

**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE**



**CORSO DI LAUREA MAGISTRALE  
IN BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA**

**RUOLO DEL POLIMORFISMO CAG DEL RECETTORE DEGLI  
ANDROGENI COME MEDIATORE DELL'AZIONE DEL  
TADALAFIL**

**HOW ANDROGEN RECEPTOR CAG<sub>n</sub> IS INVOLVED IN  
MEDIATING THE ACTION OF TADALAFIL**

Tesi di laurea magistrale di:

Sara Sacco

Relatore:

Chiar.mo Prof. Giancarlo Balercia

Correlatore:

Dott.ssa Federica Finocchi

Sessione straordinaria di febbraio  
Anno Accademico 2020/2021

## INDICE

<b>CAPITOLO 1. LA DISFUNZIONE ERETTILE</b> .....	4
1.1 FISIOLOGIA DELL'EREZIONE .....	6
1.2 LA FISIOPATOLOGIA DELLA DISFUNZIONE ERETTILE .....	9
1.2.1 CAUSE NEUROLOGICHE .....	11
1.2.2 CAUSE ENDOCRINE .....	11
1.2.3 CAUSE VASCOLARI .....	12
1.2.4 CAUSE FARMACOLOGICHE .....	13
1.2.5 MALATTIE SISTEMICHE, INVECCHIAMENTO, STILE DI VITA E DISFUNZIONE ERETTILE .....	14
1.3 DIAGNOSI DELLA DISFUNZIONE ERETTILE .....	16
1.3.1 ANAMNESI .....	16
1.3.2 ESAME OBIETTIVO.....	17
1.3.3 ESAMI DI LABORATORIO .....	17
1.3.4 ECO-COLOR-DOPPLER PENIENO.....	21
1.4 TRATTAMENTO DELLA DISFUNZIONE ERETTILE .....	22
1.4.1 TERAPIA PSICO-SESSUALE .....	23
1.4.2 INTERVENTI SULLO STILE DI VITA .....	24
1.4.3 FARMACI INIBITORI DELLE FOSFODIESTERASI-5 .....	24
<b>CAPITOLO 2: RECETTORE DEGLI ANDROGENI, POLIMORFISMO CAG E SUOI EFFETTI</b> .....	31
2.1 METABOLISMO OSSEO .....	35
2.2 SALUTE MENTALE .....	35
2.3 DISORDINI NEURODEGENERATIVI.....	36
2.4 PROFILO METABOLICO.....	37

2.5 FERTILITÀ MASCHILE.....	38
2.6 CANCRO PROSTATICO .....	39
2.7 FUNZIONE SESSUALE.....	40
<b>CAPITOLO 3: SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI.....</b>	<b>46</b>
4.1 CASISTICA.....	46
4.2 DISEGNO DELLO STUDIO .....	46
4.3 ANALISI ORMONALE e GLICOMETABOLICA.....	48
4.4 ECOGRAFIA TESTICOLARE ED ECO-COLORDOPPLER PENIENO.....	48
4.5 QUESTIONARIO IIEF-15 .....	49
4.6 QUESTIONARIO MedDiet Score .....	51
4.7 ANALISI MOLECOLARI .....	52
4.7.1 ESTRAZIONE DNA GENOMICO.....	53
4.7.2 QUANTIZZAZIONE DEL DNA .....	53
4.7.3 PCR.....	54
4.7.4 SEQUENZIAMENTO CON ANALISI DEI FRAMMENTI.....	56
4.8 ANALISI STATISTICA.....	58
<b>CAPITOLO 5: RISULTATI .....</b>	<b>60</b>
5.1 ANALISI DI CORRELAZIONE BIVARIATA.....	65
5.1.1 PARAMETRI ORMONALI.....	65
5.1.2 PARAMETRI METABOLICI.....	66
5.1.3 FUNZIONE SESSUALE.....	66
5.1.4 STUDIO DEL POLIMORFISMO CAG .....	67
<b>CAPITOLO 6: DISCUSSIONE .....</b>	<b>74</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>81</b>

## **CAPITOLO 1. LA DISFUNZIONE ERETTILE**

L'organizzazione mondiale della sanità definisce la disfunzione erettile (DE) una condizione caratterizzata dall'incapacità di raggiungere o mantenere un'erezione sufficientemente valida per condurre un rapporto sessuale soddisfacente (1). Secondo l'OMS "la salute sessuale è essenziale per il benessere fisico ed emotivo degli individui, delle coppie e delle famiglie, nonché per lo sviluppo sociale ed economico della comunità e dei paesi". La DE accompagna l'uomo fin dagli albori della civiltà, come testimoniato da antiche scritture Egizie, vecchie di più di 5000 anni, dove viene riportata la descrizione di questo disturbo; tuttavia, il primo trattamento farmacologico efficace è comparso solo nei tardi anni '90, con la messa in commercio, da parte di Pfizer, del sildenafil (Viagra®), la prima molecola appartenente alla famiglia degli inibitori delle fosfodiesterasi-5 (PDE5i), che ha rappresentato una vera e propria rivoluzione nel trattamento della DE (2). Dal punto di vista epidemiologico, la DE si presenta con una prevalenza dell'1-10% nei soggetti di età inferiore ai 40 anni, aumentando progressivamente nelle fasce di età superiori: 20-40% nell'intervallo 60-69 anni e 50-100% sopra i 70 anni (3). Oltre all'età, che rappresenta comunque uno dei fattori di rischio più importanti, numerosi studi trasversali e longitudinali hanno riportato una correlazione tra sviluppo di DE e diverse

condizioni cliniche patologiche come: diabete mellito (DM), ipertensione arteriosa, iperlipidemia, sindrome metabolica (SMET), depressione e sintomi ostruttivi delle basse vie urinarie (LUTS) (1). Secondo una recente indagine (The Multinational Survey on the Aging Male - MSAM-7), a proposito, tra gli uomini con LUTS, la DE ha una prevalenza complessiva del 49%, con un 10 % di soggetti che lamentano la completa assenza di erezioni (2). Inoltre, i dati provenienti da numerosi studi hanno mostrato che anche fattori ambientali e stili di vita (es. fumo, obesità, attività fisica limitata o assente) possono condizionare la comparsa di DE (1).

## ***1.1 FISIOLOGIA DELL'EREZIONE***

Il meccanismo erettile è basato su modificazioni di tipo emodinamico, che richiedono un controllo nervoso centrale e periferico e un substrato endocrino non alterati, nonché un'anatomia normale dell'organo (3).

Questo meccanismo neurovascolare quindi richiede: vasodilatazione peniena, rilasciamento della muscolatura dei corpi cavernosi, iperafflusso vascolare da parte delle arterie cavernose e pertinenza del sistema veno-occlusivo (4).

(figura 1)

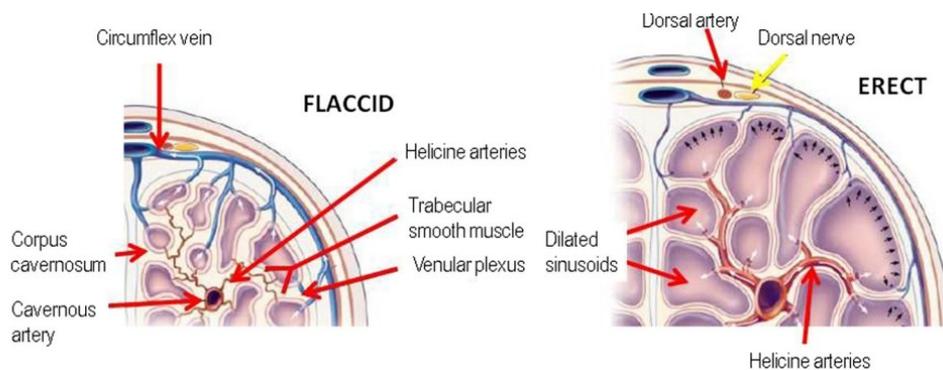


Figura 1: modificazione vascolare nell'erezione (K.-E. Andersson, 2011)

Un altro elemento fondamentale del meccanismo è l'ossido nitrico (NO), neurotrasmettitore prodotto sia dalle cellule dell'endotelio ma in gran parte anche dai terminali assonici dei neuroni post-gangliari NANC. A livello penieno, il rilascio locale di NO, provoca il rilassamento della muscolatura liscia del tessuto cavernoso e un incremento del flusso ematico afferente ai

corpi cavernosi, che a loro volta determinano la compressione dei piccoli efferenti venosi situati al di sotto della tonaca albuginea, ostacolando il ritorno venoso locale e determinando, in questo modo, l'inizio dell'erezione.

Il rilassamento delle cellule muscolari lisce deriva dall'aumento della guanosina monofosfato ciclico (cGMP), per stimolazione diretta da parte dell'NO della guanilato-ciclasa.

Il cGMP attiva a livello intra-cellulare la protein-chinasi C, la quale causa una riduzione dell'ingresso di calcio all'interno della cellula. (Figura 2)

Il cGMP residuo è catabolizzato dall'isoenzima di tipo 5 delle fosfo-diesterasi (PDE5), che è il target degli inibitori enzimatici delle fosfodiesterasi (***PDE5-inibitori***) utilizzati per la terapia della ***disfunzione erettile***. (5)

La fase di detumescenza inizia, invece, con l'attivazione dei recettori adrenergici situati sulle arterie cavernose e sulla muscolatura liscia trabecolare, che a sua volta conduce alla riduzione dell'afflusso arteriosa e al collasso degli spazi lacunari. Si ha quindi la decompressione dei vasi efferenti che permette il drenaggio dei corpi cavernosi e la risoluzione dell'erezione (1).

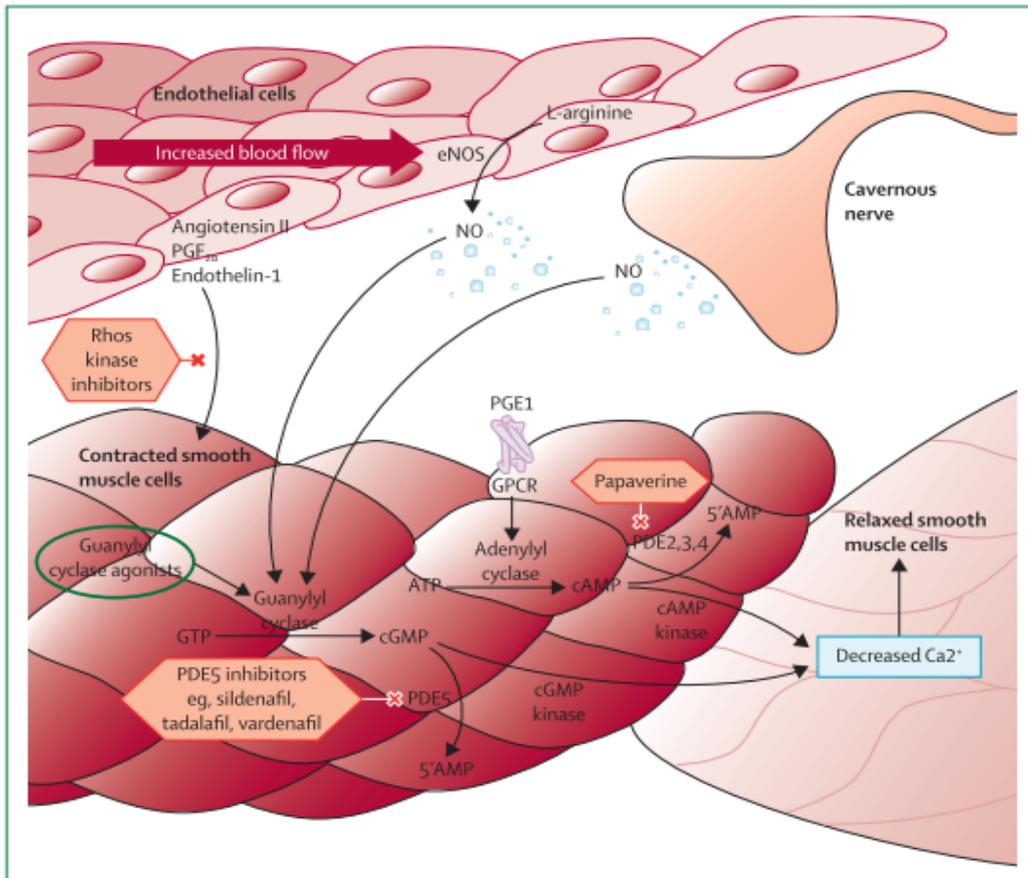


Figura 2: il meccanismo dell'erezione (Haderer & Muller Biomedical Art, 2009)

## ***1.2 LA FISIOPATOLOGIA DELLA DIFUNZIONE ERETTILE***

La funzione sessuale “normale” è stata descritta come “un processo psicosociale che implica il coordinamento dei sistemi psicologico, endocrino, vascolare e neurologico” (6). La DE può essere classificata come psicogena, organica o mista; quest’ultima rappresenta la forma più comune. (7)

Le principali forme organiche di DE:

### **VASCULOGENICA**

- Arteriosa: macro- o microangiopatia (es. aterosclerosi e traumi)
- Venosa: insufficienza del meccanismo veno-occlusivo cavernoso
- Sinusoidale: ostacolo al rilassamento (es. fibrosi)

### **NEUROGENA**

- Centrale (cervello o midollo spinale): insulti cerebrali, sclerosi multipla, lesioni del midollo spinale
- Periferica
  - Afferente (neuropatia sensitiva, es. diabete mellito e polineuropatie)
  - Efferente (neuropatia autonoma o esiti di chirurgia pelvica)

### **ENDOCRINA**

- Diabete mellito, ipogonadismo, iperprolattinemia

### **INDOTTA DA SOSTANZE**

- Farmaci (antipertensivi, antiandrogeni, antidepressivi, sedativi)
- Fumo di sigaretta, alcol, sostanze ad uso voluttuario (es. marijuana ed eroina)

### **MALATTIE SISTEMICHE**

- Malattie epatiche, renali, respiratorie e cardiovascolari

### **FATTORI LOCALI**

- Es. fibrosi dei corpi cavernosi post-priapismo, Induratio Penis Plastica, frattura dei corpi cavernosi

Fattori psicologici, inoltre, sono coinvolti in un significativo numero di casi di DE, da soli o in combinazione con fattori organici. Uno dei fattori psicologici più importante in assoluto collegato all'erezione è sicuramente l'ansia da prestazione (fobia di non riuscire a portare a termine il rapporto sessuale). Al momento, si ritiene che la DE psicogena sia riconducibile a una serie di fattori predisponenti, precipitanti e di mantenimento (3).

Fattori collegati allo sviluppo della disfunzione erettile psicogena

**Fattori predisponenti**

- Pregresse esperienze traumatiche
- Educazione repressiva
- Educazione sessuale inadeguata
- Condizionamenti religiosi o culturali
- Problemi fisici e mentali

**Fattori precipitanti**

- Problemi relazionali acuti
- Pressione sociale o familiare
- Eventi significativi (es. gravidanza, nascita di un figlio, perdita del lavoro)

**Fattori di mantenimento**

- Problemi relazionali
- Problemi fisici o mentali
- Mancanza di conoscenza sulle possibilità di trattamento

### ***1.2.1 CAUSE NEUROLOGICHE***

Alcune patologie neurologiche sono frequentemente associate alla DE, incluse la sclerosi multipla, l'epilessia del lobo temporale, il morbo di Parkinson, l'ictus, l'Alzheimer e i danni al midollo spinale. I pazienti che vanno incontro a chirurgia pelvica (es. prostatectomia radicale) hanno un rischio molto elevato di danno ai *nervi erigentes* con conseguente DE neurogena. Fortunatamente, i recenti avanzamenti nelle tecniche chirurgiche hanno ridotto in modo significativo l'incidenza di DE post-chirurgia pelvica (3).

