

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

**MEDICINA MATERNO INFANTILE E DELL'ETA' EVOLUTIVA E
FISIOPATOLOGIA DELLO SVILUPPO SESSUALE**

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/ H1

Settore Scientifico disciplinare: MED 40

TESI

**EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI
TESTOSTERONE NELLA DONNA**

Presentata da: Dott.ssa Francesca Armillotta

Coordinatore Dottorato

Prof. L Bolondi

Relatore

Dott.ssa MC Meriggiola

Esame finale anno 2012

1. Introduzione	pag. 2-3
2. Fisiologia degli androgeni nella donna	pag. 4-7
3. Terapia con testosterone nella donna	pag. 8-9
4. Effetti avversi del testosterone	pag. 10-12
5. Scopo dello studio	pag. 13
6. Materiali e metodi	pag. 14-20
Protocollo	
Metodi	
7. Analisi statistica	pag. 21
8. Risultati	pag. 22-31
9. Discussione	pag. 32-35
10. Bibliografia	pag. 36-38

1. INTRODUZIONE

Il testosterone (T) è storicamente considerato un ormone di pertinenza maschile, connesso con l'idea di virilità e potenza fisica. Fino a tempi piuttosto recenti nella donna il T ha avuto rilevanza solo con significato patologico in condizioni in cui, per cause di varia natura, si registrava un aumento anomalo degli ormoni maschili.

Eppure, se si considera anche il contributo della ghiandola surrenale nella produzione di steroidi, gli androgeni circolanti nel siero femminile sono gli steroidi presenti in quantità maggiore; il testosterone da solo normalmente è in concentrazione più alta rispetto allo stesso estradiolo (E2), ormone chiave nell'organismo femminile, e questo aspetto può sfuggire poiché gli estrogeni sono normalmente indicati in picogrammi mentre gli androgeni in nanogrammi.

Livelli androgenici nella donna in età fertile*

Estradiolo (pg/ml)	100-150
Testosterone (pg/ml) [§]	400
DHEA (pg/ml)	500
Androstenedione (pg/ml)	1900

* Mean value during early follicular phase

[§] Androgens level are higher estradiol

Lobo R. J Clin Endocrinol Metab.1974;39:1020-4

Negli ultimi anni l'interesse si è ampliato all'esplorazione e definizione dei livelli di androgeni in condizioni basali, alle implicazioni che un tasso insufficiente di tali ormoni comporta e all'uso possibile del testosterone

come trattamento medico nelle condizioni di carenza per i possibili effetti benefici riportati su desiderio sessuale, massa ossea, massa muscolare e benessere generale. Evidenza di queste molteplici azioni è la distribuzione dei recettori per gli androgeni in concentrazioni elevate in molteplici tessuti femminili, riproduttivi e non.

Tessuti riproduttivi	<i>Livello di espressione</i>	Tessuti riproduttivi	<i>Livello di espressione</i>
Endometrio	1,8	Prostata	1
Ovaio	1,5	Testicolo	0,9
tube di falloppio	1	Vescichette	0,7
Utero	1		
Mammella	0,3		
Colon	0,1		
Rene	0,4		
Polmone	0,07		
Modificata da Wilson CM, 1996			

2. ANDROGENI NELLA DONNA

Gli androgeni nella donna sono prodotti dalla corticale della ghiandola surrenale, dalla teca ovarica (e in grado minore dalle cellule dello stroma ovarico) e dalla bioconversione periferica dei pro-ormoni androgenici.

I più importanti androgeni nella donna sono il testosterone (T), il diidrotestosterone (DHT), il deidroepiandrosterone (DHEA), deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) e l'androstenedione (Δ 4A).

DHEA, DHEA-S e Δ 4A sono considerati pro-androgeni, non hanno attività androgenica propria ma devono essere convertiti in T e DHT per esercitare la loro azione. T e DHT possono entrambi legare e attivare i recettori androgenici. Il T può essere convertito in DHT, il quale ha un'affinità cinque volte maggiore per i recettori androgenici, o può essere aromatizzato in estrogeni.

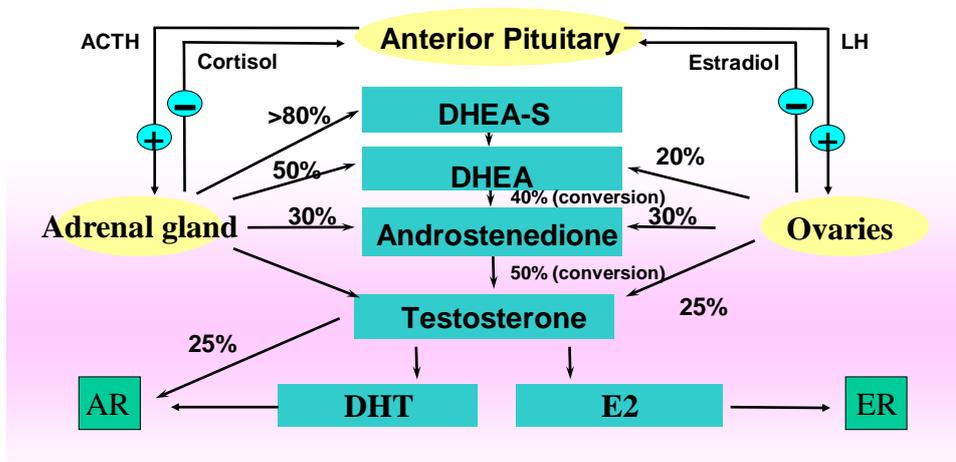
La ghiandola surrenalica produce il 95% circa dei livelli circolanti di DHEA-S e il 50% del DHEA. I restanti livelli circolanti di DHEA derivano dalla conversione periferica del DHEA-S e in piccola parte dall'ovaio (1).

L' Δ 4A è prodotto circa in egual modo dalla surrenale e dall'ovaio e per il 40% deriva dalla conversione periferica del DHEA.

Il T, il più importante androgeno circolante, è prodotto per un 25% del surrene e 25% dall'ovaio, mentre il restante 50% deriva dalla conversione periferica del Δ 4A.

Il DHT è prodotto solo esclusivamente nei tessuti periferici per azione della 5 α -reduttasi che agisce sul T circolante.

Dinamiche androgeniche nella donna in premenopausa



Buster JE, et al. In: Lobo RA, ed. *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects*. 2nd edition. Philadelphia, Pa: Lippincott, Williams & Wilkins; 1999:142.

Nella donna la produzione di androgeni inizia durante l'adrenarca, tra i 6 e i 10 anni, e si caratterizza per la comparsa dei peli pubici. L'adrenarca è indipendente dal menarca.

Le dinamiche androgeniche nella donna sono soggette a 3 fenomeni temporali: ciclicità ovarica, declino della produzione di androgeni da parte del surrene (adrenopausa) e ridotta funzione follicolare ovarica che caratterizza la transizione menopausale.

Nel corso di un normale ciclo ovulatorio le variazioni di livelli di LH risultano in differenti livelli di stimolazione delle cellule della teca e il picco dell'LH a metà ciclo si accompagna ad un picco della produzione di $\Delta 4A$ e T (questo si riflette sul piano clinico ad un incremento del desiderio sessuale periovulatorio).

La ridotta funzionalità ovarica che accompagna la transizione menopausale si caratterizza per una riduzione della produzione di estrogeni e perdita del feedback negativo esercitato dagli estrogeni sull'asse ipotalamo-ipofisario. In risposta i livelli di LH ed FSH aumentano stimolando la produzione di

androgeni da parte della teca e dello stroma ovarico. Infatti nella fase di transizione menopausale l'ovaio produce più testosterone e questo effetto continua anche nella post menopausa attenuandosi.

Sovrapposti a questi fenomeni c'è una riduzione della produzione androgenica adrenocorticale. Gli androgeni surrenalici, DHEA e DHEA-S, sono prodotti dalle cellule reticolari della corteccia surrenalica e, contemporaneamente ad una diminuzione di queste cellule età-correlato, si assiste ad una diminuzione della produzione di steroidi e ridotta risposta all'ACTH. Adrenopausa è il termine utilizzato per definire questa senescenza. Il calo della produzione surrenalica inizia intorno ai 20-25 anni e prosegue lentamente, così che i livelli di DHEA-S di una donna di 80 anni sono circa il 20% dei livelli di DHEA-S di una donna in età riproduttiva (2). Poiché gli androgeni surrenalici rappresentano una sostanziale porzione dei livelli di $\Delta 4A$ e T, l'adrenopausa rappresenta un significativo substrato per la perdita età-correlata dei livelli di T, indipendentemente dalla menopausa.

