

LA TERAPIA SOSTITUTIVA CON TESTOSTERONE NELL'IPOANDROGENISMO DELL'UOMO ANZIANO

SOMMARIO

- A) Comportamento età correlato dei livelli ematici del Testosterone
 - B) Criteri per definire la condizione di ipoandrogenismo nell'uomo anziano
 - C) Riduzione del livello di Testosterone e dell'effetto testosterone nell'uomo che invecchia: meccanismo patogenetico
 - D) Introduzione al tema dei potenziali effetti biologici della terapia sostitutiva con Testosterone nell'uomo anziano
 - E) Effetti del Testosterone sul tessuto muscolare e sul tessuto adiposo
 - F) Effetti del Testosterone sul tessuto osseo
 - G) Effetti del Testosterone sul Sistema Nervoso Centrale e in particolare sulla dinamica della funzione sessuale
 - H) Effetti del Testosterone sul metabolismo lipidico
 - I) Effetti del Testosterone sul metabolismo glicidico
 - L) Effetti del Testosterone sul sistema eritropoietico
 - M) Effetti del Testosterone sull'apparato cardiovascolare
 - N) Effetti del Testosterone sulla ghiandola prostatica
 - O) Altri effetti del Testosterone
 - P) Ipotesi di terapie sostitutive
 - Q) Raccomandazioni
-

A Comportamento età correlato dei livelli ematici del Testosterone

A tutt'oggi è stato ormai sufficientemente documentata nell'uomo una progressiva riduzione della concentrazione ematica del Testosterone correlata con la età a partire dalla quarta decade. Sono assai numerosi i riscontri nella letteratura scientifica su questa tematica. Una metanalisi del 1991 ha tuttavia sottolineato che la maggior parte di questi studi è inficiata da molteplici bias metodologici relativi alle tecniche di reclutamento; il diverso stato di salute, l'uso di farmaci, le differenti caratteristiche della composizione corporea e la variabilità dello stile di vita (attività sportiva, abuso di sostanze alcoliche, fumo di sigarette e abitudini alimentari) sono i principali fattori che in questi studi rendono poco attendibile il confronto con i gruppi di soggetti in giovane età (1). Sono perciò decisamente più attendibili i risultati di uno studio di popolazione di tipo cross-sectional dei ricercatori del **Massachusetts Male Study** in un gruppo di 415 soggetti selezionati eliminando nella analisi i fattori capaci di interferire con la concentrazione ematica del Testosterone. Lo studio si conclude dimostrando un declino età correlato dei livelli del Testosterone totale e soprattutto del Testosterone libero con un parallelo incremento della concentrazione della proteina di trasporto SHBG (Sex Hormone Binding Globulin); il comportamento dello steroide è simile quando l'analisi viene condotta in un gruppo allargato di 1294 soggetti in cui uno o più fattori interferenti sono presenti (2). Sono in linea con queste osservazioni i risultati di un nostro studio di popolazione, lo **studio inChianti**, in cui 573 soggetti di sesso maschile sono stati analizzati come largo campione rappresentativo della popolazione che vive nell'area del Chianti vicino a Firenze; in esso viene descritto un declino significativo età correlato del Testosterone totale insieme ad un declino ancora più evidente del Testosterone libero e di quello biodisponibile valutato con la formula di Vermeulen e ciò in modo assolutamente indipendente dai principali fattori interferenti (3). Sono poche le conferme che vengono dagli studi longitudinali. Tra questi merita di essere segnalato il **New Mexico Aging Process Study** condotto su di una coorte di 39 soggetti accuratamente selezionati al fine di eliminare i fattori interferenti; lo studio dimostra un significativo declino del Testosterone durante un periodo di osservazione di 14 anni (4). Una ulteriore conferma viene dal **Baltimore Longitudinal Study of Aging** che dimostra un trend alla diminuzione del Testosterone totale e libero dalla terza alla ottava decade di età in modo indipendente da fattori interferenti come obesità, presenza di situazioni

patologiche, uso di farmaci, abuso di alcool e abitudine al fumo (5). La entità della diminuzione della concentrazione del Testosterone totale da alcuni Autori è stata stimata di 1.1 ng/mL per decade (4); altri suggeriscono che la caduta è dello 0.4% per anno per il Testosterone totale e dell'1.2% per quello libero a partire dai 40 anni di età (2). Secondo altri infine (6) la diminuzione del Testosterone totale è di circa il 35% nel range di età tra i 25 e i 75 anni mentre la diminuzione del Testosterone libero è di circa il 60-70% nello stesso arco di tempo.

B Criteri per definire la condizione di ipoandrogenismo nell'uomo anziano

L'ipotesi di un trattamento sostitutivo con Testosterone nell'anziano è condizionata dalla preventiva formulazione diagnostica di ipoandrogenismo che si può avvalere per il suo espletamento di una serie di criteri sia clinici che laboratoristici.

L'elenco delle **manifestazioni cliniche di ipoandrogenismo** è piuttosto complesso. Le vampate di calore, l'aumento della sudorazione, l'insonnia e la sonnolenza postprandiale, le turbe del tono dell'umore e della cognitività (irritabilità, riduzione del well being, perdita di motivazioni, deficit della memorizzazione a breve termine, depressione e perdita dell'autostima), la regressione dei segni tipici della mascolinità (sarcopenia, riduzione della forza muscolare, aumento della massa grassa addominale, riduzione della peluria pubica e ascellare, rallentamento nella crescita della barba), le turbe della funzione sessuale (riduzione della libido, disfunzione erettile, debolezza nel getto eiaculatorio, riduzione nel volume dell'eiaculato, alterazioni qualitative dell'orgasmo), le alterazioni qualitative del metabolismo osseo (osteopenia fino alla osteoporosi), il deficit della funzione eritropoietica (anemia). Una attenta indagine anamnestica mirata su queste componenti è perciò premessa indispensabile. Un aiuto importante per la routine clinica al fine di standardizzare le procedure è fornito dalla somministrazione di specifici questionari. Il più comunemente usato è il questionario **AMS** (Aging Male Symptoms Scale) sviluppato in Germania nel 1999 (Heinemann) ben accettato a livello internazionale e tradotto e validato in molteplici realtà nazionali. Dal 2005 è disponibile una versione tradotta e validata per l'Italia (7). Essa si compone di 17 item distribuiti in modo da esplorare tre ambiti differenziati rappresentati dalla sfera psicologica, somatica e sessuale. La rassegna va completata ricordando altri questionari come **ADAM** (Androgen Deficiency in the Aging Male) e **MMAS** (Massachusetts Male Aging Study). Purtroppo la specificità di questi profili risulta piuttosto scarsa; questi questionari tuttavia possono risultare molto utili per individuare la presenza e la severità dei sintomi come prerequisito per iniziare il trattamento sostitutivo e per monitorare nel tempo la risposta clinica al trattamento stesso (8-11).

Fatta questa valutazione si rende indispensabile una **conferma laboratoristica** con il dosaggio del Testosterone ematico.

Come è noto il 98% del Testosterone ematico circola legato ad una proteina di

trasporto, la Sex Hormone Binding Globulin (SHBG) per il 40% e all'Albumina per il 60%. Solo il 2% quindi è libero e pronto per l'impatto recettoriale. Va tuttavia ricordato che il legame con l'Albumina è molto labile per cui ragionevolmente si può dire che tutto il Testosterone non legato alla SHBG può essere considerato biodisponibile per la periferia cellulare. Il dosaggio più comunemente usato è quello effettuato con **metodo radioimmunologico o immunoenzimatico** che quantizza il Testosterone come somma della componente legata e della libera. E' pure disponibile un **metodo radioimmunologico per la frazione libera** ma scarsamente utilizzato perchè si è verificato che sottostima le basse concentrazioni. Un altro metodo per la frazione libera è quello che utilizza delle procedure dialitiche che purtroppo rendono problematica e indagativa la standardizzazione. Leggermente più semplice ma non completamente agevole per la routine è il dosaggio del Testosterone previa precipitazione del vettore proteico SHBG con Solfato di Ammonio e che quantizza quindi la componente biologicamente attiva. Più recentemente ha preso corpo l'utilizzo di una procedura che prevede il dosaggio del Testosterone totale, quello di SHBG e quello della Albumina che inseriti in una formula matematica (**formula di Vermeulen**) danno la possibilità di risalire alla concentrazione sia del Testosterone libero che di quello biodisponibile, inteso come somma di quello libero e di quello debolmente legato all'Albumina. Nel sito web www.issam.ch di ISSAM (International Society for the Study of Aging Male) è disponibile questa procedura semplificata e di agevole esecuzione.

Per completezza va ricordato il dosaggio del **Testosterone nei campioni di saliva** che semplificherebbe notevolmente la procedura del prelievo e che sarebbe riconducibile alla quota biodisponibile. Alcuni studi recenti di correlazione tra il Testosterone salivare e quello plasmatico tuttavia risultano solo modestamente significativi lasciando ipotizzare la presenza di numerosi interferenti tecnici e biologici nella procedura (12).

Per concludere quindi il dosaggio del **Testosterone totale** e quello che utilizza la formula di Vermeulen per la **componente libera e quella biodisponibile** sono gli approcci diagnostici più utilizzati nella pratica routinaria. Per il Testosterone totale sono considerati valori normali le concentrazioni superiori a 3.2 ng/mL (11.0 nmol/L). Un riscontro di questo tipo non comporta alcuna indicazione alla terapia di sostituzione. Le indicazioni alla terapia compaiono quando i valori sono al disotto dei 2.0 ng/mL (7.0 nmol/L). Si configura in tal modo una zona grigia compresa tra i 2.0 ng/mL (7.0 nmol/L) e i 3.2 ng/mL (11.0 nmol/L) che suggerisce la opportunità in questi casi di approfondire l'iter diagnostico ricorrendo alla determinazione del Testosterone libero o del Testosterone biodisponibile. Si confermerà l'indicazione al trattamento in caso di basse concentrazioni di questi indici, mentre la si escluderà in

caso di concentrazioni normali. Diventerà determinante la valutazione delle condizioni cliniche in caso di valori di concentrazione borderline. I parametri sopra riferiti fanno riferimento ad uno studio del gruppo EMAS (European Male Aging Study) recentemente pubblicato sul NEJM (13).

Algoritmo diagnostico per l'ipogonadismo nell'uomo anziano

Sospetto clinico di ipogonadismo



Dosaggio del Testosterone totale

< 7.0 nmol/L
< 2.0 ng/mL

[7.0 – 11.0 nmol/L]
[2.0 – 3.2 ng/mL]

> 11.0 nmol/L
> 3.2 ng/mL

Indicazione alla terapia
sostitutiva

Non indicazione alla
terapia sostitutiva

Dosaggio del Testosterone libero *

Basso

Borderline

Normale

Indicazione alla terapia
sostitutiva

Accurata valutazione
clinica

Non indicazione alla
terapia sostitutiva

* L'intervallo di normalità del Testosterone libero dipende dalla metodologia utilizzata per la stima del livello sierico.

Va tuttavia ricordato che a tutt'oggi non vi è un sicuro consenso relativo al livello di concentrazione del Testosterone Totale al disotto del quale poter definire la condizione di ipogonadismo. Infatti nella review di Wang (14) e nel contributo di Lunenfeld (8) il limite inferiore suggerito è di 2.3 ng/mL (8.0 nmol/L) con una zona grigia che si protrae fino a 3.5 ng/mL (12.0 nmol/L).

La combinazione di queste procedure basate sulla valutazione dei sintomi e sui riscontri laboratoristici ci consente quindi di definire una condizione clinica di ipoandrogenismo per la quale sono state utilizzate diverse definizioni. Sono decisamente superate le vecchie etichette di climaterio maschile, "menopausa maschile", andropausa, viropausa tutte accomunate da una terminologia che sottolinea la caratteristica di una sintomatologia a brusca insorgenza, quando invece le manifestazioni cliniche sopra descritte, a differenza di quanto succede nel sesso femminile, mostrano una insorgenza lenta e progressiva e con notevole variabilità da soggetto a soggetto. Decisamente preferibili quindi le definizioni di **PADAM acronimo di Partial Androgen Deficiency of Aging Male** (deficienza parziale di androgeni nel maschio che invecchia) e di **LOH acronimo di Late Onset Hypogonadism** (ipogonadismo a insorgenza tardiva). La preferenza a mio avviso è per la prima di queste due perchè la seconda confina la problematica ad un deficit gonadico quando invece mi sembra più corretto parlare di deficit androgenico includendo in tal modo anche la componente degli androgeni surrenalici, come il deidroepiandrosterone (DHEA), capaci di un effetto biologico in parte come tali e in parte previa bioconversione periferica in Testosterone.

C Riduzione del livello del Testosterone e dell'effetto testosterone nell'uomo che invecchia: meccanismo patogenetico

Per una corretta impostazione dell'eventuale programma terapeutico sostitutivo può essere molto utile cercare di chiarire quali sono le **vie patogenetiche che sottendono in corso di invecchiamento il calo progressivo della concentrazione del Testosterone** ricordando che meglio sarebbe parlare della **riduzione dell'effetto testosterone** che può esprimersi anche come si vedrà in presenza di valori di Testosterone non particolarmente modificati. Ora appunto si cercherà di analizzare il fenomeno della riduzione dell'effetto testosterone che si esprime con un classico meccanismo di tipo multifattoriale.

1) Una componente patogenetica determinante è rappresentata dalla progressiva compromissione del sistema neuroendocrino preposto alla **sintesi del Testosterone** per i cui dettagli si rimanda al nostro contributo del Giornale di Gerontologia 38,539, 1990 e di cui si sintetizzano i punti fondamentali.

1a) Un primo significativo coinvolgimento è quello delle **strutture nervose extradiencefaliche (corteccia, sistema limbico, mesencefalo) e diencefaliche (ipotalamo)** ove centri specifici sono dedicati alla sintesi del decapeptide LHRH preposto a sua volta alla sintesi e al release delle gonadotropine ipofisarie LH e FSH. I collegamenti fra queste strutture sono mantenuti in questo caso specifico da tre sistemi neurotrasmettitoriali (noradrenalina, dopamina, serotonina). Un progressivo deterioramento età correlato di queste strutture diencefaliche ed extradiencefaliche non può non avere ripercussioni sulla sintesi di questo steroide. Vi sono alcune prove inequivocabili di un loro coinvolgimento patogenetico. La secrezione gonadotropinica infatti è dimostrato che modifica la sua pulsatilità (diminuzione della frequenza e ampiezza dei classici picchi secretori) con una conseguente ripercussione sul Testosterone che riduce la sua concentrazione e attenua o perde la sua classica fluttuazione circadiana (16,17). Ulteriori prove sono rappresentate dalla anomalia di risposta al feedback esercitato dagli androgeni esogeni (17,18). La possibilità che il danno possa essere primitivamente anche a livello ipotalamico viene dai riscontri sperimentali di diminuite concentrazioni di LHRH specie nella eminenza mediana, dalla diminuzione del numero dei neuroni LHRH secernenti e dalle documentazioni istochimiche di processi degenerativi di queste strutture cellulari (19,20).

1b) Vi sono prove anche di un **primitivo coinvolgimento ipofisario**. Ciò è comprovato dal comportamento di entrambe le gonadotropine allo stimolo con LHRH, essendo queste risposte quantitativamente ridotte e ritardate (21-23). Sono pure in linea con questa ipotesi i riscontri di anomalie di carattere qualitativo delle secrezioni di LH (24,25) e FSH (26,27) che ridurrebbero il loro potere biologico senza vedere intaccato quello immunogeno; anomalie dell'accorpamento delle due subunità alfa e beta che le compongono o del processo di glicosilazione o infine del contenuto di acido sialico sarebbero in ipotesi le cause della compromissione della loro efficacia (21,28,29).

1c) Sono infine prove dirette di un **primitivo danno gonadico** i bassi livelli di Testosterone e soprattutto le loro ridotte risposte agli stimoli con HCG, reperti associati peraltro ad una esaltata secrezione di gonadotropine LH e soprattutto di FSH (21,29). Sono ulteriore conferma i riscontri anatomico-strutturali del parenchima testicolare che mostrano segni di degenerazione, su verosimile patogenesi vascolare, sia per quanto concerne la componente germinativa dei tubuli che quella endocrina dell'interstizio (30,31).

Qualunque sia il meccanismo patogenetico coinvolto (uno o più di uno tra quelli sopra ricordati) il risultato finale sarà la riduzione della sintesi del Testosterone e quindi ovviamente anche quella del suo effetto biologico.

2) Sono poi da prendere in considerazione per il Testosterone le **modificazioni dei momenti metabolici della periferia** che si accompagnano inevitabilmente a ricadute negative sull'economia generale dell'effetto biologico. Mi riferisco in primo luogo **all'incremento età-correlato della proteina di trasporto SHBG** cui consegue una riduzione della quota di Testosterone libero disponibile per l'effetto biologico sui recettori periferici. Come già si è detto il 60% del Testosterone legato utilizza questo vettore mentre invece il 40% è trasportato dall'albumina con un legame tuttavia molto labile. Complessivamente questa parte del Testosterone rappresenta il 98% del Testosterone totale, mentre il 2% restante rappresenta la quota assolutamente libera. Col nome di Testosterone biodisponibile si è convenuto di definire oltre alla quota di Testosterone libero anche quella debolmente legata all'albumina. Con il progredire della età aumenta la presenza dei vettori proteici e quindi si riduce la quota di ormone libero capace dell'effetto biologico sui recettori periferici; è questa la motivazione per cui **l'effetto biologico quindi può essere compromesso anche se la quota totale del Testosterone non è significativamente modificata**. Un altro evento metabolico è rappresentato dal processo di **aumentata aromatizzazione del Testosterone a estrogeni** che si esprime elettivamente nel tessuto adiposo particolarmente ricco di aromatasi e che notoriamente subisce un incremento progressivo in corso di invecchiamento. Infine un ruolo non indifferente

può essere giocato dalla progressiva **diminuzione della 5-alfareduttasi con conseguente riduzione del processo di bioconversione del Testosterone al più efficace DHT**. Un deficit dell'effetto Testosteronico perciò potrebbe essere sostenuto da un deficit di questa attività enzimatica periferica a fronte di una quota di Testosterone Totale non particolarmente compromessa (32-35). Infine non può essere sottovalutato il **coinvolgimento di steroidi surrenalici come il DHEA** che notoriamente può essere bioconvertito in periferia in androgeni ed estrogeni. Le attività enzimatiche coinvolte in questo processo sono la 3beta e 17beta idrossisteroide-deidrogenasi, la delta5 delta4 isomerasi, la 5alfa reduttasi e la aromatasi. Tale attività è diffusamente distribuita nelle cellule di molti tessuti della periferia: tessuto adiposo, osseo, muscolare, mammario, prostatico, cutaneo, cerebrale ed epatico (36,37). Recentemente è stato etichettato col termine di "intracrinology" questa parte "nascosta" del metabolismo ormonale scarsamente accessibile alla diagnostica laboratoristica (38). Queste osservazioni ci fanno comprendere perchè nella riduzione dell'effetto testosteronico un ruolo non marginale può essere giocato dalla ridotta secrezione del DHEA di frequente riscontro nella età avanzata.

3) Un'altra interferenza importante sull'effetto del Testosterone è rappresentato dalle **modificazioni eventuali a livello recettoriale e postrecettoriale**. Superata la membrana cellulare il Testosterone per effetto di enzimi specifici come 5alfareduttasi e aromatasi può venire bioconvertito rispettivamente in DHT o estrogeni e infine lo steroide può superare la membrana nucleare per impattare recettori specifici e dare l'avvio a molteplici effetti biologici. E' noto che in età pediatrica certe anomalie dello sviluppo dei genitali possono essere ricondotte ad anomalie genetiche che condizionano importanti ripercussioni sulla disponibilità recettoriale. Non è escluso che anche nelle persone anziane almeno in parte la riduzione dell'effetto testosteronico possa essere ricondotto ad alterazioni età correlate delle strutture recettoriali. Non meno importanti a questo livello sono gli eventi a livello postrecettoriale e in particolare quello della attivazione della RNA polimerasi per l'avvio degli eventi translazionali e post-translazionali (39-42). È facile ipotizzare che il calo dell'effetto testosteronico nell'anziano possa essere promosso almeno in parte anche dalla progressiva compromissione di questa sequenza metabolica.

Fatte queste premesse è chiaro che col progredire della età nell'uomo si assisterà ad un deficit dell'effetto biologico del Testosterone promosso dall'invecchiamento di per sè esercitato direttamente su uno o più di questi momenti metabolici, da quelli centrali neuroipotalamici fino a quelli periferici dei

recettori della periferia cellulare. Possiamo etichettare questo percorso col termine di "**idiopathic pathway**".

Per completezza tuttavia dobbiamo aggiungere che molti altri meccanismi patogenetici possono essere coinvolti nel modulare questa progressiva caduta del Testosterone e del suo effetto biologico e che potremmo definire col termine di "**secondary pathway**".

Vi sono infatti ad esempio alcune **situazioni patologiche** non infrequenti in età geriatrica come la cirrosi epatica e l'ipertiroidismo che si possono accompagnare ad una riduzione della quota libera di Testosterone per effetto di un incremento della sintesi di SHBG. Allo stesso modo alcune patologie ad andamento cronico come il diabete, l'artrite reumatoide, l'insufficienza renale o respiratoria possono accompagnarsi ad una sorta di ipogonadismo ipogonadotropo il cui grado si correla con la severità della stessa patologia cronica (43,44).

Anche la **somministrazione di alcuni farmaci** di frequente utilizzo in età geriatrica possono interferire nell'economia generale di tale sistema. E' questo il caso ad esempio dei farmaci antiepilettici che si sono dimostrati capaci di incrementare la sintesi di SHBG e dei trattamenti log term con cortisone, di frequente utilizzo in occasione di patologie autoimmuni, capaci di inibire il sistema gonadotroposecerno ipofisario. Allo stesso modo vanno considerati gli antipsicotici e gli antidepressivi che sovente si accompagnano ad una ipersecrezione di Prolattina, un ormone dotato di una attività classicamente antiandrogenica. Infine il trattamento con aminoglutetimide e ketoconazolo attraverso una inibizione degli enzimi preposti alla steroidosintesi può provocare una drammatica riduzione dei livelli di Testosterone (43,45).

Per completezza è bene ricordare che anche il trattamento con oppioidi è capace di provocare una sindrome clinica caratterizzata da diminuzione dei livelli di Testosterone, riduzione della libido, della massa muscolare e della densità minerale ossea (46,47). Il meccanismo patogenetico in questo caso sembra rappresentato da una interferenza negativa sulla secrezione ipotalamica di GnRH (48). Molto contrastanti invece sono le osservazioni relative agli effetti della cannabis, cocaina, amfetamine (49). Più omogeneo sembra l'effetto promosso dal trattamento con steroidi anabolizzanti spesso utilizzati in dosaggi generosi dagli atleti, dagli sportivi amatoriali e dai body-builders. L'inibizione del sistema di controllo centrale ipotalamo-ipofisario promuove una soppressione della produzione del Testosterone endogeno che richiede tempi lunghissimi per il recupero funzionale dopo la sospensione del trattamento (50-52).

Un altro fattore importante può essere rappresentato dai **cambiamenti della composizione corporea**. È noto che in età geriatrica nell'uomo si assiste spesso ad un incremento della massa grassa specie nella sua distribuzione viscerale. Come già si è detto altrove è proprio in questa sede che si concentra la disponibilità dell'enzima aromatasi responsabile della bioconversione del Testosterone in estrogeni con conseguente riduzione della concentrazione di uno steroide androgenico e incremento contemporaneo di uno per molti versi di tipo antagonista (6).

Alcune **abitudini alimentari** infine meritano la nostra attenzione come ad esempio la dieta vegetariana che si accompagna frequentemente ad un aumento della sintesi di SHBG (53). Bassi livelli di Testosterone sia totale che free sono stati evidenziati anche per effetto di diete rigorosamente a basso contenuto di colesterolo (53). L'abuso di alcool infine si può rendere responsabile di effetti inibitori sulla sintesi del Testosterone attraverso diversi meccanismi patogenetici; alcuni hanno chiamato in causa il ruolo di un metabolita dell'alcool come l'acetaldeide e altri la inibizione di neuroni preposti alla sintesi di LHRH realizzata attraverso la attivazione dei neuroni beta-endorfinergici (54,55). Non vanno neppure dimenticati gli **Xenoestrogeni** ("estrogeni stranieri") sostanze ad effetto estrogenico capaci di antagonizzare quello degli androgeni e il cui impiego è di larga diffusione in agricoltura come pesticidi ed erbicidi (DDT ad esempio) e come plastificanti (BPA per esempio) per la produzione di contenitori di plastica per alimenti; il BPA trova pure un largo utilizzo per rivestire la parete interna dei contenitori dei cibi inscatolati (canned food) al fine di impedire il trasferimento del sapore metallico dalla parete al cibo (56). È in questo modo che viene a concretizzarsi la possibilità di una sorta di contaminazione nutrizionale a prevalente effetto antiandrogenico.

Piuttosto controverso invece è **l'effetto del fumo**. Vi sono buone documentazioni nell'animale da esperimento che dimostrano una diretta inibizione sulla steroidosintesi nelle cellule di Leydig (57,58) mentre le esperienze nell'uomo sembrano andare in direzione opposta (60,61). Ricordiamo a tale proposito una recente metanalisi che ha analizzato oltre 13.000 uomini in 22 studi che ha dimostrato che i livelli di Testosterone nei soggetti fumatori è significativamente più alto rispetto a quelli dei non fumatori (59).

Da ultimo va ricordato che la **condizione di stress sia fisico che psichico** è in grado di inibire l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadico nel sesso maschile promuovendo una riduzione sia della produzione che dell'effetto del Testosterone. Una particolare condizione di stress è rappresentato dallo stress chirurgico che si accompagna a significative riduzioni dei livelli di Testosterone che si protraggono per alcuni giorni

dopo l'intervento (vedi nostri lavori sullo stress chirurgico (62). Esperienze cliniche ulteriori sono auspicabili per approfondire questa tematica; un protocollo è già disponibile approntato da una collaborazione tra geriatri e cardiocirurghi (63).

Questa serie di considerazioni oltre ad avere il significato di approfondimento culturale sull'argomento può anche offrire elementi utili per il perfezionamento diagnostico di ipogonadismo dei pazienti e conseguentemente per la scelta della strategia terapeutica più adeguata.

D Introduzione al tema dei potenziali effetti biologici della terapia sostitutiva con Testosterone nell'uomo anziano

E' noto che il Testosterone fisiologicamente controlla la funzione di numerosi organi e sistemi che in varia partecipazione sono coinvolti nei fenomeni involutivi propri dell'invecchiamento. Per una adeguata terapia di sostituzione diventa perciò indispensabile in primo luogo sulla base di studi osservazionali verificare se esiste o meno una correlazione tra la caduta dei livelli circolanti di Testosterone e la comparsa del deficit funzionale. Fatta questa verifica diventa ragionevole procedere agli studi sperimentali di intervento. Nei paragrafi successivi verrà analizzato ciascun potenziale effetto biologico prendendo in considerazione dapprima gli studi sperimentali sull'animale e successivamente quelli sull'uomo: dagli studi osservazionali epidemiologici (cross-sectional e prospettici) per finire con gli studi di intervento veri e propri. Per quanto concerne gli studi di intervento ci siamo imposti i seguenti criteri di inclusione:

- disegno dello studio rigorosamente randomizzato e controllato contro placebo
- partecipanti di sesso maschile di età \geq 50 anni, in buona salute e con livelli ematici di Testosterone al di sotto del range normale di giovani adulti
- trattamento con Testosterone di ogni tipo (intramuscolare, orale, transdermico) a dosaggi sostitutivi e per variabili periodi di tempo.