### ***1.2.2 CAUSE ENDOCRINE***

Il testosterone e gli androgeni giocano un ruolo importante nella stimolazione del desiderio sessuale e nel mantenimento di adeguate erezioni spontanee notturne, ma hanno un effetto più limitato sulle erezioni indotte da stimoli visivi. In più, il testosterone è importante nel regolare l'espressione di NO sintasi (NOS) e di PDE-5 a livello locale penieno. Il deficit di testosterone, o ipogonadismo, è stato recentemente associato a mortalità e morbilità cardiovascolari (3). Un altro ormone importante è la prolattina, il cui aumento della concentrazione (iperprolattinemia) determina l'inibizione degli ormoni rilascianti le gonadotropine. Ciò conduce a una riduzione della secrezione di

ormone luteinizzante (LH), responsabile a sua volta della secrezione da parte delle cellule di Leydig di testosterone, che risulterà diminuita (3).

### ***1.2.3 CAUSE VASCOLARI***

Le vasculopatie rappresentano la più frequente causa organica di DE (fino all'80% dei casi) e sono tutte associate dal comune denominatore della disfunzione endoteliale (1). Tutti i fattori di rischio cardiovascolare implicati nella patogenesi dell'aterosclerosi possono determinare la comparsa di DE su base vascolare. Numerosi studi, infatti, hanno confermato la maggiore prevalenza di disfunzione erettile in pazienti con ipertensione, che in questo sottogruppo di soggetti può raggiungere una prevalenza del 68% (8). Inoltre, diabete mellito, ipertensione, dislipidemia, obesità e fumo di sigaretta sono tutti forti fattori di rischio per arteriopatia coronarica e disfunzione erettile (3).

Le attuali linee guida della *III Princeton Consensus* hanno riconosciuto la DE come un indice predittore di rischio cardiovascolare e in particolare, di arteriopatia coronarica (9), come già suggerito dallo studio del 2010 di Bohm et al., che avevano riportato un pericolo di infarto del miocardio aumentato di 2 volte nei pazienti ad alto rischio cardiovascolare con DE (10).

### **1.2.4 CAUSE FARMACOLOGICHE**

Farmaci e sostanze d'abuso associati a DE

#### **ANTIANDROGENI**

- Agonisti del GnRH (leuprolide, goserelina)
- Chemioterapici (ciclofosfamide e busulfano)
- Flutamide
- Ketoconazolo
- Spironolattone
- Cimetidina

#### **ANTIPERTENSIVI**

- Tiazidici
- B-bloccanti
- Calcio-antagonisti

#### **ANTIARITMICI**

- Digossina
- Amiodarone
- Disopiramide

#### **STATINE**

- Atorvastatina

#### **PSICOFARMACI**

- Antidepressivi triciclici
- Inibitori selettivi del reuptake della serotonina
- Fenotiazine
- Butirrofenoni

#### **SOSANZE D'ABUSO**

- Marijuana
- Oppiacei
- Cocaina
- Nicotina
- Alcol

Gli psicofarmaci e gli antipertensivi sono tra le classi di farmaci più frequentemente coinvolte nello sviluppo della DE (11). Tra questi, gli

antidepressivi, inclusi gli inibitori selettivi del reuptake della serotonina, sono gli psicofarmaci più utilizzati, mentre gli antipsicotici come risperidone e olanzapina sono quelli che si associano con più alta probabilità a DE (12). I tiazidici, seguiti dai  $\beta$ -bloccanti, sono i più comuni gruppi di antipertensivi che causano DE, mentre gli  $\alpha$ -litici, gli ACE inibitori e i sartani, dal punto di vista della funzione sessuale, sono quelli con minori effetti collaterali (13).

### ***1.2.5 MALATTIE SISTEMICHE, INVECCHIAMENTO, STILE DI VITA E DISFUNZIONE ERETTILE***

Dati ricavati da studi epidemiologici confermano che l'età rappresenta il principale fattore di rischio per DE, sia in termini di prevalenza che di severità. Nello studio "The Massachusetts Male Aging Study", il 39% degli uomini entro i 40 anni presentava DE, con una prevalenza che incrementava fino al 70% negli uomini di 70 anni. Questa relazione è stata poi confermata da altri due ampi studi di popolazione, condotti su 2476 e 1464 soggetti (3).

Il diabete mellito di tipo 2 rappresenta il secondo più comune fattore di rischio per DE, che si presenta nel 50-75% dei soggetti diabetici e che insorge 3 volte più frequentemente in questa categoria di pazienti, rappresentando il primo segno di malattia nel 12% dei diabetici (14).

Lo stile di vita sedentario, il fumo, l'alcol e l'abuso di droghe, i disturbi del sonno, l'obesità e la sindrome metabolica sono tutti fattori associati a DE,

come anche malattie sistemiche croniche quali nefropatie, epatopatie e malattie polmonari (3).

In una *review* del 2017 del gruppo di Di Francesco, viene sottolineato il rapporto tra dieta mediterranea e DE. In particolare, tutti i trial clinici mostrano come la dieta mediterranea e lo stile di vita possano influenzare positivamente la funzione sessuale. L'uso dell'olio d'oliva, l'assunzione di vegetali, un consumo moderato di vino, l'introduzione di cereali integrali, frutta secca, fibre e pesce si associano a una minore prevalenza di DE, soprattutto nei pazienti con diabete mellito di tipo 2. Inoltre, dallo studio MEDITA (MEditerranean DIet and Type 2 diAbetes), è emerso che la dieta mediterranea, nei pazienti diabetici, rallenta il deterioramento dell'attività sessuale e diminuisce l'infiammazione del sistema vascolare (15).

## ***1.3 DIAGNOSI DELLA DISFUNZIONE ERETTILE***

### ***1.3.1 ANAMNESI***

Una corretta diagnosi di DE è legata ad un'anamnesi completa che indaghi oltre che la storia clinica del paziente, anche dettagli della sua vita sessuale e del quadro psicosociale.

L'anamnesi può essere d'aiuto anche nella prima differenziazione tra cause organiche e psicologiche di DE: erezioni spontanee al mattino o stimulate da fantasie sessuali, suggeriscono una causa prevalentemente psicogena, come anche la comparsa improvvisa, l'andamento intermittente o la breve durata del disturbo. Al contrario, la comparsa graduale, l'andamento progressivo e la lunga durata della DE suggeriscono una causa organica. Andrebbero inoltre indagati le patologie pregresse, l'attuale o pregressa assunzione di farmaci o di sostanze d'abuso, il fumo e la presenza o meno di desiderio sessuale (3).

Tra gli strumenti utili ad indagare la presenza e severità di DE ci sono questionari standardizzati come: "International Index of Erectile Function" (IIEF-15) e lo "Structured Interview on Erectile Dysfunction (SIEDY). L'IIEF-15 è un questionario multidimensionale auto-somministrabile costruito per investigare 5 diversi aspetti della vita sessuale maschile (16).

Il SIEDY, invece, è un'intervista strutturata che utilizza 13 items per fornire al clinico una guida nell'inquadramento del DE e quantificarne la componente organica, psicologica e relazionale (17).

Una descrizione più approfondita del questionario IIEF-15 è riportata nella sezione di "materiali e metodi".

### ***1.3.2 ESAME OBIETTIVO***

In tutti i casi di DE è raccomandata l'esecuzione di un esame obiettivo generale focalizzato sulla funzione sessuale, andando a ricercare eventuali anomalie nell'anatomia genitale (es. placche peniene), metabolici, neurologici e vascolari. Vanno quindi valutati la presenza, il volume e la consistenza dei testicoli, nonché la distribuzione e la rappresentazione dei caratteri sessuali secondari, per identificare eventuali casi di ipogonadismo. L'esame andrebbe completato con l'esplorazione rettale digitale in tutti gli uomini di età maggiore di 50 anni o negli uomini a rischio aumentato di adenocarcinoma prostatico. (18)

### ***1.3.3 ESAMI DI LABORATORIO***

La Società Internazionale della Medicina della Sessualità (ISSM) ha proposto, come indagini di laboratorio per i pazienti con DE, la valutazione di: glicemia a digiuno, profilo lipidico e, in casi selezionati, livelli di testosterone totale (18). Importante è anche lo screening per escludere rischio di cancro alla

prostata dosando l'antigene prostatico specifico (PSA, associato all'esplorazione rettale digitale) in tutti i pazienti con DE ed età superiore ai 50 anni, in quelli di età inferiore ma a rischio moderato e in quelli sintomatici per LUTS (19).

Anomalie dello stato glicemico si dimostrano con valori di glicemia a digiuno di 100-126 mg/dl o da valori di emoglobina glicata pari a 42-48 mmol/mol (6-6,5%). In questi casi, si esegue la curva glicemica con 75 g di glucosio che può aiutare a rilevare i casi di ridotta tolleranza ai carboidrati (glicemia a 120' 140-199 mg/dl) o di diabete mellito franco (glicemia a 120' > 200 mg/dl). Alcuni studi, hanno evidenziato anche alti livelli di omocisteina come potenziale fattore di rischio per malattie cardiovascolari e neurodegenerative. L'omocisteina è un aminoacido non essenziale che deriva dalla biosintesi e dal metabolismo della metionina e che può essere degradato a cisteina o rimetilato per produrre nuova metionina. L'accumulo di elevate quantità di omocisteina, nella maggior parte dei casi è legato a un difetto genetico di trascrizione degli enzimi deputati al suo smaltimento, come la metilene-tetraidrofolato reduttasi (MTHFR), o derivare da carenze vitaminiche (B6, B12, acido folico), oltre che aumentare con l'età, il fumo, il consumo di alcolici e la sedentarietà. Inoltre, data l'origine vascolare della maggior parte dei casi di DE, l'iperomocisteinemia è stata recentemente oggetto di studio

come possibile elemento implicato nella disfunzione sessuale. A questo proposito, un recente studio clinico randomizzato controllato ha valutato l'efficacia e la sicurezza di tadalafil (10 mg a giorni alterni) insieme a 5 mg/die di acido folico rispetto a tadalafil (stesso dosaggio) e placebo nel trattamento di soggetti diabetici e con DE (20). 83 pazienti con un punteggio di IIEF < 17 sono stati arruolati e monitorati per 3 mesi, con un netto beneficio a favore del gruppo in trattamento combinato rispetto al gruppo trattato con tadalafil e placebo ( $5.14 \pm 3.84$  vs  $1.68 \pm 0.99$ ,  $P < 0.001$ ). Un altro studio ha valutato la risposta al trattamento con supplementi vitaminici in pazienti con DE e iperomocisteinemia che avevano mostrato una scarsa risposta al trattamento con PDE5i. Gli Autori, dopo aver determinato i livelli di acido folico e omocisteina e lo stato mutazionale del gene C677T MTHFR, hanno trattato pazienti arruolati con sildenafil, quindi li hanno divisi in tre gruppi sulla base dei risultati delle analisi genetiche (mutazione in eterozigosi, mutazione in omozigosi, wild-type) e hanno trattato i non-responders per ulteriori 6 settimane con sildenafil in associazione a supplementi di acido folico e vitamina B6. Al termine del trattamento è stato riportato un netto miglioramento della funzione erettile correlato allo stato mutazionale del gene MTHFR, con un effetto più marcato nei soggetti con mutazione in omozigosi (21). Sulla base di questi risultati, è stato quindi

proposto il dosaggio routinario dei livelli di omocisteina e acido folico in tutti i pazienti con DE, da associare all'analisi del genotipo MTHFR per i soggetti con iperomocisteinemia.

Tutti i pazienti con DE e ridotta libido, risposta incompleta ai PDE5i, eiaculazione ritardata e, in generale, tutti i pazienti diabetici, andrebbero valutati per un possibile quadro di ipogonadismo. A questo proposito, lo screening effettuato mediante misurazione dei livelli di testosterone totale al mattino (alle ore 8:00-11:00) rappresenta il gold standard (1). Il testosterone totale, infatti, rappresenta la somma del testosterone legato alle proteine di trasporto e di quello libero; inoltre, una certa percentuale di testosterone circola legata alla Sex Hormone-binding Globulin (SHBG), una proteina prodotta dal fegato, che veicola il testosterone con un legame ad alta affinità, mentre la restante parte del testosterone non libero si lega all'albumina, una delle proteine più abbondanti nel plasma, che però forma un legame a bassa affinità con gli ormoni. Testosterone libero e testosterone legato all'albumina, costituiscono ciò che viene indicato come testosterone biodisponibile, ovvero quello che a livello capillare può diffondere nei tessuti ed esplicare la sua attività biologica. Gli esami ad oggi disponibili non forniscono stime attendibili di testosterone libero e biodisponibile, quindi se il paziente presenta sintomi da ipogonadismo in presenza di livelli di testosterone totale

borderline, una stima più attendibile può essere fornita dai livelli di testosterone libero o biodisponibile calcolato usando apposite formule (es. Formula di Vermeulen) disponibili anche online ([www.issam.ch/freetesto.htm](http://www.issam.ch/freetesto.htm)).

In realtà, il limite di testosteronemia sufficiente per mantenere un'adeguata funzione erettile è piuttosto basso (5,5 nmol/L), per cui la DE si manifesta, di solito, solo nei casi più gravi di ipogonadismo.

Ulteriori indagini possono essere indicate sulla base della storia clinica, dell'esame obiettivo o degli esami preliminari e includono: TSH, funzionalità anteroipofisaria, imaging ipofisario, cariotipo, emocromo ed esame urine. (22)

#### ***1.3.4 ECO-COLOR-DOPPLER PENIENO***

L'ecocolordoppler penieno è una tecnica di imaging ampiamente utilizzata nella diagnosi di disfunzione erettile, grazie alla sua capacità di analizzare il flusso sanguigno penieno e di evidenziarne le principali alterazioni.

L'ecocolordoppler penieno sfrutta sonde ecografiche ad alta frequenza (7.5-13 MHz) dotate di software digitale e di modulo color-Doppler, che permettono di analizzare le onde riflesse dalla parte corpuscolata del sangue che scorre nei vasi del pene. Durante l'esame si sfruttano quindi le onde sonore, senza somministrare alcun tipo di radiazione pericolosa. (23)

L'ecocolordoppler penieno dinamico (D-PCDU) è attualmente considerato il gold standard per la diagnosi di DE arteriogenica. La procedura più diffusa prevede la misurazione del picco di velocità sistolica (PSV) delle arterie cavernose campionate dopo somministrazione intracavernosa di farmaci vasoattivi (es. Alprostadil 10 mcg). Un PSV < 25 cm/s viene considerato suggestivo di vasculopatia, mentre un PSV > 35 cm/s permette di escludere, con ragionevole sicurezza, una problematica di natura vascolare (24).