Esiste ovviamente una variabilità individuale piuttosto marcata nei livelli androgenici in menopausa a causa della somma dei due fenomeni (adrenarca e aumento della produzione ovarica di T), ma ciò che si può affermare con sicurezza è che i livelli di androgeni e soprattutto di T non subiscono una brusca variazione (come invece accade per gli estrogeni) all'ingresso in menopausa.

La situazione cambia radicalmente in due condizioni: quando la donna in menopausa assume una terapia ormonale sostitutiva HRT e qualora sia la donna sottoposta ad annessictomia.

Nel primo caso, l'assunzione di estrogeni associati o meno al progestinico agisce in modo inibitorio sul rilascio di gonadotropine ipofisarie con conseguente minor stimolazione ovarica nella produzione di androgeni. La privazione del tessuto ovarico invece toglie ovviamente qualsiasi possibilità di funzione ghiandolare. Con la rimozione delle ovaie si assiste infatti ad brusco calo di A circolanti.

LIVELLI PLASMATICI ORMONALI IN PRE E POST MENOPAUSA

	Reproductive age	Natural menopause		Surgical menopause (ovariectomized)	
Estradiol (pg/ml)	40 ± 3	Below assay		Below assay	
Testosterone (pg/ml)**	400 ± 30	200 ± 20	↓ 50%	100 ± 20	↓ 75%
DHEA (pg/ml)**	4200 ± 210	1970 ± 430	↓ 53%	1260 ± 360	↓ 70%

*Assay detection limit = 20 pg/ml, ** 1ng/dl =

**RA Lobo,
2001**

3. TERAPIA CON TESTOSTERONE NELLA DONNA

Molti studi riportati sempre più frequentemente in letteratura dimostrano che la terapia supplementare con T migliora diversi aspetti della funzione sessuale femminile, così come ha effetti benefici sul tono dell'umore, sul benessere psico-fisico e sul trofismo dell'apparato osteo-muscolare (3,4,5,6).

Il primo studio randomizzato, doppio cieco, placebo-controllato sugli effetti del T per il trattamento del calo della libido risale al 1950, quando Greenbland e i suoi collaboratori riportarono un miglioramento della libido e del benessere generale in donne trattate con metiltestosterone (7). Da allora numerosi studi sono stati realizzati e molti di questi dimostrano che l'aggiunta di T ad E migliora significativamente la libido, il desiderio sessuale, l'eccitamento, la frequenza e la soddisfazione nel rapporto sessuale e nella vita relazionale (8,9,10,11,12).

L'eccitamento sessuale risulta dalla sinergia di meccanismi centrali e periferici. A livello periferico la vagina è l'organo chiave della risposta sessuale ma, ad oggi, esistono limitati studi sugli effetti della somministrazione a lungo termine di T sulle strutture vaginali umane (13) e la vagina è stata per lungo tempo considerata un organo non-androgeno dipendente. Evidenze scientifiche riportate negli ultimi anni, in particolare studi su animali, hanno tuttavia suggerito che gli androgeni potrebbero avere un ruolo chiave diretto sulle strutture vaginali e sulla funzione sessuale, indipendente dagli estrogeni.

E' noto che donne con bassi livelli di androgeni (per esempio dopo ovariectomia) sono associate ad una declino del desiderio sessuale, libido ed orgasmo. La somministrazione esogena di T in queste donne migliora diversi aspetti della funzione sessuale. In aggiunta agli effetti centrali, gli androgeni sembrano avere effetti sulla vagina (14, 15) . La presenza di recettori per androgeni (AR) è stata infatti dimostrata su vagina umana da studi

immunoistochimici e studi su ratti dimostrano un incremento della presenza di fibre nervose su tessuto vaginale dopo somministrazione di T (16).

Esistono molteplici formulazioni di T in commercio ma nessuna preparazione è specificatamente approvata dalla Food and Drug Administration (FDA) per i disordini della sfera sessuale o per il trattamento della sindrome da insufficienza androgenica nella donna, tuttavia da più di 40 anni il T viene utilizzato “off-label” per il trattamento delle disfunzioni sessuali.

Recentemente è stato approvato in Europa il cerotto medicato al testosterone, per il trattamento di donne sottoposte ad annessiectomia bilaterale con desiderio sessuale ipoattivo. Il rilascio transdermico di T presentare alcuni vantaggi rispetto alle altre formulazioni, in quanto consente di evitare il primo passaggio metabolico e di rilasciare livelli controllati di T nel tempo.

I due principali studi di fase III del cerotto medicato al T sono gli studi INTIMATE SM I e II, condotti in Nord America e nel resto del mondo, allo scopo di valutare l'efficacia e la sicurezza del T transdermico alla dose di 300 mcg/die (2 cerotti alla settimana) in donne in menopausa chirurgica con Disturbo del Desiderio Sessuale Ipoattivo. Sono entrambi studi randomizzati, in doppio cieco verso placebo, della durata di 24 settimane, includenti più di mille pazienti. In entrambi gli studi l'aggiunta di T transdermico alla terapia estrogenica ha comportato un significativo miglioramento rispetto al placebo dell'attività sessuale soddisfacente a 24 settimane, del desiderio sessuale e diminuzione del disagio personale relativo alla vita sessuale di coppia (17).

Tuttavia, molti, se non tutti, gli studi pubblicati in letteratura indagano i potenziali effetti benefici sulla libido e sul benessere psico-fisico della donna e sugli effetti avversi androgenici sulla cute, ma scarsi pochi sono i dati pubblicati sugli effetti del T su profilo lipidico, glucidico, composizione corporea e ancor più insufficienti sono gli studi che indagano un possibile rischio oncologico.

4. EFFETTI AVVERSI DEL TESTOSTERONE

La preoccupazione sull'uso del T nella donna e i suoi potenziali effetti avversi nasce dagli effetti osservati in uomini ipogonadici trattati con alte dosi di T o in donne trattate con steroidi anabolizzanti per migliorare la performance fisica.

Effetti su lipidi, BMI e altri fattori di rischio cardio-vascolare

Uno dei potenziali effetti avversi del trattamento con T è la potenziale riduzione delle HDL attraverso un'azione sul fegato. Trias clinici nei quali è stato utilizzato metiltestosterone orale hanno mostrato una riduzione della HDL con riduzione o nessun cambiamento delle LDL. Sappiamo che donne con iperandrogenismo mostrano un profilo lipidico sfavorevole (bassi livelli di HDL con aumento delle LDL). Tuttavia la riduzione delle HDL non è stata osservata in trias clinici nei quali venivano utilizzate preparazioni di T non orali, ma preparazioni intramuscolari o transdermiche (18). Gli effetti sul sistema cardiovascolare a lungo termine del T non sono noti. Molti studi riportano un aumento del grasso addominale in uomini con bassi livelli di androgeni e questo si accompagna a sequele metaboliche come il diabete di tipo II e patologie cardiovascolari mentre la somministrazione di T riduce l'accumulo di grasso viscerale e si accompagna ad un aumento della massa magra e migliore sensibilità insulinica.

Effetti sulla mammella

Alla luce delle recenti controversie sul possibile rischio di neoplasia mammaria in donne sottoposte ad HRT nate dalla pubblicazione del Women's Health Initiative, una delle maggiori preoccupazioni sul trattamento con testosterone nella donna riguarda proprio il tumore mammario. Gli studi epidemiologici sui livelli androgenici in donne con tumore al seno riportano risultati discordanti, alcuni suggeriscono un

incremento di rischio neoplastico in donne con bassi livelli di A, altri suggeriscono un incremento di rischio neoplastico in donne con alti livelli di A (19,20). Tuttavia nessuno degli studi in donne trattate con androgeni è stato di così lunga durata o su campioni sufficientemente ampi per valutare il rischio di cancro mammario, mentre studi retrospettivi o studi su animali e in vitro suggeriscono che gli A potrebbero svolgere un ruolo protettivo sul tessuto mammario. Il tessuto mammario esprime i recettori androgenici e alcuni studi hanno dimostrato che la stimolazione di questi recettori sopprime la crescita cellulare (21). Altri dati supportano questa ipotesi: la soppressione androgenica nell'uomo sembra associata con comparsa di neoplasia mammaria del maschio e in soggetti transessuali trattati con alte dosi di T il tessuto mammario post terapia appare atrofico. Una recente review di 508 pazienti trattate con estrogeni/progestinici/ testosterone riporta un'incidenza di cancro mammario in questa popolazione più basso di quello riportato in una popolazione comparabile di donne non trattate (22).