In tal modo abbiamo selezionato 44 studi elencati in sequenza temporale nella **Tab. 1.**

N	Authors	Study	Country	Number	Age	Basal T value	Intervention
1	Tenover 1992	RCT	USA	13	57-76	TT < normal range in 7/13	T enanthate 100 mg IM weekly for 3 weeks
2	Morley et al 1993	RCT	USA	15	69-89	FT < 70 ng/dL	T enanthate 200 mg IM every 15 days for 3 months
3	Uyanilk et al 1997	RCT	Turkey	37	53-89	FT < normal range TT < normal range in 28/37	Oral T undecanoate 120 mg daily for 2 months
4	Sih et al 1997	RCT	USA	32	51-79	FT < 60 ug/mL	T cypionate 200 mg IM every 15 days for 12 months
5	Snyder et al 1999 (1) Snyder et al 1999 (2)	RCT	USA	108	> 65	TT 367 ± 79 ng/dL	Transdermal T patch 6 mg daily for 36 months
6	Clague et al 1999	RCT	UK	14	> 60	TT < 14 nmol/L	T enanthate 200 mg IM every 15 days for 12 weeks
7	Ly et al 2000	RCT	Australia	35	> 60	TT < 15 nmol/L	Transdermal DHT 35 mg daily for 12 weeks
8	Kenny et al 2001	RCT	USA	67	65-87	Bioavailable T < 4.44 nmol/L	Transdermal T patch 5 mg daily for 1 year
9	Simon et al 2001	RCT	France	18	52.8 ± 4.2	TT 2.4 ± 0.1 ng/mL	Transdermal T daily aimed at obtaining plasma T 4-10 ng/mL for 3 months
10	Ferrando et al 2002	RCT	USA	12	> 60	TT < 480 ng/dL	T enanthate IM weekly/biweek

							ly aimed at obtaining T 17-28 nmol/L for 6 months
11	Christmas et al 2002	RCT	USA	72	65-88	TT 409 ± 15 ng/dL	T enanthate 100 mg IM every 2 weeks for 26 weeks
12	Kenny et al 2002	RCT	USA	44	65-87	Bioavailable T < 4.44 nmol/L	Transdermal T patch 5 mg daily for 1 year
13	Kunelius et al 2002	RCT	FIN	114	50-70	TT < 15 nmol/L	Transdermal DHT 125-250 mg daily for 6 months
14	Wittert et al 2003	RCT	USA	76	> 60	FT index 0.3-0.5	Oral T undecanoate 80 mg twice daily for 1 year
15	Amory et al 2004	RCT	USA	34	> 65	TT < 350 ng/dL	T enanthate 200 mg IM every 2 weeks for 36 months
16	Page et al 2005	RCT	USA	34	> 65	TT < 350 ng/dL	T enanthate 200 mg IM every 15 days for 36 months
17	Nair et al 2006	RCT	USA	58	> 60	Bioavailable T < 3.6 nmol/L	Transdermal T patch 5 mg daily for 2 years
18	Ottenbacher 2006	MA (11)	USA	474	> 65	TT low or low-normal	T or DHT
19	Allan et al 2008	RCT	Australia	60	> 55	TT < 15 nmol/L	Transdermal T patch 5 mg for 52 weeks
20	Basurto et al 2008	RCT	Mexico	48	> 60	TT < 320 ng/dL	T enanthate 200 mg IM every 3 weeks for 12 months

21	Emmelot-Vonk et al 2008	RCT	Holland	207	60-80	TT < 13.7 nmol/L	Oral T undecanoate 80 mg twice daily for 6 months
22	Legros et al 2009	RCT	Belgium	322	> 50	FT < 0.26 nmol/L	Oral T undecanoate 80, 160, 240 mg daily for 12 months
23	Koutsari C et al 2009	RCT	USA	61	> 60	Bioavailable T < 3.6 nmol/L	Transdermal T patch 5 mg for 2 years
24	Emmelot-Vonk et al 2009	RCT	Holland	207	60-80	TT < 13.7 nmol/L	Oral T undecanoate 80 mg twice daily for 6 months
25	Atkinson et al 2010	RCT	UK	30	65-89	TT < 12 nmol/L	Transdermal 5 g of 1% T gel daily for 6 months
26	Srinivas-Shankar et al 2010	RCT	UK	274	> 65	TT < 12 nmol/L	Transdermal 5 g of 1% T gel daily for 6 months
27	Kenny et al 2010	RCT	USA	131	77.1 ± 7.6	TT < 350 ng/dL	Transdermal 5 g of 1% T gel daily for 12 to 24 months
28	Behre et al 2012	RCT	Germany	362	50-80	TT < 15 nmol/L	Transdermal 2/7.5 g of 1% T gel daily for 6 months
29	Frederiksen et al 2012 (1) Frederiksen et al 2012 (2)	RCT	Denmark	38	60-78	Bioav T < 7.3 nmol/L	Transdermal 5/10 g of 1% T gel daily for 6 months

30	Zhang et al 2012	RCT	Chyna	160	> 50	TT 7.98 ± 0.73 nmol/L	Oral T undecanoate 120-160 mg daily for 6 months
31	Maggio et al 2013	RCT	Italy	167	> 65	TT < 475 ng/dL	Scrotal T patch (6 mg/24 h) daily for 36 months
32	Basaria et al 2015	RCT	USA	308	> 60	TT 100-400 ng/dL	Transdermal 7.5 g of 1% Te gel daily for 3 years
33	Borst et al 2014 (1) Borst et al 2014 (2)	RCT	Japan	60	> 60	TT < 300 ng/dL	T enanthate 125 mg IM weekly for 1 year
34	Cunningham et al 2016	RCT	USA	470	> 65	TT < 275 ng/dL	Transdermal 5 g 1% T gel daily for 1 year
35	Kohn et al 2016	MA (14)	USA	2029	mean 64.5	TT range of hypogonadism	Different formulations for average follow-up of 34.4 months
36	Huang et al 2016	RCT	USA	308	> 60	TT 3.47-13.9 nmol/L	Transdermal 7.5 g of 1% T gel daily for 3 years
37	Storer et al 2017	RCT	China	256	> 60	TT 100-400 ng/dL	Transdermal 7.5 g of 1% T gel daily for 3 years
38	Nian et al 2017	MA (5)	USA	1212			
39	Traustadottir et al 2018	RCT	USA	129	> 60	TT 3.5-13.9 nmol/L	Transdermal 7.5 g of 1% T gel daily for 3 years
40	Mohler et al	RCT	USA	788	> 65	TT < 275	Transdermal 5

	2018					ng/dL	g of 1% T gel daily for 1 year
41	Snyder et al 2018	RCT	USA	788	> 65	TT < 275 ng/dL	Transdermal 5 g of 1% T gel daily for 1 year

Tab. 1 Studi randomizzati e controllati oggetto della nostra revisione sistematica presentati in sequenza temporale.

Non abbiamo incluso in questo raggruppamento 6 studi (64-69) in quanto la casistica studiata, anche se in prevalenza in età geriatrica, include anche soggetti di età compresa tra i 40 e i 50 anni. I risultati di queste sperimentazioni tuttavia sono comunque stati presi nella dovuta considerazione quando abbiamo stilato le conclusioni relative agli effetti del Testosterone sui singoli apparati. Infine abbiamo classificato i risultati delle nostre analisi usando i criteri proposti dal North of England Evidence-based Guidelines Development Project (70) sotto elencati.

- I a) evidenza da almeno una metanalisi di trial randomizzati e controllati
- I b) evidenza da almeno un trial randomizzato e controllato
- II a) evidenza da almeno un trial controllato ma non randomizzato
- II b) evidenza da almeno un trial semi sperimentale
- III) evidenza da studi descrittivi, comparativi, di correlazione, caso-controllo
- IV) evidenza da esperienze cliniche di gruppi scientifici

E Effetti del Testosterone sul tessuto muscolare e sul tessuto adiposo

In entrambe i sessi l'invecchiamento si accompagna a significativi cambiamenti della composizione corporea. In particolare nel maschio si registra un progressivo declino della massa muscolare insieme ad un aumento della massa grassa specie per quanto concerne la sua componente viscerale (71,72). Tale situazione si rende responsabile del declino della forza muscolare che condiziona

conseguentemente lo stato funzionale e la qualità della vita. La correlazione di queste modificazioni corporee con la caduta progressiva età correlata della disponibilità di Testosterone è stata oggetto di molti studi che hanno portato a conclusioni non sempre univoche. Ciò si può spiegare per diverse motivazioni. Le casistiche sono alquanto disomogenee per età, stato nutrizionale e condizioni di salute e pure disomogenee per gli indici nutrizionali e di composizione corporea utilizzati; inoltre le associazioni non sempre sono state aggiustate per la potenziale interferenza di covariate.

Ricordiamo cinque studi in cui sono stati considerati solo soggetti in buono stato nutrizionale e in età superiore ai 60 anni. In due di questi (73,74) non viene documentato alcun ruolo del declino dei livelli di Testosterone nei cambiamenti età-correlati della composizione corporea bensì solo una lieve correlazione inversa del Free Testosterone con il BMI e in uno dei due studi con la massa grassa. In un terzo studio invece (75) i livelli di free Testosterone si correlano negativamente con la massa grassa e positivamente con la forza muscolare. In un quarto studio Baungartner (76) in una popolazione del New Mexico Aging Process Study viene documentata una significativa positiva correlazione tra free Testosterone e massa muscolare. In un quinto studio (77) condotto su soggetti anziani afroamericani il declino del Testosterone si correla con la caduta della forza muscolare.

Infine vanno ricordati studi che hanno preso in considerazione fasce di età più allargate (da quelle giovanili fino a quelle più avanzate). Roy (78) in una popolazione del Baltimore Longitudinal Study of Aging osserva come bassi livelli di indice di free Testosterone si associano a ridotta massa muscolare, come pure Vermoilen registra una significativa correlazione positiva tra Testosterone plasmatico da un lato e massa muscolare e densità minerale ossea dall'altro (73).

La possibilità che la composizione corporea nell'anziano possa trovare beneficio da una terapia sostitutiva ha trovato ulteriore conforto da altre evidenze sperimentali. L'effetto anabolico del Testosterone è stato confermato nell'uomo in alcune situazioni patologiche come l'ipogonadismo e la obesità ove la terapia sostitutiva porta ad aumentare la massa muscolare, a ridurre quella grassa e ad incrementare la forza muscolare (79-82); allo stesso modo la obesità viscerale dell'anziano viene ridotta dal trattamento sostitutivo (83). Un'altra situazione patologica in cui si è sperimentato questo trattamento sostitutivo è rappresentata dagli stati catabolici in corso di infezione da HIV; in tre di essi è stato documentato un aumento della massa muscolare ed in due anche della forza muscolare (84-86).

Nel gruppo di trial clinici di trattamento sostitutivo con Testosterone da noi selezionati ne abbiamo individuati 22 (tra cui una matanalisi) che hanno preso in considerazione le eventuali ripercussioni sulla composizione corporea (massa magra

e massa grassa) e sulla forza muscolare (87-109). Complessivamente nei trial clinici sono stati studiati 1976 soggetti; a questi si aggiunge una metanalisi condotta su 474 soggetti provenienti da trial clinici focalizzati sugli effetti del Testosterone sul parametro della forza muscolare (99). Il trattamento negli studi dell'ultimo decennio utilizza prevalentemente la via transdermica mentre nel periodo precedente si distribuisce pressochè equamente tra quella intramuscolare e quella transdermica. I parametri considerati in tutti gli studi sono stati inseriti tra gli outcome primari.

Il parametro **massa magra** su 18 trial clinici è risultato significativamente incrementato in 16 mentre in 2 non si registrano variazioni. Il parametro **massa grassa** su 15 trial clinici è risultato significativamente diminuito in 12 mentre in 3 non si registrano variazioni. Quanto al parametro **forza muscolare** su 15 trial clinici esso è risultato significativamente incrementato in 8 mentre negli altri 7 non si registrano variazioni; in uno studio aggiuntivo di metanalisi (99) tuttavia si conferma con evidenza l'effetto positivo sulla forza muscolare.

A complemento è bene ricordare che gli effetti positivi sulla massa magra sono confermati anche in uno studio RCT dopo 12 mesi di terapia sostitutiva intramuscolare (69) e in una metanalisi (68) relativa a 16 studi randomizzati e controllati; in questa ultima rassegna la riduzione della massa grassa non raggiunge la evidenza statistica. Questi ultimi due studi tuttavia non sono stati inseriti nella nostra analisi perché, come si è detto, condotti su una popolazione di soggetti ipogonadici in gran parte in età geriatrica ma includente anche una buona componente di soggetti in età giovane-adulta.

In conclusione l'effetto positivo su questi parametri di composizione corporea è chiaramente evidenziato su di una casistica di ampio respiro. La forza della evidenza secondo i criteri che ci siamo dati **per il comportamento di massa magra e massa grassa è di livello 1b per arrivare a quello di 1a per il comportamento della forza muscolare** che, come si è detto, si conferma anche in uno studio di metanalisi.

Meccanismo di azione.

Tessuto muscolare.

In primo luogo va ricordato che nel tessuto muscolare è chiaramente documentato che esistono recettori per il Testosterone. Essi si esprimono in diversi tipi di cellule: fibroblasti, cellule dell'endotelio vasale, cellule muscolari lisce e mastcellule. La sede prevalente tuttavia sembra sia quella delle cellule satelliti, elementi cellulari situati entro la lamina basale delle stesse fibrocellule muscolari; quando stimolati dal Testosterone essi subiscono una sorta di "up regulation" (110). La attivazione di specifici recettori nucleari di queste cellule si rende responsabile di **effetti di tipo genomico** che sono alla base di una ipertrofia dose dipendente delle

fibrocellule di tipo I e II. Il fenomeno ipertrofico sarebbe realizzato soprattutto attraverso l'attivazione di meccanismi replicativi delle cosiddette cellule satelliti destinate poi a trasformarsi in mioblasti prima e in miociti successivamente. Tale replicazione cellulare sembra correlarsi positivamente con la concentrazione ematica del Testosterone (110). Non è escluso che all'aumento di questa componente cellulare possa contribuire anche una sorta di inibizione promossa dal Testosterone sui loro processi di apoptosi (110). Altre documentazioni sperimentali chiamano in causa la capacità del Testosterone di aumentare localmente a livello muscolare la sintesi proteica (111). Questa sarebbe mediata dalla produzione di fattori di crescita come IGF-1 e dalla contemporanea inibizione delle loro specifiche binding proteins con conseguente aumento della loro biodisponibilità (112). È proprio ad IGF-1 che si attribuisce la capacità di stimolare la sintesi proteica e in particolare la produzione di miogenina, una proteina indispensabile per la differenziazione dei mioblasti in miociti (112). Accanto a questi classici effetti di tipo genomico si affiancherebbero anche altri **di tipo non genomico**: il Testosterone sarebbe infatti capace di incrementare la captazione di ioni Ca e di modulare alcune attività di tipo kinasico (113).

Quanto alla necessità o meno che il Testosterone per essere efficace sul muscolo debba bioconvertirsi a DHT la risposta parrebbe negativa se consideriamo che nella letteratura viene segnalato come l'enzima 5alfa-reduttasi sembra scarsamente rappresentato nelle fibrocellule muscolari (114); in linea con questa impostazione si segnala la esperienza clinica di assenza di perdita di massa muscolare negli uomini in trattamento cronico con inibitori della 5-alfa-reduttasi (115).

Non è escluso infine che un ruolo almeno complementare nell'effetto anabolico sul muscolo possa essere giocato da una azione di antagonismo promosso dal testosterone sui recettori per i glicocorticoidi notoriamente capaci di un effetto catabolico sul tessuto muscolare (116).

Tessuto adiposo.

Quanto agli effetti negativi sul tessuto adiposo è stato ipotizzato che questo risultato possa essere realizzato negli adipociti tramite una sorta di inibizione da parte del Testosterone sull'uptake dei lipidi, sulla attività lipoproteinlipasica e anche tramite la attivazione dei processi di lipolisi (87). Tale fenomeno si esprimerebbe anche attraverso un aumento dei recettori beta-adrenergici deputati all'effetto lipolitico e attraverso una inibizione sulla differenziazione dei preadipociti in adipociti (117).

Riteniamo possibile ipotizzare con Bhasin una visione unitaria di questi due effetti contrapposti del Testosterone sul tessuto muscolare e sul tessuto adiposo. Va ricordato che i due meccanismi di azione sarebbero accomunati da un unico sistema cellulare rappresentato dalle cellule mesenchimali pluripotenti su cui si concentrerebbe l'azione del Testosterone. Esse sarebbero localizzate nel tessuto muscolare e disponibili per la differenziazione sia in miociti che in adipociti. Il Testosterone sarebbe capace di stimolare la linea del tessuto muscolare e contemporaneamente di inibire quella del tessuto adiposo (117,118).

F Effetti del Testosterone sul tessuto osseo

Il fatto che la massa ossea nell'uomo si riduca progressivamente nella età senile è un dato abbondantemente rappresentato nella letteratura medica. Sono molteplici i fattori che possono contribuire a modificare in senso negativo il metabolismo osseo in corso di invecchiamento. Tra questi il declino della disponibilità del Testosterone può giocare un ruolo importante sia nell'invecchiamento fisiologico che patologico.

Numerosi studi sperimentali in vitro, nell'animale da esperimento e nell'uomo

sono a supporto di questa ipotesi. Nelle **cellule osteoblast-like umane in coltura** sono stati individuati specifici recettori che stimolati direttamente o previa bioconversione a DHT o a estrogeni sono in grado di influenzare sia il momento metabolico della sintesi che quello del riassorbimento dell'osso. Quanto all'**animale** si ricorda ad esempio che la castrazione è capace di provocare nel tempo a livello osseo modificazioni che richiamano la osteoporosi umana. Passando alle **osservazioni sperimentali nell'uomo** iniziamo ricordando uno studio osservazionale su 400 soggetti sani di età superiore a 70 anni che ha dimostrato una correlazione positiva tra livelli ematici di Testosterone biologicamente attivo e il parametro BMD (Bone Mineral Density) (75). Ricordiamo inoltre che l'ipogonadismo di qualunque origine nell'uomo si associa ad alterazioni di tipo osteoporotico (119). In studi di coorte su soggetti maschili bassi livelli di Testosterone si correlano con il riscontro di osteoporosi e fratture patologiche (120,121). Uno studio prospettico infine ha dimostrato che bassi livelli di Testosterone sono predittivi di frattura in modo più efficace rispetto ad altri fattori di rischio come età, BMI, fumo, alcool, attività fisica, diuretici e ormoni tiroidei (122). Non mancano infine gli studi di intervento in corso di ipogonadismo in giovani maschi che hanno documentato effetti significativamente positivi su BMD e marker del turnover osseo (79,91,123). Sono invece disomogenei infine i risultati da interventi con dosaggi farmacologici di Testosterone in soggetti giovani eugonadici (124,125).

Nel gruppo di **trial clinici di trattamento sostitutivo con Testosterone da noi selezionati abbiamo individuato 15 studi** che hanno utilizzato come outcome primario il parametro del BMD ed in alcuni di essi indici metabolici come osteocalcina e fosfatasi alcalina (87-89,91,93,94,98,100,102,107,108,126-129). Il numero complessivo dei soggetti utilizzati è di 1424. Quanto alla via di somministrazione quella intramuscolare e quella transdermica si equivalgono numericamente. In 7 di questi studi si è documentato un incremento significativo del BMD mentre in 4 di essi non si osservano variazioni significative. Di particolare significato ci sembra lo studio di Snyder (129) che per valutare il BMD ha utilizzato la Quantitative Computerized Tomography che ha consentito di individuare l'incremento a livello della componente trabecolare e di estrapolare anche il valore, anch'esso aumentato dopo trattamento, della "bone strength". Nessun cambiamento è stato osservato negli indici metabolici come Fosfatasi alcalina e Osteocalcina in 7 studi. Quanto al ruolo della via di somministrazione del Testosterone (intramuscolare o transdermica) sembra di poter escludere ogni possibile interferenza dei diversi tipi di trattamento sulla risposta del BMD.

Secondo i criteri che ci siamo dati per l'incremento del BMD la forza di evidenza sarebbe di tipo 1b. Tuttavia va sottolineata la notevole variabilità dei

risultati di queste sperimentazioni cliniche. Alla base di questo riscontro va rimarcata la notevole diversità dei livelli basali di Testosterone prima del trattamento, essendo l'effetto positivo del trattamento particolarmente evidente quando i livelli basali sono nel range di franco ipogonadismo. Un'altra variabile importante è rappresentata dal dosaggio di Testosterone utilizzato e dalla sua durata di trattamento. Alcuni studi con risultato negativo sono impostati infatti con un dosaggio sostitutivo insufficiente e/o da una durata del trattamento troppo breve (126). Uno studio peraltro con effetti positivi sul BMD è ottenuto con un trattamento sostitutivo a livelli sopra-fisiologici (108). Ci piace infine ricordare uno studio di metanalisi (68) che utilizza complessivamente 16 trial clinici e che non abbiamo inserito nel gruppo da noi analizzato perchè alcuni trial sono stati condotti su popolazioni che includevano anche soggetti non in età geriatrica; lo studio tuttavia sulla BMD ricavato solo su 4 trial clinici che hanno utilizzato pazienti di età tutte superiori ai 50 anni conferma effettivamente l'effetto positivo su questo parametro.

In conclusione l'orientamento prevalente dei risultati visti nella loro globalità ci pare quello, in buona evidenza, di una spinta da parte del Testosterone a migliorare il trofismo del tessuto osseo.

Meccanismo di azione.

Alcune osservazioni sperimentali fanno ipotizzare che l'effetto del Testosterone sul tessuto osseo sia mediato dall'impatto con specifici recettori: questi sarebbero stati individuati su cellule osteoblast-like umane in coltura (130). Inoltre studi in vitro su cellule umane della componente spongiosa dell'osso dimostrerebbero la capacità del Testosterone di impattare specifici recettori e di attivare eventi postrecettoriali che porterebbero alla bioconversione del Testosterone sia in DHT che in Androstenedione in maniera qualitativamente e quantitativamente sovrapponibile a quella documentata in altri bersagli cellulari classicamente sensibili al Testosterone (131).

Quanto alla necessità che il Testosterone per esercitare il suo effetto debba o meno bioconvertirsi a DHT si rimanda anche alle esperienze cliniche di Amory (127) e di Borst (108) che segnalano effetti positivi su BMD in soggetti anziani ipogonadici sia in trattamento isolato con Testosterone che in trattamento combinato con inibitori della 5-alfa-reduttasi.

È molto più probabile invece che l'effetto benefico del Testosterone sull'osso sia mediato dalla sua bioconversione a Estrogeni. L'impatto positivo di E2 sul BMD è stato dimostrato in un uomo con bassi valori di BMD essendo portatore di alti livelli di Testosterone e contemporaneamente di deficit congenito di aromatasi e in cui il

trattamento con estrogeni ha promosso un significativo incremento del BMD (132). Anche lo studio di Falahati-nini (133) che puntualizza il ruolo di Testosterone e Estrogeni nel regolare formazione e assorbimento osseo nell'uomo anziano conclude sottolineando il ruolo determinante degli Estrogeni nel regolare la fase di riassorbimento osseo mentre entrambi sono importanti nella fase della formazione.

Un effetto documentato del Testosterone è sicuramente quello positivo sul **momento di sintesi** a livello degli osteoblasti. In colture cellulari si è dimostrato che il Testosterone, una volta impattato il recettore specifico, è capace di esprimere il suo effetto anabolico stimolando la replicazione cellulare e attivando la sintesi del collagene (134,135). Inoltre l'aumento della densità minerale del tessuto osseo potrebbe essere almeno in parte sostenuto dalla capacità del Testosterone di incrementare l'intake di Calcio e di vitamina D di cui viene attivata la idrossilazione (136). Infine potrebbe essere ipotizzata la possibilità di un coinvolgimento del sistema GH-IGF1 sulla base delle esperienze di Christmas (126) e Blackman (137).

Per contro altre ricerche sottolineano l'importanza della interferenza sul **momento della destrutturazione** del tessuto osseo che risulterebbe inibita dal Testosterone come dimostra il riscontro di una diminuzione della desossipiridinolina urinaria e della fosfatasi alcalina promosso dal trattamento con Testosterone molto verosimilmente, come si è detto, previa aromatizzazione a Estrogeni (79, 127).

G Effetti del Testosterone sul Sistema Nervoso Centrale e in particolare sulla dinamica della funzione sessuale

Le interazioni tra gli ormoni androgeni e il sistema nervoso centrale sono state oggetto di numerosi studi sperimentali sotto il profilo sia anatomico-strutturale che funzionale. Le aree sessualmente dimorfiche del cervello sono state particolarmente analizzate nell'animale da esperimento. Tuttavia anche nell'umano sono state descritte aree sessualmente specifiche sotto il profilo morfologico, ben differenziate tra i due sessi, ad esempio a livello dei nuclei ipotalamici anteriori e a livello delle strutture mediane cerebrali come lo splenium del corpus callosum, la commissura anteriore e la massa intermedia (138).

Quanto alla componente funzionale vi sono studi cross-sectional che hanno

mostrato una correlazione positiva fra livelli di Testosterone e cognitiv  spaziale (139) peraltro non confermata da altri (140). Tra gli studi prospettici uno ha dimostrato che alti livelli di Testosterone totale o biodisponibile sarebbero predittivi di migliori performance nelle funzioni cognitive (141). Una correlazione tra il Testosterone e il tono dell'umore inoltre   stata ipotizzata nell'anziano, dove bassi livelli dello steroide sarebbero predittivi di stato depressivo (142). Passando a considerare le possibili correlazioni con la componente ideo-affettiva della sessualit  sono disponibili studi osservazionali che suggeriscono una correlazione tra livelli di Testosterone e libido; quando la analisi dei dati viene effettuata separatamente per fasce di et  la relazione appare significativa solo nei soggetti di et  compresa tra i 50 e 59 anni (143,144).

Gli studi osservazionali sono parzialmente confermati da quelli di intervento sull'uomo adulto. Trattamenti con dosi soprafisiologiche in adulti normali hanno sortito effetti contrastanti sulla aggressivit , sul tono dell'umore e sulla libido. Molto pi  omogenei sono i risultati relativi al trattamento con Testosterone in soggetti ipogonadici che hanno mostrato effetti significativamente positivi sia sul tono dell'umore che sulla libido (82,145,146).

Nel gruppo di **trial clinici di intervento sostitutivo con Testosterone nella persona anziana ne abbiamo selezionati 16 (15 RCT e 1 di Metanalisi)** in cui sono stati presi in considerazione come outcome generalmente primari e solo talvolta secondari parametri volti ad esplorare tramite la somministrazione di adeguati questionari alcuni aspetti delle funzioni corticali superiori: mi riferisco a test per focalizzare alcune performance della cognitivit , test per definire la qualit  della vita (well being e tono dell'umore) e infine test per esplorare la funzione sessuale (con particolare riferimento alla componente ideoaffettiva della sessualit ). (89,90,93,98,100,103,107,129,147-154). Il numero complessivo dei soggetti studiati   di 3493 a cui si aggiungono i 1212 dello studio di metanalisi (154) relativa a 5 studi RCT. Il trattamento sostitutivo nel 50% dei casi   realizzato per via transdermica; nella restante percentuale la somministrazione   per via orale o intramuscolare.

Solo in 6 di questi studi   stata valutata la capacit  del Testosterone di interferire sulla **funzione cognitiva**. In uno di questi (151) il trattamento ha influenzato positivamente in modo significativo solo uno dei numerosi test somministrati e precisamente quello relativo alla memoria visivo-spaziale (Rey Osterrieth Complex Figure Test). Negli altri 5 (89,93,100,129,149,153) nessun effetto significativo   stato evidenziato sui vari test somministrati per esplorare le performance relative alla funzione cognitiva. Tra questi si segnala il lavoro di Emmelot-Vonk (100) particolarmente complesso per l'utilizzo di 5 test volti ad

esplorare diversi aspetti della cognitiv  nessuno dei quali   risultato interferito dal trattamento. Degno di nota anche quello di Huang (153) dove il trattamento protratto per tre anni non   riuscito a modificare nessuno dei test utilizzati per definire l'abilit  visivo-spaziale, la fluenza verbale, la memoria verbale, la destrezza manuale e la funzione attentiva ed esecutiva. Da ultimo merita segnalazione il contributo di Snyder (129) che ha dimostrato la incapacit  del trattamento di migliorare le performance cognitive in un gruppo di soggetti affetti da AAMI (age associated memory impairment).

Nel complesso ci pare di poter concludere che le osservazioni fino ad ora disponibili non sono sufficienti per lasciare ipotizzare effetti positivi sulla dinamica delle funzioni cognitive.