Una valida alternativa potrebbe essere l'ecocolordoppler basale (B-PCDU), il quale fornisce risultati più precisi ed è un esame meno invasivo e più economico (25)

## 1.4 TRATTAMENTO DELLA DISFUNZIONE ERETTILE

I farmaci inibitori delle PDE5 sono il cardine della terapia della DE. Altre modalità di trattamento includono le modificazioni dello stile di vita, la terapia iniettiva, la protesi peniena, la psicoterapia e, di recente introduzione, le onde d'urto

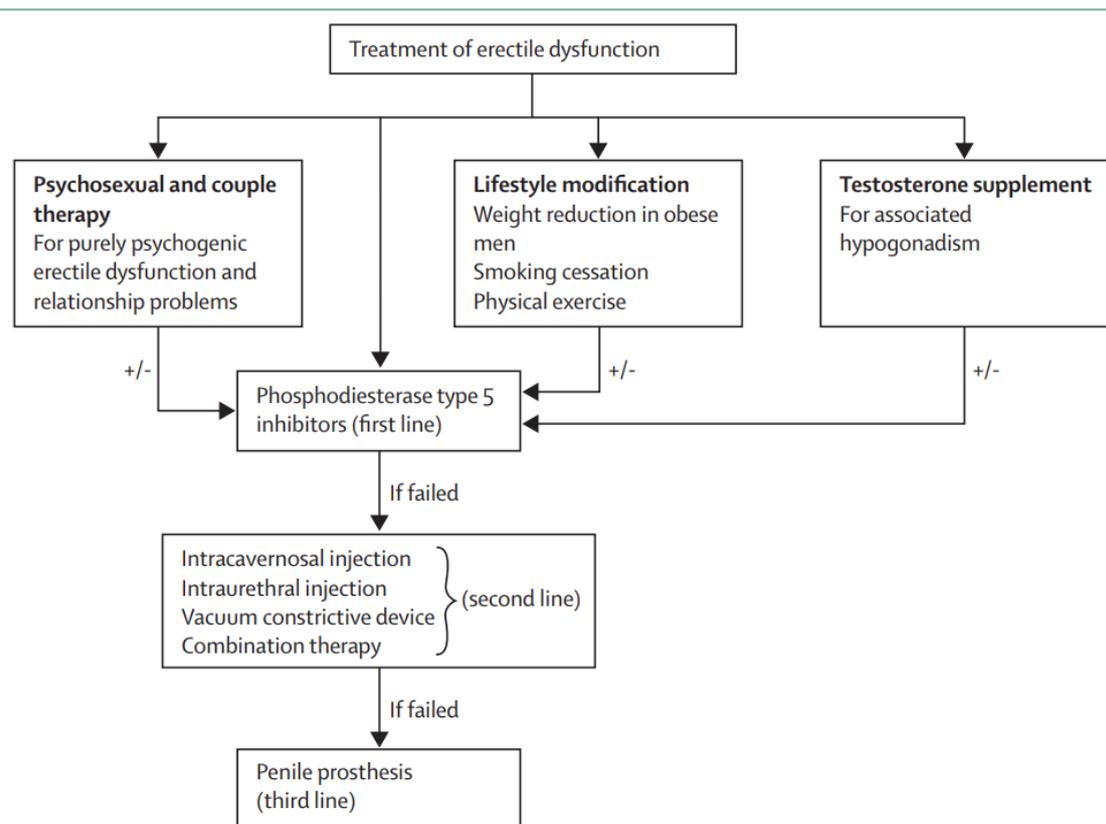


Figura 3: Algoritmo per il trattamento della DE (Rany Shamloul, Hussein Ghanem, Lancet 2013)

### 1.4.1 TERAPIA PSICO-SESSUALE

La terapia psico-sessuale è indicata soprattutto quando emergono significativi problemi psicologici. La sua indicazione principale è la DE prevalentemente

psicogena. Tecniche di psicoterapia includono la focalizzazione sensoriale, l'educazione sessuale e la terapia interpersonale. Tuttavia, i dati relativi alla terapia psico-sessuale sono ancora poco esaustivi (3).

#### ***1.4.2 INTERVENTI SULLO STILE DI VITA***

I dati di recenti studi clinici e di base hanno rivelato che la modificazione di abitudini comunemente associate alla DE, come il fumo, l'alcol, l'obesità e la sedentarietà, può avere effetti significativi nel miglioramento della funzione erettile (26), sebbene possa essere necessario un tempo considerevole (fino a 2 anni) prima di osservare qualche beneficio (27). Molti studi però hanno evidenziato come la combinazione di PDE5i orali e intervento sullo stile di vita portano ad effetti più rilevanti e in tempi più brevi (28).

#### ***1.4.3 FARMACI INIBITORI DELLE FOSFODIESTERASI-5***

I farmaci PDE5i sono attualmente considerati la prima linea di trattamento per la DE. Queste molecole facilitano l'erezione inibendo l'enzima PDE5, responsabile della degradazione del guanosin-monofosfato ciclico (cGMP) nella muscolatura liscia dei corpi cavernosi. Questa inibizione determina un prolungamento nell'attività del cGMP, che a sua volta provoca una riduzione dei livelli intracellulari di calcio, mantiene il rilassamento della muscolatura liscia, con conseguente erezione (figura 4).

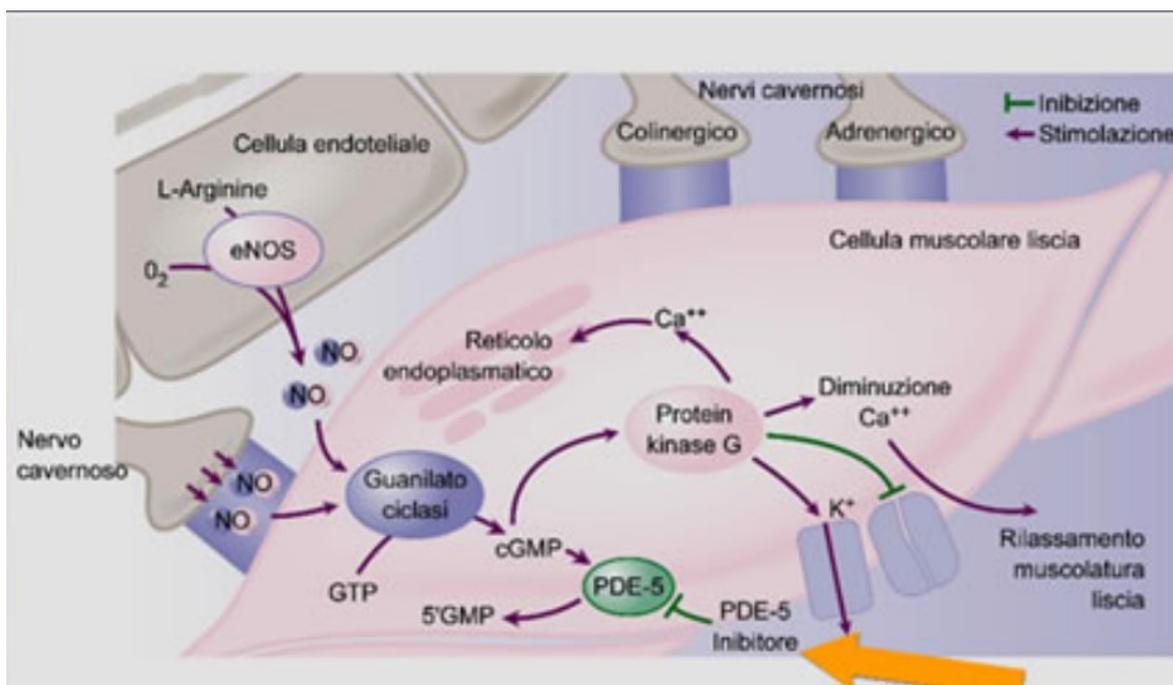


Figura 4: meccanismo d'azione dei PDE5i

Al momento, in Italia, sono in commercio 4 principi attivi come inibitori di PDE5, che sono: sildenafil (Viagra), tadalafil (Cialis), vardenafil (Levitra) e avanafil (Spedra). (29)

L'attuale tasso di successo di questi farmaci, indipendentemente dalla molecola scelta, risulta pari al 65% (3).

Non c'è un farmaco d'elezione, quindi in campo clinico vengono testati tutti, scegliendo poi quello che sia più efficace e abbia meno effetti collaterali. Questo deriva dal fatto che, purtroppo, non si può prevedere la risposta che ogni singolo paziente avrà a ciascun farmaco (30).

Diversi studi hanno dimostrato che il trattamento cronico e/o quotidiano con sildenafil (31) o tadalafil (32) (33), può migliorare in maniera significativa la

funzione endoteliale, con un potenziale curativo, e non solo sintomatico, sulla DE.

In altri studi invece, sembra che tra tutti i PDE5i, tadalafil 5 mg sia l'unico farmaco approvato clinicamente per l'utilizzo quotidiano, con il potenziale vantaggio di poter trattare i non-responders alla terapia on demand, ma non solo, porterebbe anche ad un miglioramento generale della malattia e mantenimento di una funzione sessuale più spontanea. Gli svantaggi sono prevalentemente legati al costo elevato del trattamento, oltre che alla mancanza di dati relativi alla sicurezza a lungo termine (34).

Il principale vantaggio dei PDE5i, risiede nel miglioramento della performance sessuale senza alterazioni della libido. In pazienti giovani, non affetti da DE, i PDE5i possono determinare una riduzione del periodo refrattario (un periodo di tempo fisiologico di flaccidità che insorge immediatamente dopo l'eiaculazione e che impedisce la comparsa di una nuova erezione) e a un miglioramento del controllo dell'eiaculazione (35).

Tuttavia, i PDE5i andrebbero utilizzati con cautela nei pazienti con patologie cardiovascolari gravi, come ipertensione non controllata e angina instabile o in quelli in trattamento con  $\alpha$ -litici a scopo antipertensivo.

Gli effetti collaterali dei PDE5i, sono generalmente lievi e ben tollerati. Il più comune è la cefalea, seguito dal flushing. Il tadalafil, per un possibile effetto

crociato sulle fosfodiesterasi-11 (PDE11), può causare mialgie e dolori muscolari (36). In alcuni casi, il sildenafil ha mostrato la capacità di inibire anche PDE6 portando a retinite pigmentosa, altre volte, l'uso del sildenafil è stato associato a perdita dell'udito per inibizione di PDE5 a livello delle cellule capillate cocleari, almeno nei pazienti con età superiore ai 40 anni (36) (37).

Nonostante il meccanismo d'azione sia comune a quello degli altri farmaci PDE5i, il tadalafil si caratterizza per proprietà farmacocinetiche uniche, con un inizio d'azione più lento e con un'emivita estremamente lunga (e un'efficacia mantenuta fino a 36 ore) (38).

Per queste sue caratteristiche può essere usato quotidianamente e con dosaggio ridotto, in alternativa alla più comune somministrazione on demand. Come già detto, nonostante i PDE5i siano un buon trattamento di prima linea, risultano inefficaci nel 35% dei pazienti con DE. Cause comuni di fallimento terapeutico sono, il diabete mellito e le severe neuro/vasculopatie. Nonostante non ci sia una definizione universale per definire il fallimento dei PDE5i, una spiegazione accettabile è "l'incapacità di ottenere o mantenere un'adeguata erezione durante l'attività sessuale dopo almeno 4 episodi consecutivi, nonostante un dosaggio ottimale" (30).

La gestione del fallimento della terapia con farmaci PDE5i dipende dalla causa e prevede: counselling del paziente, passaggio a un altro farmaco PDE5i, utilizzo di prostaglandine intracavernose, terapia combinata o invio a uno specialista per ulteriori approfondimenti. Pazienti che non rispondono a nessuno dei trattamenti farmacologici possono essere candidati all'impianto di una protesi peniena.

Le caratteristiche farmacocinetiche dei diversi PDE5i, sono riassunte in tabella 1. Sebbene, le singole molecole possano presentare una maggiore o minore affinità verso specifiche isoforme di PDE5, non esiste un farmaco che presenti un'efficacia clinica superiore a un altro, in termini assoluti.

Alcuni studi hanno dimostrato un'efficacia maggiore di tadalafil e vardenafil, rispetto al sildenafil, valutata tramite miglioramento del questionario IIEF-15 (39).

Pertanto, nella scelta del farmaco più adatto, andrebbero considerate le preferenze del paziente e della partner, oltre che la risposta clinica del paziente a eventuali farmaci assunti in precedenza (40)

Tabella 1: caratteristiche degli inibitori delle fosfodiesterasi-5 (da Shamloul 2013 e McMahon 2019)

	<b>Sildenafil</b>	<b>Vardenafil</b>	<b>Tadalafil</b>	<b>Avanafil</b>
<b>Dosaggio</b>	25, 50 e 100 mg. Massimo 100 mg/die	2.5, 5, 10 e 20 mg. Partire con 10 mg; massimo 200 mg/die	2.5, 5, 10 e 20 mg. Partire con 10 mg; massimo 20 mg/die	50, 100 e 200 mg. Massimo 200 mg/die
<b>TMAX</b>	30-120 minuti (media 60)	30-120 minuti (media 60)	30-360 minuti (media 120)	30-45 minuti
<b>Emivita</b>	4 ore	4 ore	17,5 ore	6-17 ore
<b>Efficacia</b>	>65%	>65%	>65%	>65%
<b>Effetti collaterali</b>	Cefalea, flushing, dispesia, congestione nasale, visione dei colori alterata	Cefalea, flushing, dispesia, rinite, sinusite	Fushing, mal di schiena, dolori muscolari, congestione nasale	Cefalea, flushing, dispesia, rinite, sinusite
<b>Controindicazioni</b>	Nitroderivati, recenti eventi cardiovascolari severi, neuropatia ischemica non arteritica, $\alpha$ -litici	Nitroderivati, recenti eventi cardiovascolari severi, neuropatia ischemica non arteritica, $\alpha$ -litici, sindrome del QT lungo	Nitroderivati, recenti eventi cardiovascolari severi, neuropatia ischemica non arteritica, $\alpha$ -litici	Nitroderivati, recenti eventi cardiovascolari severi, neuropatia ischemica non arteritica, $\alpha$ -litici
<b>Interazione con alcol e alimenti</b>	Assumere a digiuno. Non influenzato dall'alcol.	Assumere a digiuno (+++). Non influenzato dall'alcol.	Non influenzato da cibo e alcol.	Assumere a digiuno. Non influenzato dall'alcol.

Nel caso in cui, i trattamenti di prima linea fallissero, lo specialista può valutare se procedere con i trattamenti di seconda e terza linea, tra cui:

- terapia androgenica: iniezioni di testosterone esogeno, raccomandata nei soggetti con DE e insufficienti livelli di testosterone biodisponibile

- iniezioni intracavernose: iniezione di farmaci a livello delle caverne, che permettono di avere un'erezione in tempi brevi, indipendente dal desiderio sessuale
- vaccum device: dispositivo che permette di ottenere erezioni in maniera meccanica richiamando e bloccando sangue a livello del pene.