Tuttavia, non esistono studi controllati e randomizzati ed è importante ricordare che il testosterone è potenzialmente aromatizzabile in estrogeni in molti tessuti.

Effetti sull'endometrio

È ben noto che gli E stimolano la proliferazione endometriale e che il trattamento a lungo termine di donne in post-menopausa con soli E promuove l'iperplasia endometriale e incrementa il rischio di cancro endometriale. Al contrario il progesterone esercita un effetto antiproliferativo sui tessuti ed è pertanto usato in associazione ad E per prevenire la proliferazione endometriale (23,24). Estrogeni e progestinici agiscono attraverso attivazione di recettori ed è noto che sulle cellule stromali ed epiteliali endometriali umane sono espressi non solo recettori per E ed P ma anche recettori per androgeni (AR). L'espressione dei AR è stata dimostrata sia nello stroma che nell'epitelio durante il normale ciclo mestruale con

prevalente espressione stromale (25). La presenza di RA suggerisce un'azione diretta degli A sull'endometrio.

Le conoscenze attualmente disponibili sulla sicurezza e sui possibili effetti avversi del T sull'endometrio, così come le basi biologiche dell'azione degli A sull'endometrio, sono limitate. E i pochi dati pubblicati a questo riguardo sono discordanti. Studi *in vitro* suggeriscono che gli androgeni hanno un effetto inibitorio sulla crescita cellulare endometriale. Nel 2000 Tuckerman et al. dimostrarono che l'androstenedione può inibire la crescita cellulare endometriale e la sua attività secretiva e questo effetto può essere bloccato dall'aggiunta di antiandrogeni (26).

In un recente lavoro (2008) Zang studia l'espressione di recettori per ormoni steroidei in donne trattate con estradiolo valerato versus donne trattate con estradiolo valerato in combinazione con testosterone undecanoato per 3 mesi. L'autore riporta un'espressione dei RA e dei recettori per estrogeni- α significativamente più alta dopo trattamento combinato rispetto al trattamento con soli estrogeni, mentre risultava più bassa dopo trattamento combinato l'espressione dei recettori per estrogeni- β e dei recettori per il progesterone. I dati di Zang supportano l'idea che gli androgeni giochino un ruolo diretto, attraverso meccanismo recettoriali, nella differenziazione e proliferazione delle cellule endometriali (27).

Nonostante i dati rassicuranti degli studi *in vitro* la somministrazione di T nella donna non rimane priva di preoccupazioni, preoccupazione che nasce innanzitutto dalla possibilità di aromatizzazione degli androgeni in estrogeni.

La preoccupazione nel somministrare androgeni nasce anche da studi clinici che riportano un aumentato rischio di neoplasia endometriale in donne con iperandrogenismo, come donne con PCOS e donne in post menopausa.

5. SCOPO DELLO STUDIO

In questi anni abbiamo condotto alcuni studi presso il Dipartimento Materno Infantile dell'Università di Bologna (Ospedale S. Orsola Malpighi) per valutare gli effetti del testosterone e dei suoi metaboliti sulla funzione sessuale e su altre differenti funzioni fisiologiche.

Abbiamo utilizzato come campione di studio una popolazione femminile rappresentata da donne in pre-menopausa (PrM), donne in menopausa (M) e soggetti transessuali FtM. I soggetti transessuali FtM si sottopongono a trattamento con T per lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie maschili. Essi ricevono alte dosi di T e per lunghi periodi prima e dopo l'intervento di riconversione del sesso (RCS) e rappresentano pertanto un buon modello per lo studio degli effetti androgenici.

Parte del nostro studio è stato dedicato allo studio degli effetti del testosterone sul metabolismo osseo, composizione corporea, metabolismo lipidico e glucidico.

Parte dei nostri studi sono stati dedicati alla valutazione degli effetti del testosterone sulla vagina umana e nella modulazione della attività sessuale femminile.

6. MATERIALI E METODI

TESTOSTERONE E PARAMETRI METABOLICI

Per lo studio delle funzioni metaboliche del testosterone abbiamo utilizzato come campione di studio una popolazione di 16 soggetti FtM , trattati per 54 settimane con:

- gruppo A (n = 8): testosterone undecanoato (Nebid 1000 mg, 1 iniezione alle settimane 0, 6, 18, 30 e 42) + placebo
- gruppo B (n = 8): testosterone undecanoato (Nebid 1000 mg, 1 iniezione alla settimana 0,6,18,30,42) + dutasteride (Avodart 0.5 mg /die)

Lo studio prevedeva una fase di controllo della durata di 3 settimane ed una fase di trattamento della durata di 42 settimane.

Fase di Controllo: (durata 3 settimane) durante questo periodo i soggetti hanno fornito 2 campioni di sangue a digiuno (minimo 10 ore) ed uno di urine. I soggetti sono stati sottoposti a 2 visite per confermare la presenza dei criteri di inclusione e l'assenza di quelli di esclusione, per determinare lo stato di salute e essere informati circa gli scopi dello studio. Durante le 2 visite sono stati sottoposti a:

- esame fisico: pressione arteriosa e frequenza cardiaca
- esami del sangue per la misurazione di: emocromo con formula, LH, FSH, estradiolo, testosterone, SHBG, TSH, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, GOT, GPT, insulina, glucosio, creatinina, Na, K, Ca, P, Mg, Cl, proteine totali, fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina, vitamina D
- esami antropometrici: peso e misure corporee

- DEXA total body per la determinazione della massa ossea e la composizione corporea

Fase di Trattamento: I campioni di sangue a digiuno (almeno 10 ore) sono stati prelevati ad ogni settimana di trattamento (settimane 0, 6, 18, 30, 42 sempre prima delle iniezioni).

Alla settimana 54 (fine dello studio) sono stati effettuati i seguenti esami:

- esame fisico: pressione arteriosa e frequenza cardiaca
- esame urine
- esami del sangue per la misurazione di: emocromo con formula, LH, FSH, estradiolo, testosterone, DHT, SHBG, TSH, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, GOT, GPT, insulina, glucosio, creatinina, Na, K, Ca, P, Mg, Cl, proteine totali, fosfatasi alcalina ossea, osteocalcina, vitamina D
- esami antropometrici: peso e misure corporee
- DEXA total body per la determinazione della massa ossea e la composizione corporea

Sono stati reclutati soggetti FtM sani, gonadectomizzati, di età compresa tra i 18 e i 45 anni. I soggetti sono stati informati circa la natura, lo scopo e gli obiettivi dello studio ed è stato richiesto loro di firmare un Consenso informato scritto per la partecipazione allo studio.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale S Orsola Malpighi di Bologna. I partecipanti sono stati assegnati al gruppo di trattamento A o B in maniera casuale (random) per garantire caratteristiche uniformi dei partecipanti nei due gruppi di studio. Il processo di randomizzazione è avvenuto attraverso liste generate tramite computer (Software package SAS, Windows NT). Lo studio è stato condotto in doppio cieco. I soggetti reclutati e lo sperimentatore non erano a conoscenza del gruppo di appartenenza dei volontari fino alla fine dello studio, in quanto il

paziente e il medico avrebbero potuto essere influenzati dal sapere quale trattamento era somministrato. Il doppio cieco poteva tuttavia essere rilevato in caso di emergenza medica.

PARAMETRI ANTROPOMETRICI E OSSO

Le misure antropometriche quali peso, l'indice di massa corporea (BMI), vita e circonferenza fianchi, sono state valutate ad ogni visita dalla stessa persona, secondo le raccomandazioni dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Altezza e peso sono stati misurati con l'approssimazione di 0,1 cm e 0,1 kg, rispettivamente, e il BMI è stato calcolato come rapporto tra peso (kg) per altezza (m) al quadrato (kg/m^2). Rapporto vita-fianchi (WHR) è stato calcolato dividendo la circonferenza vita con quella dei fianchi misurata con l'approssimazione di 0,1 cm.