In 12 degli studi considerati   stato preso in considerazione il parametro della **qualit  della vita** e del **tono dell'umore**. Per la percezione della qualit  della vita sono stati utilizzati soprattutto il Test MOS (Medical Outcome Study), SF-36 ove lo score si esprime come sommatoria di una componente fisica e soprattutto di una componente emozionale e mentale e il test AMS (Aging Male Score) ove lo score include la esplorazione insieme degli stati funzionali fisico, psichico e sessuale (89,90,93,98,103,107,148,150-154). Una specifica attenzione sul tono dell'umore   stata riservata in due studi utilizzando la GDS (Geriatric Depression Scale) (89) e la HADS (Hospital Anxiety Depression Scale) (150).

In conclusione l'effetto positivo del trattamento sostitutivo sulla **percezione della qualit  della vita e sul tono dell'umore**   stato significativamente documentato in 6 studi (90,93,103,107,150,151) ed in uno studio di metanalisi (154) per cui secondo i criteri che ci siamo dati **la forza della evidenza del fenomeno pu  definirsi di tipo 1a**. A conferma citiamo anche il contributo di Ho (67) che si esprime nella stessa direzione ma che non abbiamo incluso nella nostra casistica perch  la popolazione studiata non   rigorosamente geriatrica. Nonostante ci  va segnalato che in 5 studi (89,98,147-149) l'effetto tendenzialmente positivo, non raggiunge la evidenza statistica; lo stesso dicasi per le esperienze di Morales (66) e di Konaka (69) che non abbiamo incluso nella nostra analisi in quanto i soggetti studiati anche se in prevalenza in et  geriatrica sono parzialmente in et  giovane-adulta. Quando   stato utilizzato un test specifico per il tono dell'umore (GDS) si   registrato un comportamento differenziato, uno positivo (151) e l'altro invariato nei confronti col placebo (89).

In 9 studi infine si   focalizzata l'attenzione sul **comportamento sessuale**. I test pi  frequentemente utilizzati sono rappresentati dal questionario AMS (Aging Male Score) per gli item relativi al dominio sulla sessualit  in 4 studi RCT e nello studio di

metanalisi, dall'IIEF (International Index for Erectile Function) in 3 studi e dal test ESF (Eleven Question on Sexual Function) in uno. In 8 di questi studi (103,107,129,147,148,150,152,154) è stato documentato un effetto significativamente positivo sul comportamento sessuale, essendo incluso tra questi una metanalisi (154) sintesi di 5 studi RCT. Da rimarcare che lo studio di Cunningham (152) e quello di Snyder (129) utilizzano verosimilmente la stessa casistica. In uno solo di questi studi infine (149) l'effetto sul comportamento sessuale non raggiunge la evidenza statistica. Tra gli studi ad effetto positivo degno di segnalazione è lo studio di Cunningham (152) per l'ampia casistica di 470 soggetti seguiti per un anno e per la complessa batteria di questionari utilizzata: la PDQ (Psychosexual Daily Questionnaire) per l'attività sessuale in senso lato, la DISF (Derogatis Interview for Sexual Function) per la componente del desiderio sessuale, la IIEF (International Index for Erectile Function) per la componente della funzione erettile e la IIEF-OD (IIEF Orgasmic Domain) per la funzione orgasmica. Meritano infine segnalazione tre studi RCT (66,67,69) condotti su di una popolazione come già si è rimarcato non esclusivamente geriatrica, in cui l'effetto positivo del trattamento non raggiunge la evidenza statistica.

In **conclusione** dalla analisi complessiva di questi studi **l'effetto positivo sul comportamento sessuale ci pare possa essere accreditato di una forza di evidenza di tipo 1a.**

Meccanismo di azione.

Una prima considerazione va fatta in merito alla individuazione di recettori per il Testosterone in alcuni distretti cerebrali. Studi immunocitochimici e biochimici hanno dimostrato la presenza di recettori per gli androgeni in varie regioni della corteccia di roditori e di primati non umani. Sono più scarse le documentazioni nell'umano tra cui merita segnalazione quella che ha localizzato recettori nella corteccia temporale di pazienti epilettici sottoposti a resezione (155). Da ricordare infine lo studio in soggetti giovani ove la "positron emission tomography" (PET) ha dimostrato la attivazione di regioni cerebrali (regione temporale inferiore e aree paralimbiche) in stretta correlazione con l'incremento sierico del Testosterone promossa da una eccitazione sessuale evocata visivamente (evoked sexual arousal) (156). L' effetto del Testosterone sul SNC può essere sostanzialmente di due tipi, quello organizzativo e quello attivazionale. Quello di tipo **organizzativo** è ben documentato nel corso della vita fetale e neonatale nell'animale da esperimento ove lo steroide è capace di orientare in senso maschile il nucleo sessuale dimorfico della regione preottico anteriore ipotalamica (138,157). Si tratta verosimilmente di effetti diretti ma soprattutto di effetti mediati dalla bioconversione del Testosterone a Estrogeni. Le cellule dell'astroglia

sono particolarmente coinvolte nella ricezione dei messaggi degli ormoni gonadici. Questo fenomeno si realizza a livello delle sinapsi neuronali attraverso la modulazione delle loro capacità di interconnessione e soprattutto della loro plasticità con conseguenti ricadute di ordine morfologico strutturale nelle diverse aree cerebrali (158).

Alcune documentazioni sperimentali lasciano ipotizzare che gli astrociti possano partecipare in modo determinante liberando sostanze neuroattive e regolando l'accumulo di specifici fattori di crescita quali l'IGF1. Questi processi sono particolarmente espressi già all'epoca neonatale per protrarsi fino al momento della pubertà; essi tuttavia possono essere attivati anche nell'adulto per promuovere a livello neuronale effetti neuroprotettivi e rigenerativi ad esempio dopo un insulto neuronale (159). Questi effetti di tipo organizzativo nell'adulto sono prevalentemente realizzati dagli Estrogeni. Vi è infatti buona documentazione nella letteratura che in corso di danno cerebrale viene attivata a livello di astrociti la espressione dell'enzima aromatasi indispensabile per catalizzare la bioconversione del Testosterone a Estrogeni (160).

È tuttavia altrettanto ben documentato che il Testosterone è capace nella età postpubere di effetti classicamente di tipo **attivazionale**. Le esperienze clinico sperimentali sopra ricordate (studi osservazionali e di intervento) confermano la ipotesi di un ruolo del Testosterone (come tale o previa aromatizzazione a Estrogeni) nella modulazione dei processi di vari sistemi neurotrasmettitoriali, specie quelli preposti alle dinamiche del tono dell'umore e della componente ideoaffettiva della sessualità. Se mettiamo a fuoco i complessi meccanismi neurochimici della sinapsi neuronale possiamo renderci conto delle molteplici possibilità per gli ormoni gonadici di modulare la dinamica della neurotrasmissione poichè molteplici appunto sono i possibili bersagli di questa interferenza: il momento intraneuronale della sintesi e dello storage del neurotrasmettitore, il momento del suo reuptake in vista di un possibile successivo riutilizzo, il momento del processo metabolico di inattivazione nello spazio extracellulare e infine la attivazione del recettore presinaptico che dà l'avvio al feedback negativo sui processi di sintesi dello stesso neurotrasmettitore (161). Questo ruolo di vera e propria **neuromodulazione** del Testosterone si esercita elettivamente su alcune vie neurotrasmettitoriali che sottendono alcune funzioni corticali superiori come il tono dell'umore e la libido. Studi osservazionali confermano una correlazione positiva tra libido e livelli ematici di Testosterone (143). Ulteriore conferma viene da studi di intervento in soggetti chiaramente ipogonadici ove il trattamento sostitutivo migliora in modo significativo sia la libido che il tono dell'umore (82,146).

Quanto alla interferenza del Testosterone sulla funzione sessuale è doverosa una precisazione. Si riteneva fino a qualche tempo fa che il meccanismo di azione fosse realizzato esclusivamente attraverso una capacità di modulazione di tipo centrale; vi sono invece buone documentazioni che **il Testosterone è capace di attivare i momenti periferici del meccanismo della erezione.**

Recettori specifici per questo steroide nell'animale da esperimento sono stati individuati a livello di aree del midollo spinale e a livello dei gangli pelvici considerati importanti nella innervazione autonoma del pene (162). Sempre nell'animale da esperimento anche a livello dei corpi cavernosi sono stati documentati recettori la cui concentrazione sembra ridursi col progredire della età (163,164). Nell'uomo infine a livello penieno il recettore androgenico è stato localizzato pressochè ubiquitariamente nell'endotelio vascolare e nelle cellule muscolari lisce dei vasi su cui agirebbe con due meccanismi distinti e indipendenti. Uno di tipo genomico si realizza attraverso la attivazione di sintesi proteiche e classicamente di tipo strutturale. Un secondo non genomico di tipo prettamente funzionale si esprime attraverso la modulazione delle giunzioni periferiche neuromuscolari. L'effetto sarebbe legato alla attivazione di un recettore localizzato sulla membrana cellulare e su quella microsomiale (165,166). Tra i molteplici eventi postrecettoriali a seguito della attivazione di questi recettori si ricordano l'aumento del calcio citoplasmatico e la attivazione della proteinchinasi A (PKA) cui farebbe seguito il rilasciamento del tessuto muscolare liscio (167). Questo effetto sarebbe sostenuto anche dalla capacità del Testosterone di stimolare la produzione di sostanze vasoattive come l'ossido nitrico (NO) a livello endoteliale e di migliorare i meccanismi di riparazione dell'endotelio aumentando il numero di cellule progenitrici dell'endotelio di derivazione dal midollo osseo (168,169).

Si aggiungono infine le osservazioni clinico sperimentali nell'uomo che dimostrano come la ridotta o mancata risposta agli inibitori della PDE-5 può essere positivamente modificata con la supplementazione testosteronica associata. La maggior parte degli studi ha preso in considerazione il Sildenafil ma non mancano tuttavia osservazioni sperimentali ottenute con inibitori di successive generazioni come Verdenafil e Tadalafil (170-173).

H Effetti del Testosterone sul metabolismo lipidico

Sono assai ben documentate le differenze nel profilo lipoproteico tra i due sessi che possono condizionare negli studi epidemiologici sostanziali diversità legate al sesso nella valutazione del rischio cardiovascolare (174). Nel maschio al momento della pubertà si assiste ad un declino dei livelli di HDL che restano successivamente inferiori a quelli riscontrati nel sesso femminile. Nello stesso tempo nel sesso femminile al momento del menarca le concentrazioni di HDL subiscono un incremento per restare costantemente più alte rispetto al sesso maschile fino al momento della menopausa quando inizia una progressiva discesa (175). Diviene facile a questo punto evidenziare la correlazione del profilo lipidico con il cambiamento del clima steroideo; la concentrazione di Testosterone e Estrogeni quindi sembra giocare un ruolo importante nel metabolismo lipoproteico.

Studi osservazionali cross-sectional mirati sulla correlazione tra Testosterone e Lipoproteine hanno mostrato una relazione significativa tra bassi livelli di Testosterone e dislipidemia (176) peraltro non confermata da altri (74,177).

Tuttavia studi di intervento mirati alla soppressione degli ormoni androgeni indotta farmacologicamente o chirurgicamente hanno mostrato un significativo

incremento delle HDL (178-181). Vi è poi una serie di studi di intervento con Testosterone che hanno evidenziato un aumento del rischio cardiovascolare per un incremento di LDL combinato ad un decremento di HDL; si tratta però di trattamenti per la maggior parte di breve durata, non randomizzati e controllati, spesso con dosaggi di Testosterone soprafisiologici condotti su giovani volontari, body-builders, transessuali, pazienti ipogonadici di età diverse (182-185). Effetti almeno parzialmente positivi sul profilo lipidico sono suggeriti invece da studi condotti su popolazioni di soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2. Mi riferisco ad esempio allo studio RCT di Jones (186) e alla metanalisi di Zhang (187) ove il trattamento sostitutivo è sempre condotto su pazienti affetti da diabete di tipo 2; il dato prevalente è quello della riduzione del Colesterolo Tot e LDL con comportamento variabile del Colesterolo HDL.

Nel gruppo di **trial clinici da noi presi in considerazione abbiamo individuato 16 studi randomizzati e controllati** in cui il profilo lipidico è stato inserito in alcuni casi tra gli outcome primari ma più frequentemente tra quelli secondari o addirittura nel capitolo degli eventi avversi: mi riferisco al Colesterolo totale in 15, al Colesterolo LDL in 12, al Colesterolo HDL in 16 e ai Trigliceridi in 14. Il **Colesterolo Totale** è risultato significativamente diminuito in 7 su 15 studi (87,88,93,97,100,188, 189) pressochè equamente distribuiti tra le tre diverse vie di somministrazione intramuscolare, orale e transdermico; in 8 su 15 studi (89,96,103,105,147,190-192) il Colesterolo Totale resta praticamente immutato con una somministrazione del Testosterone prevalentemente per via transdermica. Pressochè sovrapponibile il comportamento del **Colesterolo LDL**, diminuito in 5 su 12 studi (87,93,97,188,189) e invariato in 7 su 12 (89,96,98,103,105,191,192). Quanto al **Colesterolo HDL** solo in 5 studi su 16 (96,100,102,105,189) si è documentato un significativo decremento con una somministrazione transdermica in 3 studi e orale negli altri 2; nessuna significativa variazione negli altri (87-89,93,97,98,103,188,190-192). Per quanto concerne il comportamento dei **Trigliceridi** solo in uno studio (97) su 14 viene documentata una significativa diminuzione mentre negli altri 13 non si registrano cambiamenti sostanziali (87,89,93,94,96,98,100,103,105,188,190-192).

In **conclusione** il comportamento di questi parametri ci induce a non individuare evidenze di particolare significato ma solo a formulare alcune considerazioni. Un **dato positivo** da sottolineare ci sembra il comportamento del Colesterolo totale e LDL che spesso appaiono significativamente ridotti o con un trend in diminuzione pur senza che si raggiunga la significanza statistica. Si aggiunge poi che la diminuzione del Colesterolo totale è segnalata con chiara evidenza anche in una metanalisi condotta su 8 studi (68) che non abbiamo considerato nella nostra

analisi perché il parametro anagrafico dei soggetti non collimava perfettamente con i criteri che ci eravamo dati. Da segnalare infine il riscontro di effetti di riduzione del Colesterolo totale in un'altra metanalisi (187) relativa a 7 studi che non abbiamo inserito nel nostro gruppo perché condotti su soggetti prevalentemente in età geriatrica tutti affetti da diabete mellito di tipo 2. Pertanto per le modificazioni di questi profili lipoproteici **la forza della evidenza potrebbe definirsi di tipo 1b**; tuttavia la numerosità degli studi che non evidenziano alterazioni significative finisce per attenuarne il significato. Un **dato invece negativo** parrebbe rappresentato dalla riduzione di HDL che troverebbe conferma anche in uno studio di metanalisi (193) condotto su 51 studi sia randomizzati che non randomizzati di soggetti che solo in parte sono in età geriatrica e che per questi motivi non abbiamo inserito nel nostro gruppo. Una ulteriore conferma verrebbe da Bashin (194) che riscontra diminuzione significativa di HDL per effetto del trattamento con Testosterone e che pure non abbiamo inserito nella nostra casistica in quanto lo studio è condotto in soggetti eugonadici. Anche in questo caso **la forza della evidenza definibile di tipo 1b** finisce tuttavia per attenuarsi a fronte della prevalenza numerica degli studi che non mostrano variazioni di HDL.

Meccanismo di azione.

Come si può osservare dalla analisi della letteratura passata in rassegna nella maggior parte dei lavori non si osservano effetti significativi su Colesterolo totale, LDL, HDL e Trigliceridi. Tuttavia in un corposo numero di lavori sperimentali, anche se minoritario, si registrano effetti di diminuzione sia del Colesterolo totale e LDL che di HDL; anche due metanalisi danno consistenza a questi effetti inibitori. Per quanto riguarda il Colesterolo totale e LDL si può ipotizzare che il meccanismo di azione possa essere quello di una inibizione a livello epatico della sintesi lipoproteica. Per quanto concerne invece HDL oltre a ipotizzare un identico meccanismo a livello epatico, si è suggerita la possibilità di una attivazione da parte di questo steroide di enzimi lipolitici. La lipasi epatica infatti subisce un incremento dopo trattamento con steroidi anabolizzanti o con Testosterone previo blocco della sua aromatizzazione a estrogeni; ciò confermerebbe la ipotesi di una azione diretta del Testosterone e non mediata dalla sua bioconversione a Estrogeni (195,196).

In questo specifico settore si procede ancora sulla base di interpretazioni ipotetiche piuttosto che su approfondimenti sperimentali ben documentati.

Va infine ricordato che le diverse vie di somministrazione usate nelle diverse

sperimentazioni (intramuscolare, orale o transdermica) insieme alla diversa partecipazione del tessuto adiposo nella composizione corporea e la conseguente variabile aromatizzazione del Testosterone a Estrogeni potrebbero giustificare il riscontro di effetti contrastanti da parte del Testosterone sul metabolismo lipidico.

I Effetti del Testosterone sul metabolismo glicidico

Il progredire della età si associa frequentemente a complesse modificazioni del metabolismo glicidico. Tra queste la comparsa di una resistenza insulinica di variabile entità molto verosimilmente legata a disordini di tipo postrecettoriale è una delle evenienze più frequenti. Alla base di queste modificazioni stanno cambiamenti età correlati di specifici determinanti fisiologici della sensibilità insulinica quali la composizione corporea e lo stile di vita (abitudini alimentari e attività fisica). A modificare il metabolismo glicidico tuttavia stanno anche altri fattori di natura ormonale capaci di interferire in modo diretto o indiretto sulle tappe metaboliche della secrezione di insulina. Il Testosterone ad esempio che subisce una progressiva flessione nell'uomo che invecchia e che è notoriamente capace di influenzare la distribuzione del tessuto adiposo e il metabolismo lipidico come descritto nei precedenti capitoli, potrebbe ragionevolmente essere coinvolto anche in queste dinamiche.

A confermare questo possibile coinvolgimento stanno studi osservazionali condotti su soggetti normali o con patologie metaboliche come la obesità e il diabete. In questi si registra una correlazione inversa tra i livelli ormonali e quelli della glicemia e della insulinemia (sia basale che stimolata) e una correlazione

positiva peraltro con la sensibilità insulinica e la utilizzazione periferica del glucosio. (197-201). Sulla stessa linea sono le considerazioni di Maggio (202) che in uno studio di popolazione ha descritto una correlazione negativa tra i livelli di Testosterone e la presenza di sindrome metabolica. Ulteriore conferma viene dalla review di Choong e Basaria (203) che sottolineano le complicanze metaboliche (resistenza insulinica e sindrome metabolica) sopravvenute in soggetti affetti da carcinoma prostatico e sottoposti a deprivazione androgenica di tipo farmacologico.

Quanto agli studi di intervento con Testosterone la disponibilità di osservazioni è piuttosto contenuta. La somministrazione di dosi farmacologiche non provoca modificazioni sull'equilibrio glicidico valutato coi test di tolleranza al glucosio somministrato sia per via orale che endovenosa in soggetti normopeso (204). Al contrario un effetto positivo sulla sensibilità insulinica è stato documentato in casistiche di soggetti di media età affetti da obesità (205, 206). È in accordo con questa conclusione una esperienza in soggetti di media età ipogonadici affetti da diabete di tipo 2 ove il trattamento con Testosterone promuove una riduzione della resistenza insulinica valutata con l'indice HOMA e una riduzione della emoglobina glicata, due indici scelti come outcome primari (207). Peraltro in una metanalisi impostata per valutare gli effetti del trattamento con Testosterone sugli eventi cardiovascolari e i loro fattori di rischio in uomini in età adulta con differenti livelli di carenza androgenica non vengono segnalati effetti sul metabolismo glicidico (208).

Se proviamo a focalizzare la nostra attenzione sulle esperienze effettuate solo su **studi di intervento in casistiche di persone anziane con bassi livelli di Testosterone vengono selezionati solo 8 studi sperimentali** in cui il metabolismo glicidico è individuato tra gli outcome primari (198, 97, 98, 100, 101, 209, 105, 189). La **sensibilità insulinica**, valutata con la determinazione dell'HOMA index, è apparsa significativamente aumentata in 3 studi (100, 189, 198). In realtà nello studio di Simon (198) la variazione significativa è stata ottenuta solo nel gruppo di soggetti trattati con DHT e non in quelli trattati con Testosterone; secondo questo Autore l'effetto sul metabolismo glicidico sarebbe secondario alle modificazioni prodotte sulla composizione corporea (riduzione del grasso viscerale con parallela riduzione degli acidi grassi liberi). Nessun effetto sulla sensibilità insulinica è stato evidenziato da Allan (101) che pure ha utilizzato l'HOMA index. Allo stesso modo nessun effetto è stato segnalato utilizzando il test del clamp iperinsulinemico nello studio di Frederiksen (106); lo stesso autore (105) descrive addirittura una diminuzione della adiponectina, una adipokina capace di stimolare la sensibilità insulinica. Invariata infine è risultata la sensibilità insulinica nello studio di Nair (98) ove è stato utilizzato lo "insuline sensitivity index" calcolato sul comportamento dei livelli di glucosio, insulina e C Peptide dopo pasto standardizzato. Una riduzione dei valori di

insulinemia a digiuno è stata descritta in 3 su 6 studi (189, 198, 209) mentre invariati sono risultati i livelli di insulinemia a digiuno negli altri 3 (97, 101, 106). Nessun effetto sui livelli a digiuno della **glicemia** è stato segnalato in 5 studi su 5 (98, 101, 149, 189, 198). Invariato anche il comportamento della **emoglobina glicata** nello studio di Mohler (189). La maggior parte di questi studi è stata effettuata somministrando il Testosterone per via transdermica; solo lo studio di Page (97) ha utilizzato la via intramuscolare e quello di Emmelot-Vonk la via enterale (149). **La forza della evidenza pertanto potrebbe definirsi di tipo 1b.**

Per concludere tuttavia la scarsità delle osservazioni non consente di estrapolare evidenze significative anche se il trend emerso parrebbe quello di un effetto positivo nei confronti della utilizzazione periferica del glucosio, documentato in studi che hanno utilizzato sia la via transdermica che quella enterale.

Meccanismo di azione

Un eventuale effetto positivo del Testosterone sul metabolismo glicidico e in particolare sulla sensibilità insulinica è molto verosimile che possa essere considerato secondario alla modificazione della composizione corporea e in particolare alla riduzione del grasso viscerale e degli acidi grassi liberi (198,210) piuttosto che ad un effetto diretto sulle tappe specifiche del metabolismo glicidico. Il ruolo condizionante della composizione corporea potrebbe essere la causa del disomogeneo comportamento emerso dai dati della letteratura. Non si può escludere infine che altri fattori entrino in gioco nella interazione fra Testosterone e metabolismo glicidico. Lo studio di Maggio (201) ad esempio che mostra una correlazione inversa tra Testosterone e Sindrome Metabolica evidenzia anche una correlazione negativa, aggiustando nell'analisi per tutti i fattori confondenti, altamente significativa con SHBG la proteina di trasporto del Testosterone: una ulteriore conferma della ipotesi che questa molecola sia veramente qualcosa di più di un semplice vettore ormonale e che possa entrare, anche se con meccanismi ancora da definire, in tappe importanti del metabolismo glico-lipidico.

L Effetti del Testosterone sul sistema eritropoietico

Le documentazioni relative alla capacità del Testosterone di stimolare la eritropoiesi sono molteplici. Iniziamo con ricordare le esperienze in vitro che hanno dimostrato per il Testosterone la **capacità di stimolare negli eritroblasti l'RNA ribosomiale** attraverso la attivazione dell'RNA polimerasi I. Ciò avverrebbe **in modo sinergico con la eritropoietina (EPO)** che si esprime attraverso la attivazione della RNA polimerasi II (211-213). L'effetto sulla eritropoiesi infatti sembrerebbe mediato non soltanto da una azione diretta sul midollo osseo ma anche da una capacità di stimolare la produzione di EPO come dimostrato nell'animale da esperimento (214,215).

Tale correlazione si conferma nell'umano dove sono ben noti i differenziati comportamenti nei due sessi di parametri ematologici come emoglobina ed ematocrito con un tipico incremento dei loro valori nel maschio al momento della pubertà in coincidenza con l'aumento dei livelli ematici di Testosterone (216). Si aggiungono a conferma nell'uomo gli studi caso-controllo che sottolineano la riduzione dei livelli di emoglobina nella condizione di ipogonadismo e in particolare in quello indotto chirurgicamente o farmacologicamente (217-220). Uno studio di popolazione (220) completato con un follow up longitudinale a tre anni ha dimostrato che bassi livelli di Testosterone possono rappresentare un fattore di rischio nei due sessi per la comparsa di una condizione clinica di anemia; viene suggerito che bassi livelli di Testosterone in persone anziane possono costituire la

causa principale di una condizione di anemia in quelle situazioni in cui tutte le altre cause plausibili siano state escluse o quando un trattamento sostitutivo con ferro, acido folico e vit B12 non abbia sortito alcun effetto. Si aggiungono poi i numerosi studi di intervento in cui i livelli di emoglobina aumentano a seguito di trattamento sostitutivo con Testosterone nei maschi affetti da ipogonadismo (82,221,222). Lo stesso comportamento si ripete in occasione di trattamenti sopra-fisiologici utilizzati nell'uomo a scopo contraccettivo (223-225).

Va pertanto considerato che l'effetto eritropoietico del Testosterone fino a certi limiti rappresenta un sicuro vantaggio nell'anziano che manifesta un variabile grado di diminuzione della concentrazione ematica della emoglobina. Questo processo di anemizzazione in età avanzata ha una componente patogenetica classicamente multifattoriale. Tra i fattori coinvolti un ruolo di primo piano è esercitato dalla riduzione dell'apporto e/o assorbimento dei complessi nutrienti essenziali per un normale processo eritropoietico; non è escluso peraltro che nella anemia dell'anziano almeno un ruolo di concausa possa essere giocato anche dal declino età correlato della funzione gonadica.

E' pur vero tuttavia che un aumento eccessivo della eritropoiesi promosso dal trattamento sostitutivo può comportare un aumento della viscosità ematica che potrebbe peggiorare un eventuale preesistente compromissione del sistema cardiovascolare fino al rischio conclamato di venotromboembolismo. Va ricordato che questo tipo di correlazione evidenziato da molti studi sperimentali non ha trovato conferma in molti altri (226,227). In questo clima di incertezza tuttavia nei protocolli che regolano il trattamento sostitutivo con Testosterone viene consigliato un assiduo controllo dell'ematocrito e/o della emoglobina; si è poi convenuto di considerare un evento avverso la situazione in cui i loro valori debordino nel range tipico della eritrocitosi (Ematocrito >50% e Emoglobina >17,5 g/dL).

Il numero di studi disponibili per le nostre considerazioni è piuttosto corposo; si tratta infatti di 23 studi ove i parametri ematologici sono stati inseriti tra gli outcomes primari in 8 di essi (87-89,101,108,129,228,229) mentre nel gruppo restante (90, 93-96, 98, 102, 103, 106, 107, 127, 147-149, 192) essi hanno fatto parte degli outcomes secondari o sono stati inseriti nella sezione relativa alle problematiche della sicurezza. In 4 di questi studi (98,101,102,191) non vengono registrati effetti significativi sui parametri ematologici mentre in 19 di questi viene segnalato un incremento significativo dell'ematocrito e/o della emoglobina e/o del numero degli eritrociti. In 14 di essi è risultato significativo l'incremento dell'ematocrito (87, 88, 90, 93, 95, 96, 103, 106-108, 127, 147-149); in 7 di essi viene registrato anche un incremento significativo della emoglobina (87, 90, 93, 106, 127, 147, 149). In 4 studi è segnalato solo l'incremento della emoglobina (89, 129, 228,

229). Infine in 2 di questi studi (93,187) oltre all'incremento di emoglobina ed ematocrito è stato segnalato anche quello del numero dei globuli rossi. Solo in 3 di questi studi viene segnalata la incidenza percentuale dei soggetti in cui i parametri ematologici hanno superato il livello di guardia: 2,6% e 6,6% nell'ematocrito rispettivamente con un dosaggio di Testosterone undecanoato di 80 e 240 mg/giorno per Legros (148), 8,4% nell'ematocrito per Behre (107) e 5,5% nella emoglobina per Snyder (90). Ciò ha comportato ovviamente per alcuni soggetti la impossibilità di completare lo studio sperimentale.