## **CAPITOLO 2: RECETTORE DEGLI ANDROGENI, POLIMORFISMO CAG E SUOI EFFETTI**

Gli androgeni (testosterone e diidrotestosterone), sono necessari per il normale sviluppo degli organi sessuali maschili, per il mantenimento dei caratteri sessuali secondari, per la spermatogenesi e per il mantenimento della funzione riproduttiva maschile nonché del comportamento sessuale. Sebbene gli androgeni possano diffondere all'interno di tutte le cellule, la loro azione è mediata da un recettore presente solo nei tessuti androgeno-responsivi come: prostata, testicoli e pelle.

Il recettore degli androgeni regola la trascrizione di specifici geni e appartiene alla superfamiglia dei fattori di trascrizione ligando-attivati. Quando l'ormone si lega al recettore, questo subisce un cambiamento conformazionale, che gli permette di interagire con specifiche sequenze di DNA che saranno trascritte e porteranno, dopo traduzione, a proteine che alterano la normale funzione cellulare provocando cambiamenti fenotipici (41) (figura 5).

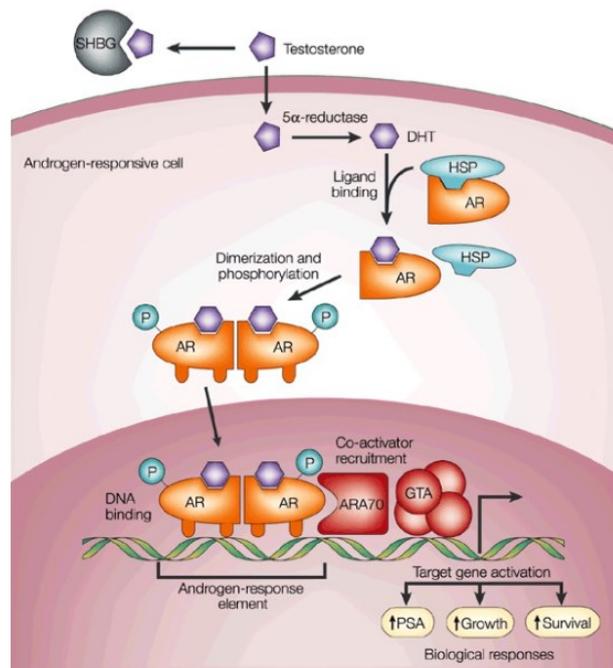


Figura 5: possibili effetti biologici dovuti all'azione di AR (Feldman BJ, nature review cancer, 2001)

Il recettore degli androgeni (AR) è locato sul braccio lungo del cromosoma X in posizione Xq11-12. Questo gene contiene otto esoni raggruppati in tre domini principali: dominio amino-terminale di transattivazione, il DNA binding domain e il dominio che lega l'ormone steroideo. (figura 6).

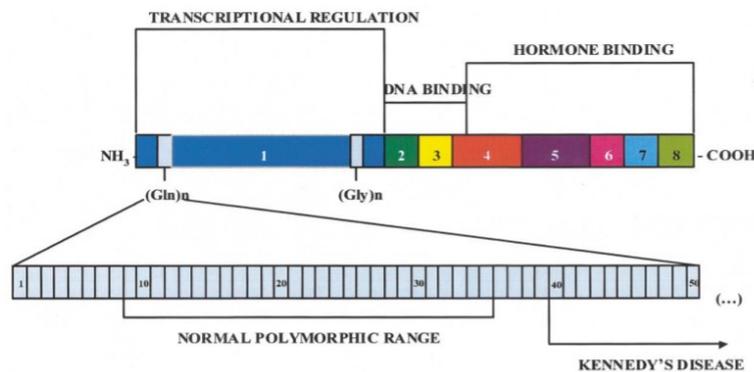


Figura 6: struttura di AR e del tratto di poliglutammine nell'esone 1 (R. Casella et al. 2001,

ELSEVIER SCIENCE INC.)

Il dominio amino-terminale di transattivazione è codificato dall'esone 1 ed è legato all'attività trascrizionale del recettore nei confronti di geni target. Questa regione contiene sequenze polimorfiche ripetute di glutamina (CAG) e glicina (GGC) (41).

Un polimorfismo genetico, per definizione, si manifesta quando uno stesso locus può presentare alleli multipli e almeno 2 alleli si presentano, nella popolazione, con una frequenza maggiore dell'1%.

Nel caso del polimorfismo CAG la lunghezza delle unità ripetute varia, in un normale range, da 10 a 35 (figura 7) (42). Espansioni e contrazioni nel normale spettro polimorfico sono associate ad anomalie più o meno gravi in base all'entità delle ripetizioni.

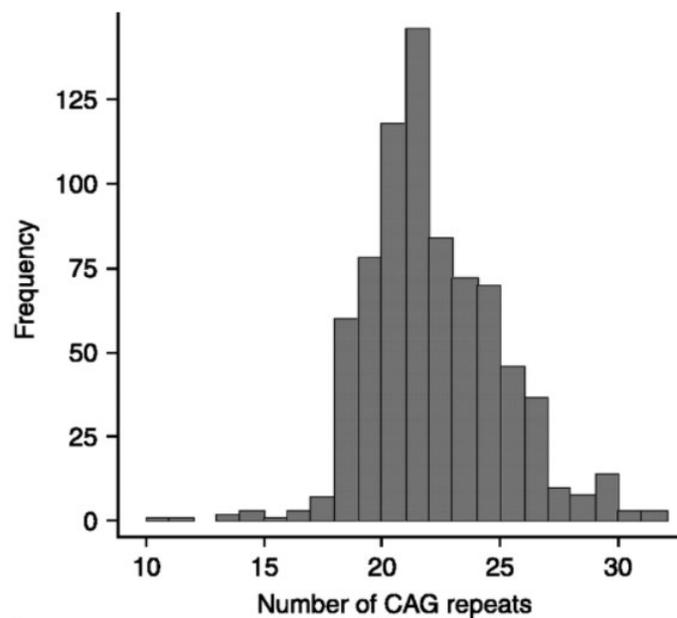


Figura 7: distribuzione del polimorfismo (CAG)<sub>n</sub> in una popolazione campione di 767 uomini tra i 20 e 29 anni (da Torben Leo Nielsen et al. European Journal of Endocrinology, 2010)

In generale, come dimostrato da molti studi, la lunghezza del tratto (CAG)n influenza la funzione di AR, provocando un aumento dell'attività per ripetizioni più basse e una diminuzione per numeri più alti di ripetizioni (41)-(44).

Numerosi studi hanno tentato di elucidare la correlazione tra lunghezza delle ripetizioni CAG e possibili effetti sull'organismo. Ad oggi, molti meccanismi non trovano ancora una risposta ma alcune possibili implicazioni sono racchiuse in figura 8 (42).

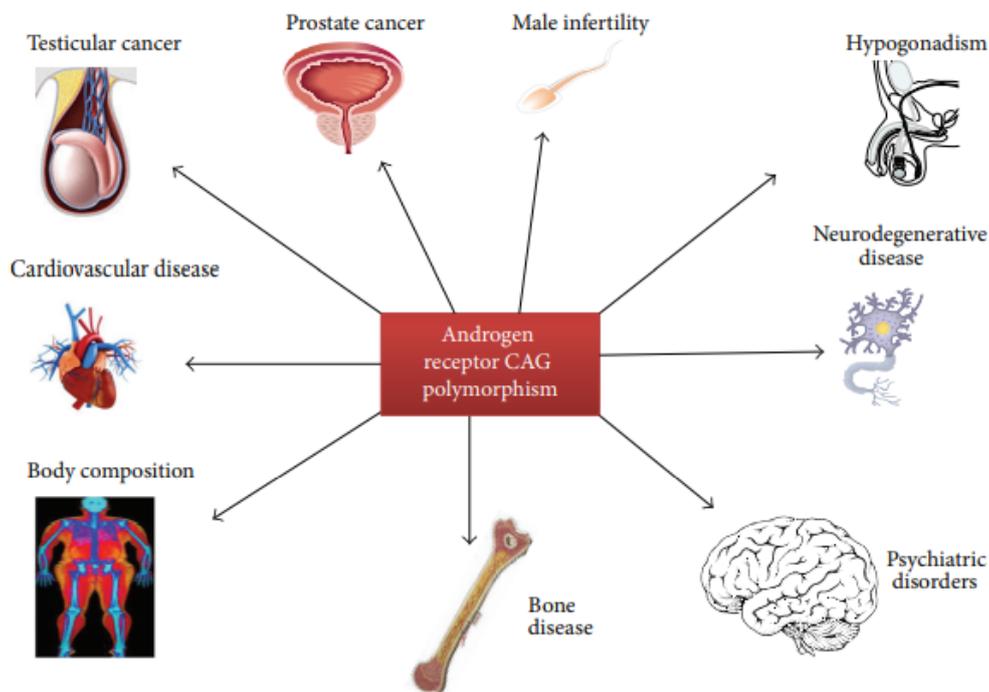


Figura 8: Tessuti e organi influenzati dal polimorfismo CAG di AR (G. Tirabassi et al. International Journal of Endocrinology, 2015)

## ***2.1 METABOLISMO OSSEO***

Il polimorfismo dei recettori ormonali può influenzare l'attività dell'ormone sui tessuti target. Alcuni studi hanno riportato come in condizioni di deficit da testosterone, la densità ossea (BD: bone density) risulti diminuita e i markers legati a turnover osseo, elevati (45) (46) (47) (48).

Sebbene l'effetto del polimorfismo CAG sul metabolismo osseo, non sia del tutto chiaro, alcuni autori hanno ipotizzato una correlazione inversa tra lunghezza del tratto CAG e valore di BMD (bone mineral density) a causa del minore effetto del testosterone sull'osso (49). Questo dato non è stato confermato da altri autori (50). Uno studio del 2014 ha valutato come il trattamento con terapia androgenica sostitutiva abbia un effetto positivo sulla BMD indipendentemente dalla lunghezza del polimorfismo (51).

## ***2.2 SALUTE MENTALE***

L'influenza del polimorfismo CAG sulla salute mentale nell'uomo è molto interessante. Diversi studi, tra cui quello di J. T. Mannin correlano la lunghezza delle ripetizioni CAG con la velocità di trasmissione neurale, sottolineando come in soggetti con ripetizioni molto corte (<11 ripetizioni), si ha una minore velocità di trasmissione neuronale (52). Inoltre, altri autori hanno recentemente osservato che pazienti con valori di testosterone e di triplette "normali", mostrano una migliore attitudine alla paternità e alla cura

della partner rispetto ai soggetti con valori estremi di questi parametri (53). Studi successivi correlano livelli di testosterone e lunghezza del polimorfismo CAG con i sintomi della depressione (54), con l'istinto di dominanza (55), con gli atteggiamenti violenti (56) e con l'impulsività (57). In più, sequenze di CAG più corte sono state associate al disturbo da deficit dell'attenzione/iperattività (58).

### ***2.3 DISORDINI NEURODEGENERATIVI***

Le espansioni di triplette sono implicate in molte malattie neuromuscolari, come, ad esempio, la Sindrome dell'X fragile, la malattia di Huntington, l'atassia spinocerebellare di tipo 1 e l'atrofia dentatorubro-pallido-luisiana, la malattia di Machado-Joseph e l'atassia di Freidrich (59). Allo stesso modo, il polimorfismo CAG del recettore degli androgeni è correlato all'atrofia muscolare spino bulbare (SBMA), un disordine neurodegenerativo a esordio nell'età adulta caratterizzato da progressiva debolezza e atrofia muscolare e determinato dalla degenerazione dei motoneuroni localizzati nelle regioni spinale e bulbare (60). Il numero di ripetizioni CAG è direttamente proporzionale alla gravità dei sintomi e inversamente proporzionale all'età di esordio di malattia (61). Il meccanismo patogenetico implicato sembra che sia un accumulo di proteine AR anomale nel nucleo, con conseguente perdita di

equilibrio trascrizionale, impedimento del trasporto assonale e disfunzione mitocondriale che determinano, alla fine, neuro degenerazione.

#### ***2.4 PROFILO METABOLICO***

Il termine “sindrome metabolica” (SM) indica un insieme di fattori di rischio o condizioni patologiche (ipertensione, obesità, dislipidemia e iperglicemia), spesso associate ad insulino-resistenza, con conseguente aumento di rischio cardiovascolare (62). Non è ancora chiaro che rapporto ci sia tra polimorfismo CAG e profilo metabolico. Solo alcuni studi sembrerebbero mostrare un’associazione significativa tra, bassi livelli di testosterone e sindrome metabolica, come quelli analizzati nella review di G. Corona et al. (63).

Proprio per tale ambiguità di dati, la relazione tra testosterone e rischio cardiovascolare è ancora una questione aperta e dibattuta.

Possono essere comunque citati alcuni studi per capire meglio come il polimorfismo sia coinvolto in alcuni processi metabolici. Nel 2009, Campbell e collaboratori, hanno studiato un gruppo di 156 soggetti magri, con una percentuale media di grasso corporeo del 10% e un BMI medio di  $17,8 \pm 1,9$  kg/m<sup>2</sup>, rilevando una correlazione significativa tra numero di ripetizioni CAG e altezza e tra numero di ripetizioni CAG e massa magra. Questo dato suggerirebbe l’ipotesi che recettori dotati di un maggior numero di triplette, e quindi meno sensibili all’azione degli androgeni, potrebbero risultare in

un'esposizione delle ossa lunghe al testosterone meno efficace durante la pubertà e, di conseguenza, in una crescita lineare prolungata (64).

È importante sottolineare come il testosterone nell'età puberale intervenga anche nello sviluppo scheletrico, limitando l'allungamento delle ossa lunghe ed in questo modo una crescita spropositata degli arti.

## ***2.5 FERTILITÀ MASCHILE***

Il rapporto tra numero di ripetizioni CAG e fertilità maschile è stato a lungo motivo di dibattito. Il gruppo di Mazhar Salim Al Zoubi et al. nel 2020 ha analizzato lo stato dell'arte relativo alla correlazione tra CAG e infertilità maschile (65). Nonostante una decina di studi non trovassero nessuna correlazione tra alte ripetizioni di CAG e infertilità maschile, 8 studi evidenziavano un andamento diametralmente opposto. Gli stessi autori hanno anche svolto uno studio originale, valutando una stretta correlazione tra ripetizioni CAG e condizione di oligozoospermia e teratozoospermia in 260 uomini giordani. In particolare, negli infertili, si osserva un trend di ripetizioni >21, situazione invece poco presente nei controlli (65). In uno studio meno recente, del 2001, Mifsud e co. (66) hanno valutato la stessa correlazione tra parametri seminali e lunghezza del tratto CAG ma in 357 pazienti, di cui 215 infertili. Gli Autori hanno osservato che alcuni azoospermici avevano ripetizioni CAG significativamente più lunghe rispetto ai controlli fertili e

hanno anche riportato una correlazione diretta tra la lunghezza del tratto CAG e la gravità del difetto nella spermatogenesi, mostrando che ripetizioni maggiori o uguali a 26 erano associate a un rischio 7 volte maggiore di azoospermia, come anche teorizzato da studi precedenti (67) (68). Come citato in precedenza, va ricordato che in molti studi non si evince questa correlazione diretta tra lunghezza delle ripetizioni CAG e infertilità, come nella meta analisi di Nenonen et al. (69), condotta su 3743 soggetti, che non ha dimostrato differenze significative nel numero medio di ripetizioni tra soggetti fertili e infertili. Alla luce di quanto riportato, è evidente come l'argomento sia ancora poco chiaro e necessiti di ulteriori approfondimenti.