La misurazione della composizione corporea è stata ottenuta utilizzando un sensitometro a doppio raggio fotonico (DEXA: Dual Energy X-ray Absorptiometry). La massa corporea magra (LBM) e massa grassa (FM) sono stati calcolati. La scansione è stata eseguita secondo le istruzioni del produttore. Il partecipante è stato scannerizzato in posizione orizzontale da dorsale a ventrale.

ACNE

L'acne è stata valutata con il metodo Cook modificato. Abbiamo valutato la gravità complessiva dell'acne su una scala da 0-8 sulla base di immagini fotografiche. In aggiunta agli standard fotografici, una scala di nove punti per comedoni, papule e macule sul viso è stata utilizzata in combinazione per una maggiore sensibilità.

FUNZIONE SESSUALE E UMORE

Nella fase di screening e alla fine del trattamento ai volontari dello studio sono stati somministrati due questionari per lo studio della funzione sessuale e del comportamento: l'FSFI (Female Sexual Function Index) e il POMS (Profile of Mood States).

TESTOSTERONE E VAGINA

Per lo studio degli effetti del T sulla vagina abbiamo reclutato 16 donne in pre-menopausa (PrM) e 16 donne in post menopausa (M) sottoposte a isterectomia vaginale per prolasso e 16 transessuali FtM sottoposti ad isterectomia, annessiectomia e vaginectomia per completamento del percorso di riconversione del sesso. I soggetti FtM reclutati erano stati precedentemente trattati con T (Testoviron depot i.m. ogni 7-10 gg, da 1 aa prima dell'intervento).

Sono state incluse nello studio donne sane, con anamnesi negativa per patologie maggiori in particolar modo oncologiche, non sottoposte a terapie croniche, non sottoposte a trattamenti ormonali nell'anno precedente l'intervento chirurgico. Sono state escluse donne in pre-menopausa con una gravidanza recente (<3 anni).

Per ogni donna, al termine dell'isterectomia, sono stati eseguiti 4 prelievi biotipici vaginali: tratto prossimale anteriore, prossimale posteriore, distale anteriore e distale posteriore. Queste aree biotipiche sono rappresentative di due porzioni della vagina: il prossimale di una regione di origine mulleriana e il distale di una regione di origine dal tratto uro-genitale.

Sono stati eseguiti prelievi biotipici di circa 1 cm x 1 cm che includessero stroma ed epitelio. I campioni sono stati divisi in due porzioni, una congelata per analisi biomolecolari, una fissata in formaldeide al 4% per analisi istologica ed immunoistochimica.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Ospedale S Orsola Malpighi di Bologna.

ANALISI ISTOLOGICA

Per ciascun paziente sono stati raccolti quattro biopsie dalla vagina prossimale e distale, anteriore e posteriore. Tali campioni di tessuto, sono stati fissati in un buffer (o soluzione tamponata) al 10% di formalina per l'analisi istologica. I campioni di tutti i pazienti sono stati sottoposti ad analisi standard morfologica con colorazione di ematossilina-eosina.

COLAZIONE CON ACIDO PERIODICO SCHIFF (PAS)

La colorazione PAS di ogni biopsia vaginale è stato eseguita per la valutazione delle riserve di glicogeno. In breve, i campioni, fissati in formalina e inclusi in paraffina, sono stati tagliati a fettine dello spessore di 4µm e montati su vetrini. Tali sezioni di tessuto, sono state deparaffinate, reidratate in acqua distillata, e quindi pre-trattati per cinque minuti con 1% di acido periodico (FlukaChemie, Svizzera). Dopo lavaggio in DDW, le sezioni sono state lasciate reagire con il reagente di Schiff (Sigma-Aldrich, Italia) per 15 minuti a temperatura ambiente. Per l'osservazione dei nuclei, è stata utilizzata la soluzione di ematossilina di Mayer, per visualizzarne il contrasto (Sigma-Aldrich, Milano, Italia).

ANALISI IMMUNOISTICHIMICA

I campioni di tessuto vaginale, sono stati fissati prima in formalina, incluse in paraffina, per poi essere tagliate con uno spessore di 4µm. Dopo deparaffinizzazione e blocco di attività perossidasi endogena, i vetrini sono stati sottoposti a recupero antigene in tampone citrato a pH 6 e sono state poi incubate con 10% siero di capra normale per 45 minuti. Le sezioni sono state colorate a 4°C con anticorpo monoclonale anti Ki67 (1:50; Dako Cytomation, Danimarca), con anticorpo monoclonale anti ER-α (recettori α per estrogeni) (1:50, Santa Cruz Biotechnology, USA) e anticorpo monoclonale anti PGP 9.5 (Preotein gene product) (US Biologicalm USA) .

WESTERN BLOT

Biopsie di tessuto vaginale sono state omogeneizzate con tampone utilizzando l' 1% di Triton X-100 integrato con un cocktail di inibitori delle proteasi (NaCl 0,1 mol / l, Tris-HCl 0,01 mol / l pH 7,6, EDTA 0,001 mol / l, 1% Triton X-100, leupeptina 10 mg / ml, pepstatina 1 mg / ml, aprotinina 2 mg / ml, antipaina 2 mg / ml, PMSF 100 ng / ml, itiotreitolo (DTT) 1 mmol / l, Na₃VO₄ 1 mmol / l). La concentrazione di proteine totali per ciascun campione è stata determinata mediante il metodo di Lowry. Successivamente abbiamo caricato una quantità totale per ciascun campione pari a 50 µg di proteina utilizzando sodio dodecil solfato all' 8% (SDS) su gel di poliacrilammide (8% di poliacrilamide; 10% SDS) in condizioni denaturanti (5% β- mercaptoetanololo) per poi trasferlo su membrana di difluoruro di polivinilidene (PVDF) (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Le membrane sono state bloccate con 5% di latte secco in 0,1% Tween-PBS e incubato per una notte a 4°C con anticorpo monoclonale anti-estrogeno utilizzando così' un anticorpo per il recettore alfa (1:500, Santa Cruz Biotechnology, USA). Le membrane sono state poi lavate tre volte con 0,1% Tween-PBS e incubate con anticorpo anti-topo perossidasi di rafano secondario. Dopo il lavaggio accurato il segnale è stato rilevato incubando le membrane con acqua ossigenata e utilizzando una soluzione di luminol enhancer per rilevare il segnale (ECL-Advance, Amersham Biosciences, USA) per poi esporli alla pellicola auto radiografica (ECL-Hyperfilm, Amersham Biosciences, USA). La densitometria su pellicola digitalizzata è stata effettuata utilizzando il software NIH ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

PCR (Real-time polimerasi chain reactions)

L' RNA totale è stato preparato da biopsie vaginali congelate con Trizol / cloroformio (Invitrogen, Paisley, UK) e sottoposto a semi-quantitativa Real Time qPCR utilizzando iQSybrGreen Supermix (BioRad, Hercules, California, USA) e primers per il gene del recettore degli androgeni (AR) (5' =GCAGCAGCAGCGGGAGAG e 3' = CCTTGGCGTTGTCAGAAATGGTC) utilizzando la strumentazione e il software suiCycler (BioRad) . Tutte le coppie di oligonucleotidi dei primers utilizzati nella PCR , sono stati progettati utilizzando il software Beacon Designer 2,0 e acquistati da Integrated DNA Technologies (IDT, Belgio). E` stato inoltre utilizzato il metodo $\Delta\Delta C$ per calcolare il campo di induzione e il valore Ct di ciascun gene è stato normalizzato con gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) 5' = GTGAAGCAGGCGTCGGAGG e 3' =CAAAGGTGGAGGAG TGGGTGTC).

7. ANALISI STATISTICHE

I dati sono stati riportati come valori medi + SD, mediana, 25 e 75 percentile. Le valutazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il programma computerizzato SPSS/PC. Valori di P minori di 0,005 sono stati considerati statisticamente significativi.