Una segnalazione di particolare importanza merita lo studio di Snyder (129). Un braccio della numerosa casistica utilizzata è rappresentato da 126 soggetti anemici (Hb <12.7 g/dL) di cui 64 soffrivano di una condizione di anemia da cause note (deficit di Ferro, B12 e Folati o flogosi croniche), mentre 62 erano considerati affetti da anemia da causa sconosciuta; il trattamento con Testosterone in questo secondo gruppo è risultato capace di aumentare la concentrazione di emoglobina di almeno 1.0 g/dL correggendo la condizione di anemia nel 58,3% dei soggetti trattati.

Dalla analisi complessiva di questi dati emerge con chiara evidenza che il trattamento sostitutivo con Testosterone nell'anziano è capace di significativi effetti ematologici generalmente positivi ma che, per quanto esposto in precedenza, possono anche creare condizioni di rischio di complicanze vascolari. **La forza della evidenza di questo fenomeno raggiunge il livello Ib** secondo i criteri di valutazione che ci siamo dati. Ciò si evince dalla numerosità degli studi sperimentali randomizzati e controllati. A parziale conferma è doveroso ricordare anche la metanalisi di Fernandez (193) le cui conclusioni vanno nella stessa direzione e che ha incluso un gruppo corposo di ben 51 studi peraltro in parte non randomizzati e in cui il range di età anche se prevalentemente di tipo geriatrico non esclude tuttavia anche quella di soggetti giovani e adulti. Gli effetti positivi sull'ematocrito sarebbero confermati anche da una metanalisi di Calof su 19 studi RCT (64) che tuttavia non abbiamo inserito nel nostro gruppo poichè, come nel caso precedente, il dato anagrafico non è completamente in linea con i parametri che ci siamo dati. Da ricordare anche lo studio randomizzato e controllato di Konaka (69), che non abbiamo inserito per la stessa motivazione metodologica, in cui viene segnalato per effetto del trattamento un incremento significativo di emoglobina, ematocrito e del numero dei globuli rossi, con un caso di policitemia costretto perciò a uscire dallo studio (corrispondente allo 0,3% dei soggetti trattati con il Testosterone).

Meccanismo di azione

E' il momento ora di cercare di mettere a fuoco il problema del **meccanismo**

attraverso cui il Testosterone si rende capace di questi effetti di eritrocitosi (aumento della massa eritrocitaria) **e/o di policitemia** (aumento del numero degli eritrociti). Vi è tuttora molta incertezza nel definire il meccanismo attraverso cui il Testosterone riesce a promuovere questi effetti.

Una prima ipotesi proposta è stata quella di un **meccanismo indiretto** in quanto il Testosterone sarebbe in grado di attivare il rene per la produzione di EPO. Uno studio di Bachman (230) ha effettivamente confermato che un trattamento transdermico di Testosterone è in grado di promuovere un significativo aumento di EPO. Quasi contemporaneamente tuttavia Maggio (228) in uno studio di trattamento sostitutivo con Testosterone transdermico ha potuto verificare che l'incremento significativo di emoglobina non si accompagna ad un parallelo incremento di EPO.

Un'altra ipotesi sempre proposta da Bachman (230) è stata quella di chiamare in causa per chiarire il meccanismo di azione del Testosterone il turnover metabolico del Ferro che verrebbe attivato a seguito della diminuzione di Epcidina, un peptide normalmente sintetizzato dal fegato, che sarebbe fisiologicamente responsabile di una sorta di "iron sequestration".

Ancora più datate sono le ipotesi che vedrebbero il Testosterone capace di un **effetto diretto** sulla eritropoiesi a livello delle cellule staminali del midollo osseo (231, 232). Recentemente Calado (233) ha ipotizzato che il Testosterone previa parziale aromatizzazione ad Estradiolo sia capace di stimolare gli alfa recettori per gli estrogeni e quindi di promuovere una informazione genica responsabile della proliferazione e sopravvivenza delle cellule staminali del midollo osseo.

Si è dibattuto infine sulla ipotesi che l'effetto di tipo ematologico del Testosterone sia in realtà condizionato dalla sua **bioconversione a DHT**. È perciò interessante a questo proposito lo studio di Borst (108) che ha messo a confronto due gruppi in trattamento uno con solo Testosterone e un secondo in cui lo steroide è associato ad un inibitore della 5alpha reduttasi. Le risposte ematologiche sovrapponibili nei due gruppi sembrerebbero perciò sconfiggere la ipotesi sopra ricordata.

Da ultimo infine ritengo utile la disamina relativa alle **diverse vie di somministrazione del Testosterone** nella ipotesi che possano in qualche modo interferire sul meccanismo d'azione a livello ematologico. Analizzando la nostra casistica abbiamo rilevato che in 5 studi che utilizzavano la via intramuscolare l'incremento di ematocrito è stato in media di 10.5 % (87, 88, 95, 108, 127) e quello di emoglobina di 11,2 % (89, 127). In 5 studi che utilizzavano la via transdermica l'aumento di ematocrito è stato in media di 4.0 % (90, 93, 103, 106, 147) e in 6 quello di emoglobina di 5.5% (90, 103, 106, 147, 228, 229). Sembrerebbe che la via

parenterale sortisce effetti pressochè raddoppiati sui parametri ematologici rispetto alla via transdermica. Si tratta di una analisi molto superficiale su popolazioni molto disomogenee dove i bias interferenti sono molteplici quali in primis la diversità dei dosaggi utilizzati e le diverse durate del trattamento. Questa osservazione tuttavia sarebbe perfettamente allineata con alcuni riscontri della letteratura che evidenziano come la via iniettiva per la somministrazione del Testosterone sia quella capace dei maggiori effetti su emoglobina ed ematocrito. Interessante la ipotesi interpretativa della review di Jones (186) secondo cui questa via di somministrazione si caratterizza per picchi ematici decisamente soprafisiologici seguiti da cadute sottofisiologiche. Nei momenti di maggior concentrazione ematica il Testosterone verrebbe shuntato dai bersagli specifici su altri recettori tra cui quelli del midollo osseo con conseguente attivazione della eritropoiesi. Questo evento sarebbe assai meno probabile in caso di somministrazione transdermica che si caratterizza per indurre concentrazioni ematiche di Testosterone assai più costanti nel tempo e senza picchi soprafisiologici. La via iniettiva pone peraltro il rischio di una maggiore incidenza di eritrocitosi e policitemia come evidenziato nella review di Rhoden (234) e nello studio caso- controllo di Vorkas (235).

M Effetti del Testosterone sull'apparato cardiovascolare

È concetto consolidato che la patologia cardiovascolare nell'uomo ha una incidenza almeno tre volte superiore a quanto riscontrato nel sesso femminile. Si è così ipotizzato da un lato un ruolo protettivo per gli estrogeni nei confronti di questa patologia e dall'altro per il Testosterone quello di fattore di rischio.

Questo secondo assunto tuttavia è uscito fortemente ridimensionato dagli **studi osservazionali** di quest'ultimo decennio. Studi trasversali e di coorte hanno suggerito una associazione tra bassi livelli di Testosterone endogeno e patologia arteriosa coronarica (236, 237). Vanno poi ricordati alcuni studi cross-sectional che hanno dimostrato che bassi livelli di Testosterone si associano ad aumento dello spessore medio intimale delle carotidi; inoltre in studi caso-controllo si osserva che pazienti con patologia arteriosa coronarica si caratterizzano per un significativamente più basso livello ematico di Testosterone rispetto ai soggetti controllo, con una severità aumentata delle lesioni coronariche nei soggetti con più bassi livelli di Testosterone (238). A suggello infine viene la metanalisi di 12 studi osservazionali (239) che dimostra che bassi livelli di Testosterone ematico si correlano proprio con la mortalità a eziologia cardiovascolare.

Quando poi si vanno ad analizzare gli **studi clinici di intervento** con trattamento sostitutivo di Testosterone che hanno preso in considerazione le ricadute di tipo cardiovascolare il panorama si fa alquanto disomogeneo. Iniziamo con il TOM (Testosterone in Older Men) trial condotto su di una popolazione di 209 soggetti con limitazioni della mobilità che fu prematuramente interrotto per la

comparsa di eventi avversi di natura cardiovascolare sopravvenuti in 23 soggetti trattati con Testosterone e in 5 trattati con placebo (240). In uno studio retrospettivo di coorte su soggetti anziani ipogonadici trattati con Testosterone, a tre anni di distanza da un controllo angiografico coronarico, gli eventi avversi cardiovascolari sono significativamente più numerosi in confronto a quelli dei soggetti non trattati (241). Terminiamo con lo studio recente di Snyder (129) un trial clinico dove il trattamento sostitutivo con Testosterone transdermico in soggetti anziani ipogonadici protratto per 1 anno si caratterizza per un aumento delle placche arteriose coronariche non calcificate.

Un quadro diverso emerge dalla metanalisi di Calof (64) che raccoglie 19 trial clinici di soggetti ipogonadici sia di età avanzata che giovane-adulta; in essa la frequenza di eventi avversi di tipo cardiovascolare nei soggetti trattati con Testosterone non differisce da quella riscontrata nel gruppo di controllo. Identico atteggiamento troviamo nello studio di Basaria (192) che focalizza l'attenzione sulla progressione della malattia aterosclerotica subclinica dopo tre anni di trattamento testosteroneico transdermico; le variazioni dello spessore medio intimale della carotide e del suo contenuto in calcio dei soggetti anziani ipogonadici trattati sono sovrapponibili a quelle del gruppo placebo.

Si passa così ad una serie di studi di intervento che si caratterizzano per risultati che muovono decisamente in direzione opposta, sottolineando addirittura effetti positivi sugli indici funzionali vascolari presi in considerazione. Nello studio di English (242) condotto su di un gruppo di soggetti anziani eugonadici affetti da angina cronica stabile il trattamento con una dose transdermica di Testosterone protratto per 12 settimane produce un significativo miglioramento nel tempo di comparsa della ischemia indotta da esercizio fisico nei confronti col gruppo placebo. Sono sulla stessa linea altri due studi. E' il caso della esperienza di Rosano (243) in un gruppo di soggetti anziani eugonadici con insufficienza coronarica in cui la somministrazione di Testosterone in acuto (2,5 mg ev 20 minuti prima del test) migliora significativamente l'ischemia miocardica indotta con esercizio fisico. Sono simili i risultati dello studio randomizzato controllato in cross over di Malkin (244), condotto su un gruppo di soggetti anziani ipogonadici affetti da insufficienza coronarica ove il trattamento per 4 settimane ritarda significativamente il tempo di comparsa della ischemia indotta in confronto a quanto succede col trattamento in placebo. Per finire si segnala uno studio retrospettivo di coorte su una larga popolazione di uomini anziani che avevano fatto trattamenti con Testosterone di varie formulazioni e per variabili periodi di tempo; nei confronti di soggetti controllo essi non hanno mostrato rischio maggiore di infarto del miocardio e addirittura quelli ad alto rischio di patologia vascolare sono risultati moderatamente protetti

(245).

Come si può osservare sia gli studi osservazionali sopra citati che buona parte di quelli di intervento ci ripropongono il Testosterone in una veste nuova rispetto al passato: talvolta responsabile di eventi avversi significativi, ma più frequentemente incapace di interferenze negative sul sistema cardiovascolare o addirittura protettivo nei confronti dei processi degenerativi di questo sistema.

Testosterone e pressione arteriosa

La disamina sopra riportata sui rapporti tra Testosterone e apparato cardiovascolare necessita per completezza di una appendice che metta a fuoco i rapporti tra questo steroide e il **comportamento della pressione arteriosa**. La pressione sistolica negli uomini prima dei 60 anni è di circa 6-7 mm Hg più alta nei confronti delle donne e quella diastolica di 3-5 mm Hg (246). Dopo i 60 anni la pressione sistolica in particolare nel sesso femminile comincia ad aumentare per cui nell'arco di 5-20 anni la prevalenza della ipertensione nei due sessi finisce per sovrapporsi (247). Si è così ipotizzato che la caduta del clima estrogenico nella donna con un contemporaneo incremento degli androgeni possa almeno in parte giustificare questa situazione (248). Al pari di quanto osservato per la patologia cardiovascolare sopra considerata anche per la ipertensione si è fatta strada la ipotesi di due ruoli contrapposti per estrogeni e Testosterone, di protezione per gli uni e di fattore di rischio per l'altro. Tuttavia il comportamento della pressione arteriosa a seguito di un trattamento sostitutivo androgenico a tutt'oggi non appare sufficientemente chiarito e anche il ruolo degli estrogeni viene messo in discussione poichè il trattamento sostitutivo estrogenico nella donna dopo la menopausa non sembrerebbe in grado di diminuire in modo significativo i valori pressori (249).

È per questo che nei trial clinici di trattamento sostitutivo con Testosterone da noi selezionati abbiamo provato a cercare una ipotetica correlazione tra lo steroide e l'equilibrio pressorio. Purtroppo il numero di studi in cui si è cercato di mettere a fuoco questo problema è piuttosto limitato. Inoltre va rimarcato che quando esso è stato preso in considerazione dai vari gruppi di ricerca è sempre stato inserito tra gli outcomes secondari.

Sintetizzando, 3 studi (89, 95, 96) non hanno evidenziato effetti significativi sulla pressione sistolica; un solo studio (190) segnala valori di pressione sistolica inferiore a quella del gruppo placebo dopo un trattamento protrattosi solo per 3

mesi. Nessun effetto viene segnalato sulla pressione diastolica in 3 studi (95, 96, 190). In 2 studi infine (93, 191) si è proceduto alla misurazione non invasiva della funzione vascolare endoteliale utilizzando immagini ultrasonografiche dell'arteria brachiale; in essi la reattività vascolare non appare significativamente influenzata dal trattamento sostitutivo. Merita segnalazione da ultimo anche lo studio più recente randomizzato e controllato di Konaka (69) che non ha evidenziato variazioni significative di pressione sistolica e diastolica ma che non abbiamo inserito tra gli studi da noi presi in considerazione perchè, come si è detto in precedenza, non perfettamente allineato con i criteri di reclutamento che ci siamo prefissati.

La casistica disponibile come si può osservare è quindi troppo limitata per poter quantizzare la evidenza del fenomeno; la maggior parte degli studi lascerebbe ipotizzare una mancata interferenza del trattamento sostitutivo sull'equilibrio pressorio.

Meccanismo di azione.

La ricerca clinica come si è osservato ci propone un quadro nebuloso e non ben definito; la letteratura disponibile tuttavia ci propone sperimentazioni in vitro e in vivo nell'animale e nell'uomo, che documentano la possibilità che il Testosterone sia capace di azioni specifiche sulle strutture vascolari.

Va in primo luogo ricordato che nella parete dei vasi per gli **estrogeni** sono presenti **recettori in tre forme diverse: ER alfa, ER beta e GPER**. Le prime due sono presenti nella membrana, nel citoplasma e soprattutto nel nucleo della fibrocellula muscolare capaci di mediare effetti di tipo genomico finalizzati alla sintesi dell'Ossido Nitrico endoteliale. Il recettore GPER invece è un classico recettore di membrana che interagendo sui canali del Ca e del K è responsabile di rapidi effetti di rilasciamento del tono vasomotorio della parete. Complessivamente l'attivazione di questi recettori si associa ad una attenuazione o riduzione della pressione arteriosa. Non è marginale questa puntualizzazione se pensiamo che molti effetti biologici del Testosterone si realizzano previa aromatizzazione periferica ad estrogeni (250).

Per quanto riguarda poi il **Testosterone** è documentata la presenza di due tipi di **recettori, AR alfa e AR beta**, localizzati nelle cellule muscolari lisce dei vasi e nelle cellule endoteliali sia a livello di nucleo che di membrana. Il Testosterone perciò legandosi ai recettori nucleari è capace di facilitare molteplici processi di trascrizione genomica; d'altro lato è capace anche di effetti non genomici utilizzando i recettori specifici localizzati nella membrana.

Negli studi in vitro il Testosterone si mostra capace di effetti spesso contrapposti, sia di vasodilatazione che di vasocostrizione. Molto verosimilmente la variazione della concentrazione di Testosterone usata e della durata della esposizione come pure il diverso tipo di letto vasale considerato sono alla base di

questi comportamenti eterogenei; inoltre non si può escludere che il passaggio dal vitro al vivo possa capovolgere la dinamica degli eventi (251, 252).

Utilizzando questa complessa disponibilità recettoriale distribuita sia sulle cellule muscolari lisce della parete sia sulle cellule endoteliali il Testosterone si renderebbe capace in primo luogo di **effetti di tipo vasodilatatorio**. Si tratta in questo caso di esperienze in acuto che si realizzano con meccanismi di tipo non genomico come quello di interferire sulle proteinchinasi A e C; conseguentemente, tramite processi di fosforilazione, verrebbe modulata l'azione dei canali ionici che sono alla base della regolazione del tono vasomotorio (250). Questo tipo di effetti non sembra mediato dalla possibile aromatizzazione a estrogeni in quanto l'efficacia è documentata anche per il trattamento con DHT che notoriamente non può essere aromatizzato (253). L'effetto vasodilatatorio non sembrerebbe mediato dalla attivazione della sintesi endoteliale di Ossido Nitrico, come suggerito dalle esperienze sulla aorta del ratto da Honda (254). L'effetto vasodilatatorio potrebbe essere inoltre mediato da interferenze sui canali ionici di membrana promosse da acido solfidrico (H₂S) prodotto a sua volta sotto la spinta di un effetto di tipo genomico (255).

Mentre quindi per alcuni ricercatori l'effetto del Testosterone sia di tipo genomico che non genomico sembra prevalentemente indirizzato alla vasodilatazione la ricerca sperimentale come si è detto ci parla anche di effetti di segno opposto. Un **effetto di tipo vasocostrittorio** potrebbe essere promosso dalla attivazione della sintesi di norepinefrina stimolando la attività dell'enzima tirosin-idrossilasi (256) o dalla liberazione di fattori di vasocostrizione come neuropeptide Y (257) e endoteina-1 (258). Un'altra possibilità ipotizzata è stata quella di inibire fattori vasodilatanti come la adenosina (259) o di facilitare l'azione vasocostrittrice del Trombossano A₂ (260). Vi è infine la possibilità che nell'effetto ipertensivante possa essere coinvolta la attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (261). Non si può escludere inoltre che il Testosterone possa contribuire all'azione ipertensivante attraverso effetti diretti sulla parete attivando la proliferazione delle cellule muscolari lisce (262) o stimolando la adesione di monociti all'endotelio vasale (263).

In **conclusione** per quanto riguarda le interazioni con l'apparato cardiovascolare, come si desume dai risultati della ricerca sull'animale da esperimento sia in vivo che in vitro e soprattutto dai trial clinici sull'uomo, il Testosterone si rende capace di effetti incerti o addirittura contrapposti. Restringendo infine l'attenzione ai trial clinici randomizzati e controllati nell'uomo si potrebbe ipotizzare che gli effetti di vasodilatazione e quelli ipotensivanti siano più frequenti negli studi in acuto ove prevale il meccanismo di azione non genomico.

Negli studi a lungo termine molto verosimilmente finiscono per prevalere gli effetti diretti sulla crescita della parete vasale e sui relativi processi degenerativi aterogeni che inevitabilmente col passare del tempo comportano una riduzione della elasticità vasale. In questa ultima componente patogenetica potrebbe non essere estranea la frequente interferenza negativa sul metabolismo lipidico che come si è visto porta spesso a ridurre la presenza di lipoproteine HDL. Infine anche se l'effetto del Testosterone sembra di tipo prevalentemente diretto non si può escludere che a complicare ulteriormente il problema possa intervenire la variabile presenza degli estrogeni in cui si può aromatizzare il Testosterone somministrato; questo processo di bioconversione procede infatti elettivamente nel tessuto adiposo e quindi in modo quantitativamente differenziato da soggetto a soggetto in relazione alle caratteristiche della sua composizione corporea. Ulteriori approfonditi trial clinici sono perciò assolutamente indispensabili per poter giungere ad una puntualizzazione scientificamente esauriente su questo problema.

N Effetti del Testosterone sulla ghiandola prostatica

È noto da una ricca letteratura che la ghiandola prostatica è fortemente condizionata nel suo sviluppo e nella sua crescita dalla stimolazione androgenica. È stata ampiamente dimostrata la presenza di recettori per gli androgeni sia citosolici che nucleari nel tessuto iperplastico della prostata sia di tipo benigno che maligno; il ruolo del Testosterone e del DHT tuttavia sembra comunque essere più di tipo promozionale che causale (264). Una metanalisi di studi riguardanti i fattori di rischio del cancro della prostata dimostra che gli uomini nel più alto quartile della distribuzione dei livelli di Testosterone hanno doppio rischio rispetto agli uomini del quartile più basso (265). In una recente analisi di 20 studi prospettici (6.8 anni dopo la determinazione dei livelli di free Testosterone) si osserva che gli uomini nella decina più bassa della concentrazione di free Testosterone hanno più basso rischio di sviluppare cancro prostatico (266).

Va tuttavia ricordato che la dipendenza androgenica delle patologie prostatiche alla luce di numerosi studi osservazionali possiamo definirla alquanto controversa. Alcuni Autori ad esempio hanno messo in seria discussione la relazione tra Testosterone e carcinoma prostatico. In uno studio (267) viene segnalato che la maggiore incidenza di carcinoma all'esame biptico è riscontrata negli uomini con bassi livelli di Testosterone totale o libero. Gustaffson (268) infine in uno studio di popolazione randomizzata giunge alla conclusione che bassi livelli di DHT si associano a più veloce progressione della malattia in uomini portatori di carcinoma della prostata.

Queste osservazioni alquanto controverse hanno indotto i ricercatori a portare una attenzione particolare alla ghiandola prostatica nei trial clinici di terapia sostitutiva con Testosterone negli anziani con deficit androgenico. Abbiamo perciò preso in esame **24 trial clinici** randomizzati controllati impostati per verificare rischi

e benefici del trattamento sostitutivo in cui un interesse particolare veniva riservato al comportamento della ghiandola prostatica (concentrazione dell'Antigene Prostatico Specifico, variazioni del volume della ghiandola, indici di disfunzione del flusso urinario, rischio di adenocarcinoma) (87-90, 92, 93, 95, 96, 98, 101-103, 106-108, 127, 129, 147-149, 190-192, 269). Solo in 7 di essi il problema prostatico è inserito negli outcomes primari mentre in tutti gli altri è confinato negli outcomes secondari o nel capitolo degli eventi avversi.

a) Effetto sul PSA. In 9 studi (87, 90, 103, 106-108, 127, 129, 192) nei soggetti trattati con Testosterone viene evidenziato un incremento significativo del PSA mentre in 14 (88, 89, 92, 93, 95, 96, 98, 101, 102, 147-149, 190, 191) le variazioni non sono dissimili dal comportamento dei gruppi placebo. Meritano segnalazione tra questi lo studio di Amory (127) e quello successivo di Borst (108) ove l'incremento del PSA osservato nel gruppo trattato con Testosterone non compare quando al Testosterone si associa un inibitore della 5 alfa reduttasi, a dimostrare il **ruolo fondamentale del DHT** nel promuovere l'incremento di questo indice di attivazione prostatica.

Sempre in questo tema va ricordata una review sistematica con metanalisi di Cui (270) non inserita nel nostro studio perchè l'età dei soggetti non soddisfa appieno i criteri che ci siamo dati. In essa sono stati assemblati 4 studi randomizzati controllati che pongono a confronto due trattamenti sostitutivi, uno con Testosterone e uno con Testosterone associato a inibitore della 5alfa reduttasi; nei soggetti trattati con questa associazione per i trattamenti a breve termine si registra una significativa riduzione nella differenza media del PSA a conferma di quanto affermato in precedenza.

Può essere utile ricordare che alcuni studi da noi esaminati inseriscono nel protocollo il dato della eventuale uscita dalla sperimentazione del soggetto quando l'incremento del PSA è ritenuto a rischio. È il caso dello studio di Behre (107) dove nel corso dei 6 mesi della sperimentazione 6 soggetti hanno dovuto interrompere la partecipazione (2/183 nel gruppo trattato con Testosterone e 4/179 nel gruppo placebo) per avere incrementato di almeno 1 ng/ml il livello ematico di PSA; nella prosecuzione dello studio open label fino a 12 mesi ben 29 soggetti per lo stesso motivo hanno dovuto abbandonare la sperimentazione. Anche nello studio di Snyder 23/394 nel gruppo trattato con Testosterone e 8/394 nel gruppo placebo nel corso dei 12 mesi della sperimentazione è stato registrato un incremento di almeno 1 ng/ml nel livello ematico di PSA (129). Infine nello studio di Basaria 4/156 per PSA>4,0 ng/ml in corso di trattamento con Testosterone hanno abbandonato la sperimentazione a confronto con 0/152 del gruppo placebo (192).

Complessivamente **si potrebbe concludere** che, poichè è notevole il numero degli studi in cui si registrano importanti effetti sul PSA, secondo i criteri che ci siamo dati, la **forza di evidenza dell'incremento del PSA potrebbe essere di tipo 1b**. Ho usato il condizionale perchè non si può fare a meno di considerare che un buon gruppo di osservazioni come si è visto non mostra incrementi significativi. Non si può infine non sottolineare, come sopra segnalato, che l'uscita dalla sperimentazione per superamento della soglia del PSA parrebbe prevalente nei gruppi trattati con Testosterone rispetto ai gruppi placebo. Un approfondimento di indagine inoltre ci mostra che nel gruppo dove il PSA subisce un incremento significativo si concentrano proprio tutti gli studi "long term" cioè quelli che hanno protratto le osservazioni a 3 anni. E' molto verosimile che il fattore durata del trattamento svolga un ruolo molto importante. Il condizionale è ulteriormente giustificato se consideriamo che il valore del PSA dopo il trattamento utilizzato per il confronto non tiene conto dei soggetti che hanno abbandonato la sperimentazione avendo superato il livello di rischio del PSA.

Focalizzando infine la attenzione sulle diverse modalità di somministrazione del Testosterone (enterale, parenterale, transdermico) non ci sembra che questo parametro abbia mostrato una interferenza sulla dinamica di tale fenomeno.

b) Effetto sul volume della ghiandola prostatica. In 12 studi (87, 89, 93, 95, 98, 101, 107, 108, 127, 147, 149, 191) si è proceduto a valutare questo parametro con la esplorazione rettale o in un minor numero di casi con la ecografia transrettale. In tutti questi studi **la volumetria della ghiandola non è significativamente variata**. Solo Borst (108) trova un incremento significativo che peraltro si annulla in un gruppo parallelo in cui il trattamento con Testosterone è stato associato all'inibitore della 5alfa reduttasi a ulteriore conferma del ruolo del DHT negli effetti del Testosterone sul tessuto prostatico. A suffragare questa osservazione merita segnalazione la review sistematica con metanalisi di Cui (270) sopra citata in soggetti non tutti in età geriatrica che dimostra che in 3 studi a lungo termine l'associazione nel trattamento sostitutivo di un inibitore della 5alfa-reduttasi è capace di rallentare la progressione della crescita prostatica. Da segnalare infine uno studio aggiuntivo ove la esplorazione digitale ha evidenziato dopo il trattamento una formazione nodulare che all'indagine bioptica si è rivelata una iperplasia benigna (190).

Per concludere nel loro complesso tuttavia questi dati ci inducono a sottolineare la prevalente assenza di significativi effetti sul volume della ghiandola prostatica nella pressochè totale quantità degli studi analizzati.

c) Effetto sui segni clinici di ipertrofia prostatica (IPSS, Boyarsky score). In 16 studi (87, 90, 95, 96, 101-103, 107, 108, 129, 147-149, 191, 192, 269) si è proceduto a considerare il problema della eventuale interferenza del Testosterone sui più classici segni clinici riconducibili ad una ipertrofia prostatica. In tutti tranne uno (269) questa osservazione era inserita tra gli outcomes secondari o nel capitolo degli eventi avversi. **In nessuno di questi studi viene evidenziato un peggioramento di questi parametri.** Fa eccezione solo uno studio, quello di Basaria (192), uno dei pochi studi veramente long term dove al termine del trattamento nel test IPSS 14 soggetti che ricevevano la terapia con Testosterone supera il valore di 21 contro 2 nel gruppo placebo; nella dinamica di questo fenomeno il fattore durata del trattamento potrebbe giocare un ruolo fondamentale.