## ***2.6 CANCRO PROSTATICO***

Per quanto riguarda la relazione tra rischio di cancro prostatico e numero di ripetizioni CAG, anche se la presenza di androgeni circolanti non è una condizione sufficiente ad iniziare il processo di carcinogenesi, è necessaria per crescita e mantenimento di cellule cancerose già preesistenti (70). Il testosterone, legandosi con AR, inibisce l'accumulo di p53 nel nucleo delle cellule di adenocarcinoma prostatico, inducendo crescita e sopravvivenza in questa popolazione cellulare (71). Quindi se la sensibilità tissutale al testosterone è influenzata dalla dimensione della sequenza CAG, questa,

potrebbe giocare un ruolo centrale nella patogenesi di questo tipo di neoplasia.

## ***2.7 FUNZIONE SESSUALE***

Invecchiando, nell'uomo, come nella donna, compaiono sintomi somatici e psicologici che portano ad un calo anche della funzione sessuale, dovuto al declino dei livelli di testosterone nel siero e quindi una diversa modulazione della sensibilità agli androgeni. Tale risposta varia da persona a persona, quindi non è detto che tutti gli uomini in età avanzata sviluppino andropausa. Grazie ad alcuni studi si ipotizza che una maggiore lunghezza delle ripetizioni CAG, influenzi la funzione sessuale causando un aumento nel rischio di DE (72) e sintomi andropausali (73). Al contrario un minor numero di ripetizioni CAG si associa a risultati migliori, soprattutto nel recupero della funzione sessuale sia in pazienti affetti da ipogonadismo ipogonadotropo post-chirurgico, sia in pazienti affetti da LOH (late on set- ipogonadismo età correlato), quando curati con terapia androgenica sostitutiva (74) (75). Nel 2012 Liu et al., hanno verificato che il polimorfismo CAG di AR può influenzare il rischio di sviluppare sintomi da ipogonadismo, in uomini anziani sani, soprattutto in presenza di normali livelli circolanti di testosterone (72). Con lo stesso meccanismo, 3 anni dopo, lo stesso gruppo ha anche osservato che il numero di ripetizioni CAG potrebbe essere un predittore

indipendente di DE: in uomini con livelli di testosterone totale superiori ai 330 ng/dL e numero di triplette > 25 aumenta il rischio di DE rispetto a soggetti con numero di ripetizioni pari o inferiore a 21 in presenza di eugonadismo (73).

Harkonen et al. hanno invece condotto uno studio su 172 soggetti anziani, valutando che una maggiore frequenza di DE si osserva in soggetti con più di 23 ripetizioni (76).

Anche Crabbe et al. hanno valutato i livelli di ormoni sessuali e il numero di ripetizioni CAG in una popolazione di soggetti sani. In generale il numero di ripetizioni correla positivamente sia con i livelli di testosterone totale che di testosterone libero; osservano inoltre una variabilità dei livelli di testosterone libero che sarebbe da imputare in parte alla diversa sensibilità agli androgeni e in parte al differente setpoint del feedback ipofisario, entrambi modulati dal polimorfismo di AR (77). Alla stessa conclusione sono arrivati Krithivas et al. (78), che hanno rilevato un'associazione significativa tra CAG e livelli di testosterone libero e totale e di testosterone legato all'albumina. Anche Trivison et al. (79) hanno confermato questi dati, rilevando una correlazione positiva tra livelli di testosterone libero e totale e numero di triplette CAG, lavorando, però, con soggetti anziani. Tuttavia, la correlazione non trova conferma nello studio successivo di Kim et al. (80).

Concludendo, nonostante in letteratura ci siano dati che correlano funzione sessuale e attività trascrizionale di AR, sono necessari ulteriori studi per valutare, invece, in che modo il polimorfismo CAG influenzi l'azione degli ormoni sessuali.

### **CAPITOLO 3: SCOPO DELLO STUDIO**

L'ipogonadismo si associa a ridotta espressione tissutale di fosfodiesterasi, imputabile a una riduzione della massa muscolare dei corpi cavernosi, che riduce il substrato su cui possono andare ad agire i PDE5i e giustificando, al tempo stesso, la scarsa risposta al trattamento con PDE5i e il miglioramento dell'efficacia dei farmaci vasoattivi, dopo correzione dello stato di ipogonadismo (81) di poter influenzare la produzione gonadica di testosterone. Nelle cellule di Leydig, a livello gonadico, la produzione del testosterone (steroidogenesi) è modulata da cAMP (adenosin monofosfato ciclico) e cGMP (guanosina monofosfato ciclico). Quando l'ormone luteinizzante LH lega i suoi recettori accoppiati a proteine G, sulle cellule di Leydig, a livello intracellulare c'è un aumento del cAMP, con conseguente attivazione della proteina kinase A, che induce steroidogenesi. Sempre nelle cellule di Leydig, l'ossido nitrico (NO), stimola la produzione di cGMP. Questo, attiva la proteina kinase G, la quale fosforila la proteina regolatrice acuta steroidea (StAR), che attiva la steroidogenesi. Questi due fattori giocano un ruolo chiave anche nel meccanismo dell'erezione. Le dinamiche di attivazione dei pathways che coinvolgono sia cAMP che cGMP sono regolate anche dall'attività delle fosfodiesterasi (PDE) (81).

Inoltre, è stata dimostrata una relazione inversa tra il numero di ripetizioni nel tratto CAG e l'attività trascrizionale di AR (82). In aggiunta alla diminuzione dei livelli circolanti di testosterone, una ridotta attività di AR potrebbe contribuire allo sviluppo della sintomatologia tipica dell'ipogonadismo maschile (73).

Alla luce di quanto trattato, la nostra ipotesi è che, l'attività trascrizionale di AR, dipendente dalla lunghezza del polimorfismo CAG, possa modulare la risposta al trattamento con farmaci PDE5i, anche in presenza di livelli di testosterone normale. Pertanto, andremo a valutare la possibile correlazione tra lunghezza del polimorfismo CAG di AR e risposta al trattamento con Tadalafil 20 mg *on demand* in pazienti eugonadici e affetti da DE e/o calo della libido.

**Outcome primario:**

- miglioramento della funzione erettile, valutata mediante punteggio IIEF – EF (Q1-5+Q15), in relazione alla lunghezza del polimorfismo CAG.

**Outcome secondari:**

- Miglioramento della funzione sessuale globale valutata mediante punteggio complessivo del questionario IIEF-15 e punteggi relativi ai sottodomini della funzione orgasmica (IIEF-OF), del desiderio sessuale (IIEF-SD), della

soddisfazione per i rapporti (IIEF-IS) e della soddisfazione generale (IIEF-OS).

- Esplorazione di eventuali differenze clinico-biochimiche relative a caratteri ormonali e metabolici in relazione alla distribuzione del polimorfismo nel campione

## **CAPITOLO 4: MATERIALI E METODI**

### ***4.1 CASISTICA***

I pazienti sono stati arruolati presso l'ambulatorio Andrologico della Clinica di Endocrinologia (Dipartimento di scienze cliniche e molecolari) dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Ospedali riuniti di Ancona nel periodo compreso tra novembre 2020 e ottobre 2021.

I criteri di esclusione sono stati: presenza di patologie ormonali o diabete mellito, storia di malattie cardiovascolari o cerebrovascolari recenti, pregresse patologie neoplastiche, pregressa chirurgia e/o radioterapia pelvica; terapie ormonali, antineoplastiche o assunzione cronica di farmaci noti per avere effetti sulla funzione sessuale (es. antidepressivi e  $\beta$ -bloccanti).

I pazienti, durante la normale attività ambulatoriale svolta dal Prof. Giancarlo Balercia, dal Dr. Gianmaria Salvio e dalla Dr.ssa Melissa Cutini, sono stati adeguatamente informati riguardo lo studio, hanno firmato un consenso informato e sono dunque stati arruolati.

### ***4.2 DISEGNO DELLO STUDIO***

Dopo una prima visita di screening, i pazienti arruolati hanno effettuato a precisi periodi, le seguenti valutazioni:

## **T0 – Basale (prima della terapia):**

- ✚ Prelievo ematico per profilo ormonale (FSH, LH, testosterone totale, SHBG, prolattina, albumina) e glicometabolico (glicemia, insulina, emoglobina glicata, colesterolo totale, HDL, trigliceridi, omocisteina e PSA) e per studio del polimorfismo CAG.
- ✚ Esame obiettivo con rilievo di peso, altezza e pressione arteriosa
- ✚ Ecografia testicolare
- ✚ Eco-color-doppler penieno basale
- ✚ Compilazioni di questionari: IIEF-15 e MedDiet

## **T1 – 4 settimane dall’inizio della terapia**

- ✚ Esame obiettivo con rilievo di peso, altezza, pressione arteriosa
- ✚ Eco-color-doppler penieno basale
- ✚ Compilazione dei medesimi questionari di T0

## **T2 – 8 settimane dall’inizio della terapia**

- ✚ Esame obiettivo con rilievo di peso, altezza, pressione arteriosa
- ✚ Eco-color-doppler penieno basale
- ✚ Compilazione dei medesimi questionari di T0

### **4.3 ANALISI ORMONALE e GLICOMETABOLICA**

I campioni di sangue sono stati raccolti da tutti i pazienti tra le 8 e le 10 del mattino a digiuno. Solo al baseline, sono stati valutati i valori di FSH, LH, PRL, SHBG, testosterone totale, albumina, glicemia, insulina, emoglobina glicata (HbA1c), colesterolo totale, HDL, trigliceridi, omocisteina e PSA. Inoltre, i livelli di testosterone libero sono stati calcolati mediante la formula di Vermeulen, gli LDL con la formula di Friedewald e l'indice HOMA-IR (Homeostatis Model Assessment for Insulin Resistance) secondo la formula  $(\text{glicemia} \times \text{insulina})/405$ .

I normali range secondo l'OMS sono: 1.38–9.58 IU/L (FSH), 1.80–8.16 IU/L (LH), 2.0–18.0 ng/mL (PRL), 10.0–57.0 nmol/L (SHBG), 9.0–30.0 ng/dL (testosterone libero), 2.41–8.27 ng/mL (testosterone totale), 3.4–5.4 g/dL (albumina), 70.0–130.0 mg/dL (glicemia), <25.0  $\mu$ IU/mL (insulina), 0.22–2.5 (indice HOMA-IR), <42.0 mmol/mol (HbA1c), <200.0 mg/dL (colesterolo totale), <100.0 mg/dL (LDL), 40.0–80.0 mg/dL (HDL), <150.0 mg/dL (trigliceridi), 5.0–12.0  $\mu$ mol/L (omocisteina) and  $\leq 4.0$  ng/mL (PSA).

### **4.4 ECOGRAFIA TESTICOLARE ED ECO-COLORDOPPLER**

#### **PENIENO**

L'ecografia testicolare è volta a valutare il volume testicolare. Viene comunemente utilizzata la formula ellissoide standard ( $\text{larghezza} \times \text{altezza} \times$

lunghezza  $\times \pi/6$ ). I testicoli vengono considerati ipotrofici se il volume medio è  $< 12 \text{ mL}$  (83).

Nel nostro studio abbiamo preferito svolgere l'ecocolordoppler basale (B-PCDU), che valuta il picco sistolico della velocità (PSV) dell'arteria cavernosa e il tempo di accelerazione (TA), calcolato come [PSV-velocità diastolica]/tempo sistolico). I cut-off suggeriti sono per il PSV  $>13 \text{ cm/s}$  (25) e per TA  $<1.17 \text{ cm/s}^2$  (84)

#### **4.5 QUESTIONARIO IIEF-15**

L'IIEF-15 è un questionario multidimensionale auto-somministrabile costruito per investigare 5 diversi aspetti della vita sessuale maschile: funzione erettile (EF domande 1-5 e 15), funzione orgasmica (domande 9 e 10), desiderio sessuale (domande 11 e 12), soddisfazione del rapporto (domande 6-8) e soddisfazione in generale (13 e 14).

Di seguito sono riportate le domande del questionario IIEF-15:

- 1) Nelle ultime quattro settimane quante volte è stato in grado di avere un'erezione durante l'attività sessuale?
- 2) Nelle ultime 4 settimane quando ha avuto delle erezioni in seguito a stimolazione sessuale, quante volte erano sufficienti da permettere la penetrazione?

- 3) Nelle ultime 4 settimane, quando ha tentato di avere un rapporto sessuale, quante volte è stato in grado di penetrare la sua partner?
- 4) Nelle ultime 4 settimane durante il rapporto sessuale, quanto spesso è stato in grado di mantenere l'erezione dopo aver penetrato la partner?
- 5) Nelle ultime 4 settimane durante il rapporto sessuale quanto difficile è stato mantenere l'erezione fino al completamento del rapporto?
- 6) Nelle ultime 4 settimane quante volte ha tentato di avere rapporti sessuali?
- 7) Nelle ultime 4 settimane quando ha tentato di avere un rapporto sessuale, quanto spesso è stato soddisfacente per Lei Personalmente?
- 8) Nelle ultime 4 settimane quanto piacevoli sono stati per lei i suoi rapporti sessuali?
- 9) Nelle ultime 4 settimane quando ha avuto una stimolazione oppure un rapporto sessuale, quanto ha eiaculato?
- 10) Nelle ultime quattro settimane quando ha avuto una stimolazione sessuale oppure un rapporto sessuale, quanto spesso ha provato la sensazione d'orgasmo con o senza eiaculazione?
- 11) Nelle ultime 4 settimane quanto spesso ha provato desiderio sessuale?
- 12) Come valuterebbe il suo livello di desiderio sessuale relativo alle ultime 4 settimane?

13) Nelle ultime 4 settimane in che misura è stato soddisfatto della vita sessuale in generale?

14) Nelle ultime 4 settimane in che misura è stato soddisfatto della sua relazione sessuale con la partner?

15) Nelle ultime 4 settimane come valuterebbe il suo livello di fiducia nel poter raggiungere e mantenere una erezione?

Le domande 1, 2, 3, 4, 7, 8, e 10 vengono valutate secondo una scala di Likert con un punteggio da 1 (quasi mai o mai) a 5 (quasi sempre o sempre), dove lo 0 corrisponde a nessuna attività sessuale nelle 4 settimane precedenti.

Analogamente, le altre domande vengono valutate secondo un punteggio da 1 a 5, dove 1 rappresenta la condizione peggiore, mentre 5 la migliore.

In particolare, le domande 1-5 e 15 esplorano la funzione erettile, che si considera conservata per punteggi compresi tra 26 e 30. Dal 25 in giù può essere posta diagnosi di DE, con la possibilità, inoltre, di classificarla in lieve (17-25), moderata (11-16) e grave (1-10) (16).