8. RISULTATI

TESTOSTERONE E PARAMETRI METABOLICI

16 soggetti FtM, età media 33.0 ± 4.9 e 35.6 ± 4.2 nel gruppo TU da solo e TU + D rispettivamente, sono stati inclusi, previa randomizzazione, nello studio. 8 soggetti FtM hanno ricevuto un'iniezione di TU 1000 mg alla settimana 0,6, 18,30, 42 più compresse placebo e 8 soggetti FtM hanno ricevuto un'iniezione di TU 1000 mg più una compressa di D (0,5 mg / die, per os) alla stessa settimana. 15 FtM hanno completato lo studio ed un paziente nel gruppo D + TU ha interrotto il trattamento dopo 30 settimane. Nessuna differenza significativa è stata trovata tra il gruppo TU-alone e TU+ D al basale per età, parametri antropometrici e livelli ormonali. (Tabella 1).

Tabella 1. Parametri basali: media + deviazione standard (SD)

	Mean \pm SD		P
	TU	TU+D	
Age (years)	33.0 ± 4.9	35.6 ± 4.2	ns
BMI (kg/m ²)	23.43 ± 3.07	23.15 ± 2.99	ns
FSH (IU/L)	77.66 ± 42.25	67.59 ± 29.78	ns
LH (IU/L)	49.40 ± 28.29	44.06 ± 17.09	ns
TT (nmol/L)	3.86 ± 3.61	7.29 ± 7.59	ns
FREE T nmol/L	0.18 ± 0.25	0.46 ± 0.75	ns
E (pg/mL)	14.50 ± 3.54	17.67 ± 9.81	ns
SHBG (nmol/L)	33.50 ± 12.29	33.00 ± 6.02	ns
PRL (ng/mL)	16.63 ± 11.53	11.25 ± 5.06	ns
TSH (MCU/ml)	1.11 ± 0.44	2.37 ± 2.52	ns

Ormoni

I livelli plasmatici di FSH ed LH si riducono significativamente alla settimana 54 rispetto al basale sia nel gruppo TU-alone sia nel gruppo TU+D (settimana 54 vs basale per FSH: TU-alone [p = 0.017], TU+D [p = 0.003] ; settimana 54 vs basale per LH: TU-alone [p = 0.015], TU+D [p = 0.001] . Nessuna differenza significativa tra i due gruppi è stata rilevata.

I livelli plasmatici di testosterone e testosterone biodisponibile aumentano significativamente in entrambi i gruppi (settimana 54 vs basale per T: TU-alone [p = 0.001], TU+D [p = 0.002] ; settimana 54 vs basale per free T: TU-alone [p = 0.01], TU+D [p = 0.05]). Nessuna differenza significativa tra i due gruppi è stata rilevata.

L'SHBG mostra una significativa riduzione nel gruppo TU-alone e TU+D (settimana 54 vs basale: TU-alone [p = 0.01], TU+D [p = 0.003]) senza significative differenze tra i due gruppi. I livelli plasmatici di estradiolo tendono ad aumentare ma senza significative differenze tra i due gruppi. Non cambiano i livelli plasmatici di PRL e TSH rispetto al basale e tra i due gruppi.

La tabella 2 mostra le modificazioni del profilo ormonale durante il trattamento.

Tabella 2. Parametri ormonali : media + deviazione standard (SD)

	TU + PLACEBO			TU + DUTASTERIDE			TOTAL		TU vs. TU + D	
	BASELINE	WK 54	P vs base	BASELINE	WK 54	P vs base	BASELINE	WK 54		P vs base
FSH (IU/L)	76.7 ± 42.3	23.7 ± 17.6	0,01	67.6 ± 29.8	38.8 ± 27.1	0.003	72.1 ± 35.6	30.3 ± 22.9	0.000	ns
LH (IU/L)	49.4 ± 28.3	12.2 ± 11.9	0,01	44.1 ± 17.1	19.9 ± 14.7	0.003	46.7 ± 22.7	15.4 ± 13.3	0.000	ns
TT (nmol/L)	3.9 ± 3.6	16.5 ± 6.2	0.001	5.8 ± 6.8	24.4 ± 9.5	0.002	5.6 ± 6.0	20.2 ± 8.6	0.000	ns
FT (nmol/L)	0.2 ± 0.3	2.5 ± 1.9	0,01	0.5 ± 0.8	4.1 ± 4.1	0,05	0.3 ± 0.6	3.2 ± 3.1	0.002	ns
E (pmol/L)	46.3 ± 6.4	94.0 ± 29.1	0.003	51.8 ± 22.6	114.3 ± 41.9	0.004	49.1 ± 15.9	102.4 ± 36.1	0.000	ns
SHBG (nmol/L)	33.5 ± 12.3	21.8 ± 5.1	0,01	33.0 ± 6.0	28.9 ± 8.2	0,03	33.3 ± 9.4	25.1 ± 7.4	0.001	ns
PRL (ng/ mL)	16.6 ± 11.5	17.0 ± 18.4	ns	11.3 ± 5.1	10.6 ± 4.8	ns	13.9 ± 9.0	14.0 ± 13.8	ns	ns
TSH (MCU/ml)	1.1 ± 0.4	1.6 ± 0.7	ns	2.4 ± 2.5	1.9 ± 0.9	ns	1.7 ± 1.9	1.7 ± 0.8	ns	ns

Parametri metabolici ed ematocrito

Alla fine dello studio il colesterolo totale e i trigliceridi tendono a diminuire ma non significativamente nel gruppo TU alone e non cambiano nel gruppo TU+D. Il colesterolo LDL tende ad aumentare ma non in maniera significativa in entrambi i gruppi di studio. Il colesterolo HDL si riduce significativamente nel gruppo TU-alone e TU +D (settimana 54 vs basale: TU-alone [p = 0.003], TU+D [p = 0.005]).

I livelli plasmatici della glicemia non cambiano nel gruppo TU-alone comparati con il gruppo TU+D. I livelli plasmatici dell'insulina e l'HOMA (Homeostasis Model Assessment) si riducono significativamente nel gruppo TU-alone e tendono ad aumentare anche se non in maniera significativa nel gruppo TU+D.

Al termine dello studio l'emoglobina e l'ematocrito (Ht) aumentano significativamente nel gruppo TU-alone e TU+D (settimana 54 vs basale per

Ht : TU-alone [p = 0.003], TU+D [p = 0.04]) ma nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i due gruppi al termine dello studio.

L'ematocrito aumenta significativamente nel gruppo TU-alone già alla 18° settimana, solo alla 54° settimana nel gruppo TU+D.

Tabella 3. Parametri metabolici ed ematocrito

		TU + PLACEBO		TU + DUTASTERIDE		TOTAL	
		BASELINE	week 54	BASELINE	week 54	BASELINE	week 54
SISTOLIC BLOOD PRESSURE	(mm Hg)	111.2 ± 11.5	112.5 ± 10.0	109.3 ± 10.8	101.4 ± 9.0	110.3 ± 10.8	107.3 ± 10.8
DIASTOLIC BLOOD PRESSURE	(mm Hg)	75.6 ± 6.2	75.6 ± 14.0	76.8 ± 7.9	67.8 ± 8.0 *	76.2 ± 6.9	72.0 ± 11.9
TOTAL CHOLESTEROL	(mg/dl)	195.8 ± 18.4	184.6 ± 17.2	168.5 ± 27.4	169.5 ± 31.3	182.1 ± 26.6	177.6 ± 25.1
TRIGLYCERIDES	(mg/dl)	92.8 ± 35.9	81.1 ± 43.3	76.0 ± 23.0	79.0 ± 26.6	84.4 ± 30.4	80.1 ± 35.2
HDL	(mg/dl)	69.7 ± 21.3	58.0 ± 17.3*	59.8 ± 12.6	53.2 ± 11.9*	64.8 ± 17.7	55.8 ± 14.7 *
GLUCOSE	(g/dL)	89.8 ± 11.6	84.7 ± 8.5	79.2 ± 7.5	81.5 ± 4.6	83.8 ± 10.5	82.4 ± 7.0
INSULIN	(mU/ml)	8.4 ± 2.2	5.6 ± 3.2	5.0 ± 2.5	5.7 ± 3.7	7.1 ± 3.5	5.9 ± 3.4
HOMA		2.0 ± 0.7	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.5	1.2 ± 0.8	1.5 ± 0.8	1.2 ± 0.7
AST	(U/L)	18.1 ± 5.4	16.5 ± 3.3	21.3 ± 4.5	20.2 ± 1.9	19.7 ± 5.1	18.2 ± 3.3
ALT	(U/L)	24.8 ± 14.0	18.1 ± 5.0	23.1 ± 14.0	18.4 ± 6.5	24.0 ± 13.5	18.2 ± 5.6
CREATININE	(mg/dl)	0.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1
URIC ACID	(mg/dl)	5.1 ± 2.4	5.2 ± 1.1	4.7 ± 0.5	4.8 ± 0.8	4.9 ± 1.6	5.0 ± 1.0
TOTAL PROTEIN	(gr/dl)	7.8 ± 0.3	7.1 ± 0.1	7.8 ± 0.4	7.1 ± 0.3	7.8 ± 0.4	7.1 ± 0.2
HEMOGLOBIN	(g/dl)	13.5 ± 0.9	14.8 ± 0.9 *	13.6 ± 0.7	14.1 ± 1.3	13.5 ± 0.8	14.6 ± 1.2*
HEMATOCRIT	(%)	40.1 ± 2.3	45.1 ± 2.3*	41.3 ± 1.6	43.8 ± 2.9*	40.7 ± 2.1	44.5 ± 2.6*