In conclusione tuttavia il comportamento pressochè omogeneo di mancata interferenza negli studi analizzati con la inclusione anche di uno studio di metanalisi (269) ci induce a classificare tale fenomeno con la massima evidenza.

d) Effetto sulla incidenza di complicanze di tipo neoplastico. Tra tutti i 24 studi considerati solo in 6 vengono segnalate complicanze di questo tipo, ma senza alcuna chiara predilezione per i soggetti trattati con Testosterone. Nello studio di Amory (127) 2 su 24 soggetti hanno interrotto la sperimentazione per carcinoma prostatico a fronte i 1 su 24 nel gruppo placebo. Nello studio di Emmelot-Vonk (149), alla indagine ultrasonografica della prostata eseguita alla fine dello studio, 2 su 113 soggetti del gruppo trattato con Testosterone e 2 su 110 del gruppo placebo hanno evidenziato una lesione ipoecogena della prostata; successive valutazioni hanno diagnosticato adenocarcinoma nei due soggetti del gruppo placebo. Nello studio di Srinivas-Shankar (103) (130 soggetti trattati con Testosterone e 132 con placebo) sono stati diagnosticati all'esame bioptico un caso di adenocarcinoma nel gruppo placebo (formazione nodulare alla DRE) e una iperplasia benigna nel gruppo trattato con Testosterone (valore elevato di PSA). Da ricordare poi lo studio di Kenny (102) che ha segnalato solo nel gruppo di 53 soggetti trattati con Testosterone la fuoriuscita dalla sperimentazione per adenocarcinoma della prostata di 1 soggetto. Behre (107) segnala 2 soggetti del gruppo Testosterone usciti dallo studio uno per adenocarcinoma e uno per neoplasia intraepiteliale. Snyder (129) infine nella sperimentazione protratta per un anno nel gruppo di 394 trattati con Testosterone segnala un caso di adenocarcinoma prostatico. Le osservazioni sopra riportate si riferiscono, come si è detto, solo ad una parte degli studi; in tutti gli altri lavori presi in considerazione tuttavia è molto verosimile che complicanze di questo tipo non si siano verificate perchè in caso contrario sarebbero state inserite nella descrizione degli eventi avversi. Può essere utile infine segnalare che Marks (65) nell'esame

bioptico alla fine dello studio segnala sei casi di adenocarcinoma prostatico, 2 su 21 nel gruppo Testosterone e 4 su 19 nel gruppo placebo; questa casistica tuttavia comprende anche soggetti in età giovane-adulta e non solo geriatrica

In **conclusione** si può osservare che le complicanze neoplastiche si distribuiscono in modo pressochè uguale tra soggetti trattati con Testosterone e quelli con placebo, portando a sottolineare una certa sicurezza del trattamento sostitutivo. Dobbiamo tuttavia rimarcare che l'assiduo follow up dei soggetti trattati nella maggior parte degli studi portava ad eliminare dalla sperimentazione i soggetti che manifestavano in corso d'opera un incremento $> 4,0$ ng/ml dei livelli di PSA. Un fattore importante da considerare infine è rappresentato dalla accurata selezione dei partecipanti agli studi che permetteva di escludere tutti quei soggetti a rischio sulla base della esplorazione rettale e del dosaggio del PSA.

Meccanismo di azione

La inequivocabile capacità del Testosterone di interferire sul trofismo e sulla funzione della ghiandola prostatica sembra condizionata dalla sua successiva periferica bioconversione a DHT. Dalla rassegna di Cui (270) e dagli studi di Amory (127) e Borst (108) sopra ricordati infatti si evince come un trattamento associato con inibitori della 5 alfa reduttasi riesce a intercettare gli effetti su un tessuto, quello prostatico, che appare quindi fondamentalmente DHT dipendente.

Quanto alla capacità del Testosterone di stimolare in alcune particolari situazioni le cellule cancerose questa potrebbe essere realizzata inizialmente dalla sovraespressione di oncogeni capaci di trasformare cellule prostatiche normali in cellule immortali (271) o di inibire i normali processi di apoptosi (272). In un secondo momento la crescita delle cellule tumorali potrebbe essere sostenuta dagli androgeni attraverso la attivazione di fattori di crescita locali come Insulin-like Growth Factor e Keratinocyte Growth Factor (273, 274). Tutto ciò ha rappresentato un sufficiente substrato patogenetico per avvallare il concetto che il carcinoma della prostata si correli con l'incremento delle concentrazioni del Testosterone e che la rimozione (chirurgica o farmacologica) dell'androgeno possa rappresentare un utile strumento di controllo terapeutico come suggerito dalle lontane osservazioni di Huggins e Hodges (275).

Tuttavia negli ultimi decenni si sono moltiplicate osservazioni che hanno messo in discussione questo assunto. Cominciando da una banale considerazione epidemiologica che mette a confronto due curve età correlate ad andamento

speculare, quella in progressiva discesa della concentrazione del Testosterone e quella in progressiva ascesa della incidenza di carcinoma della prostata (276). Se il Testosterone fosse veramente "fuel for a fire" o "food for a hungry tumor", perchè i microfocolai di carcinoma prostatico evidenziabili nei referti bioptici di giovani uomini (277) non si clinicizzano in questa fase di clima androgenico ottimale?

E arriviamo così alle numerose segnalazioni di Trial clinici randomizzati e controllati relativo ai trattamenti sostitutivi ormonali che negli ultimi tempi si sono moltiplicati nel tentativo di tamponare i fenomeni dell'"aging male" che abbiamo sopra analizzato; in essi, tra gli eventi avversi sulla ghiandola prostatica, l'adenocarcinoma ha quasi sempre una incidenza sovrapponibile a quella registrata nei placebo.

Queste considerazioni sono allineate con le conclusioni di tre ricercatori autori di metanalisi che hanno centrato la attenzione in particolare sulle complicanze carcinomatose del trattamento sostitutivo con Testosterone. Mi riferisco alla metanalisi di Calof (64) che non abbiamo inserito nel nostro studio, come già si è detto, in quanto la selezione dei lavori non collima perfettamente con i criteri che ci siamo dato, specie per quanto concerne il dato anagrafico. Lo studio focalizza l'attenzione sul problema degli eventi avversi e per quanto concerne la incidenza del carcinoma della prostata non vengono segnalate differenze nella Odds ratio tra la media dei gruppi trattati con Te e quella dei soggetti placebo. Si allinea a queste osservazioni uno studio di revisione sistematica e metanalisi di Cui (270) che nella sua analisi comprende la maggior parte degli studi da noi considerati ma che in realtà include anche casistiche di soggetti in età molto più giovane di quella da noi presa in considerazione oltre a soggetti non definibili come "healthy" o non chiaramente ipogonadici. L'analisi relativa a 11 studi di trattamento "short term" (< 12 mesi) e a 11 di "long term" (12-36 mesi) mostra che in nessuna delle due situazioni si verificano incidenze diverse di carcinoma della prostata per i due trattamenti di Testosterone e placebo. Portano acqua a questo mulino anche le conclusioni dell'altra metanalisi di Fernández-Balsells (193) che pure non abbiamo inserito nel nostro studio perché tra i 51 lavori considerati ne sono compresi 9 che non rispettano i criteri anagrafici che ci siamo dati; nelle conclusioni l'incidenza del carcinoma prostatico dei soggetti trattati con Testosterone risulta sovrapponibile a quelli con placebo come risultano sovrapponibili i significativi incrementi del PSA e i cambiamenti dello score di IPSS.

Fatte queste considerazioni, mentre non si mette in discussione l'ipotesi che la castrazione chirurgica o farmacologica sia capace di far regredire le manifestazioni cliniche del carcinoma prostatico, resta invece in forte difficoltà per quanto esposto

sopra la seconda parte del vecchio assunto di Huggins che vedrebbe il Testosterone capace anche di promuovere e successivamente favorire la crescita del tumore.

Negli ultimi anni infatti si è giunti addirittura alle **ipotesi paradossali** che propongono il Testosterone come strumento utilizzabile nella prevenzione del cancro della prostata. Ricordo a tale proposito una review di studi clinici di Algarté-Genin (278) che ha dimostrato che bassi livelli di Testosterone libero si associano a cancri della prostata particolarmente aggressivi. La rimozione dell'effetto androgenico sul tessuto canceroso prostatico, secondo questi Autori, promuove nel breve termine un arresto della crescita tumorale, ma col passare del tempo le cellule si adatterebbero ai bassi livelli androgenici portando allo sviluppo di cellule tumorali androgeno-indipendenti molto più aggressive e spesso fatali. Più recentemente si è reso disponibile uno studio prospettico di Yassin (279) su di una coorte di 553 pazienti sottoposti a indagine bioptica suddivisa in un gruppo di eugonadici e in uno di ipogonadici a loro volta suddivisi in trattati con terapia sostitutiva e non trattati; la percentuale di biopsia positiva per carcinoma dei soggetti ipogonadici trattati era di gran lunga più bassa sia nei confronti degli ipogonadici non trattati che degli eugonadici a dimostrazione dell'effetto protettivo della terapia sostitutiva androgenica.

Non è agevole trovare una esauriente interpretazione per questi almeno apparentemente dissociati comportamenti del trattamento androgenico. Tra i molteplici tentativi proposti mi piace ricordarne due.

Uno di questi che parte da osservazioni lontane nel tempo (280) sottolinea per la oncogenesi prostatica il **ruolo del declino del clima androgenico** dell'uomo che invecchia; questo fenomeno infatti si rende responsabile di una progressiva atrofia della prostata che si può accompagnare a isole di iperplasia compensatoria sempre meno dipendenti dal controllo androgenico e più suscettibili a cambiamenti oncogenici. Lo sviluppo e la crescita tumorale potrebbe poi essere addirittura inibita da un incremento del clima androgenico. Secondo la **teoria della "biphasic androgen action hypothesis"** suggerita da Sonneschein (281) infatti la potenziale intrinseca proliferazione cellulare prostatica sarebbe attivata da livelli androgenici fisiologici (blocco dei fattori serici che a loro volta inibiscono la proliferazione cellulare) e per contro sarebbe inibita in modo diretto da livelli androgenici elevati. Un comportamento che richiama intriganti analogie con la ben documentata azione bifasica degli Estrogeni sul tumore mammario.

Una seconda interpretazione la **"saturation hypothesis"** è quella caldeggiata da Morgentaler (276) e Corona (282) che riprendono vecchi suggerimenti di Fowler e Whitmore (283); secondo questi ricercatori livelli normali di concentrazione del

Testosterone sono sufficienti a soddisfare la potenzialità massima di stimolazione cellulare mentre al di sotto di questi livelli e quindi in condizioni di ipogonadismo, tale punto di saturazione dei recettori androgenici non sarebbe raggiunto e vi sarebbe spazio per una sicura androgeno-dipendenza per la proliferazione neoplastica delle cellule prostatiche. Con l'azzeramento della concentrazione androgenica realizzato con la castrazione, la condizione di minima saturazione recettoriale può provocare sostanziali stimoli alla crescita del carcinoma prostatico. Per contro a seguito di una supplementazione androgenica con concentrazioni di Testosterone appena nel range fisiologico si può raggiungere il punto di saturazione recettoriale; un ulteriore incremento di concentrazione dell'androgeno esogeno troverebbe una situazione recettoriale sfavorevole per indurre sul tessuto prostatico le sue specifiche attivazioni (276).

O Altri effetti del Testosterone

Nella letteratura medica altri effetti del Testosterone, sia a livelli sovralfisiologici che di terapia sostitutiva, sono stati descritti, effetti tuttavia di relativa incidenza e che raramente sono stati oggetto di attenzione nei trial clinici da noi presi in considerazione.

Degna di attenzione in primo luogo è la potenziale **epatotossicità** di alcune formulazioni di Testosterone. Cominciamo col ricordare che alcune documentazioni nell'animale da esperimento provano che il Testosterone in condizioni fisiologiche influenza pesantemente la sintesi epatica di enzimi e proteine specifiche di trasporto coinvolti nel metabolismo degli ormoni steroidei (284) per passare poi a sottolineare il ruolo che il Testosterone potrebbe svolgere nella patogenesi del carcinoma epatocellulare. Studi in vitro infatti confermano una particolare espressione di recettori androgenici nelle cellule dell'epatocarcinoma (285,286); inoltre la somministrazione di antiandrogeni sarebbe capace di inibire la crescita di questo tumore (287). E' infine provato che il Testosterone endogeno in studi prospettici si associa in modo indipendente col rischio di epatocarcinoma in pazienti portatori di epatite B o affetti da cirrosi epatica epatite C dipendente (288). Se passiamo ora a considerare nella letteratura le osservazioni relative alla somministrazione di formulazioni di androgeni diversi dall'ormone nativo e in particolare i derivati 17-alfa-alchilati si ricorda che essa può provocare lesioni epatiche simili a quelle promosse dagli estrogeni quali tumori, peliosi epatica e colostasi intraepatica (289,290,291,292,293). Si tratta in taluni casi di lesioni reversibili che regrediscono dopo la sospensione del trattamento mentre in alcuni altri la patologia progredisce fino alla insufficienza epatica (294). A incidere su queste complicanze il dosaggio e la durata del trattamento non sembrano importanti quanto invece il tipo della formulazione di androgeno utilizzata. Infatti gli esteri del Testosterone somministrati per via intramuscolare e in dosaggi sostitutivi non parrebbero capaci di

epatotossicità (295). Nessun evento avverso a livello epatico infine è stato documentato utilizzando Testosterone micronizzato in pazienti affetti da cirrosi alcolica anche ricorrendo a dosaggi soprafisiologici (296).

Come si è anticipato negli studi RCT da noi considerati nella popolazione anziana le osservazioni relative agli eventi avversi a livello epatico sono molto scarse e quindi insufficienti per valutare la forza di evidenza del fenomeno. In nessuno dei lavori considerati in questa rassegna gli indici di funzionalità epatica sono stati inclusi tra gli outcome primari. Solo in cinque di questi sono stati presi in considerazione nella analisi degli outcome secondari o degli eventi avversi. Sih (89) con un trattamento intramuscolare di Testosterone cipionato protratto per 12 mesi non ha evidenziato alcun movimento della Transaminasi ALT, di LDH e di GGT inclusi tra gli outcome secondari. Ferrando (111) con un trattamento intramuscolare di Testosterone enantato protratto per 6 mesi non segnala alcun movimento delle Transaminasi ALT e AST. Emmelot-Vonk (100) con un trattamento orale di Testosterone undecanoato protratto per 6 mesi non segnala alcun movimento delle Transaminasi ALT e AST, della Fosfatasi alcalina e delle GGT; un solo soggetto tra i 120 trattati con Testosterone è uscito dallo studio tra il terzo e sesto mese per aumento degli enzimi epatici. Legros (148) con un trattamento orale di Testosterone undecanoato protratto per 12 mesi non segnala nei soggetti che hanno terminato lo studio alcun movimento degli indici di funzionalità epatica (ALT, AST, bilirubina e gammaGT). A complemento si ricorda che Konaka (69) con un trattamento intramuscolare di Testosterone enantato protratto per 12 mesi in una casistica non completamente geriatrica non riscontra alcun significativo cambiamento degli enzimi epatici (Transaminasi ALT e AST e GGT); dei 169 soggetti del braccio trattato uno solo è uscito dallo studio alla sedicesima settimana per una lieve disfunzione epatica. Nel complesso si può concludere che le ripercussioni sulla funzionalità epatica sono risultate praticamente irrilevanti.

Un altro potenziale evento avverso della terapia sostitutiva con Testosterone è rappresentato dalla induzione o peggioramento di una condizione di **apnea notturna**, evento non completamente inaspettato se consideriamo che i disturbi del ritmo respiratorio sono notoriamente più frequenti nel sesso maschile. Alcuni trial non controllati di trattamenti sostitutivi con Testosterone ne sono conferma (297,298,299).

Nella rassegna degli studi RCT da noi considerati nella popolazione anziana tale problema raramente è stato oggetto di valutazione. Il più significativo è lo studio di Snyder (90) che con un trattamento transdermico di Testosterone protratto per tre anni non ha evidenziato alcun significativo cambiamento nel numero di episodi di apnea o ipopnea durante il sonno. Va ricordato invece che

nello studio di Konaka (69) condotto con terapia sostitutiva di Testosterone enantato per via intramuscolare protratto per 12 mesi in una popolazione tuttavia non esclusivamente geriatrica due soggetti su 169 trattati hanno interrotto la sperimentazione alla 16ma e 28ma settimana per la comparsa di episodi di apnea notturna. A complemento può essere utile segnalare altre due osservazioni relative a RTC condotte su popolazioni in parte in età giovane-adulta. Calof (64) in uno studio di metanalisi che utilizza 19 trial RCT non segnala alcuna differenza significativa tra i gruppi trattati e non trattati. Identica conclusione per lo studio di Guo (68), una metanalisi che utilizza 16 trial clinici RCT. Anche per tale evento avverso dopo queste considerazioni sopra esposte siamo tenuti a minimizzarne il significato.

P Ipotesi di terapie sostitutive

La scelta della formulazione più adatta, considerato l'obiettivo terapeutico che si vuole raggiungere e l'effetto indesiderato che si vuole evitare, presuppone una premessa sul metabolismo periferico del Testosterone. Lo steroide sui tessuti della periferia può agire come tale legandosi a specifici recettori, previa bioconversione a DHT usando gli stessi recettori o previa aromatizzazione a estrogeni utilizzando recettori estrogenici. Ciascuno di questi tre steroidi mostra affinità differenziate sui tessuti della periferia. Molto schematicamente possiamo classificarli nel modo seguente.

I principali potenziali benefici **del Testosterone come tale** sono sul trofismo della massa muscolare (quindi sulla forza muscolare), sul sistema scheletrico (quindi sulla densità minerale ossea), sul tessuto cerebrale e sul midollo osseo (quindi sulla eritropoiesi); i potenziali rischi saranno rappresentati dalla eritrocitosi e dalla apnea notturna. I principali potenziali benefici **del DHT** sono indirizzati sulla funzione riproduttiva (sulla prostata in particolare), sul tessuto cutaneo, sull'apparato pilifero e probabilmente anche sul midollo osseo; i rischi potenziali sono rappresentati soprattutto dalle displasie prostatiche. Il **Testosterone aromatizzato a estrogeni** infine è efficace sul sistema scheletrico e sul cervello; effetti estrogeno mediati sembrano inoltre esercitati sulla regolazione del sistema GH - IGF-1, sul metabolismo glicidico e sulla stabilità vasomotoria. I principali potenziali benefici degli estrogeni sono concentrati sulla densità minerale ossea e sulla componente ideaffettiva della sessualità mentre i rischi potenziali si limitano alla comparsa di ginecomastia (300). Diviene comprensibile pertanto dopo queste premesse che l'effetto farmacologico, a seconda degli obiettivi che si vogliono raggiungere, possa essere artificialmente modificato bloccando il processo di aromatizzazione o la bioconversione a DHT inibendo la 5 alfa reduttasi.

Fatte queste premesse possiamo convenire che in generale una preparazione ottimale di Testosterone dovrebbe possedere numerose caratteristiche. Dovrebbe essere capace di antagonizzare i segni clinici dell'ipogonadismo che sono prevalenti

(scegliendo quindi la formulazione più adatta fra le tre sopra ricordate), essere priva di importanti effetti collaterali, essere in grado di ricostruire il profilo fisiologico giornaliero dello steroide, essere facile da somministrare e infine non essere particolarmente costosa. Purtroppo, tra le formulazioni disponibili a oggi, è assai problematico trovarne una capace di rispondere contemporaneamente a tutti questi requisiti.

Formulazioni di Testosterone disponibili

a) Preparazioni iniettabili Le principali preparazioni di questo capitolo sono rappresentate da **Testosterone esterificato in posizione 17 beta**. La esterificazione in posizione 17 beta rende la molecola idrofobica e solubile invece in veicoli oleosi da cui viene rilasciata lentamente. Questo dà giustificazione della lunga durata di effetto di queste formulazioni (301,302). La esterificazione avviene con formazione di catene laterali a diverso numero di atomi di carbonio. Si hanno così diverse formulazioni di Testosterone: propionato, enantato, isocaproato, cipionato (non approvato per l'uso in Italia) e undecanoato. Quest'ultima formulazione si caratterizza per una lunga catena di ben 11 atomi carbonio che condiziona un prolungamento dell'effetto biologico di circa 10 settimane a fronte delle 2-4 settimane del Testosterone propionato, enantato e cipionato. Alcune di queste formulazioni vengono commercializzate sia in modo isolato e sia in variabili combinazioni fra di loro. Vengono tutte somministrate per via intramuscolare evitando così nel processo assorbitivo il primo impatto epatico. Dopo la somministrazione l'estere viene idrolizzato proprio in prossimità del punto di iniezione e diviene metabolicamente identico al Testosterone endogeno. In questo modo la adeguatezza della posologia può essere valutata misurando la concentrazione ematica del Testosterone. Va rilevato comunque che la somministrazione intramuscolare comporta inevitabili fluttuazioni di concentrazione dell'androgeno accompagnate da simili cambiamenti nelle risposte cliniche. Dopo 24 ore dalla somministrazione si raggiungono picchi normali o sovralfisiologici seguiti da progressiva discesa dello steroide fino a livelli di ipogonadismo nel prosieguo dei giorni ("roller coaster effect") (303,304). Si dissocia da questo comportamento il Testosterone undecanoato che, somministrato nel dosaggio di 1000 mg, si caratterizza per la assenza di picchi sovralfisiologici iniziali e per il mantenimento a seguire di concentrazioni molto stabili per 8-10 settimane. La comodità dell'impiego è sicuramente un elemento positivo; tuttavia la lunga inarrestabile esposizione al farmaco diventa un grosso problema in caso di comparsa di effetti indesiderati specie nella persona anziana (305,306).

b) Preparazioni orali. Queste comprendono due gruppi fondamentali, quelli di Testosterone 17 alchilato e quello di Testosterone undecanoato.

1) Fanno parte del primo gruppo il **Fluoximesterone** ed il **Metiltestosterone** insieme al **Mesterolone** che a differenza degli altri è derivato dal diidrotestosterone. La alchilazione in posizione 17 indispensabile per l'effetto biologico provoca una lenta degradazione a livello del fegato che peraltro nei trattamenti prolungati nel tempo subisce danneggiamenti e compromissioni funzionali (307). Il gruppo di alchilazione inoltre non viene rimosso durante la clearance metabolica e mantiene la sua presenza nei prodotti di degradazione e escrezione. La maggior parte dei derivati alchilati di Testosterone pertanto interagisce molto debolmente con l'anticorpo per il Testosterone e ciò compromette la possibilità di procedere alla determinazione ematica delle concentrazioni dello steroide (308). Diviene perciò problematico il monitoraggio laboratoristico e il conseguente assestamento posologico, essendo lo specifico dosaggio del composto alchilato molto laborioso e quindi poco praticabile. Queste problematiche hanno finito per accantonare questa strategia terapeutica in caso di trattamenti da prolungare nel tempo.

2) Il **Testosterone undecanoato** può essere somministrato oralmente col cibo. La sua lunga catena di atomi di carbonio conferisce idrofobicità per cui l'assorbimento preferenziale avviene per via linfatica con successivo ingresso nel torrente circolatorio; viene perciò evitato il primitivo impatto epatico. Il prodotto è generalmente ben tollerato e pressochè privo di effetti collaterali anche per lunghi periodi di somministrazione. A causa tuttavia della sua breve emivita è consigliabile che il trattamento avvenga con almeno due somministrazioni giornaliere. Va rimarcato infine che il processo assorbitivo varia da soggetto a soggetto per cui con lo stesso dosaggio si possono ottenere livelli ematici di Testosterone differenziati. Una recente preparazione si avvale di una miscela di "castor oil and propylene glicol laurate" che ha risolto il problema della scarsa stabilità a temperatura ambiente (309).

c) Preparazione buccale. Il Testosterone è complessato con ciclodextrina una sostanza che facilita l'assorbimento dalla mucosa sublinguale frequentemente utilizzata per le molecole steroidee; il picco ematico viene raggiunto dopo 20 minuti seguito da un progressivo decremento di concentrazione fino a un ritorno ai valori di base dopo 4-6 ore, il chè può comportare la necessità di multiple somministrazioni giornaliere (310). Le tavolette di Testosterone vanno fatte aderire alla mucosa gengivale col ritmo di una applicazione ogni 12 ore. Il sistema consente un ingresso dello steroide direttamente nel circolo sistemico evitando il primo impatto epatico. La rimozione della tavoletta fa scendere il livello sotto la norma entro 4 ore consentendo una regressione completa quando necessaria. Il preparato consente di

mimare il ritmo circadiano provocando un picco al momento della seconda dose senza che si registrino fenomeni di accumulo col passare del tempo. Il prodotto sembra essere ben tollerato anche se in circa il 18% dei soggetti vengono segnalate irritazioni della mucosa sul punto di applicazione. Un sistema quindi assolutamente non invasivo con la caratteristica del minimo rischio di trasferimento secondario a donne e bambini.

d) Preparazione nasale. Si tratta di un gel che deve essere assorbito dalla mucosa nasale da poco approvato dalla FDA negli Stati Uniti che potrà essere a breve anche in Italia (311). La somministrazione viene effettuata ricorrendo ad un apposito dispositivo procedendo con due applicazioni (una per narice) tre volte nelle 24 ore per una dose totale di 33 mg. Tra i vantaggi va ovviamente ricordato che lo steroide evita nell'assorbimento il primo impatto epatico; tra gli svantaggi vanno ricordati il numero frequente di applicazioni e i possibili episodi di irritazione della mucosa nasale.

e) Preparazione sottocutanea in pellets. Si tratta di Testosterone cristallino contenuto in formazioni granulari che consentono attraverso una uniforme erosione della superficie una lenta dispersione dello steroide nel fluido extracellulare del sottocute delle anche (312). Questi pellet sono a variabile contenuto di Testosterone e vengono rinnovati a intervalli di 3 - 6 mesi. Tra gli eventi avversi più comuni vanno ricordati episodi di estrusione del pellet e fenomeni di infezione o fibrosi nel punto di inserzione. La somministrazione è comunque invasiva e richiede incisione della cute previa anestesia locale. Il prodotto è da tempo in uso negli Stati Uniti.

f) Preparazioni transdermiche. Dal 1980 si è resa disponibile questa nuova via di somministrazione. La prima proposta che consisteva in patches che si applicavano sulla cute dello scroto ha lasciato il posto a formulazioni da applicare alla cute non genitale; l'abbandono della prima proposta aveva diverse motivazioni quale la eccessiva bioconversione a DHT per la abbondante concentrazione di 5 alfa reduttasi propria della cute scrotale e soprattutto la scarsa praticità di questo tipo di applicazione. Anche la seconda proposta di applicazioni sulla cute non genitale è stata in breve accantonata per i frequenti fenomeni dermatitici facilitati dalla aggiunta al patch di sostanze attivatrici dell'assorbimento per migliorare la biodisponibilità (313,314,315). Nei primi anni del 2000 si sono rese disponibili diverse formulazioni idroalcoliche in gel a concentrazioni di 1 o 2% in grado di somministrare dosi differenziate di Testosterone da 10 a 100 mg quasi tutte disponibili anche in Italia (316). Diverse proposte si sono avvicinate nell'ultimo decennio; dalle bustine monodose a diversi dosaggi (50 o 100 mg) da spalmare manualmente sulla cute fino ad un'ultima che si caratterizza per essere un gel

idroalcolico ad alta viscosità munito di un particolare dispenser che regola il dosaggio di Testosterone da 23 fino a 69 mg e che rende possibile l'applicazione senza diretto contatto con le mani dell'operatore; un nuovo sistema quindi che esalta la permeabilità e che garantirebbe un rapido assorbimento utilizzando un minimo volume per ogni applicazione. Ciò ridurrebbe al minimo il rischio di esposizione secondaria. Da ricordare anche una proposta in soluzione all'1% con buona biodisponibilità e ottima tollerabilità anch'essa munita di un dispenser simile a quello appena ricordato.