#### ***4.6 QUESTIONARIO MedDiet Score***

L'aderenza alla dieta mediterranea è stata valutata mediante un questionario precedentemente descritto da Panagiotakos et al. (2006). Per valutare l'aderenza a questo modello alimentare, è stato considerato il consumo di 11 componenti principali della dieta mediterranea: cereali non raffinati, frutta,

verdura, patate, legumi, olio d'oliva, pesce, carne rossa, pollame, carne latticini grassi e alcol. Per il consumo di alimenti strettamente connessi alla dieta mediterranea è stato assegnato un punteggio da 0 a 5 quando veniva riportato un consumo nullo, raro, frequente, molto frequente, settimanale o giornaliero. Per il consumo di alimenti distanti da questo pattern alimentare (carne rossa, pollame, latticini e alcol), è stato assegnato lo stesso punteggio ma con scala inversa.

È stato calcolato un punteggio totale compreso tra 0 e 55. Valori elevati indicano una grande aderenza al modello alimentare mediterraneo.

#### ***4.7 ANALISI MOLECOLARI***

È stata condotta un'analisi molecolare su campioni di sangue periferico con lo scopo di indagare la possibile associazione tra eventuali polimorfismi dei geni *AR* e compliance al farmaco Tadalafil in pazienti con disfunzione erettile.

Il protocollo seguito consta delle seguenti fasi:

- Estrazione DNA e relativa quantizzazione
- Amplificazione con coppie di primers specifici, nella quale uno dei due viene marcato con fluorocromo (FAM)
- Sequenziamento mediante metodica dell'analisi dei frammenti
- Analisi informatica mediante software

#### **4.7.1 ESTRAZIONE DNA GENOMICO**

Il DNA genomico è stato estratto mediante il Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison, WI, USA) che permette di isolare il DNA da leucociti attraverso 4 passaggi principali:

1. Lisi cellulare di eritrociti e leucociti seguita da una lisi nucleare per la degradazione delle membrane nucleari dei leucociti.
2. Digestione con RNasi per degradare selettivamente l'RNA.
3. Rimozione delle proteine cellulari per precipitazione mediante soluzione salina.
4. Allontanamento della soluzione salina mediante precipitazione del DNA con isopropanolo e successiva concentrazione del DNA genomico.

#### **4.7.2 QUANTIZZAZIONE DEL DNA**

La concentrazione e la purezza del DNA sono state determinate utilizzando il NanoDrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Il Nanodrop è uno spettrofotometro che permette di quantificare la concentrazione di campioni di diversa natura (DNA, RNA, proteine, polisaccaridi) e la loro purezza. È composto da una parte strumentale e un software, il quale misura l'assorbanza alle diverse lunghezze d'onda dei diversi composti (260 nm per acidi nucleici, 230 nm per i polisaccaridi, 280

nm per le proteine) e calcola concentrazione in ng/ $\mu$  e la purezza del campione. Per quest'ultima viene calcolata il rapporto tra le assorbanze 260/280 che deve essere  $\sim 1,8$  per DNA. Rapporti di purezza significativamente differenti possono indicare la presenza di proteine, fenolo o altri contaminanti. Nel seguente studio sono stati utilizzati 1,5  $\mu$ l per ogni campione.

La tecnica della quantizzazione è stata eseguita sia a seguito dell'estrazione di DNA da sangue periferico che a seguito della purificazione post-PCR.

#### **4.7.3 PCR**

La tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) permette l'amplificazione esponenziale di una sequenza di acido nucleico di nostro interesse. Per ottenere ottimi risultati bisogna tener conto di alcuni parametri fondamentali come la purezza e la quantità/resa, per tale ragione è necessario effettuare la quantizzazione prima di procedere con la PCR.

Altra condizione fondamentale per l'amplificazione, è la conoscenza della sequenza a monte e a valle del tratto da analizzare, in modo da poter costruire due oligonucleotidi (con lunghezza compresa tra 20 e 30 nucleotidi) che funzionino da primers.

Nel nostro studio è stato analizzato il polimorfismo CAG del gene AR. La lunghezza dei frammenti polimorfici e il numero delle ripetizioni sono state analizzate utilizzando i seguenti primers:

- CAG

forward: TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC

reverse: GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCAT.

Il primers forward è marcato con il fluorocromo FAM al 5' per permettere la visualizzazione dei frammenti durante elettroforesi capillare.

La tecnica della PCR prevede l'alternarsi di tre fasi:

- *Denaturation*: apertura della doppia elica del DNA;
- *Annealing*: i primers si legano alle due estremità del tratto da amplificare;
- *Estensione*: la DNA polimerasi (Taq) sintetizza i nuovi filamenti di DNA aggiungendo nucleotidi all'estremità 3'-OH libera.

La reazione di amplificazione è stata condotta in un volume di 25  $\mu$ L (0.5 ng DNA, 0.8  $\mu$ M di ciascun primer, 12.5  $\mu$ L di Ampli Taq Gold 360 Marster Mix – Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA).

Il protocollo di amplificazione è riportato nel dettaglio nella tabella 2.

Gene	Position	Polymorphism	Primers	Conditions of amplification
<i>AR</i>	Xq11-12	(CAG) <sub>n</sub> exon 1	6-FAM-5'- TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTCCTCAT-3''	35 cycles: 94°C 45'' 59°C 30'' 72°C 1' 72°C 7'

Tabella 2. Descrizione protocollo di amplificazione

#### ***4.7.4 SEQUENZIAMENTO CON ANALISI DEI FRAMMENTI***

I frammenti amplificati, sono stati successivamente analizzati con elettroforesi automatica capillare 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) mediante analisi di frammenti.

L'elettroforesi capillare è una tecnica di separazione elettroforetica condotta all'interno di un capillare. Si tratta di un processo elettrocinetico nel quale gli analiti vengono separati sulla base delle loro differenti velocità di migrazione all'interno di un campo elettrico. Grazie alla presenza dei gruppi fosfato, le molecole di DNA sono cariche negativamente e quindi, se sottoposte a un campo elettrico, migrano verso il polo positivo (anodo) con una velocità che dipende dalla loro lunghezza.

Nello studio è stata utilizzata l'analisi di frammenti in quanto i polimorfismi tra i diversi alleli di un locus corrispondono a frammenti di diversa lunghezza

che differiscono per il numero di repeats. L'analisi dei frammenti mediante sequenziamento automatico è una metodica che permette di individuare prodotti di PCR di una determinata lunghezza grazie alla marcatura del singolo frammento con molecole fluorescenti. Questo è possibile perché, per ogni coppia di primers utilizzati, uno dei due viene marcato all'estremità 5' con un fluorocromo specifico che emette fluorescenza se eccitato con una specifica lunghezza d'onda. Nel nostro caso è stato marcato il primer forward con il fluorocromo FAM. Per ogni campione è possibile separare i frammenti amplificati sia per colore sia per size degli alleli. Il dimensionamento dei singoli alleli avviene per confronto con uno standard interno costituito da una miscela di frammenti con dimensione nota e marcato con un fluorocromo. Nel presente studio è stato utilizzato GeneScan™ 600 LIZ® Size Standard, progettato per dimensionare frammenti di DNA nella gamma 20-600 nucleotidi, il quale contiene 36 frammenti di DNA a singolo filamento marcati con colorante LIZ (arancione).

Per la valutazione dei CAG repeats del gene AR, l'elettroforesi capillare è stata condotta in 10 µL di mix di reazione (2.5 µL di prodotto PCR, 0.3 µL di Gene Scan Liz 600 - Applied Biosystems, 7.7 µL di formammide). I campioni prima di essere posti nel 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) sono stati denaturati 5 min a 95°C.

Per l'analisi dei dati ottenuti con l'elettroforesi capillare è stato utilizzato il software Gene Mapper Analysis (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA). Ogni prodotto amplificato (frammento) si presenta quindi come un picco in un grafico avente per ascissa il tempo di migrazione sul gel capillare e per ordinata l'intensità del prodotto amplificato.

#### ***4.8 ANALISI STATISTICA***

L'analisi statistica è stata effettuata con il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le variabili continue sono state sottoposte, qualora non risultasse evidente dalla rappresentazione grafica mediante istogramma e/o grafico di normalità, a test di normalità di Shapiro-Wilk. In caso di normalità, le distribuzioni sono state descritte in termini di media e di deviazione standard; altrimenti, sono state utilizzate la mediana e lo scarto interquartile. Il confronto tra gruppi è stato effettuato, in caso di normalità, mediante t-test per campioni indipendenti o ANOVA a una via, a seconda del numero dei gruppi valutati, mentre in caso di distribuzioni non normali sono stati utilizzati il test U di Mann-Whitney e il test di Kruskal-Wallis (per confronti tra 2 o più gruppi, rispettivamente). Per campioni dipendenti, sono stati utilizzati il test ANOVA per misure ripetute e il test ANOVA di Friedman, a seconda della normalità della distribuzione. Il test dei segni è stato utilizzato nel confronto tra variabili dipendenti in

presenza di 2 gruppi e di variabili con distribuzione non normale. L'analisi della covarianza (ANCOVA) è stata eseguita per confrontare i risultati dopo trattamento tenendo in considerazione la condizione di partenza. Il confronto tra variabili dicotomiche è stato effettuato mediante test Chi-quadrato.

Infine, le correlazioni bivariate sono state indagate mediante test di Pearson o test di Spearman (scelti sulla base della normalità o meno della distribuzione).

Valori di  $p < 0,05$  sono considerati statisticamente significativi.

## CAPITOLO 5: RISULTATI

Nel nostro studio sono stati reclutati 54 pazienti (età media  $46,65 \pm 8,31$  anni) affetti da disfunzione erettile e/o perdita della libido. A tutti è stata somministrata una terapia con Tadalafil 20mg on demand.

Nella tabella 3 sono riportate le caratteristiche clinico-biochimiche dei pazienti al baseline.

	<b>Media <math>\pm</math> DS</b>
<b>Età (anni)</b>	$46,65 \pm 8,31$
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	$23,28 \pm 1,62$
<b>FSH (mIU/ml)</b>	$6,51 \pm 6,06$
<b>LH (mIU/ml)</b>	$4,58 \pm 3,20$
<b>Prolattina (ng/ml)</b>	$6,502 \pm 2,78$
<b>SHBG (nmol/l)</b>	$46,09 \pm 24,28$
<b>Testosterone libero calcolato (ng/dl)</b>	$6,86 \pm 2,46$
<b>Testosterone totale (ng/ml)</b>	$4,72 \pm 2,27$
<b>Albumina (g/dl)</b>	$4,27 \pm 0,22$
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	$92,57 \pm 10,52$
<b>Insulina (mcUI/ml)</b>	$10,32 \pm 4,52$
<b>HOMA-IR</b>	$2,34 \pm 1,08$
<b>HbA1c (mmol/mol)</b>	$37,11 \pm 3,41$
<b>Colesterolo totale (mg/dl)</b>	$195,69 \pm 39,25$
<b>HDL (mg/dl)</b>	$54,92 \pm 10,14$

<b>LDL (mg/dl)</b>	118,84 ± 40,39
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	109,46 ± 62,66
<b>Omocisteina (mcmol/l)</b>	13,17 ± 5,65
<b>PSA (ng/ml)</b>	1,55 ± 1,34
<b>Fumo (sì)</b>	14 (26,4%)
<b>Questionario Dieta Mediterranea (Punti)</b>	32,28 ± 5,00

Tabella 3: caratteristiche clinico-biochimiche dei pazienti al momento dell'arruolamento

Dei 54 pazienti reclutati, 51 si sono presentati al successivo controllo a 4 settimane. Al momento, invece, sono disponibili i dati solo di 16 pazienti per il controllo a 8 settimane.

Nella tabella 4, sono invece riportati i risultati dell'esame ecografico testicolare (eseguito solo al baseline) e dell'analisi eco-colordoppler dei vasi arteriosi penieni (ripetuta ad ogni visita). Durante il trattamento, non sono emerse modificazioni statisticamente significative negli indici velocimetrici arteriosi.

	<b>T0 – baseline (n=54)</b>	<b>T1– 4 settimane (n=51)</b>	<b>T2 - 8 settimane (n=16)</b>	<b>P</b>
<b>Volume testicolare medio (ml)</b>	16,34 ± 4,28	-	-	
<b>Velocità di picco sistolico (cm/s)</b>	13,37 ± 2,95	13,43 ± 2,91	13,10 ± 4,20	n.s. <sup>a</sup>
<b>Tempo di accelerazione (m/s<sup>2</sup>)</b>	2,31 ± 0,66	2,32 ± 0,60	2,18 ± 0,63	n.s. <sup>a</sup>
<sup>a</sup> ANOVA per misure ripetute				

Tabella 4: ecografia testicolare ed eco-color Doppler penieno basale

Nella tabella 5 vi sono i risultati del questionario IIEF, espressi sia come punteggio complessivo, che in punteggi relativi ai vari sottodomini. Dopo 8 settimane di trattamento, è stato osservato un miglioramento statisticamente significativo dei punteggi di IIEF totale (+7,43,  $p=0,001$ ) (grafico 1) e dei punteggi relativi al dominio “funzione erettile” (+4,11,  $p< 0,001$ ) e “orgasmo” (+1,19,  $p= 0,03$ ). Una seconda analisi, eseguita tenendo conto anche dei risultati pre-trattamento e confrontando solo le differenze tra T0 e T1, ha confermato l’effettivo beneficio del trattamento già dopo 4 settimane sia in termini di IIEF-15 ( $p= 0,003^*$ ), che di EF ( $p= 0,03^*$ ), OF ( $p=0,02^*$ ) e OS ( $p= 0,003^*$ ) (\*ANCOVA).