Composizione corporea e osso

BMI (body mass index) e WHR (waist to hip) alla fine dello studio tendono a ridursi in entrambi in gruppi senza tuttavia significatività. Nel gruppo TU-alone si riduce significativamente la massa grassa ($p=0.005$), mentre la massa magra aumenta in maniera non significativa ($p=0.08$). Nel gruppo TU+D la massa grassa si riduce ($p=0.05$) e la massa magra tende ad aumentare ($p=0.11$) ma non sono state osservate differenze significative alla fine del trattamento. L'analisi dei dati ha mostrato una differenza significativa tra i due gruppi nella riduzione della massa grassa.

Il BMI, il T score e lo Z score non cambiano significativamente nel gruppo TU-alone e TU+D, tuttavia nel gruppo TU-alone questi parametri hanno mostrato una tendenza ad incrementare al termine dello studio.

Tabella 4. Antropometria

	TU (n= 8)			TU + D (n= 7)			TU + TU+D (n= 15)	TU vs. TU + D
	Baseline	week 54	P vs baseline	baseline	week 54	P vs baseline	P value wk 54 vs basale	P value
Weight (kg)	66.9 ± 11.2	65.2 ± 11.5	ns	64.0 ± 10.5	63.0 ± 9	ns	Ns	ns
WHR	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.1	ns	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	ns	Ns	ns
Fat mass (gr)	19.2 ± 11.6	17.6 ± 10.0	0.005	16.1 ± 7.3	14.8 ± 4.7	ns	0.040	0.026
% Fat mass	30.9 ± 9.2	25.4 ± 9.7	0.002	25.1 ± 6.4	22.9 ± 4.0	ns	0.004	0.007
Lean mass (kg)	43.6 ± 5.5	46.0 ± 4.2	ns	45.6 ± 4.0	47.1 ± 5.0	ns	0.013	ns
% Lean mass	66.5 ± 8.3	71.0 ± 9.0	ns	72.7 ± 7.9	75.0 ± 4.3	ns	0.052	ns

Tabella 5. Metabolismo osseo

		TU + PLACEBO		TU + DUTASTERIDE		TOTAL	
		BASELINE	week 54	BASELINE	week 54	BASELINE	week 54
Osteocalcin	(ng/mL)	23.1 ± 7.8	21.4 ± 7.9	18.7 ± 9.2	21.3 ± 5.1	21.0 ± 8.6	21.4 ± 6.5
Vit D	(ng/mL)	22.7 ± 9.2	17.7 ± 9.3	20.8 ± 12.1	18.4 ± 11.8	21.8 ± 10.4	20.8 ± 12.1
Bone Alk Phosp	(U/L)	13.4 ± 4.5	13.8 ± 5.2	17.3 ± 5.1	16.4 ± 4.5	15.4 ± 5.1	15.1 ± 4.9
Ca	(mg/dl)	9.7 ± 0.3	9.2 ± 0.2	8.2 ± 3.2	9.0 ± 0.2	8.9 ± 2.3	9.1 ± 0.1
P	(mg/dl)	4.3 ± 0.5	3.7 ± 0.7	4.1 ± 0.5	3.7 ± 0.8	4.2 ± 0.5	3.7 ± 0.7
Mg	(mg/dl)	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1	2.2 ± 0.1	2.0 ± 0.1
TOTAL BODY							
BMD tot		1.2 ± 0.0	1.2 ± 0.0	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
T score		0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.6	-0.2 ± 0.4	0.0 ± 0.9	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.8
Z score		0.8 ± 0.6	0.9 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.9	0.6 ± 0.6	0.7 ± 0.8
LUMBAR SPINE							
BMD lomb		1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.2	1.0 ± 0.2
T score		-0.3 ± 0.7	-0.3 ± 0.3	-0.8 ± 1.0	-0.1 ± 0.9 *	-0.6 ± 0.9	-0.6 ± 0.7
Z score		-0.2 ± 0.8	-0.2 ± 0.5	-0.5 ± 1.0	-0.7 ± 0.8	-0.4 ± 0.9	-0.5 ± 0.7

Funzione sessuale e comportamento

Nessun cambiamento nel comportamento e nella forza muscolare è emerso dallo studio dei questionari somministrati alla settimana 0 e al termine dello studio.

Eventi avversi

Durante il trattamento non sono stati riportati effetti avversi maggiori eccetto lieve dolore nella sede di iniezione del farmaco durante e il giorno dopo.

Non è stato riportato un incremento dello score dell'acne nei soggetti trattati con TU-alone né effetti benefici derivati dall'aggiunta di D.

TESTOSTERONE E VAGINA

Analisi morfologica del tessuto vaginale

L'epitelio vaginale dei soggetti FtM appare più sottile di quello delle donne in premenopausa. L'epitelio vaginale di donne M appare atrofico. Glicogeno intracitoplasmatico è presente in tutte le donne PrM. Mentre non è stata dimostrata la presenza di glicogeno intracitoplasmatico in donne M e FtM.

Colorazione PAS

Anche se la colorazione con acido Schiff consente solo una valutazione qualitativa del glicogeno, sembra essere diminuita in M rispetto alle donne in PrM. La somministrazione di T è associata con una perdita completa di glicogeno nella mucosa vaginale.

Espressione del Ki-67

Ki-67 è una proteina nucleare presente in due isoforme di 345 e 395 Kda rispettivamente usata come marker di proliferazione cellulare. Il Ki-67 è prevalentemente espresso durante tutte le fasi attive del ciclo (G1, S, G2 e fasi M) ma è assente in cellule in fase G0. Durante l'interfase, l'antigene può essere esclusivamente rilevato nel nucleo, mentre durante la fase mitotica la maggior parte della proteina è localizzata sulla superficie dei cromosomi. L'antigene si degrada rapidamente all'ingresso della cellula in fase non proliferativa. La presenza del Ki-67 è stata ricercata sulla mucosa e sullo stroma vaginale usando l'anticorpo monoclonare anti Ki-67, clone MIB1 diluito 1:50. La valutazione dell'espressione del Ki-67 è stata eseguita valutando la percentuale di cellule positive in 12 campi microscopici a 400 ingrandimenti sia mediante normale conta ottica, sia mediante un programma di analisi di immagini. L'espressione del Ki-67 è stata dimostrata nei nuclei

delle cellule epiteliali vaginali in ogni gruppo studiato. Risulta tuttavia un' espressione maggiore nelle donne PrM e anche se non statisticamente significativamente ridotta nelle donne M. Nelle donne sottoposte a trattamento con T l'espressione del Ki-67 appare minima.

ER α expression

I nostri studi immunohistochimici confermano la presenza di recettori ER α con differente espressione sia nello stroma che nell'epitelio nei tre gruppi studiati. ER α appare ridotta nella mucosa e nello stroma di donne M quando comparata con donne PrM, anche se una differenza significativa è stata rilevata solo per la mucosa ($p < 0,001$). La somministrazione di T determina una riduzione della espressione di ER α sia nella mucosa ($p < 0,05$) che nello stroma ($p < 0,001$) quando comparato con donne PrM.