I vantaggi più consistenti di queste ultime proposte sono la buona tollerabilità e la possibilità di personalizzare la posologia; il tipo di somministrazione inoltre consentirebbe di rispettare la fisiologica fluttuazione circadiana dello steroide. Resta l'inconveniente del trasferimento secondario a donne o bambini che vengano a contatto con la cute del paziente, inconveniente che si manifesta tuttavia con una variabile incidenza nelle diverse proposte di preparazioni transdermiche.

g) Ulteriori formulazioni non disponibili in Italia. Per completezza è opportuno ricordare che altre formulazioni sia a lento che pronto rilascio sono state approntate anche se non disponibili in Italia. E' il caso del **Testosterone buciclato** (esterificato in posizione 17 beta) somministrato intramuscolo in dosaggi da 600 o 1000 mg a intervalli rispettivamente di 3 e 4 mesi con concentrazioni ematiche sufficientemente stabili nel tempo (317,318). L'utilizzo di questa formulazione sembra tuttavia essere stata confinata al blocco della spermatogenesi nel capitolo della contraccezione maschile. Un'altra proposta è quella del **Testosterone in microsfere** iniettate per via intramuscolare nella dose di 315 mg ogni 10-11 settimane (319).

A complemento di quanto detto va ricordato che vi sarebbero **altre possibilità** per incrementare la disponibilità di Testosterone.

1) Una è rappresentata dalla possibilità di fare incrementare il Testosterone endogeno stimolando le cellule di Leydig con **Gonadotropine**: la Gonadotropina LH normalmente prodotta dalle specifiche cellule ipofisarie e la Gonadotropina corionica HCG prodotta invece elettivamente da cellule della placenta durante la gravidanza e in minima parte anche dalle cellule ipofisarie in ambo i sessi. Sono entrambe composte da due subunità alfa e beta; la subunità alfa ha dimensioni sovrapponibili con identico numero di aminoacidi, 92 per entrambe, mentre la subunità beta ha una sequenza di 121 aminoacidi per LH e 145 per HCG. Queste differenze strutturali sono alla base della diversa emivita che è nell'ordine di minuti per LH e di ore per HCG. I recettori riconosciuti nella periferia sono identici anche se

la affinità di binding per HCG è superiore a quella di LH. Sulla base di queste considerazioni si può affermare che la Gonadotropina HCG sia biologicamente più attiva rispetto a LH. La disponibilità di queste Gonadotropine è garantita da formulazioni di natura estrattiva soppiantate più recentemente da quelle artificialmente prodotte in laboratorio da colture di cellule in vitro geneticamente modificate mediante la tecnologia del DNA ricombinante. L'utilizzo di queste strategie per il problema da noi preso in considerazione non ci pare tuttavia proponibile poiché si dovrebbe ricorrere infatti al disagio di troppo frequenti somministrazioni per via parenterale. Inoltre con tale procedura si porrà il problema di una responsività di cellule di Leydig più o meno compromesse di soggetti in età avanzata (320).

2) Una seconda possibilità si riallaccia al riscontro nella recente letteratura di osservazioni che dimostrano la capacità di alcuni macronutrienti e micronutrienti di interferire sul metabolismo periferico del Testosterone. E' così che in ipotesi sulla base di alcune particolari manipolazioni nutrizionali si potrebbe pensare di incrementare la concentrazione ematica dello steroide. A seguire ecco alcune esemplificazioni significative.

Vi sono alcuni nutrienti che si è dimostrato essere capaci di incrementare la concentrazione del Testosterone inibendo l'aromatasi e quindi riducendo la metabolizzazione del Testosterone a estrogeni. E' il caso di una pianta la **Brassaiopsis glomerulata (ginseng)** (321), di alcuni **vini rossi (cabernet sauvignon)** (322) che sarebbero anche in grado in alcuni casi di ridurre la concentrazione della SHBG e quindi di incrementare la quota libera di Testosterone e infine di alcuni **funghi champignon** (323) e degli **estratti dei fiori del trifoglio** (324). Nella maggior parte di queste situazioni la capacità antiaromatasi sembra riconducibile alla presenza di flavonoidi, sostanze per le quali questa capacità di modulazione di funzioni enzimatiche come la aromatasi si associa alle ben note proprietà antiossidanti, antiinfiammatorie e antimutagene. Particolarmente importante è la attività anti aromatasi di un flavonoide, la **crisina**, presente in alte concentrazioni nel **miele** e nella **propoli** (325). Un micronutriente che sembra condizionare in modo diretto a livello delle cellule di Leydig la sintesi del testosterone è rappresentato dalla **vitamina D** svolgendo un ruolo di proormone considerata la sua struttura molecolare simile a quella del Colesterolo; è noto il riscontro di bassi livelli di Testosterone nei soggetti carenti di questa vitamina (326). Per concludere vorrei far cenno anche al ruolo di alcuni minerali come lo **Zinco** e il **Magnesio**. Il ruolo dello **Zinco** nella economia generale del Testosterone sembra sia legato al coinvolgimento diretto di questo minerale nel processo di sintesi e secrezione di LH oltre che nella conversione del Testosterone a DHT (327). Viene suggerito tuttavia anche un

meccanismo indiretto rappresentato dalla capacità dello Zinco di attivare la sintesi di ACE (Angiotensin-Converting Enzyme) a sua volta capace di stimolare la sintesi di LH (328,329). Quanto al **Magnesio** va ricordato che diverse ricerche hanno documentato una stretta correlazione positiva tra livelli di Magnesio e Testosterone in particolare nei soggetti anziani (330,331,332). Il meccanismo responsabile di questa correlazione sembrerebbe essere più indiretto che diretto. E' noto infatti che il Magnesio svolge un ruolo importante nel ridurre lo stress ossidativo (333) e che lo stress ossidativo a sua volta può influenzare negativamente la concentrazione ematica di Testosterone (334); una concentrazione ottimale di Magnesio può pertanto contribuire a mantenere ottimali i livelli di Testosterone anche nei periodi di stress ossidativo. Va ricordato inoltre che bassi livelli di Magnesio si possono associare ad aumento dei fattori proinfiammatori come citochine, tumor necrosis factor alfa (TNF alfa) e interleukina 1 (IL-1) (335) capaci a loro volta di interferire negativamente sulla sintesi del Testosterone a livello della cellula di Leydig (336). Ne consegue che una supplementazione di Magnesio, oltre a ridurre lo stato infiammatorio, può interferire positivamente sulla concentrazione ematica del Testosterone. Infine il Magnesio sembra capace di inibire con una sorta di meccanismo competitivo la capacità di binding della SHBG sul Testosterone incrementando quindi la quota di Testosterone biodisponibile (337).

Q Raccomandazioni

Dopo quanto si è esposto, anche se non vi sono ancora i presupposti per formulare delle vere e proprie "linee guida" su questa tematica, riteniamo che almeno si possa suggerire una serie di raccomandazioni allo scopo di portare chiarezza sul problema del "se e come" procedere alla terapia sostitutiva con Testosterone nell'anziano.

1) Per i soggetti anziani di sesso maschile la prima condizione per poter essere considerati idonei per un trattamento sostitutivo è che sia presente qualcuno dei classici segni clinici di ipogonadismo che abbiamo descritto in precedenza. Uno dei sintomi più frequentemente riscontrato è la riduzione della libido. Altri segni importanti sono rappresentati dalla disfunzione erettile, dalla diminuzione della massa e della forza muscolare, dall'aumento della massa grassa, dalla riduzione della densità minerale ossea, dalla diminuzione della vitality e dal peggioramento del tono dell'umore. L'utilizzo di un questionario tipo AMS (Aging Male Symptom Score) o ADAM (Androgen Deficiency in Aging Man) potrebbe essere di aiuto anche se è provata per entrambi una scarsa specificità. Dopodichè è indispensabile la conferma laboratoristica offerta da una concentrazione di Testosterone Totale inferiore ai 7 nmol/L; quando i valori sono compresi tra 7 e 11 nmol/L il dosaggio del Testosterone libero o biodisponibile potrebbe essere raccomandato, insieme ad una accurata e approfondita valutazione del quadro clinico. Una volta formulata la diagnosi di ipogonadismo diventa utile discriminare se si tratta di un ipogonadismo idiopatico età correlato o secondario invece ad una importante disendocrinia, ad una causa iatrogena, ad una alimentazione anomala, ad uno scorretto stile di vita; tutto ciò al fine di impostare un programma terapeutico adeguato.

2) La indicazione alla terapia sostitutiva è facilitata dalla considerazione che la dimostrazione di efficacia clinica a tutt'oggi è stata scientificamente documentata, come si è detto nei capitoli precedenti, per alcuni parametri clinici come la massa e la forza muscolare, la massa grassa, la attività eritropoietica, il well being e il comportamento sessuale. Restano invece ancora alcune incertezze per quanto riguarda gli effetti positivi sul metabolismo glicidico e quello di riduzione dei livelli

del colesterolo totale, delle lipoproteine LDL e HDL. Ancora nebulose infine sono le ripercussioni sul sistema cardiovascolare. Perciò per questi ultimi settori sono ancora indispensabili nuovi contributi di clinica sperimentale. Ulteriori esperienze cliniche sono pure auspicabili per la condizione di ipogonadismo indotta dallo stress chirurgico nell'anziano ove una adeguata supplementazione ormonale potrebbe garantire prognosi postchirurgiche assai più favorevoli.

3) Alla luce di quanto esposto nei capitoli precedenti dobbiamo segnalare la evidenza di alcune controindicazioni.

a) Come si è approfondito nel capitolo dedicato in precedenza agli effetti del trattamento sul tessuto prostatico il ruolo del Testosterone come fattore di rischio per le displasie sia benigne che maligne è stato notevolmente ridimensionato nella ricerca clinica degli ultimi anni. Infine nella nostra rassegna sopra esposta gli effetti sul volume della ghiandola, quelli sui livelli di PSA e i riscontri di degenerazione carcinomatosa in corso di trattamento non mostrano movimenti significativi. Dobbiamo ammettere tuttavia che ci sono nella letteratura evidenze significative che il Testosterone può stimolare la crescita e peggiorare la sintomatologia clinica di un cancro prostatico specie se in fase avanzata o in evoluzione metastatica. Si preferisce perciò prudenzialmente controindicare il trattamento a tutti quei pazienti che possono essere definiti a rischio di cancro della prostata. Il dosaggio del PSA, la esplorazione prostatica digitale, la ecografia transrettale ed eventualmente una risonanza magnetica multiparametrica sono gli strumenti consigliati per una corretta valutazione. Il sospetto clinico di cancro sarà una controindicazione assoluta al trattamento. La ipertrofia prostatica benigna con segni moderati o severi di ostruzione (IPSS score > 30) si può invece definire una controindicazione relativa. Da ricordare infine che il valore del PSA e il riscontro palpatorio alla esplorazione rettale insieme ad alcune informazioni anamnestiche possono essere utilizzati per costruire modelli matematici disponibili per il clinico finalizzati a valutare la percentuale di rischio cancerogeno (338).

b) Considerati gli effetti sicuramente documentati del trattamento con Testosterone sulla eritropoiesi, il riscontro di un ematocrito superiore al 52% e/o di Emoglobina superiore 17,5 g/dL a cui è legato il rischio del tromboembolismo possono rappresentare una controindicazione assoluta, fermo restando tuttavia che al contrario una condizione di anemia si può configurare come una indicazione al trattamento.

c) Un' altra controindicazione relativa può essere individuata nei quadri dislipidemici con bassi livelli di HDL in via prudenziale non essendo ancora ben definito il ruolo del Testosterone in questo settore del metabolismo lipidico. Stessa considerazione per i riscontri laboratoristici di epatite C e B e per i soggetti obesi

soprattutto con disturbi respiratori a tipo di apnea notturna.

4) Quanto al follow up clinico sulla base delle considerazioni sopra esposte questo dovrebbe comprendere:

a) esplorazione rettale della ghiandola prostatica ogni tre mesi nel corso del primo anno di trattamento

b) determinazione del PSA ematico ogni tre mesi nel corso del primo anno del trattamento e annualmente in seguito, ricordando che un incremento di 2.0 ng/ml in un qualunque riscontro o l'incremento di 0.75 ng/ml per anno possono rappresentare una valida indicazione per la sospensione del trattamento

c) determinazione dell'ematocrito e del profilo lipoproteico ogni tre mesi nel corso del primo anno di trattamento e annualmente in seguito, ricordando che un aumento del valore di ematocrito superiore a 52% e un peggioramento del profilo lipoproteico possono rappresentare una valida indicazione per la sospensione del trattamento.

Bibliografia

- 1) Gray A, Berlin JM, McKinlay JB, Longcope C. An examination of research design effects on the association of testosterone and male aging: results of a meta-analysis. *J Clin Epidemiol* 1991;44:671-84.
- 2) Gray A, Feldman HA, McKinlay JB, Longcope C. Age, disease and changing of sex hormone levels in middle-aged men: results of the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1991;73:1016-25.
- 3) Valenti G. The pathway of partial androgen deficiency of aging male. *J Endocrinol Invest* 2005;28:28-33.
- 4) Morley JE, Kaiser FE, Perry HM 3rd, Patrick P, Morley PM, Stauber PM, Vellas B, Baumgartner RN, Garry PJ. Longitudinal changes in testosterone, luteinizing hormone, and follicle-stimulating hormone in healthy older men. *Metabolism* 1997 Apr;46(4):410-3.
- 5) Harman SM, Metter EJ, Tobin JD, Pearson J, Blackman MR. Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:724-31.
- 6) Vermeulen A, Kaufmann JM, Giagulli VA. Influence of some biological indices on sex hormone binding globulin and androgen levels in aging and obese males. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1921-7.
- 7) Valenti G, Gontero P, Saccò M, Fontana F, Strollo F, Castellucci A & Heinemann LAJ. Harmonized Italian version of the Aging Males' Symptoms scale. *The Aging Male* 2005;8:180-183.
- 8) Lunenfeld B, Mskhalaya G, Zitzmann M, Arver S, Kalinchenko S, Tishova Y and Morgentaler A. Recommendations on the diagnosis, treatment and monitoring of hypogonadism in men. *The Aging Male* 2015;18:5-15.
- 9) Zengerling F, Schrader AJ, Cronauer MV, Stemann H, Schrader M, Rinnab L. The "Aging Males' Symptoms" Scale (AMS): predictive value for lowered circulating androgens. *The Aging Male* 2012;15:253-7.
- 10) Lee CP, Jiang JR, Chen Y, Chu CL, Hsu SC, Chen CL, Chen CY. The "Aging Males' Symptoms" (AMS) Scale assesses depression and anxiety. *The Aging Male* 2013;16:97-101.

- 11) Moore C, Huebler D, Zimmermann T, Heinemann LA, Saad F, Thai DM. The Aging Males' Symptoms scale (AMS) as outcome measure for treatment of androgen deficiency. *Eur Urol* 2004;46:80-7.
- 12) De Wit AE, Bosker FJ, Giltay EJ, de Kloet CS, Roelofs K, van Pelt J, Penninx BWJH, Schoevers RA. Testosterone in human studies: Modest associations between plasma and salivary measurements. *Andrologia* 2018;50:e12779.
- 13) Wu FC, Tajar A, Beynon JM, Pye SR, Silman AJ, Finn JD, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Forti G, Giwercman A, Han TS, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Boonen S, Vanderschueren D, Labrie F, Huhtaniemi IT; EMAS Group. Identification of late-onset hypogonadism in middle-aged and elderly men. *N Engl J Med* 2010;363:125-35.
- 14) Wang C, Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Hellstrom WJ, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B, Morales A, Morley JE, Schulman C, Thompson IM, Weidner W, Wu FC. ISA, ISSAM, EAU, EAA and ASA recommendations: investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males. *Int J Impot Res* 2009;21:1-8.
- 15) Valenti G, Ceda GP, Ceresini GP, Denti L, Fontanesi P, Banchini A, Tarditi E, Marchini L, Daccò L, Ferretti G, Padula P. Profilo neuroendocrino in corso di invecchiamento cerebrale normale. *Giorn Geront* 1990;38:539-551.
- 16) Bremner WJ, Vitiello MV, Prinz PN. Loss of circadian rhythmicity in blood testosterone levels with aging in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;56:1278-81.
- 17) Deslypere JP, Kaufman JM, Vermeulen T, Vogelaers D, Vandalem JL, Vermeulen A. Influence of age on pulsatile luteinizing hormone release and responsiveness of the gonadotrophs to sex hormone feedback in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:68-73.
- 18) Muta K, Kato K, Akamine Y, Ibayashi H. Age-related changes in the feedback regulation of gonadotrophin secretion by sex steroids in men. *Acta Endocrinol* 1981;96:154-62.
- 19) Hoffman GE, Sladek JR Jr. Age-related changes in dopamine, LHRH and somatostatin in the rat hypothalamus. *Neurobiol Aging* 1980;1:27-37.
- 20) Simpkins JW, Millard WJ. Influence of age on neurotransmitter function. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987;16:893-917.
- 21) Blackman MR. Pituitary hormones and aging. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987;16:981-94.

- 22) Valenti G, Tarditi E, Roti E, Vescovi PP, Bernasconi S, Chiodera P, Polotti R. Comportamento della risposta ipofisaria al GnRH nella pubertà e senilità normali. *Atti Giornate Endocrinologiche Senesi* 1975;276.
- 23) Valenti G, Tarditi E, Ceda GP, Banchini A, Vescovi PP, Chiodera P, Butturini U. The LH/FSH ratio under basal conditions and after stimulation with GnRH in subjects with primary hypogonadism. *Ann Endocrinol* 1976;37:63-73.
- 24) Marrama P, Montanini V, Celani MF, Carani C, Cioni K, Bazzani M, Cavani D, Baraghini GF. Decrease in luteinizing hormone biological activity/immunoreactivity ratio in elderly men. *Maturitas* 1984;5:223-31.
- 25) Montanini V, Celani MF, Baraghini GF, Cioni K, Carani C, Bazzani M, Lagana AL, Tasselli AR, Cavani D, Diazzi G, Marrama P. Age-related male hypogonadism: possible role of changes in LH biological activity/immunoreactivity (B/i) ratio. *J Endocrinol Invest* 1983;6:118.
- 26) Tenover JS, Dahl KD, Hsueh AJ, Lim P, Matsumoto AM, Bremner WJ. Serum bioactive and immunoreactive follicle-stimulating hormone levels and the response to clomiphene in healthy young and elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;64:1103-8.
- 27) Wide L. Median charge and charge heterogeneity of human pituitary FSH, LH and TSH: relationship to sex and age. *Acta Endocrinol* 1985;109:190-7.
- 28) Ceda GP, Denti L, Ceresini G, Dotti G, Valenti G. Age-related changes of alpha-subunit and LH in healthy man. *Ares-Serono Symposia IV International Congres of Andrology* 1989;41.
- 29) Tsitouras PD. Effects of age on testicular function. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1987;16:1045-59.
- 30) Albeaux-Fernet M, Bohler CSS, Karpas AE. Testicular function in the aging male. *Geriatric Endocrinology* 1978;201.
- 31) Nicod P, Burger A, Staeheli V, Vallotton MB. Radioimmunoassay for 3,3',5'-triiodo-L-thyronine in unextracted serum: method and clinical results. *J Clin Endocrinol Metab* 1976;42:823-9.
- 32) Khoury SA, Sowers JR. Age related changes in sexual function. *Endocrinology of Aging* 1988;113.
- 33) Sparrow D, Bosse R, Rowe JW. The influence of age, alcohol consumption, and body build on gonadal function in men. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:508-12.
- 34) Baker HW, Burger HG, de Kretser DM, Hudson B, O'Connor S, Wang C, Mirovics A, Court J, Dunlop M, Rennie GC. Changes in the pituitary-testicular system with age. *Clin Endocrinol* 1976;5:349-72.

- 35) Lewis JG, Ghanadian R, Chisholm GD. Serum 5alpha-dihydrotestosterone and testosterone changes with age in man. *Acta Endocrinol* 1976;82:444-8.
- 36) Baulieu EE. Androgens and aging men. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198:41-9.
- 37) Valenti G, Banchini A, Denti L, Maggio M, Ceresini G, Ceda GP. Acute oral administration of dehydroepiandrosterone in male subjects: effect of age on bioavailability, sulfoconjugation and bioconversion in other steroids. *J Endocrinol Invest* 1999;22:24-8.
- 38) Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M, Pelletier G, Bélanger A. Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* 2000;25:1-16.
- 39) Chouknyiska R, Vassileva-Popova JG. Effect of age on the bonding of H3 testosterone with receptor protein from rat brain and testes. *C R Acad Bulg Sci* 1977;30:133-5.
- 40) Roy AK, Milin BS, McMinn DM. Androgen receptor in rat liver: hormonal and developmental regulation of the cytoplasmic receptor and its correlation with the androgen-dependent synthesis of alpha2u-globulin. *Biochim Biophys Acta* 1974;354:213-32.
- 41) Shain SA, Boesel RW, Axelrod LR. Aging in the rat prostate. Reduction in detectable ventral prostate androgen receptor content. *Arch Biochem Biophys* 1975;167:247-63.
- 42) Krithivas K, Yurgalevitch SM, Mohr BA, Wilcox CJ, Batter SJ, Brown M, Longcope C, McKinlay JB, Kantoff PW. Evidence that the CAG repeat in the androgen receptor gene is associated with the age-related decline in serum androgen levels in men. *J Endocrinol* 1999;162:137-42.
- 43) Turner HE, Wass JA. Gonadal function in men with chronic illness. *Clin Endocrinol* 1997;47:379-403.
- 44) Spratt DI, Cox P, Orav J, Moloney J, Bigos T. Reproductive axis suppression in acute illness is related to disease severity. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:1548-54.
- 45) MacAdams MR, White RH, Chipps BE. Reduction of serum testosterone levels during chronic glucocorticoid therapy. *Ann Intern Med* 1986;104:648-51.
- 46) Hsieh A, DiGiorgio L, Fakunle M, Sadeghi-Nejad H. Management Strategies in Opioid Abuse and Sexual Dysfunction: A Review of Opioid-Induced Androgen Deficiency. *Sex Med Rev* 2018;6:618-623.

- 47) Cepeda MS, Zhu V, Vorsanger G, Eichenbaum G. Effect of Opioids on Testosterone Levels: Cross-Sectional Study using NHANES. *Pain Med* 2015;16:2235-42.
- 48) Fronczak CM, Kim ED, Barqawi AB. The insults of illicit drug use on male fertility. *J Androl* 2012;33:515-28.
- 49) Duca Y, Aversa A, Condorelli RA, Calogero AE, La Vignera S. Substance Abuse and Male Hypogonadism. *J Clin Med* 2019;8:732.
- 50) La Vignera S, Condorelli RA, Cannarella R, Duca Y, Calogero AE. Sport, doping and female fertility. *Reprod Biol Endocrinol* 2018;16:108.
- 51) Coward RM, Rajanahally S, Kovac JR, Smith RP, Pastuszak AW, Lipshultz LI. Anabolic steroid induced hypogonadism in young men. *J Urol* 2013;190:2200-5.
- 52) Rasmussen JJ, Selmer C, Østergren PB, Pedersen KB, Schou M, Gustafsson F, Faber J, Juul A, Kistorp C. Former Abusers of Anabolic Androgenic Steroids Exhibit Decreased Testosterone Levels and Hypogonadal Symptoms Years after Cessation: A Case-Control Study. *PLoS One* 2016;11:e0161208.
- 53) Hämäläinen EK, Adlercreutz H, Puska P, Pietinen P. Decrease of serum total and free testosterone during a low-fat high-fibre diet. *J Steroid Biochem* 1983;18:369-70.
- 54) Badr FM, Bartke A, Dalterio S, Bulger W. Suppression of testosterone production by ethyl alcohol. Possible mode of action. *Steroids* 1977;30:647-55.
- 55) Rettori V, McCann SM. Role of nitric oxide and alcohol on gonadotropin release in vitro and in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 1998;840:185-93.
- 56) Paterni I, Granchi C, Minutolo F. Risks and benefits related to alimentary exposure to xenoestrogens. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017;57:3384-3404.
- 57) Kavitharaj NK, Vijayammal PL. Nicotine administration induced changes in the gonadal functions in male rats. *Pharmacology* 1999;58:2-7.
- 58) Kim KH, Joo KJ, Park HJ, Kwon CH, Jang MH, Kim CJ. Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells. *Fertil Steril* 2005;83:1093-9.
- 59) Zhao J, Leung JYY, Lin SL, Mary Schooling C. Cigarette smoking and testosterone in men and women: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Prev Med* 2016;85:1-10.
- 60) Vine MF, Margolin BH, Morrison HI, Hulka BS. Cigarette smoking and sperm density: a meta-analysis. *Fertil Steril* 1994;61:35-43.

- 61) Künzle R, Mueller MD, Hänggi W, Birkhäuser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril* 2003;79:287-91.
- 62) Maggio M, Ceda GP, De Cicco G, Cattadori E, Visioli S, Ablondi F, Beghi C, Gherli T, Basaria S, Ceresini G, Valenti G, Ferrucci L. Acute changes in circulating hormones in older patients with impaired ventricular function undergoing on-pump coronary artery bypass grafting. *J Endocrinol Invest* 2005;28:711-9.
- 63) Maggio M, Nicolini F, Cattabiani C, Beghi C, Gherli T, Schwartz RS, Valenti G, Ceda GP. Effects of testosterone supplementation on clinical and rehabilitative outcomes in older men undergoing on-pump CABG. *Contemp Clin Trials* 2012;33:730-8.
- 64) Calof OM, Singh AB, Lee ML, Kenny AM, Urban RJ, Tenover JL, Bhasin S. Adverse events associated with testosterone replacement in middle-aged and older men: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2005;60:1451-7.
- 65) Marks LS, Mazer NA, Mostaghel E, Hess DL, Dorey FJ, Epstein JI, Veltri RW, Makarov DV, Partin AW, Bostwick DG, Macairan ML, Nelson PS. Effect of testosterone replacement therapy on prostate tissue in men with late-onset hypogonadism: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006;296:2351-61.
- 66) Morales A, Black A, Emerson L, Barkin J, Kuzmarov I, Day A. Androgens and sexual function: a placebo-controlled, randomized, double-blind study of testosterone vs dehydroepiandrosterone in men with sexual dysfunction and androgen deficiency. *Aging Male* 2009;12:104-12.
- 67) Ho CC, Tong SF, Low WY, Ng CJ, Khoo EM, Lee VK, Zainuddin ZM, Tan HM. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial on the effect of long-acting testosterone treatment as assessed by the Aging Male Symptoms scale. *BJU Int* 2012;110:260-5.
- 68) Guo C, Gu W, Liu M, Peng BO, Yao X, Yang B, Zheng J. Efficacy and safety of testosterone replacement therapy in men with hypogonadism: A meta-analysis study of placebo-controlled trials. *Exp Ther Med* 2016;11:853-863.
- 69) Konaka H, Sugimoto K, Orikasa H, Iwamoto T, Takamura T, Takeda Y, Shigehara K, Iijima M, Koh E, Namiki M; EARTH study group. Effects of long-term androgen replacement therapy on the physical and mental statuses of aging males with late-onset hypogonadism: a multicenter randomized controlled trial in Japan (EARTH Study). *Asian J Androl* 2016;18:25-34.

- 70) Eccles M, Freemantle N, Mason J. North of England evidence based guidelines development project: methods of developing guidelines for efficient drug use in primary care. *BMJ* 1998;316:1232-5.
- 71) Steen B. Body composition and aging. *Nutr Rev* 1988;46:45-51.
- 72) Baumgartner RN, Stauber PM, McHugh D, Koehler KM, Garry PJ. Cross-sectional age differences in body composition in persons 60+ years of age. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 1995;50:307-16.
- 73) Vermeulen A, Goemaere S, Kaufman JM. Testosterone, body composition and aging. *J Endocrinol Invest* 1999;22:110-6.
- 74) Denti L, Pasolini G, Sanfelici L, Benedetti R, Cecchetti A, Ceda GP, Ablondi F, Valenti G. Aging-related decline of gonadal function in healthy men: correlation with body composition and lipoproteins. *J Am Geriatr Soc* 2000;48:51-8.
- 75) Van Den Beld AW, De Jong FH, Grobbee DE, Pols HA, Lamberts SW. Measures of bioavailable serum testosterone and estradiol and their relationships with muscle strength, bone density, and body composition in elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3276-82.
- 76) Baumgartner RN, Waters DL, Gallagher D, Morley JE, Garry PJ. Predictors of skeletal muscle mass in elderly men and women. *Mech Ageing Dev* 1999;107:123-36.
- 77) Perry HM 3rd, Miller DK, Patrick P, Morley JE. Testosterone and leptin in older African-American men: relationship to age, strength, function, and season. *Metabolism* 2000;49:1085-91.
- 78) Roy TA, Blackman MR, Harman SM, Tobin JD, Schragger M, Metter EJ. Interrelationships of serum testosterone and free testosterone index with FFM and strength in aging men. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;283:284-94.
- 79) Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4358-65.
- 80) Bhasin S, Storer TW, Berman N, Yarasheski KE, Clevenger B, Phillips J, Lee WP, Bunnell TJ, Casaburi R. Testosterone replacement increases fat-free mass and muscle size in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:407-13.
- 81) Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, Hannoush P, Haddad G, Dlewati A, Santanna J, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Kapoor SC, Atkinson LE, Strom BL.

- Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2670-7.
- 82) Wang C, Swerdloff RS, Iranmanesh A, Dobs A, Snyder PJ, Cunningham G, Matsumoto AM, Weber T, Berman N; Testosterone Gel Study Group. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength, and body composition parameters in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2839-53.
- 83) Mårin P, Holmäng S, Gustafsson C, Jönsson L, Kvist H, Elander A, Eldh J, Sjöström L, Holm G, Björntorp P. Androgen treatment of abdominally obese men. *Obes Res* 1993;1:245-51.
- 84) Bhasin S, Storer TW, Javanbakht M, Berman N, Yarasheski KE, Phillips J, Dike M, Sinha-Hikim I, Shen R, Hays RD, Beall G. Testosterone replacement and resistance exercise in HIV-infected men with weight loss and low testosterone levels. *JAMA* 2000;283:763-70.
- 85) Strawford A, Barbieri T, Van Loan M, Parks E, Catlin D, Barton N, Neese R, Christiansen M, King J, Hellerstein MK. Resistance exercise and supraphysiologic androgen therapy in eugonadal men with HIV-related weight loss: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999;281:1282-90.
- 86) Grinspoon S, Corcoran C, Askari H, Schoenfeld D, Wolf L, Burrows B, Walsh M, Hayden D, Parlman K, Anderson E, Basgoz N, Klibanski A. Effects of androgen administration in men with the AIDS wasting syndrome. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998;129:18-26.
- 87) Tenover JS. Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1092-8.
- 88) Morley JE, Perry HM 3rd, Kaiser FE, Kraenzle D, Jensen J, Houston K, Mattammal M, Perry HM Jr. Effects of testosterone replacement therapy in old hypogonadal males: a preliminary study. *J Am Geriatr Soc* 1993;41:149-52.
- 89) Sih R, Morley JE, Kaiser FE, Perry HM 3rd, Patrick P, Ross C. Testosterone replacement in older hypogonadal men: a 12-month randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:1661-7.
- 90) Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlin JA, Loh L, Lenrow DA, Holmes JH, Dlewati A, Santanna J, Rosen CJ, Strom BL. Effect of testosterone treatment on body composition and muscle strength in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:2647-53.
- 91) Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlin JA, Loh L, Holmes JH, Dlewati A, Staley J, Santanna J, Kapoor SC, Attie MF, Haddad JG Jr, Strom BL. Effect of

- testosterone treatment on bone mineral density in men over 65 years of age. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1966-72.
- 92) Clague JE, Wu FC, Horan MA. Difficulties in measuring the effect of testosterone replacement therapy on muscle function in older men. *Int J Androl* 1999;22:261-5.
- 93) Ly LP, Jimenez M, Zhuang TN, Celermajer DS, Conway AJ, Handelsman DJ. A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial of transdermal dihydrotestosterone gel on muscular strength, mobility, and quality of life in older men with partial androgen deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4078-88.
- 94) Kenny AM, Prestwood KM, Gruman CA, Marcello KM, Raisz LG. Effects of transdermal testosterone on bone and muscle in older men with low bioavailable testosterone levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001;56:266-72.
- 95) Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Yeckel CW, Gilkison C, Jiang J, Achacosa A, Lieberman SA, Tipton K, Wolfe RR, Urban RJ. Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:601-7.
- 96) Wittert GA, Chapman IM, Haren MT, Mackintosh S, Coates P, Morley JE. Oral testosterone supplementation increases muscle and decreases fat mass in healthy elderly males with low-normal gonadal status. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003;58:618-25.
- 97) Page ST, Amory JK, Bowman FD, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Tenover JL. Exogenous testosterone (T) alone or with finasteride increases physical performance, grip strength, and lean body mass in older men with low serum T. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1502-10.
- 98) Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Dhatariya K, Short KR, Nehra A, Vittone JL, Klee GG, Basu A, Basu R, Cobelli C, Toffolo G, Dalla Man C, Tindall DJ, Melton LJ 3rd, Smith GE, Khosla S, Jensen MD. DHEA in elderly women and DHEA or testosterone in elderly men. *N Engl J Med* 2006;355:1647-59.
- 99) Ottenbacher KJ, Ottenbacher ME, Ottenbacher AJ, Acha AA, Ostir GV. Androgen treatment and muscle strength in elderly men: A meta-analysis. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:1666-73.
- 100) Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, Nakhai Pour HR, Aleman A, Lock TM, Bosch JL, Grobbee DE, van der Schouw YT. Effect of testosterone supplementation on functional mobility, cognition, and other parameters in older men: a randomized controlled trial. *JAMA* 2008;299:39-52.

- 101) Allan CA, Strauss BJ, Burger HG, Forbes EA, McLachlan RI. Testosterone therapy prevents gain in visceral adipose tissue and loss of skeletal muscle in nonobese aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:139-46.
- 102) Kenny AM, Kleppinger A, Annis K, Rathier M, Browner B, Judge JO, McGee D. Effects of transdermal testosterone on bone and muscle in older men with low bioavailable testosterone levels, low bone mass, and physical frailty. *J Am Geriatr Soc* 2010;58:1134-43.
- 103) Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, O'Connell MD, Adams JE, Oldham JA, Wu FC. Effects of testosterone on muscle strength, physical function, body composition, and quality of life in intermediate-frail and frail elderly men: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:639-50.
- 104) Atkinson RA, Srinivas-Shankar U, Roberts SA, Connolly MJ, Adams JE, Oldham JA, Wu FC, Seynnes OR, Stewart CE, Maganaris CN, Narici MV. Effects of testosterone on skeletal muscle architecture in intermediate-frail and frail elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2010;65:1215-9.
- 105) Frederiksen L, Højlund K, Hougaard DM, Mosbech TH, Larsen R, Flyvbjerg A, Frystyk J, Brixen K, Andersen M. Testosterone therapy decreases subcutaneous fat and adiponectin in aging men. *Eur J Endocrinol* 2012;166:469-76.
- 106) Frederiksen L, Højlund K, Hougaard DM, Brixen K, Andersen M. Testosterone therapy increased muscle mass and lipid oxidation in aging men. *Age* 2012;34:145-56.
- 107) Behre HM, Tammela TL, Arver S, Tolrá JR, Bonifacio V, Lamche M, Kelly J, Hiemeyer F; European Testogel® Study Team, Giltay EJ, Gooren LJ. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of testosterone gel on body composition and health-related quality-of-life in men with hypogonadal to low-normal levels of serum testosterone and symptoms of androgen deficiency over 6 months with 12 months open-label follow-up. *Aging Male* 2012;15:198-207.
- 108) Borst SE, Yarrow JF, Conover CF, Nseyo U, Meuleman JR, Lipinska JA, Braith RW, Beck DT, Martin JS, Morrow M, Roessner S, Beggs LA, McCoy SC, Cannady DF 2nd, Shuster JJ. Musculoskeletal and prostate effects of combined testosterone and finasteride administration in older hypogonadal men: a randomized, controlled trial. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014;306:433-42.
- 109) Storer TW, Basaria S, Traustadottir T, Harman SM, Pencina K, Li Z, Trivison TG, Miciek R, Tsitouras P, Hally K, Huang G, Bhasin S. Effects of

- Testosterone Supplementation for 3 Years on Muscle Performance and Physical Function in Older Men. *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102:583-593.
- 110) Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5245-55.
- 111) Ferrando AA, Tipton KD, Doyle D, Phillips SM, Cortiella J, Wolfe RR. Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport. *Am J Physiol* 1998;275:864-71.
- 112) Urban RJ, Bodenbunrg YH, Gilkison C, Foxworth J, Coggan AR, Wolfe RR, Ferrando A. Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am J Physiol* 1995;269:820-6.
- 113) Dubois V, Laurent M, Boonen S, Vanderschueren D, Claessens F. Androgens and skeletal muscle: cellular and molecular action mechanisms underlying the anabolic actions. *Cell Mol Life Sci* 2012;69:1651-67.
- 114) Bartsch W, Krieg M, Voigt KD. Quantification of endogenous testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone and 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol in subcellular fractions of the prostate, bulbocavernosus/levator ani muscle, skeletal muscle and heart muscle of the rat. *J Steroid Biochem* 1980;13:259-64.
- 115) Wilson JD. The role of 5alpha-reduction in steroid hormone physiology. *Reprod Fertil Dev* 2001;13:673-8.
- 116) Danhaive PA, Rousseau GG. Binding of glucocorticoid antagonists to androgen and glucocorticoid hormone receptors in rat skeletal muscle. *J Steroid Biochem* 1986;24:481-7.
- 117) Bhasin S, Taylor WE, Singh R, Artaza J, Sinha-Hikim I, Jasuja R, Choi H, Gonzalez-Cadavid NF. The mechanisms of androgen effects on body composition: mesenchymal pluripotent cell as the target of androgen action. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2003;58:1103-10.
- 118) Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2 pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 2003;144:5081-8.
- 119) Choi HR, Lim SK, Lee MS. Site-specific effect of testosterone on bone mineral density in male hypogonadism. *J Korean Med Sci* 1995;10:431-5.
- 120) Boonen S, Vanderschueren D, Cheng XG, Verbeke G, Dequeker J, Geusens P, Broos P, Bouillon R. Age-related (type II) femoral neck osteoporosis in men: biochemical evidence for both hypovitaminosis D- and

- androgen deficiency-induced bone resorption. *J Bone Miner Res* 1997;12:2119-26.
- 121) Gillberg P, Johansson AG, Ljunghall S. Decreased estradiol levels and free androgen index and elevated sex hormone-binding globulin levels in male idiopathic osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 1999;64:209-13.
- 122) Greendale GA, Edelstein S, Barrett-Connor E. Endogenous sex steroids and bone mineral density in older women and men: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 1997;12:1833-43.
- 123) Behre HM, Kliesch S, Leifke E, Link TM, Nieschlag E. Long-term effect of testosterone therapy on bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2386-90.
- 124) Anderson FH, Francis RM, Faulkner K. Androgen supplementation in eugonadal men with osteoporosis-effects of 6 months of treatment on bone mineral density and cardiovascular risk factors. *Bone* 1996;18:171-7.
- 125) Hall GM, Larbre JP, Spector TD, Perry LA, Da Silva JA. A randomized trial of testosterone therapy in males with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1996;35:568-73.
- 126) Christmas C, O'Connor KG, Harman SM, Tobin JD, Münzer T, Bellantoni MF, Clair CS, Pabst KM, Sorkin JD, Blackman MR. Growth hormone and sex steroid effects on bone metabolism and bone mineral density in healthy aged women and men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:M12-8.
- 127) Amory JK, Watts NB, Easley KA, Sutton PR, Anawalt BD, Matsumoto AM, Bremner WJ, Tenover JL. Exogenous testosterone or testosterone with finasteride increases bone mineral density in older men with low serum testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:503-10.
- 128) Basurto L, Zarate A, Gomez R, Vargas C, Saucedo R, Galván R. Effect of testosterone therapy on lumbar spine and hip mineral density in elderly men. *Aging Male* 2008;11:140-5.
- 129) Snyder PJ, Bhasin S, Cunningham GR, Matsumoto AM, Stephens-Shields AJ, Cauley JA, Gill TM, Barrett-Connor E, Swerdloff RS, Wang C, Ensrud KE, Lewis CE, Farrar JT, Cella D, Rosen RC, Pahor M, Crandall JP, Molitch ME, Resnick SM, Budoff M, Mohler ER 3rd, Wenger NK, Cohen HJ, Schrier S, Keaveny TM, Kopperdahl D, Lee D, Cifelli D, Ellenberg SS. Lessons From the Testosterone Trials. *Endocr Rev* 2018;39:369-386.
- 130) Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, Riggs BL, Spelsberg TC. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:854-7.

- 131) Schweikert HU, Rulf W, Niederle N, Schäfer HE, Keck E, Krück F. Testosterone metabolism in human bone. *Acta Endocrinol* 1980;95:258-64.
- 132) Carani C, Qin K, Simoni M, Faustini-Fustini M, Serpente S, Boyd J, Korach KS, Simpson ER. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1997;337:91-5.
- 133) Falahati-Nini A, Riggs BL, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Eastell R, Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* 2000;106:1553-60.
- 134) Kasperk CH, Wergedal JE, Farley JR, Linkhart TA, Turner RT, Baylink DJ. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* 1989;124:1576-8.
- 135) Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987;8:1-28.
- 136) Dawson-Hughes B, Harris SS, Krall EA, Dallal GE. Effect of calcium and vitamin D supplementation on bone density in men and women 65 years of age or older. *N Engl J Med* 1997;337:670-7.
- 137) Blackman MR, Sorkin JD, Münzer T, Bellantoni MF, Busby-Whitehead J, Stevens TE, Jayme J, O'Connor KG, Christmas C, Tobin JD, Stewart KJ, Cottrell E, St Clair C, Pabst KM, Harman SM. Growth hormone and sex steroid administration in healthy aged women and men: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;288:2282-92.
- 138) Swerdloff RS, Wang C, Hines M, Gorski R. Effect of androgens on the brain and other organs during development and aging. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:375-83.
- 139) Moffat SD, Hampson E. A curvilinear relationship between testosterone and spatial cognition in humans: possible influence of hand preference. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:323-37.
- 140) Christiansen K, Knusmann R. Sex hormones and cognitive functioning in men. *Neuropsychobiology* 1987;18:27-36.
- 141) Barrett-Connor E, Goodman-Gruen D, Patay B. Endogenous sex hormones and cognitive function in older men. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3681-5.
- 142) Barrett-Connor E, Von Mühlen DG, Kritz-Silverstein D. Bioavailable testosterone and depressed mood in older men: the Rancho Bernardo Study. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:573-7.

- 143) Davidson JM, Chen JJ, Crapo L, Gray GD, Greenleaf WJ, Catania JA. Hormonal changes and sexual function in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:71-7.
- 144) Schiavi RC, Schreiner-Engel P, White D, Mandeli J. The relationship between pituitary-gonadal function and sexual behavior in healthy aging men. *Psychosom Med* 1991;53:363-74.
- 145) Skakkebaek NE, Bancroft J, Davidson DW, Warner P. Androgen replacement with oral testosterone undecanoate in hypogonadal men: a double blind controlled study. *Clin Endocrinol* 1981;14:49-61.
- 146) Wang C, Alexander G, Berman N, Salehian B, Davidson T, McDonald V, Steiner B, Hull L, Callegari C, Swerdloff RS. Testosterone replacement therapy improves mood in hypogonadal men--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:3578-83.
- 147) Kunelius P, Lukkarinen O, Hannuksela ML, Itkonen O, Tapanainen JS. The effects of transdermal dihydrotestosterone in the aging male: a prospective, randomized, double blind study. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1467-72.
- 148) Legros JJ, Meuleman EJ, Elbers JM, Geurts TB, Kaspers MJ, Bouloux PM; Study 43203 Investigators. Oral testosterone replacement in symptomatic late-onset hypogonadism: effects on rating scales and general safety in a randomized, placebo-controlled study. *Eur J Endocrinol* 2009;160:821-31.
- 149) Emmelot-Vonk MH, Verhaar HJ, Nakhai-Pour HR, Grobbee DE, van der Schouw YT. Effect of testosterone supplementation on sexual functioning in aging men: a 6-month randomized controlled trial. *Int J Impot Res* 2009;21:129-38.
- 150) Zhang XW, Liu ZH, Hu XW, Yuan YQ, Bai WJ, Wang XF, Shen H, Zhao YP. Androgen replacement therapy improves psychological distress and health-related quality of life in late onset hypogonadism patients in Chinese population. *Chin Med J* 2012;125:3806-10.
- 151) Borst SE, Yarrow JF, Fernandez C, Conover CF, Ye F, Meuleman JR, Morrow M, Zou B, Shuster JJ. Cognitive effects of testosterone and finasteride administration in older hypogonadal men. *Clin Interv Aging* 2014;9:1327-33.
- 152) Cunningham GR, Stephens-Shields AJ, Rosen RC, Wang C, Bhasin S, Matsumoto AM, Parsons JK, Gill TM, Molitch ME, Farrar JT, Cella D, Barrett-Connor E, Cauley JA, Cifelli D, Crandall JP, Ensrud KE, Gallagher L, Zeldow B, Lewis CE, Pahor M, Swerdloff RS, Hou X, Anton S, Basaria S, Diem SJ, Tabatabaie V, Ellenberg SS, Snyder PJ. Testosterone Treatment and Sexual

- Function in Older Men With Low Testosterone Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101:3096-104.
- 153) Huang G, Wharton W, Bhasin S, Harman SM, Pencina KM, Tsitouras P, Li Z, Hally KA, Asthana S, Storer TW, Basaria S. Effects of long-term testosterone administration on cognition in older men with low or low-to-normal testosterone concentrations: a prespecified secondary analysis of data from the randomised, double-blind, placebo-controlled TEAAM trial. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016;4:657-665.
- 154) Nian Y, Ding M, Hu S, He H, Cheng S, Yi L, Li Y, Wang Y. Testosterone replacement therapy improves health-related quality of life for patients with late-onset hypogonadism: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Andrologia* 2017;49.
- 155) Puy L, MacLusky NJ, Becker L, Karsan N, Trachtenberg J, Brown TJ. Immunocytochemical detection of androgen receptor in human temporal cortex characterization and application of polyclonal androgen receptor antibodies in frozen and paraffin-embedded tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;55:197-209.
- 156) Stoléru S, Grégoire MC, Gérard D, Decety J, Lafarge E, Cinotti L, Lavenne F, Le Bars D, Vernet-Maury E, Rada H, Collet C, Mazoyer B, Forest MG, Magnin F, Spira A, Comar D. Neuroanatomical correlates of visually evoked sexual arousal in human males. *Arch Sex Behav* 1999;28:1-21.
- 157) Raum WJ, Marcano M, Swerdloff RS. Nuclear accumulation of estradiol derived from the aromatization of testosterone is inhibited by hypothalamic beta-receptor stimulation in the neonatal female rat. *Biol Reprod* 1984;30:388-96.
- 158) Frolkis VV, Tanin SA, Marcinko VI, Muradian KK. Effects of hormones on the fast axoplasmic transport of substances in ventral horns of the spinal cord in rats of different ages. *Arch Gerontol Geriatr* 1990;11:33-41.
- 159) Chowen JA, Azcoitia I, Cardona-Gomez GP, Garcia-Segura LM. Sex steroids and the brain: lessons from animal studies. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:1045-66.
- 160) Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience* 1999;89:567-78.
- 161) Valenti G. Psychoneuroendocrinology of aging: the brain as target organ of hormones. *Psychoneuroendocrinology* 1992;17:279-82.

- 162) Breedlove SM, Arnold AP. Hormonal control of a developing neuromuscular system. II. Sensitive periods for the androgen-induced masculinization of the rat spinal nucleus of the bulbocavernosus. *J Neurosci* 1983;3:424-32.
- 163) Horwitz KB, Horwitz LD. Canine vascular tissues are targets for androgens, estrogens, progestins, and glucocorticoids. *J Clin Invest* 1982;69:750-8.
- 164) Takane KK, Wilson JD, McPhaul MJ. Decreased levels of the androgen receptor in the mature rat phallus are associated with decreased levels of androgen receptor messenger ribonucleic acid. *Endocrinology* 1991;129:1093-100.
- 165) Aversa A, Bruzziches R, Pili M, Spera G. Role of testosterone in the regulation of erectile and cardiovascular function. *GIMSER* 2005;12:102-13.
- 166) Gerdes D, Christ M, Haseroth K, Notzon A, Falkenstein E, Wehling M. Nongenomic actions of steroids--from the laboratory to clinical implications. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13:853-78.
- 167) Heinlein CA, Chang C. The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 2002;16:2181-7.
- 168) Aversa A, Isidori AM, Greco EA, Giannetta E, Gianfrilli D, Spera E, Fabbri A. Hormonal supplementation and erectile dysfunction. *Eur Urol* 2004;45:535-8.
- 169) Foresta C, Caretta N, Lana A, Cabrelle A, Palù G, Ferlin A. Circulating endothelial progenitor cells in subjects with erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2005;17:288-90.
- 170) Shabsigh R, Kaufman JM, Steidle C, Padma-Nathan H. Randomized study of testosterone gel as adjunctive therapy to sildenafil in hypogonadal men with erectile dysfunction who do not respond to sildenafil alone. *J Urol* 2004;172:658-63.
- 171) Shamloul R, Ghanem H, Fahmy I, El-Meleigy A, Ashoor S, Elnashaar A, Kamel I. Testosterone therapy can enhance erectile function response to sildenafil in patients with PADAM: a pilot study. *J Sex Med* 2005;2:559-64.
- 172) Zhang XH, Morelli A, Luconi M, Vignozzi L, Filippi S, Marini M, Vannelli GB, Mancina R, Forti G, Maggi M. Testosterone regulates PDE5 expression and in vivo responsiveness to tadalafil in rat corpus cavernosum. *Eur Urol* 2005;47:409-16.

- 173) Yassin AA, Saad F, Diede HE. Testosterone and erectile function in hypogonadal men unresponsive to tadalafil: results from an open-label uncontrolled study. *Andrologia* 2006;38:61-8.
- 174) Heiss G, Tamir I, Davis CE, Tyroler HA, Rifkind BM, Schonfeld G, Jacobs D, Frantz ID Jr. Lipoprotein-cholesterol distributions in selected North American populations: the lipid research clinics program prevalence study. *Circulation* 1980;61:302-15.
- 175) Kirkland RT, Keenan BS, Probstfield JL, Patsch W, Lin TL, Clayton GW, Insull W Jr. Decrease in plasma high-density lipoprotein cholesterol levels at puberty in boys with delayed adolescence. Correlation with plasma testosterone levels. *JAMA* 1987;257:502-7.
- 176) Barrett-Connor E. Lower endogenous androgen levels and dyslipidemia in men with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1992;117:807-11.
- 177) Haffner SM, Mykkänen L, Valdez RA, Katz MS. Relationship of sex hormones to lipids and lipoproteins in nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1610-5.
- 178) Goldberg RB, Rabin D, Alexander AN, Doelle GC, Getz GS. Suppression of plasma testosterone leads to an increase in serum total and high density lipoprotein cholesterol and apoproteins A-I and B. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;60:203-7.
- 179) Moorjani S, Dupont A, Labrie F, Lupien PJ, Brun D, Gagné C, Giguère M, Bélanger A. Increase in plasma high-density lipoprotein concentration following complete androgen blockage in men with prostatic carcinoma. *Metabolism* 1987;36:244-50.
- 180) Wallentin L, Varenhorst E. Plasma lipoproteins during anti-androgen treatment by estrogens or orchidectomy in men with prostatic carcinoma. *Horm Metab Res* 1981;13:293-7.
- 181) Denti L, Pasolini G, Cortellini P, Ferretti S, Sanfelici L, Ablondi F, Valenti G. Effects of androgen suppression by gonadotropin-releasing hormone agonist and flutamide on lipid metabolism in men with prostate cancer: focus on lipoprotein(a). *Clin Chem* 1996;42:1176-81.
- 182) Baldo-Enzi G, Giada F, Zuliani G, Baroni L, Vitale E, Enzi G, Magnanini P, Fellin R. Lipid and apoprotein modifications in body builders during and after self-administration of anabolic steroids. *Metabolism* 1990;39:203-8.
- 183) Arslanian S, Suprasongsin C. Testosterone treatment in adolescents with delayed puberty: changes in body composition, protein, fat, and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3213-20.

- 184) Jockenhövel F, Bullmann C, Schubert M, Vogel E, Reinhardt W, Reinwein D, Müller-Wieland D, Krone W. Influence of various modes of androgen substitution on serum lipids and lipoproteins in hypogonadal men. *Metabolism* 1999;48:590-6.
- 185) Zgliczynski S, Ossowski M, Slowinska-Srzednicka J, Brzezinska A, Zgliczynski W, Soszynski P, Chotkowska E, Srzednicki M, Sadowski Z. Effect of testosterone replacement therapy on lipids and lipoproteins in hypogonadal and elderly men. *Atherosclerosis* 1996;121:35-43.
- 186) Jones TH, Arver S, Behre HM, Buvat J, Meuleman E, Moncada I, Morales AM, Volterrani M, Yellowlees A, Howell JD, Channer KS; TIMES2 Investigators. Testosterone replacement in hypogonadal men with type 2 diabetes and/or metabolic syndrome (the TIMES2 study). *Diabetes Care* 2011;34:828-37.
- 187) Zhang KS, Zhao MJ, An Q, Jia YF, Fu LL, Xu JF, Gu YQ. Effects of testosterone supplementation therapy on lipid metabolism in hypogonadal men with T2DM: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Andrology* 2018;6:37-46.
- 188) Uyanik BS, Ari Z, Gümüs B, Yiğitoğlu MR, Arslan T. Beneficial effects of testosterone undecanoate on the lipoprotein profiles in healthy elderly men. A placebo controlled study. *Jpn Heart J* 1997;38:73-82.
- 189) Mohler ER 3rd, Ellenberg SS, Lewis CE, Wenger NK, Budoff MJ, Lewis MR, Barrett-Connor E, Swerdloff RS, Stephens-Shields A, Bhasin S, Cauley JA, Crandall JP, Cunningham GR, Ensrud KE, Gill TM, Matsumoto AM, Molitch ME, Pahor M, Preston PE, Hou X, Cifelli D, Snyder PJ. The Effect of Testosterone on Cardiovascular Biomarkers in the Testosterone Trials. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:681-688.
- 190) Simon D, Charles MA, Lahlou N, Nahoul K, Oppert JM, Gouault-Heilmann M, Lemort N, Thibult N, Joubert E, Balkau B, Eschwege E. Androgen therapy improves insulin sensitivity and decreases leptin level in healthy adult men with low plasma total testosterone: a 3-month randomized placebo-controlled trial. *Diabetes Care* 2001;24:2149-51.
- 191) Kenny AM, Prestwood KM, Gruman CA, Fabregas G, Biskup B, Mansoor G. Effects of transdermal testosterone on lipids and vascular reactivity in older men with low bioavailable testosterone levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2002;57:460-5.
- 192) Basaria S, Harman SM, Travison TG, Hodis H, Tsitouras P, Budoff M, Pencina KM, Vita J, Dzekov C, Mazer NA, Coviello AD, Knapp PE, Hally K, Pinjic E, Yan M, Storer TW, Bhasin S. Effects of Testosterone Administration for 3 Years on Subclinical Atherosclerosis Progression in Older Men With Low or

- Low-Normal Testosterone Levels: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2015;314:570-81.
- 193) Fernández-Balsells MM, Murad MH, Lane M, Lampropulos JF, Albuquerque F, Mullan RJ, Agrwal N, Elamin MB, Gallegos-Orozco JF, Wang AT, Erwin PJ, Bhasin S, Montori VM. Clinical review 1: Adverse effects of testosterone therapy in adult men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:2560-75.
- 194) Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Mac RP, Lee M, Yarasheski KE, Sinha-Hikim I, Dzekov C, Dzekov J, Magliano L, Storer TW. Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:678-88.
- 195) Wingard DL. The sex differential in morbidity, mortality, and lifestyle. *Annu Rev Public Health* 1984;5:433-58.
- 196) Tan KC, Shiu SW, Kung AW. Alterations in hepatic lipase and lipoprotein subfractions with transdermal testosterone replacement therapy. *Clin Endocrinol* 1999;51:765-9.
- 197) Haffner SM, Valdez RA, Stern MP, Katz MS. Obesity, body fat distribution and sex hormones in men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1993;17:643-9.
- 198) Simon D, Preziosi P, Barrett-Connor E, Roger M, Saint-Paul M, Nahoul K, Papoz L. Interrelation between plasma testosterone and plasma insulin in healthy adult men: the Telecom Study. *Diabetologia* 1992;35:173-7.
- 199) Phillips GB. Relationship between serum sex hormones and the glucose-insulin-lipid defect in men with obesity. *Metabolism* 1993;42:116-20.
- 200) Haffner SM, Valdez RA, Mykkänen L, Stern MP, Katz MS. Decreased testosterone and dehydroepiandrosterone sulfate concentrations are associated with increased insulin and glucose concentrations in nondiabetic men. *Metabolism* 1994;43:599-603.
- 201) Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, Horton ES, McKinlay JB. Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes Care* 2000;23:490-4.
- 202) Maggio M, Lauretani F, Ceda GP, Bandinelli S, Basaria S, Ble A, Egan J, Paolisso G, Najjar S, Jeffrey Metter E, Valenti G, Guralnik JM, Ferrucci L. Association between hormones and metabolic syndrome in older Italian men. *J Am Geriatr Soc* 2006;54:1832-8.