	<b>T0 – baseline (n=54)</b>	<b>T1 – 4 settimane (n=51)</b>	<b>T2 - 8 settimane (n=16)</b>	<b>P</b>
IIEF-15	42,26 ± 16,11	45,16 ± 15,97	49,69 ± 13,16	P= 0,001 <sup>a</sup>
IIEF-EF	16,52 ± 8,42	17,78 ± 8,63	20,63 ± 7,63	P< 0,001 <sup>a</sup>
IIEF-SD	6,24 ± 2,42	6,35 ± 2,29	7,75 ± 1,57	n.s. <sup>a</sup>
IIEF-OF	6,37 ± 3,26	6,57 ± 2,65	7,56 ± 2,56	P= 0,03
IIEF-IS	7,15 ± 3,12	7,59 ± 2,66	7,06 ± 2,18	n.s. <sup>a</sup>
IIEF-OS	5,98 ± 2,61	6,57 ± 2,65	6,69 ± 2,80	n.s. <sup>a</sup>

<sup>a</sup>ANOVA di Friedman, EF= Erectile Function; SD= Sexual Desire; OF= Orgasmic Function; IS= Intercourse Satisfaction; OS= Overall Satisfaction

Tabella 5: risultati del questionario IIEF-15 e dei relativi sottodomini

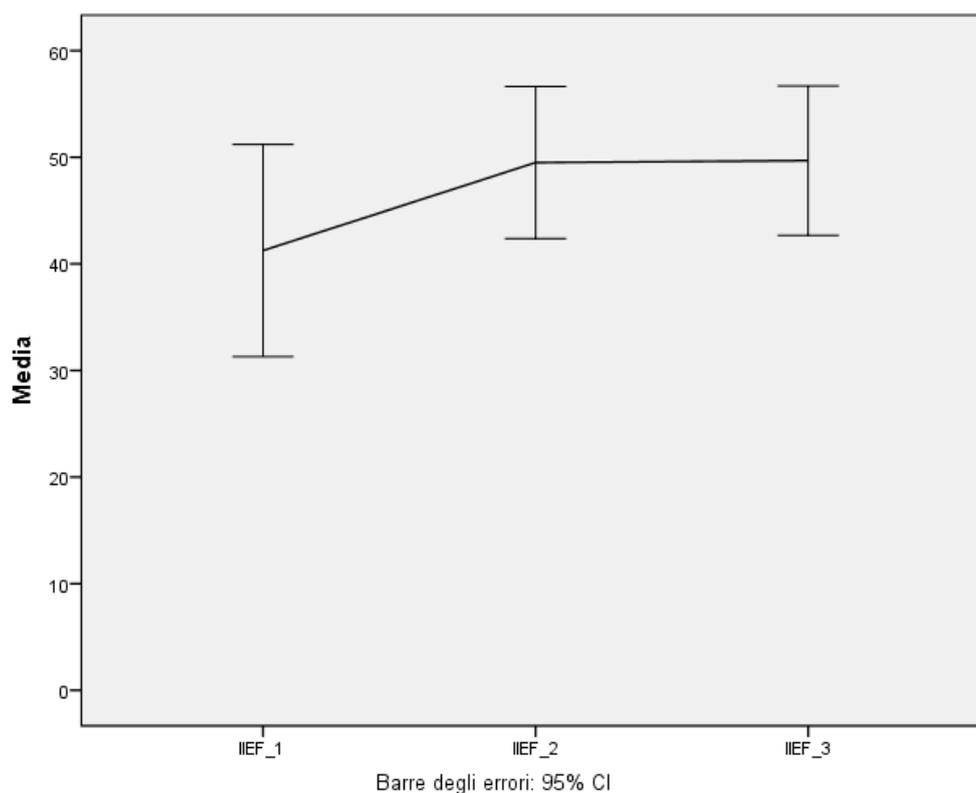


Grafico 1: andamento dei valori di IIEF-15 durante trattamento

Stratificando, inoltre, i livelli di DE sulla base del punteggio IIEF-EF (26-30 assente, 17-25 DE lieve, 11-16 DE moderata, 1-10 DE grave), è risultato che 47 pazienti su 54 (87%), al baseline, presentavano un disturbo inquadrabile come DE. A 4 settimane, la percentuale di pazienti affetti da DE risultava pari al 74,5% (38/51), e dopo 4 ulteriori settimane la percentuale si riduceva al 68,7% (11/16). Tale dato si è dimostrato statisticamente significativo (tabella 6).

	<b>T0 – baseline (n=54)</b>	<b>T1 – 4 settimane (n=51)</b>	<b>T2 – 8 settimane (n=16)</b>	<b>P</b>
N	54	51	16	-
No DE	7 (13,0%)	13 (25,5%)	5 (31,3%)	-
DE lieve	22 (40,7%)	16 (31,4%)	6 (37,5%)	-
DE moderata	10 (18,5%)	8 (15,7%)	2 (12,5%)	-
DE grave	15 (27,8%)	14 (27,5%)	3 (18,8%)	-
Totale DE	47 (87%)	38 (74,5%)	11 (68,7%)	P= 0,015 <sup>a</sup>
<sup>a</sup> ANOVA di Friedman				

Tabella 6: riduzione della percentuale di DE durante il trattamento

## **5.1 ANALISI DI CORRELAZIONE BIVARIATA**

### **5.1.1 PARAMETRI ORMONALI**

Nel nostro campione, i livelli di testosterone totale mostrano una correlazione moderata e positiva con i livelli di SHBG ( $r= 0,592$ ,  $p< 0,01$ ), mentre non correlano con i livelli di PSA.

I livelli di testosterone libero, invece, mostrano una correlazione debole-moderata con PSV ( $r= 0,359$ ,  $p< 0,01$ ) e TA ( $r= 0,406$ ,  $p= 0,01$ ) valutati all'ecocolordoppler penieno. I parametri velocimetrici, inoltre, correlano con l'età ( $r= -0,502$ ,  $p< 0,01$  e  $r= -0,545$ ,  $p< 0,01$  per VPS e TA, rispettivamente). Dopo correzione per età, TA e testosterone libero mantengono una correlazione statisticamente significativa, per quanto debole ( $r= 0,273$ ,  $p= 0,05$ ).

Si è poi osservata una correlazione positiva forte tra FSH e livelli di LH ( $r= 0,699$ ,  $p< 0,01$ ) e moderata tra FSH e prolattina ( $r= 0,292$ ,  $p= 0,04$ ). È emersa anche una correlazione positiva tra FSH e omocisteina ( $r=0,319$ ,  $p= 0,04$ ), mentre è risultata negativa la correlazione tra FSH e IIEF-15 ( $r= -0,290$ ,  $p= 0,04$ ), IIEF-EF ( $r= -0,351$ ,  $p= 0,01$ ) e volume testicolare medio ( $r=-0,384$ ,  $p< 0,01$ ). Si segnala, inoltre, una correlazione positiva tra LH e prolattina ( $r= 0,331$ ,  $p= 0,02$ ) e tra LH e testosterone totale ( $r= 0,330$ ,  $p=0,02$ ).

L'età, a sua volta, correla negativamente con i livelli di testosterone libero ( $r = -0,346$ ,  $p = 0,01$ ), ma non con quelli di PSA, di SHBG e di testosterone totale. Si segnala, infine, una correlazione negativa tra fumo e SHBG ( $r = -0,271$ ,  $p = 0,05$ ).

### **5.1.2 PARAMETRI METABOLICI**

Dal punto di vista metabolico, i livelli di testosterone libero correlano negativamente con la glicemia ( $r = -0,302$ ,  $p = 0,04$ ) e con i trigliceridi ( $r = -0,402$ ,  $p < 0,01$ ) e positivamente con i livelli di HDL ( $r = 0,392$ ,  $p = 0,04$ ). Anche i livelli di testosterone totale correlano negativamente con la glicemia ( $r = -0,283$ ,  $p = 0,05$ ) e con i trigliceridi ( $r = -0,367$ ,  $p = 0,02$ ). Si è inoltre osservata una correlazione positiva tra glicemia e colesterolo totale ( $r = 0,423$ ,  $p < 0,01$ ) e tra quest'ultimo e insulina ( $r = 0,560$ ,  $p = 0,03$ ) e trigliceridi ( $r = 0,737$ ,  $p < 0,01$ ). Infine, è stata osservata una correlazione positiva tra HOMA-IR e colesterolo totale ( $r = 0,580$ ,  $p = 0,02$ ) e trigliceridi ( $r = 0,756$ ,  $p < 0,01$ ).

L'età, invece, correla inoltre positivamente con il BMI ( $r = 0,268$ ,  $p = 0,05$ ), con la glicemia ( $r = 0,481$ ,  $p < 0,01$ ) e con l'omocisteina ( $r = 0,304$ ,  $p = 0,05$ ).

### **5.1.3 FUNZIONE SESSUALE**

Per quanto riguarda i parametri di funzionalità sessuale, valutati mediante IIEF-15, abbiamo rilevato una correlazione negativa tra punteggio totale di IIEF-15 e età ( $r = -0,450$ ,  $p < 0,01$ ) e SHBG ( $r = -0,290$ ,  $p = 0,03$ ) e debolmente

positiva tra IIEF-15 e TA ( $r= 0,287$ ,  $p= 0,04$ ). Come già riportato, si è inoltre evidenziata una correlazione negativa tra IIEF-15 e FSH ( $r=-0,290$ ,  $p= 0,04$ ). Si segnalano, poi una correlazione negativa tra IIEF-EF e età ( $r= -0,369$ ,  $p< 0,01$ ), FSH ( $r=- 0,384$ ,  $p< 0,01$ ) e SHBG ( $r=-0,277$ ,  $p= 0,04$ ) e positiva tra IIEF-EF e TA ( $r= 0,34$ ,  $p= 0,01$ ). C'è poi, una correlazione negativa tra fumo e IIEF-EF ( $r= -0,276$ ,  $p= 0,05$ ).

Infine, si è evidenziata una correlazione negativa moderata tra IIEF-OF e SHBG ( $r= -0,367$ ,  $p= 0,05$ ).

#### **5.1.4 STUDIO DEL POLIMORFISMO CAG**

L'analisi del polimorfismo CAG ha mostrato, nel nostro campione, un numero di triplette compreso tra 16 e 29, con una media di  $22,9 \pm 2.8$  (figura 9).

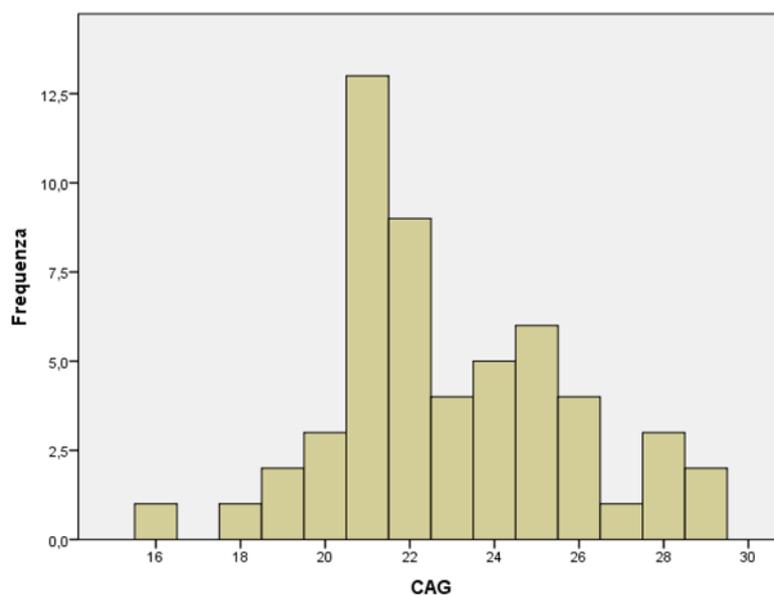


Figura 9: istogramma della distribuzione del polimorfismo CAG

La mediana della distribuzione risulta pari a 22, mentre 21 e 24 rappresentano, rispettivamente, il primo e il secondo terzile della distribuzione (tabella 7).

<b>Analisi del polimorfismo CAG</b>	
<b>Minimo</b>	16
<b>Massimo</b>	29
<b>Mediana</b>	22
<b>Media</b>	22,9
<b>Percentili</b>	
25°	21
50°	22
75°	25
<b>Terzili</b>	
1°	21
2°	24

Tabella 7: analisi descrittiva della distribuzione del polimorfismo CAG

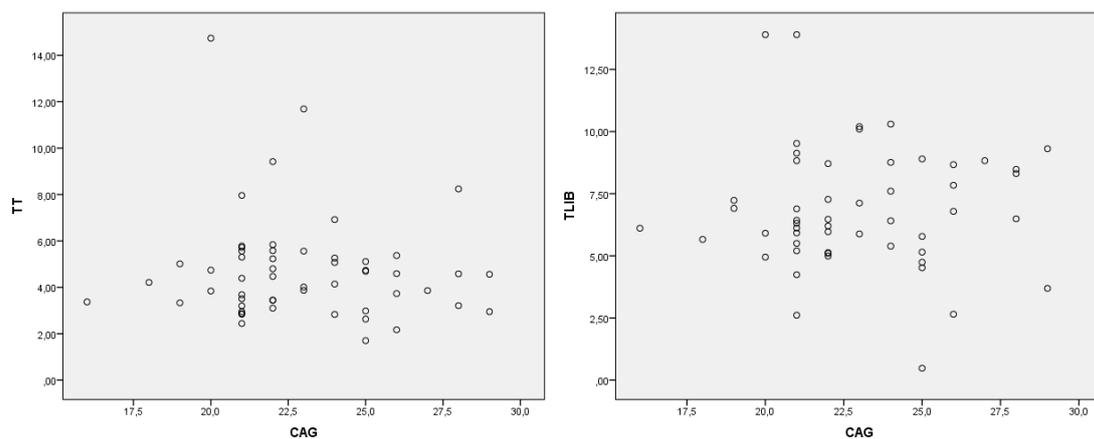


FIGURA 10: distribuzione dei CAGn in relazione del testosterone totale e libero

All'analisi bivariata, non si è rilevata nessuna correlazione diretta tra numero di triplette CAG e livelli di testosterone totale ( $r = -0,057$ ,  $p = 0,68$ ) o libero ( $r = 0,045$ ,  $p = 0,75$ ). Neanche con SHBG ( $r = -0,116$ ,  $p = 0,4$ ). Non è emersa neanche alcuna correlazione statisticamente significativa tra CAG e parametri metabolici.

In base al valore mediano di ripetizioni CAG, il nostro campione è stato quindi suddiviso in 2 gruppi ( $CAG \leq 22$  e  $CAG > 22$ ). Al baseline, l'unico parametro che ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra i 2 gruppi è stato il PSA ( $1,93 \pm 1,61$  vs  $1,03 \pm 0,56$ ,  $p = 0,04$ ).

	<b>CAG ≤ 22 ripetizioni</b>	<b>CAG &gt; 22 ripetizioni</b>	<b>P</b>
<b>N pazienti</b>	29	25	
<b>Età (anni)</b>	47,83 ± 8,86	45,28 ± 7,56	n.s. <sup>a</sup>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,90 ± 1,67	23,72 ± 1,46	n.s. <sup>a</sup>
<b>FSH (mIU/ml)</b>	7,04 ± 7,33	5,93 ± 4,23	n.s. <sup>a</sup>
<b>LH (mIU/ml)</b>	4,66 ± 3,50	4,48 ± 1,72	n.s. <sup>a</sup>
<b>Prolattina (ng/ml)</b>	6,29 ± 2,84	6,74 ± 2,74	n.s. <sup>a</sup>
<b>SHBG (nmol/l)</b>	49,62 ± 27,92	42,00 ± 18,98	n.s. <sup>a</sup>
<b>Testosterone libero calcolato (ng/dl)</b>	6,83 ± 2,49	6,90 ± 2,47	n.s. <sup>a</sup>
<b>Testosterone totale (ng/ml)</b>	4,85 ± 2,46	4,58 ± 2,07	n.s. <sup>a</sup>
<b>Albumina (g/dl)</b>	4,27 ± 0,23	4,27 ± 0,22	n.s. <sup>a</sup>
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	91,58 ± 11,67	93,70 ± 9,16	n.s. <sup>a</sup>
<b>Insulina (mcUI/ml)</b>	10,20 ± 3,52	10,42 ± 5,37	n.s. <sup>a</sup>
<b>HOMA-IR</b>	2,30 ± 0,88	2,38 ± 1,27	n.s. <sup>a</sup>
<b>HbA1c (mmol/mol)</b>	36,80 ± 3,07	37,47 ± 3,84	n.s. <sup>a</sup>
<b>Colesterolo totale (mg/dl)</b>	194,24 ± 39,61	197,82 ± 39,82	n.s. <sup>a</sup>
<b>HDL (mg/dl)</b>	54,75 ± 10,12	55,13 ± 10,49	n.s. <sup>a</sup>
<b>LDL (mg/dl)</b>	121,78 ± 35,63	115,20 ± 46,48	n.s. <sup>a</sup>
<b>Trigliceridi (mg/dl)</b>	109,75 ± 68,62	109,06 ± 55,20	n.s. <sup>a</sup>
<b>Omocisteina (mcmol/l)</b>	12,98 ± 4,37	13,39 ± 7,00	n.s. <sup>a</sup>
<b>PSA (ng/ml)</b>	1,93 ± 1,61	1,03 ± 0,56	P =

			0,04 <sup>a</sup>
<b>Fumo (sì)</b>	7 (24,1%)	7 (29,2%)	n.s. <sup>b</sup>
<b>Dieta</b>	32,71 ± 4,40	31,74 ± 5,69	n.s. <sup>a</sup>
<sup>a</sup> T-test, <sup>b</sup> Chi-quadrato			

Tabella 8: caratteristiche clinico-biochimiche dei pazienti suddivisi in base al tratto CAG

La stessa analisi è stata inoltre eseguita dopo suddivisione del campione in terzili ( $CAG \leq 21$ ,  $CAG 22-24$  e  $CAG \geq 25$ ), senza che emergessero differenze statisticamente significative (test ANOVA, non mostrato).