PGP 9.5 expression

PGP 9.5 rappresenta un marker di cellule neuronali e fibre nervose. Nei tessuti vaginali di donne PrM, la ricerca di PGP 9.5 ha mostrato una maggiore immunoreattività quando comparata con gli altri 2 gruppi.

RECETTORI PER ANDROGENI (AR)

Recettori androgenici sono stati individuati nella mucosa e nello stroma dei tessuti biotici vaginali prelevati, sia nel tratto prossimale che in quello distale della vagina, sia anteriore sia posteriore. Nella mucosa vaginale l'espressione di AR decresce con l'età ($p < 0.01$) ma non cambia con la somministrazione di T. Nello stroma, l'espressione di AR non cambia con l'età ma aumenta significativamente con la somministrazione di T ($p < 0.01$). In PrM la presenza di AR è maggiore nella mucosa rispetto allo stroma ($p < 0.01$)

mentre nelle donne M è maggiore nello stroma rispetto alla mucosa ($p < 0.05$). Non differenze di espressione sono state rilevate nei soggetti FtM trattati con T tra stroma e mucosa. Non significative differenze sono state riscontrate tra tratto prossima e distale. Infine, in nostri dati mostrano l'espressione di AR significativamente maggiore nella fase luteale (score: 22.18 ± 1.18 , mean \pm SE) rispetto alla fase follicolare del ciclo (score: 16.33 ± 2.40 mean \pm SE) ($P < 0.05$).

Espressione proteine dei AR con Western blot e PCR

L'espressione delle proteine dei AR studiata con Western blot aumenta significativamente nei soggetti FtM trattati con T ($p < 0.001$). Nessuna differenza di espressione abbiamo riscontrato tra il tratto prossimale e distale e tra la parete anteriore e posteriore.

L'espressione dell'mRNA di AR studiata con analisi quantitativa PCR conferma un'espressione significativamente più alta nei pazienti FtM rispetto alle donne M ($p < 0.01$) e nelle donne PrM rispetto alle donne M ($p < 0.01$). Nessuna differenza invece abbiamo riscontrato nell'espressione dell'mRNA tra FtM e PrM e tra tratto prossimale e distale, tra parete anteriore e posteriore, nei tre gruppi di studio.

Correlazione tra BMI ad età

Un' analisi comparativa dei nostri dati ha mostrato una correlazione negativa tra età ed espressione dei RA nella mucosa vaginale ($r = 0.33$), mentre nessuna correlazione è stata trovata tra AR e stroma.

Nessuna correlazione abbiamo inoltre individuato tra espressione di AR e BMI.

9. DISCUSSIONE

Gli effetti del T nelle donna, sia in pre che in post menopausa, sono ad oggi poco studiati e poco conosciuti e ancor meno sono noti i meccanismi biologici che sostengono gli effetti del T.

Negli ultimi anni è sempre più cresciuto tuttavia l'interesse per il trattamento con androgeni di donne in post-menopausa per i possibili effetti benefici riportati su desiderio sessuale, massa ossea, massa muscolare e benessere generale. In particolar modo numerosi studi clinici mettono in relazione uno stato di carenza androgenica con l'insorgenza o l'aggravamento di problematiche sessuali femminili. Diversi preparati di androgeni sono stati utilizzati per il trattamento di donne con desiderio sessuale ipoattivo (HSSD) e gli effetti positivi sui vari aspetti della funzione sessuale sono stati largamente riportati. L'eccitamento sessuale risulta dalla sinergia di meccanismi centrali e periferici. A livello periferico la vagina è l'organo chiave della risposta sessuale ma, ad oggi, esistono limitati studi sugli effetti della somministrazione a lungo termine di T sulle struttura vaginali umane. Evidenze scientifiche riportate negli ultimi anni, in particolare studi su animali, hanno tuttavia suggerito che gli androgeni potrebbero avere un ruolo chiave diretto sulle strutture vaginali e sulla funzione sessuale, indipendente dagli estrogeni e che oltre al loro effetto stimolatorio sulle regioni cerebrali gli androgeni possano avere un effetto periferico diretto.

Tuttavia, a causa della misura piuttosto piccola di questi effetti e l'incertezza sulla sicurezza a lungo termine, vi è una mancanza di accordo sull'utilizzo del T in donne con HSSD.

Nei nostri studi abbiamo voluto valutare da una parte gli effetti del testosterone sul metabolismo osseo, composizione corporea, metabolismo lipidico e glucidico e dall'altra gli effetti del testosterone sulla vagina umana e sulla modulazione della attività sessuale femminile.

Sul piano metabolico, nel nostro studio la somministrazione di T determina una riduzione del BMI e del WHR in entrambi i gruppi, mentre i livelli plasmatici di insulina e l'HOMA si riducono significativamente nel gruppo TU alone e tendono ad aumentare nel gruppo TU+D. I livelli plasmatici di colesterolo LDL durante il trattamento tendono ad aumentare e l'HDL ridursi, creando un profilo lipidico aterogenico. Nessun effetto benefico sul metabolismo osseo è stato riportato al termine del trattamento con il TU né effetti negativi sono risultati dalla somministrazione di D.

Obiettivo del nostro studio era quello di valutare l'impatto della terapia con testosterone da solo o in combinazione con D sui parametri metabolici e i possibili rischi cardiovascolari. Molti studi scientifici dimostrano che bassi livelli di testosterone determinano un aumento dei depositi di grasso, in particolare addominale (viscerale). Questa distribuzione del grasso è associato con lo sviluppo di sindrome metabolica e delle sue sequele, quali il diabete mellito tipo 2 e malattie cardiovascolari. Molti studi riportano che il trattamento con T diminuisce l'accumulo di grasso con un significativo miglioramento della massa magra e della sensibilità all'insulina. Sappiamo anche che uomini e donne con iperandrogenismo hanno un profilo lipidico sfavorevole (aumento TG e colesterolo LDL con riduzione del colesterolo HDL). Nel nostro studio riportiamo una tendenza alla riduzione del BMI e WHR in entrambi i gruppi, ma i livelli plasmatici di insulina e l'indice HOMA diminuisce significativamente solo nel gruppo TU-alone e tendono ad aumentare nel gruppo TU + D. Questo potrebbe suggerire un ruolo del DHT nel metabolismo del glucosio. I livelli plasmatici di colesterolo LDL durante il trattamento tendono ad aumentare il colesterolo HDL si riduce alla fine dello studio, creando un profilo lipidico aterogenico. Considerando i singoli fattori di rischio cardiovascolare, i risultati del nostro studio appaiono quindi non chiari. Non effetti più gravi sono stati riportati durante il trattamento e durante il follow-up.

Nelle nostre ricerche abbiamo studiato gli effetti del T sulle strutture vaginali umane.

I risultati del nostro studio indicano che la somministrazione di T induce la perdita della normale architettura dell'epitelio vaginale con perdita dello strato intermedio e superficiale e completa deplezione del contenuto di glicogeno. Nessuna differenza abbiamo invece riscontrato nei tre gruppi studiati nello stroma. La deplezione di glicogeno dopo T somministrazione si è verificata indipendente dalla persistenza dei livelli circolanti di E. Infatti nonostante la terapia con T, i livelli circolanti di E non sono soppressi, in parte per l'attività ovarica minima residua e in parte per l'aromatizzazione periferica degli androgeni. La deplezione di glicogeno osservata nel nostro studio è dunque probabilmente legata ad un effetto diretto del T. In vagina il glicogeno è normalmente metabolizzato dalla flora batterica vaginale in acido lattico e responsabile del normale pH vaginale. La perdita del glicogeno potrebbe risultare in una perdita del normale pH vaginale e favorire la colonizzazione micotica o batterica. Nei soggetti da noi studiati non è stata riportata un' aumentata incidenza di infezioni vaginali.

Riguardo la proliferazione dell'epitelio vaginale, le ricerche immunoistochimiche mostrano l'espressione di Ki-67 nei tre gruppi. Come ci aspettavamo l'espressione del Ki-67 risulta maggiore nelle donne PrM quando comparata con donne M e quasi assente nei soggetti FtM. La perdita di proliferazione dell'epitelio vaginale dopo somministrazione di T non era stata fin'ora mai riportata ed indica che la terapia con T potrebbe indurre atrofia vaginale nonostante la persistenza della presenza di E circolanti. L'effetto antagonizzante del T rispetto agli E è stato invece già riportato in altri tessuti come l'endometrio e la mammella (28,29).