- 203) Choong K, Basaria S. Emerging cardiometabolic complications of androgen deprivation therapy. *Aging Male* 2010;13:1-9.
- 204) Friedl KE, Jones RE, Hannan CJ Jr, Plymate SR. The administration of pharmacological doses of testosterone or 19-nortestosterone to normal men is not associated with increased insulin secretion or impaired glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab* 1989;68:971-5.
- 205) Lovejoy JC, Bray GA, Greenson CS, Klemperer M, Morris J, Partington C, Tulley R. Oral anabolic steroid treatment, but not parenteral androgen treatment, decreases abdominal fat in obese, older men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1995;19:614-24.
- 206) Mårin P, Holmäng S, Jönsson L, Sjöström L, Kvist H, Holm G, Lindstedt G, Björntorp P. The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992;16:991-7.
- 207) Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2006;154:899-906.
- 208) Haddad RM, Kennedy CC, Caples SM, Tracz MJ, Boloña ER, Sideras K, Uraga MV, Erwin PJ, Montori VM. Testosterone and cardiovascular risk in men: a systematic review and meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Mayo Clin Proc* 2007;82:29-39.
- 209) Koutsari C, Ali AH, Nair KS, Rizza RA, O'Brien P, Khosla S, Jensen MD. Fatty acid metabolism in the elderly: effects of dehydroepiandrosterone and testosterone replacement in hormonally deficient men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94:3414-23.
- 210) Boden G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. *Diabetes* 1997;46:3-10.
- 211) Perretta M, Valladares L, Garrido F, Valenzuela D, Ludwig U. Hormonal control of gene expression: differential activation of rat bone marrow RNA polymerases by erythropoietin and testosterone. *Arch Biol Med Exp* 1979;12:309-18.
- 212) Valladares LE, Cañas PE, Minguell JJ. Bone marrow ribonucleic acid polymerase. Effect of testosterone on nucleotide incorporation into nuclear RNA. *Nucleic Acids Res* 1976;3:3077-86.
- 213) Perretta M, Waissbluth L, Ludwig U, Garrido F. Hormonal control of RNA polymerases in rat bone marrow nuclei. The action of erythropoietin and testosterone. *Arch Biol Med Exp* 1980;13:247-57.

- 214) Gurney CW, Fried W. Further studies on the erythropoietic effect of androgens. *J Lab Clin Med* 1965;65:775-82.
- 215) Fried W, Gurney CW. The erythropoietic response to testosterone in male and female mice. *J Lab Clin Med* 1966;67:420-6.
- 216) Krabbe S, Christensen T, Worm J, Christiansen C, Transbøl I. Relationship between haemoglobin and serum testosterone in normal children and adolescents and in boys with delayed puberty. *Acta Paediatr Scand* 1978;67:655-8.
- 217) Eri LM, Urdal P, Bechensteen AG. Effects of the luteinizing hormone-releasing hormone agonist leuprolide on lipoproteins, fibrinogen and plasminogen activator inhibitor in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol* 1995;154:100-4.
- 218) Asbell SO, Leon SA, Tester WJ, Brereton HD, Ago CT, Rotman M. Development of anemia and recovery in prostate cancer patients treated with combined androgen blockade and radiotherapy. *Prostate* 1996;29:243-8.
- 219) Fonseca R, Rajkumar SV, White WL, Tefferi A, Hoagland HC. Anemia after orchiectomy. *Am J Hematol* 1998;59:230-3.
- 220) Ferrucci L, Maggio M, Bandinelli S, Basaria S, Lauretani F, Ble A, Valenti G, Ershler WB, Guralnik JM, Longo DL. Low testosterone levels and the risk of anemia in older men and women. *Arch Intern Med* 2006;166:1380-8.
- 221) Dobs AS, Meikle AW, Arver S, Sanders SW, Caramelli KE, Mazer NA. Pharmacokinetics, efficacy, and safety of a permeation-enhanced testosterone transdermal system in comparison with bi-weekly injections of testosterone enanthate for the treatment of hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3469-78.
- 222) Jockenhövel F, Vogel E, Reinhardt W, Reinwein D. Effects of various modes of androgen substitution therapy on erythropoiesis. *Eur J Med Res* 1997;2:293-8.
- 223) Zhang GY, Gu YQ, Wang XH, Cui YG, Bremner WJ. A clinical trial of injectable testosterone undecanoate as a potential male contraceptive in normal Chinese men. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3642-7.
- 224) Bebb RA, Anawalt BD, Christensen RB, Paulsen CA, Bremner WJ, Matsumoto AM. Combined administration of levonorgestrel and testosterone induces more rapid and effective suppression of spermatogenesis than testosterone alone: a promising male contraceptive approach. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:757-62.
- 225) Matsumoto AM. Effects of chronic testosterone administration in normal men: safety and efficacy of high dosage testosterone and parallel

- dose-dependent suppression of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and sperm production. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:282-7.
- 226) Jones SD Jr, Dukovac T, Sangkum P, Yafi FA, Hellstrom WJ. Erythrocytosis and Polycythemia Secondary to Testosterone Replacement Therapy in the Aging Male. *Sex Med Rev* 2015;3:101-112.
- 227) Tsai AW, Cushman M, Rosamond WD, Heckbert SR, Polak JF, Folsom AR. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism incidence: the longitudinal investigation of thromboembolism etiology. *Arch Intern Med* 2002;162:1182-9.
- 228) Maggio M, Snyder PJ, Ceda GP, Milaneschi Y, Luci M, Cattabiani C, Masoni S, Vignali A, Volpi R, Lauretani F, Peachey H, Valenti G, Cappola AR, Longo D, Ferrucci L. Is the haematopoietic effect of testosterone mediated by erythropoietin? The results of a clinical trial in older men. *Andrology* 2013;1:24-8.
- 229) Traustadóttir T, Harman SM, Tsitouras P, Pencina KM, Li Z, Travison TG, Eder R, Miciek R, McKinnon J, Woodbury E, Basaria S, Bhasin S, Storer TW. Long-Term Testosterone Supplementation in Older Men Attenuates Age-Related Decline in Aerobic Capacity. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103:2861-2869.
- 230) Bachman E, Travison TG, Basaria S, Davda MN, Guo W, Li M, Connor Westfall J, Bae H, Gordeuk V, Bhasin S. Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2014;69:725-35.
- 231) Palacios A, Campfield LA, McClure RD, Steiner B, Swerdloff RS. Effect of testosterone enanthate on hematopoiesis in normal men. *Fertil Steril* 1983;40:100-4.
- 232) Byron JW. Comparison of the action of 3 H-thymidine and hydroxyurea on testosterone-treated hemopoietic stem cells. *Blood* 1972;40:198-203.
- 233) Calado RT, Yewdell WT, Wilkerson KL, Regal JA, Kajigaya S, Stratakis CA, Young NS. Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood* 2009;114:2236-43.
- 234) Rhoden EL, Morgentaler A. Risks of testosterone-replacement therapy and recommendations for monitoring. *N Engl J Med* 2004;350:482-92.
- 235) Vorkas CK, Vaamonde CM, Glesby MJ. Testosterone replacement therapy and polycythemia in HIV-infected patients. *AIDS*. 2012;26:243-5.
- 236) Nigro N, Christ-Crain M. Testosterone treatment in the aging male: myth or reality? *Swiss Med Wkly* 2012;142:135-39.

- 237) Srinath R, Hill Golden S, Carson KA, Dobs A. Endogenous testosterone and its relationship to preclinical and clinical measures of cardiovascular disease in the atherosclerosis risk in communities study. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:1602-8.
- 238) Haring R, Völzke H, Steveling A, Krebs A, Felix SB, Schöfl C, Dörr M, Nauck M, Wallaschofski H. Low serum testosterone levels are associated with increased risk of mortality in a population-based cohort of men aged 20-79. *Eur Heart J* 2010;31:1494-501.
- 239) Araujo AB, Dixon JM, Suarez EA, Murad MH, Guey LT, Wittert GA. Clinical review: Endogenous testosterone and mortality in men: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:3007-19.
- 240) Basaria S, Coviello AD, Travison TG, Storer TW, Farwell WR, Jette AM, Eder R, Tennstedt S, Ulloor J, Zhang A, Choong K, Lakshman KM, Mazer NA, Miciek R, Krasnoff J, Elmi A, Knapp PE, Brooks B, Appleman E, Aggarwal S, Bhasin G, Hede-Brierley L, Bhatia A, Collins L, LeBrasseur N, Fiore LD, Bhasin S. Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med* 2010;363:109-22.
- 241) Vigen R, O'Donnell CI, Barón AE, Grunwald GK, Maddox TM, Bradley SM, Barqawi A, Woning G, Wierman ME, Plomondon ME, Rumsfeld JS, Ho PM. Association of testosterone therapy with mortality, myocardial infarction, and stroke in men with low testosterone levels. *JAMA* 2013;310:1829-36.
- 242) English KM, Steeds RP, Jones TH, Diver MJ, Channer KS. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation* 2000;102:1906-11.
- 243) Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, della Monica PL, Bonfigli B, Volpe M, Chierchia SL. Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation* 1999;99:1666-70.
- 244) 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* 2004;90:871-6.
- 245) Baillargeon J, Urban RJ, Kuo YF, Ottenbacher KJ, Raji MA, Du F, Lin YL, Goodwin JS. Risk of Myocardial Infarction in Older Men Receiving Testosterone Therapy. *Ann Pharmacother* 2014;48:1138-1144.
- 246) Stamler J, Stamler R, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. Hypertension screening of 1 million Americans. Community Hypertension Evaluation Clinic (CHEC) program, 1973 through 1975. *JAMA* 1976;235:2299-306.

- 247) Burt VL, Whelton P, Roccella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D. Prevalence of hypertension in the US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 1995;25:305-13.
- 248) Reckelhoff JF. Gender differences in the regulation of blood pressure. *Hypertension* 2001;37:1199-208.
- 249) Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial. *JAMA* 1995;273:199-208.
- 250) dos Santos RL, da Silva FB, Ribeiro RF Jr, Stefanon I. Sex hormones in the cardiovascular system. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014;18:89-103.
- 251) Kelly DM, Jones TH. Testosterone: a vascular hormone in health and disease. *J Endocrinol* 2013;217:R47-71.
- 252) 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.
- 253) 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.
- 254) Honda H, Unemoto T, Kogo H. Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1999;34:1232-6.
- 255) Lorigo M, Mariana M, Oliveira N, Lemos MC, Cairrao E. Vascular Pathways of Testosterone: Clinical Implications. *J Cardiovasc Transl Res* 2020;13:55-72.
- 256) Kumai T, Tanaka M, Watanabe M, Kobayashi S. Elevated tyrosine hydroxylase mRNA levels in the adrenal medulla of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol* 1994;65:367-9.
- 257) Zukowska-Grojec Z. Neuropeptide Y. A novel sympathetic stress hormone and more. *Ann N Y Acad Sci* 1995;771:219-33.
- 258) Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. Differential effects of 17beta-estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol* 2000;129:1301-8.
- 259) Ceballos G, Figueroa L, Rubio I, Gallo G, Garcia A, Martinez A, Yañez R, Perez J, Morato T, Chamorro G. Acute and nongenomic effects of testosterone on isolated and perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:691-7.

- 260) Matsuda K, Ruff A, Morinelli TA, Mathur RS, Halushka PV. Testosterone increases thromboxane A2 receptor density and responsiveness in rat aortas and platelets. *Am J Physiol* 1994;267:H887-93.
- 261) Reckelhoff JF, Zhang H, Srivastava K. Gender differences in development of hypertension in spontaneously hypertensive rats: role of the renin-angiotensin system. *Hypertension* 2000;35:480-3.
- 262) 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;50:169-74.
- 263) McCrohon JA, Jessup W, Handelsman DJ, Celermajor DS. Androgen exposure increases human monocyte adhesion to vascular endothelium and endothelial cell expression of vascular cell adhesion molecule-1. *Circulation* 1999;99:2317-22.
- 264) Bowman SP, Barnes DM, Blacklock NJ, Sullivan PJ. Regional variation of cytosol androgen receptors throughout the diseased human prostate gland. *Prostate* 1986;8:167-80.
- 265) Shaneyfelt T, Husein R, Bublely G, Mantzoros CS. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2000;18:847-53.
- 266) Watts EL, Appleby PN, Perez-Cornago A, Bueno-de-Mesquita HB, Chan JM, Chen C, Cohn BA, Cook MB, Flicker L, Freedman ND, Giles GG, Giovannucci E, Gislefoss RE, Hankey GJ, Kaaks R, Knekt P, Kolonel LN, Kubo T, Le Marchand L, Luben RN, Luostarinen T, Männistö S, Metter EJ, Mikami K, Milne RL, Ozasa K, Platz EA, Quirós JR, Rissanen H, Sawada N, Stampfer M, Stanczyk FZ, Stattin P, Tamakoshi A, Tangen CM, Thompson IM, Tsilidis KK, Tsugane S, Ursin G, Vatten L, Weiss NS, Yeap BB, Allen NE, Key TJ, Travis RC. Low Free Testosterone and Prostate Cancer Risk: A Collaborative Analysis of 20 Prospective Studies. *Eur Urol* 2018;74:585-594.
- 267) Morgentaler A, Bruning CO 3rd, DeWolf WC. Occult prostate cancer in men with low serum testosterone levels. *JAMA* 1996;276:1904-6.
- 268) Gustafsson O, Norming U, Gustafsson S, Eneroth P, Aström G, Nyman CR. Dihydrotestosterone and testosterone levels in men screened for prostate cancer: a study of a randomized population. *Br J Urol* 1996;77:433-40.
- 269) Kohn TP, Mata DA, Ramasamy R, Lipshultz LI. Effects of Testosterone Replacement Therapy on Lower Urinary Tract Symptoms: A Systematic Review and Meta-analysis. *Eur Urol* 2016;69:1083-90.
- 270) Cui Y, Zong H, Yan H, Zhang Y. The effect of testosterone replacement therapy on prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2014;17:132-43.

- 271) Zhau HE, Wan DS, Zhou J, Miller GJ, von Eschenbach AC. Expression of c-erb B-2/neu proto-oncogene in human prostatic cancer tissues and cell lines. *Mol Carcinog* 1992;5:320-7.
- 272) Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994;124:1-6.
- 273) Yan G, Fukabori Y, Nikolaropoulos S, Wang F, McKeehan WL. Heparin-binding keratinocyte growth factor is a candidate stromal-to-epithelial-cell andromedin. *Mol Endocrinol* 1992;6:2123-8.
- 274) Long RJ, Roberts KP, Wilson MJ, Ercole CJ, Pryor JL. Prostate cancer: a clinical and basic science review. *J Androl* 1997;18:15-20.
- 275) C. Huggins, C. V. Hodges. Studies on Prostatic Cancer. I. The Effect of Castration on Serum Phosphatases In Metastatic Carcinoma of the Prostate. *Cancer Research* 1941;1:293-296.
- 276) Morgentaler A. Testosterone and prostate cancer: an historical perspective on a modern myth. *Eur Urol* 2006;50:935-9.
- 277) Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo* 1994;8:439-43.
- 278) Algarté-Génin M, Cussenot O, Costa P. Prevention of prostate cancer by androgens: experimental paradox or clinical reality. *Eur Urol* 2004;46:285-94.
- 279) Yassin A, Salman M, Talib RA, Yassin DJ. Is there a protective role of testosterone against high-grade prostate cancer? Incidence and severity of prostate cancer in 553 patients who underwent prostate biopsy: a prospective data register. *Aging Male* 2017;20:125-133.
- 280) Prehn RT. On the prevention and therapy of prostate cancer by androgen administration. *Cancer Res* 1999;59:4161-4.
- 281) Sonnenschein C, Olea N, Pasanen ME, Soto AM. Negative controls of cell proliferation: human prostate cancer cells and androgens. *Cancer Res* 1989;49:3474-81.
- 282) Corona G, Baldi E, Maggi M. Androgen regulation of prostate cancer: where are we now? *J Endocrinol Invest* 2011;34:232-43.
- 283) Fowler JE Jr, Whitmore WF Jr. The response of metastatic adenocarcinoma of the prostate to exogenous testosterone. *J Urol* 1981;126:372-5.
- 284) Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev* 1987;8:1-28.

- 285) Wilkinson ML, Iqbal MJ, Williams R. Characterisation of high affinity binding sites of androgens in primary hepatocellular carcinoma. *Clin Chim Acta* 1985;152:105-13.
- 286) Nagasue N, Yukaya H, Chang YC, Ogawa Y, Kohno H, Ito A. Active uptake of testosterone by androgen receptors of hepatocellular carcinoma in humans. *Cancer* 1986;57:2162-7.
- 287) Nagasue N, Yu L, Yamaguchi M, Kohno H, Tachibana M, Kubota H. Inhibition of growth and induction of TGF-beta 1 in human hepatocellular carcinoma with androgen receptor by cyproterone acetate in male nude mice. *J Hepatol* 1996;25:554-62.
- 288) Tanaka K, Sakai H, Hashizume M, Hirohata T. Serum testosterone:estradiol ratio and the development of hepatocellular carcinoma among male cirrhotic patients. *Cancer Res* 2000;60:6106-10
- 289) Sweeney EC, Evans DJ. Hepatic lesions in patients treated with synthetic anabolic steroids. *J Clin Pathol* 1976;29:626-33.
- 290) Falk H, Thomas LB, Popper H, Ishak KG. Hepatic angiosarcoma associated with androgenic-anabolic steroids. *Lancet* 1979;2:1120-3.
- 291) Turani H, Levi J, Zevin D, Kessler E. Hepatic lesions in patients on anabolic androgenic therapy. *Isr J Med Sci* 1983;19:332-7.
- 292) Ishak KG, Zimmerman HJ. Hepatotoxic effects of the anabolic/androgenic steroids. *Semin Liver Dis* 1987;7:230-6.
- 293) Gurakar A, Caraceni P, Fagiuoli S, Van Thiel DH. Androgenic/anabolic steroid-induced intrahepatic cholestasis: a review with four additional case reports. *J Okla State Med Assoc* 1994;87:399-404.
- 294) Sjøe KL, Sjøe M, Gluud C. Liver pathology associated with the use of anabolic-androgenic steroids. *Liver* 1992;12:73-9.
- 295) Coodley GO, Coodley MK. A trial of testosterone therapy for HIV-associated weight loss. *AIDS* 1997;11:1347-52.
- 296) Gluud C. Testosterone and alcoholic cirrhosis. Epidemiologic, pathophysiologic and therapeutic studies in men. *Dan Med Bull* 1988;35:564-75.
- 297) Schneider BK, Pickett CK, Zwillich CW, Weil JV, McDermott MT, Santen RJ, Varano LA, White DP. Influence of testosterone on breathing during sleep. *J Appl Physiol* 1986;61:618-23.
- 298) White DP, Schneider BK, Santen RJ, McDermott M, Pickett CK, Zwillich CW, Weil JV. Influence of testosterone on ventilation and chemosensitivity in male subjects. *J Appl Physiol* 1985;59:1452-7.

- 299) Matsumoto AM, Sandblom RE, Schoene RB, Lee KA, Giblin EC, Pierson DJ, Bremner WJ. Testosterone replacement in hypogonadal men: effects on obstructive sleep apnoea, respiratory drives, and sleep. *Clin Endocrinol* 1985;22:713-21.
- 300) Russell N, Grossmann M. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Estradiol as a male hormone. *Eur J Endocrinol* 2019;181:23-43.
- 301) Honrath WL, Wolff A, Meli A. The influence of the amount of solvent (sesame oil) on the degree and duration of action of subcutaneously administered testosterone and its propionate. *Steroids* 1963;2:425-8.
- 302) James KC, Nicholls PJ, Roberts M. Biological half-lives of [4-¹⁴C]testosterone and some of its esters after injection into the rat. *J Pharm Pharmacol* 1969;21:24-7.
- 303) Snyder PJ, Lawrence DA. Treatment of male hypogonadism with testosterone enanthate. *J Clin Endocrinol Metab* 1980;51:1335-9.
- 304) Sokol RZ, Palacios A, Campfield LA, Saul C, Swerdloff RS. Comparison of the kinetics of injectable testosterone in eugonadal and hypogonadal men. *Fertil Steril* 1982;37:425-30.
- 305) von Eckardstein S, Nieschlag E. Treatment of male hypogonadism with testosterone undecanoate injected at extended intervals of 12 weeks: a phase II study. *J Androl* 2002;23:419-25.
- 306) Schubert M, Minnemann T, Hübler D, Rouskova D, Christoph A, Oettel M, Ernst M, Mellinger U, Krone W, Jockenhövel F. Intramuscular testosterone undecanoate: pharmacokinetic aspects of a novel testosterone formulation during long-term treatment of men with hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:5429-34.
- 307) Alkalay D, Khemani L, Wagner WE Jr, Bartlett MF. Sublingual and oral administration of methyltestosterone. A comparison of drug bioavailability. *J Clin Pharmacol New Drugs* 1973;13:142-51.
- 308) Alkalay D, Khemani L, Bartlett MF. Spectrophotofluorometric determination of methyltestosterone in plasma or serum. *J Pharm Sci* 1972;61:1746-9.
- 309) Köhn FM, Schill WB. A new oral testosterone undecanoate formulation. *World J Urol* 2003;21:311-5.
- 310) Uekama K, Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1987;3:1-40.
- 311) Gronski MA, Grober ED, Gottesman IS, Ormsby RW, Bryson N. Efficacy of Nasal Testosterone Gel (Natesto[®]) Stratified by Baseline Endogenous Testosterone Levels. *J Endocr Soc* 2019;3:1652-1662.

- 312) Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of testosterone pellets in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:216-22.
- 313) Cunningham GR, Cordero E, Thornby JI. Testosterone replacement with transdermal therapeutic systems. Physiological serum testosterone and elevated dihydrotestosterone levels. *JAMA* 1989;261:2525-30.
- 314) Meikle AW, Arver S, Dobs AS, Sanders SW, Rajaram L, Mazer NA. Pharmacokinetics and metabolism of a permeation-enhanced testosterone transdermal system in hypogonadal men: influence of application site. A clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1832-40.
- 315) Meikle AW, Mazer NA, Moellmer JF, Stringham JD, Tolman KG, Sanders SW, Odell WD. Enhanced transdermal delivery of testosterone across nonscrotal skin produces physiological concentrations of testosterone and its metabolites in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:623-8.
- 316) Swerdloff RS, Wang C, Cunningham G, Dobs A, Iranmanesh A, Matsumoto AM, Snyder PJ, Weber T, Longstreth J, Berman N. Long-term pharmacokinetics of transdermal testosterone gel in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:4500-10.
- 317) Behre HM, Nieschlag E. Testosterone buciclate (20 Aet-1) in hypogonadal men: pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new long-acting androgen ester. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:1204-10.
- 318) Behre HM, Nieschlag E. Comparative pharmacokinetics of testosterone esters. In Nieschlag E, Behre HM, Eds. *Testosterone: Action-Deficiency-Substitution*. Springer Germany 1998;329-48.
- 319) Bhasin S, Swerdloff RS, Steiner B, Peterson MA, Meridores T, Galmirini M, Pandian MR, Goldberg R, Berman N. A biodegradable testosterone microcapsule formulation provides uniform eugonadal levels of testosterone for 10-11 weeks in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;74:75-83.
- 320) Choi J, Smitz J. Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: origins of difference. *Mol Cell Endocrinol* 2014;383:203-13.
- 321) Kiem PV, Dat NT, Minh CV, Lee JJ, Kim YH. Lupane-triterpenes from the leaves of *Brassaiopsis glomerulata*. *Arch Pharm Res* 2003;26:594-6.
- 322) Eng ET, Williams D, Mandava U, Kirma N, Tekmal RR, Chen S. Anti-aromatase chemicals in red wine. *Ann N Y Acad Sci* 2006;963:239-246.
- 323) Grube BJ, Eng ET, Kao YC, Kwon A, Chen S. White button mushroom phytochemicals inhibit aromatase activity and breast cancer cell proliferation. *J Nutr* 2001;131:3288-93.

- 324) Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebaek NE, Leffers H. Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves. *Environ Health Perspect* 2002;110:743-8.
- 325) Zamir A, Ben-Zeev T, Hoffman JR. Manipulation of Dietary Intake on Changes in Circulating Testosterone Concentrations. *Nutrients* 2021;13:3375.
- 326) Wehr E, Pilz S, Boehm BO, März W, Obermayer-Pietsch B. Association of vitamin D status with serum androgen levels in men. *Clin Endocrinol* 2010;73:243-8.
- 327) Om AS, Chung KW. Dietary zinc deficiency alters 5 alpha-reduction and aromatization of testosterone and androgen and estrogen receptors in rat liver. *J Nutr* 1996;126:842-8.
- 328) Bernstein KE, Khan Z, Giani JF, Cao DY, Bernstein EA, Shen XZ. Angiotensin-converting enzyme in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Nephrol* 2018;14:325-336.
- 329) Kwok T, Ohlsson C, Vandenput L, Tang N, Zhang YF, Tomlinson B, Leung PC. ACE inhibitor use was associated with lower serum dehydroepiandrosterone concentrations in older men. *Clin Chim Acta* 2010;411:1122-5.
- 330) Maggio M, Ceda GP, Lauretani F, Cattabiani C, Avantaggiato E, Morganti S, Ablondi F, Bandinelli S, Dominguez LJ, Barbagallo M, Paolisso G, Semba RD, Ferrucci L. Magnesium and anabolic hormones in older men. *Int J Androl* 2011;34:594-600.
- 331) Maggio M, De Vita F, Lauretani F, Nouvenne A, Meschi T, Ticinesi A, Dominguez LJ, Barbagallo M, Dall'aglio E, Ceda GP. The Interplay between Magnesium and Testosterone in Modulating Physical Function in Men. *Int J Endocrinol* 2014;2014:525249.
- 332) Rotter I, Kosik-Bogacka D, Dołęgowska B, Safranow K, Karakiewicz B, Laszczyńska M. Relationship between serum magnesium concentration and metabolic and hormonal disorders in middle-aged and older men. *Magnes Res* 2015;28:99-107.
- 333) Barbagallo M, Dominguez LJ. Magnesium and aging. *Curr Pharm Des* 2010;16:832-9.
- 334) Demirbag R, Yilmaz R, Erel O. The association of total antioxidant capacity with sex hormones. *Scand Cardiovasc J* 2005;39:172-6.
- 335) Nielsen FH, Johnson LK, Zeng H. Magnesium supplementation improves indicators of low magnesium status and inflammatory stress in adults older than 51 years with poor quality sleep. *Magnes Res* 2010;23:158-68.

- 336) Hong CY, Park JH, Ahn RS, Im SY, Choi HS, Soh J, Mellon SH, Lee K. Molecular mechanism of suppression of testicular steroidogenesis by proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 2004;24:2593-604.
- 337) Excoffon L, Guillaume YC, Woronoff-Lemsi MC, André C. Magnesium effect on testosterone-SHBG association studied by a novel molecular chromatography approach. *J Pharm Biomed Anal* 2009;49:175-80.
- 338) Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Goodman PJ, Tangen CM, Lucia MS, Feng Z, Parnes HL, Coltman CA Jr. Assessing prostate risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *J Nat Cancer Inst* 2006;98 (8):229-34