Questo effetto è stato confermato dalla riduzione dell'espressione dei recettori α per E nei soggetti FtM come mostrato dalle analisi western blot. I recettori α per E, sia dello stroma che dell'epitelio, sono indispensabili per la normale maturazione vaginale.

Nel nostro studio abbiamo inoltre studiato l'espressione di un marker non-specifico neuronale chiamato PGP 9.5. Le tecniche immunohistochimiche mostrano una riduzione del PGP 9.5 sia nelle donne M che nei soggetti FtM. Precedenti studi su animali riportano una regolazione della densità delle fibre nervose vaginali di tipo estrogenica (30), in quanto riportano una densità maggiore nei ratti ovariectomizzati e ridotta dopo trattamento con E2. Gli studi su tessuti vaginali umani sono scarsi. I nostri dati preliminari suggeriscono una regolazione da parte degli E dell'innervazione vaginale in condizioni fisiologiche; noi troviamo infatti l'espressione di PGP 9.5 maggiore nelle donne PrM e più bassa nelle donne M, e una riduzione di PGP 9.5 dopo trattamento con T. Questa parziale differenza con studi precedenti potrebbe essere spiegata con una differente risposta agli ormoni in specie differenti e risposte differenti con dosaggi di T maggiori. I nostri dati sono dati preliminari e vogliono solo suggerire che un meccanismo ormonale nella regolazione dell'innervazione vaginale esiste.

Per quanto riguarda l'espressione dei recettori per gli androgeni, il nostro studio ha dimostrato la presenza di AR nella vagina umana, senza differenza di espressione tra il tratto prossimale e distale sia nelle donne PrM e M sia nei soggetti FtM. In accordo con studi precedenti, noi riportiamo una correlazione negativa tra età ed densità di espressione di AR nell'epitelio vaginale ma non nella stroma. Nelle donne PrM, AR sono espressi maggiormente nell'epitelio che nello stroma, ma questa differenza tende a scomparire con l'età. La ridotta espressione di AR con l'età potrebbe suggerire un ruolo del T in vagina durante l'età riproduttiva. Uno studio della variazione dei AR nella vagina umana dopo somministrazione di T non era mai stato riportato in letteratura. In accordo con studi su animali, l'espressione di AR aumenta dopo la somministrazione di T. Poiché nei nostri pazienti la somministrazione di T induce una riduzione dei livelli circolanti di E, anche questo dato suggerisce un possibile effetto diretto del T. L'espressione di AR aumenta anche durante la fase luteale del ciclo mestruale quando i valori di T circolanti sono maggiori. Come sappiamo un aumento dei livelli di T risulta in un aumento del desiderio sessuale e dell'eccitazione; l'aumento dell'espressione di AR durante il trattamento con T

potrebbe dunque contribuire a migliorare gli effetti del T e preparare l'organo vaginale a rapporto sessuale.

Scegliere una terapia androgenica nella donna che sia nel contempo efficace e sicura rimane comunque oggi una sfida aperta; poco chiari sono ancora gli effetti sul T su vari organi bersaglio e sebbene, alla luce anche dei nostri dati, il T sembra agire con effetto antiproliferativo e sembri essere una terapia sicura sul piano metabolico, occorre ricordare che l'aromatizzazione del T a E2 può indurre uno stato di relativo iperestrogenismo a livello tissutale, potenzialmente rischioso.

Nuovi studi sono dunque certamente necessari per meglio comprendere il ruolo degli androgeni e confermare la sicurezza dell'uso del T nella donna.

13. BIBLIOGRAFIA

1. **Orentreich N et al.** Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulphate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 59: 551-555.
2. **Arlt W.** Dehydroepiandrosterone and ageing. *Best practice & Research in Clin Endocrinol Metab* 2004; 18: 363-380.
3. **Sherwin BB.** Affective changes with estrogen and androgen replacement therapy in surgically menopausal women. *J Affect Disor* 1988; 14: 177.187..
4. **Floter A et al.** Addition of testosterone to estrogen replacement therapy in oophorectomized women: effects on sexuality and well-being. *Climateric* 2002; 5: 357.365.
5. **Davis SR et al.** Testosterone enhances estradiol's effects on postmenopausal bone density and sexuality. *Maturitas* 1995; 21: 227-236.
6. **Watts NB et al.** Comparison of oral estrogen and estrogen plus androgen on bone mineral density, menopausal symptoms and lipid-lipoprotein profiles in surgical menopause. *Obstet Gynecol* 1995; 85: 529-537.
7. **Greenblatt RB et al.** Evaluation of an androgen, estrogen, estrogen-androgen combination and placebo in the treatment on menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 1950; 10: 1547-1558.
8. **Sarrel P et al.** Estrogen and estrogen-androgen therapy in postmenopausal women with dissatisfied with estrogen-only therapy. *J Reprod Med* 1998; 43: 847-856.
9. **Simon JA et al.** Transdermal testosterone patch improves sexual activity and desire in surgically menopausal women. *Obstet Gynecol* 2004; 103: 64s.
10. **Braunstein GD et al.** Testosterone patch for the treatment of low sexual desire in surgically menopausal women. *Abstr Menopause* 2003; 10: 587.

11. **Davis S et al.** Efficacy and safety of testosterone patch for the treatment of low sexual desire in surgically menopausal women. *Fertil Steril* 2003; 30s: 76.
12. **Lobo RA et al.** Comparative effects of oral esterified estrogens with or without methyltestosterone on endocrine profiles and dimensions of sexual function in postmenopausal women with hypoactive desire disorder. *Fertil Steril* 2003; 79: 1341-1352.
13. **Miller N et al.** Histological changes in the genital tract in transsexual women following androgen therapy. *Histopathology* 1986;10(7):661-9.
14. **Traish AM et al.** Testosterone increases blood flow and expression of androgen and estrogen receptors in the rat vagina. *J Sex Med.* 2007 May;4(3):609-19.
15. **Se Graves R et al.** Female hypoactive sexual desire disorder: History and current status. *J Sex Med.* 2006 May;3(3):408-18.
16. **Pessina MA et al.** Differential effects of estradiol, progesterone, and testosterone on vaginal structural integrity. *Endocrinology* 2006;147(1):61-9.
17. **Shifren JL et al.** Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy. *New England Journal of Medicine* 2000; 343: 682-688.
18. **Basaria S et al.** Safety and adverse effects of androgens: how to counsel patients. *Mayo Clinic Proc* 2004; 79: S25-S32
19. **Key T et al.** Endogenous hormones and breast cancer collaborative group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 606-616.
20. **Somboonporn W et al.** Testosterone effect on breast: implications for testosterone therapy for women. *Endocr Rev* 2004; 25: 374-388.

21. **Dimitrakakis C et al.** A physiological role for testosterone in limiting estrogenic stimulation of the breast. *Menopause* 2003; 10: 292-298.
22. **Dimitrakakis C et al.** Breast cancer incidence in postmenopausal women using testosterone in addition to usual hormone therapy. *Menopause* 2004; 11: 531-535.
23. **Smith DC et al.** Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 1975; 293:1164-1167.
24. **Rose GL.** The inhibitory effects of danazol, danazol metabolites, gestrinone, and testosterone on the growth of human endometrial cells in vitro. *Fertil Steril* 1988; 49: 224-228.
25. **Mertens HJ et al.** Androgen receptor content in human endometrium. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1996; 70:11-13.
26. **Tuckerman et al.** Do androgens have a direct inhibitory effect on endometrial function? An in vitro study. *Fertil Steril* 2000; 74: 771-779.
27. **Zang H et.** Effects of testosterone and estrogen treatment on the distribution of sex hormone receptor in the endometrium of postmenopausal women. *Menopause* 2008; 15(2): 233-239.
28. **Merigiola MC et al.** Effect of Long-Term Testosterone Administration on the Endometrium of Female-to-Male (FtM) Transsexuals. *J Sex Med* 2009; 6(11):3193-200.
29. **Von Schoultz B et al.** Testosterone inhibits estrogen/progestogen-induced breast cell proliferation in postmenopausal women. *Menopause* 2007; 14:183-90.
30. **Smith PG et al.** Estrogen Regulates Vaginal Sensory and Autonomic Nerve Density in the Rat. *BiolReprod* 2004;71(4):1397-404.