Una volta suddiviso il campione in due sottogruppi in funzione della mediana, è stata ripetuta la comparazione dei parametri dell'IIEF-15 prima e dopo trattamento, sia a 4 che a 8 settimane (Figura 11).

Per il gruppo  $CAG \leq 22$  si è confermato un miglioramento statisticamente significativo per IIEF-15 ( $p= 0,02$ ), EF ( $p=0,007$ ) e OS ( $p= 0,03$ ). Nel gruppo con numero di triplete  $CAG > 22$ , invece, si conferma solo il miglioramento nel punteggio complessivo di IIEF-15 e di IIEF-OF pur non raggiungendo la significatività statistica.

Confrontati, tuttavia, i punteggi dei questionari prima e dopo trattamento tra i due gruppi, non sono emerse differenze statisticamente significative.

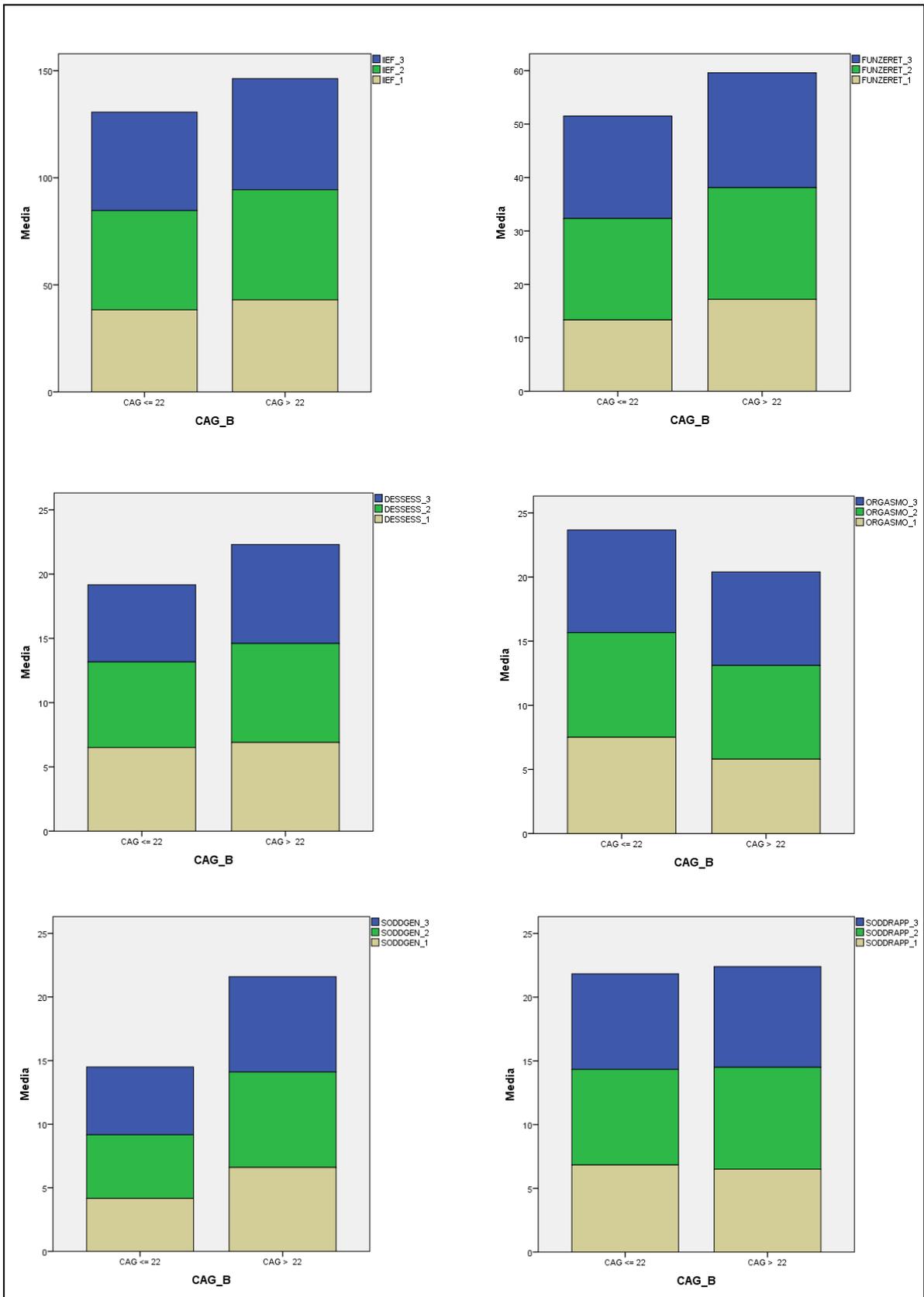


Figura 11: andamento del punteggio IIEF-15 durante terapia per CAG ≤ 22 e per CAG > 22

L'analisi della covarianza (ANCOVA), eseguita tra T0 e T1, conferma l'assenza di una differenza significativa tra i due gruppi in termini di IIEF-15 ( $F= 0,04$ ,  $p= 0,82$ ), di IIEF-EF ( $F= 14, 19$ ,  $p= 0,42$ ) e di IIEF-OS ( $F= 0,40$ ,  $p= 0,53$ ). Un risultato analogo è stato osservato dopo aver suddiviso il campione in terzili: benché, apparentemente, un miglioramento statisticamente significativo in termini di IIEF e di EF sia stato osservato nel terzile centrale (CAG 22-24), la variazione non ha raggiunto i termini della significatività statistica, quando confrontata tra i gruppi.

## **CAPITOLO 6: DISCUSSIONE**

La relazione tra libido, DE e ipogonadismo è supportata da numerose evidenze; tuttavia, recenti studi suggeriscono che, anche in presenza di livelli di testosterone normali, la performance sessuale e la libido possano essere influenzati da ulteriori fattori, ormonali e non. Per approfondire il rapporto tra testosterone e DE in condizioni fisiologiche, abbiamo condotto uno studio esplorativo su pazienti eugonadici, che valutasse l'impatto del polimorfismo CAG nel modulare la risposta al trattamento con inibitori orali delle fosfodiesterasi. I soggetti coinvolti nello studio manifestavano alterazioni della funzione sessuale quali, calo della libido e/o disfunzione erettile.

Lo studio del polimorfismo CAG, nel nostro gruppo di pazienti, ha mostrato un numero di triplette medio pari a 22.9 (range 16-29). Tale risultato risulta in linea con quelli relativi alla popolazione caucasica (85).

Dividendo i pazienti in funzione della mediana dei CAG, abbiamo notato l'assenza di differenze significative, in termini di parametri clinico-metabolici. Questo dato è giustificato dal ristretto campo di variazione tra numero di triplette e dall'influenza di molteplici fattori non ormonali nella determinazione di tali caratteristiche. Tuttavia, il riscontro di livelli di PSA significativamente maggiori nel gruppo dei pazienti con minor numero di ripetizioni CAG ( $\leq 22$ ), costituisce un'interessante eccezione. Essendo la

prostata la ghiandola androgeno-sensibile per eccellenza, valori maggiori di PSA suggerirebbero, a parità di testosteronemia, una maggiore attività trascrizionale di AR. Questo dato appare in linea con quanto presente in letteratura, in particolare con lo studio di Xue et al (86), condotto su una popolazione multi-etnica di 420 soggetti giovani e sani, in cui i livelli di PSA hanno mostrato una correlazione lineare inversa con il numero di ripetizioni CAG. Tuttavia, uno studio più recente condotto da M. B. Holgersson *et al*, nel 2014 (85), pur confermando tale riscontro, ha suggerito che non sia la lunghezza del tratto polimorfico di per sé a condizionare l'efficacia trascrizionale di AR, e quindi l'aumento dei livelli di PSA, ma la presenza dello specifico aplotipo, AR rs6152A. In presenza di questa particolare variante genetica, associata frequentemente a un numero ridotto di ripetizioni CAG, si osservano elevati valori di PSA. Gli autori, pertanto, hanno suggerito che il peso della lunghezza del tratto polimorfico nel modulare l'attività di AR, almeno per quanto riguarda il PSA, possa essere stato sovrastimato, negli studi precedenti, dalla maggiore frequenza di varianti rs6152A nei soggetti con ridotto numero di ripetizioni CAG.

Indipendentemente dalle interpretazioni della letteratura, dividendo il nostro campione in due gruppi, utilizzando come cut-off 22 ripetizioni (che, come già detto, rappresenta la mediana della distribuzione), abbiamo trovato dei

livelli medi di PSA pari a 1,93 ( $\pm$  1,61) ng/dl nel gruppo con basso numero di ripetizioni e pari a 1,03 ( $\pm$  0,56) ng/dl nel gruppo ad alto numero di ripetizioni, con una differenza media di 0,90 ng/dl ( $p=0,04$ ). Tale dato risulta ancora più significativo se si considera che, all'interno del nostro campione, non sono emerse correlazioni significative né tra i livelli di testosterone (totale e libero) e numero di triplette, né tra testosterone e PSA. Se da un lato non sorprende la mancanza di correlazione tra PSA e testosterone, visto che è ormai appurato che il fattore *età* incida maggiormente su PSA e volume prostatico, piuttosto che sul valore assoluto di testosterone (87), l'assenza di correlazione tra androgeni circolanti e numero di triplette CAG fornisce uno spunto di riflessione interessante. Infatti, almeno per il nostro campione, non si è osservato l'aumento dei livelli di testosterone in risposta alla ridotta attività trascrizionale di AR (72) (77). Una ridotta escursione dei valori di androgeni, senza una netta correlazione tra questi e l'attività biologica tissutale (espressa, appunto, dal PSA), suggerisce, a nostro avviso, un effetto mediato a livello recettoriale, su cui elementi quali l'età potrebbero fungere da cofattori.

Dal punto di vista della funzione sessuale, i nostri soggetti hanno mostrato una risposta positiva al trattamento con tadalafil, con miglioramento sia in termini di IIEF-15 che di funzione erettile (IIEF-EF) che di funzione

orgasmica (IIEF-OF). La percentuale di soggetti affetti da DE si è ridotta significativamente durante i controlli, passando dall'87% (baseline) al 74,5% (T1) e quindi al 68,7% (T2). Anche in questo caso, i nostri dati trovano conferma su quanto già presente in letteratura (88).

Tuttavia, l'azione del testosterone e quella dei farmaci PDE5i non sono del tutto indipendenti. È stato dimostrato, infatti, da un recente studio controllato randomizzato (RCT) condotto su 140 soggetti di età compresa tra 40 e 70 anni, che l'assunzione quotidiana di sildenafil per un breve periodo (3-7 settimane) determina un aumento dei livelli di testosterone totale e libero di 3,58 nmol/l e 110 pmol/l, rispettivamente, insieme a una concomitante riduzione dei livelli di LH, suggerendo uno stimolo diretto sulla steroidogenesi testicolare (89). Un altro RCT ha confermato l'effetto positivo dei farmaci PDE5i sulla produzione di androgeni, mostrando un aumento dei livelli di testosterone totale dopo 6 mesi di trattamento continuativo con vardenafil (10 mg bid), dimostrando, inoltre, un effetto benefico sui parametri biochimici della disfunzione endoteliale (90). D'altra parte, studi sperimentali hanno mostrato che la deprivazione di androgeni a livello penieno si accompagna ad apoptosi delle cellule muscolari lisce e deposizione di tessuto adiposo, con fibrosi dei corpi cavernosi, ridotto afflusso arterioso, aumentata risposta ai mediatori della vasocostrizione, ridotto rilascio NO-mediato

durante lo stimolo sessuale e, soprattutto, ridotta espressione locale di PDE5 (91). Quest'ultimo aspetto, paradossalmente, potrebbe condizionare la ridotta risposta ai farmaci PDE5i che si osserva nelle condizioni di ipogonadismo grave.

Per indagare se l'azione del testosterone possa essere influenzata dall'attività del suo recettore, abbiamo suddiviso il campione sulla base della lunghezza del tratto CAG: i due gruppi hanno mostrato una risposta simile in termini di IIEF-15, con un miglioramento statisticamente significativo per entrambi, mentre, solo per il gruppo con un numero di ripetizioni  $\leq 22$ , a fronte di un più basso score di partenza, si è osservato un miglioramento della funzione erettile (IIEF-EF). Tuttavia, nel confronto tra i due campioni dopo trattamento, non sono emerse differenze statisticamente significative per nessuno dei parametri valutati. Analogamente, la suddivisione del campione in terzili ha mostrato un miglioramento del punteggio IIEF totale e del punteggio relativo al sottogruppo EF solo nel 2° terzile (CAG 22-24), senza, tuttavia, differenze statisticamente significative tra i gruppi né al baseline né durante il follow-up. Pertanto, seppur limitatamente, i nostri dati suggerirebbero un potenziale effetto del polimorfismo CAG nel modulare la risposta al trattamento con PDE5i, ma sono necessari ulteriori studi per confermare questa supposizione.

La forza del nostro studio, che per le caratteristiche del suo disegno si propone come uno studio esplorativo, risiede nella numerosità del campione e dall'elevata qualità delle informazioni ottenute, la cui variabilità è stata ridotta mediante criteri di inclusione/esclusione piuttosto restrittivi e dall'uniformità dei metodi di indagine. Inoltre, nella scelta dei questionari, sono stati utilizzati strumenti di valutazione la cui validità è stata confermata a livello internazionale da numerosi studi. Il nostro, inoltre, è il primo studio che abbia valutato l'influenza del polimorfismo CAG nella risposta ai farmaci PDE5i negli uomini. L'unico altro studio del genere, infatti, è stato condotto su donne affette da disfunzione sessuale indotta da antidepressivi ed ha valutato la risposta a un trattamento combinato con testosterone e PDE5i, rilevando che le pazienti trattate con SSRI a basso dosaggio e con sequenze CAG più lunghe mostravano una risposta maggiore alla terapia (92).

Un punto a sfavore del nostro studio è, tuttavia, la mancanza di informazioni sull'effettiva aderenza dei pazienti al trattamento, in quanto la terapia somministrata è al bisogno (on demand). L'opzione è stata scelta dopo aver valutato anche un trattamento di tipo continuativo. Il tasso di risposta al trattamento osservato nella totalità dei nostri pazienti risulta inferiore rispetto a quello generalmente descritto in letteratura, ovvero il 70% circa (3). Tuttavia, questa percentuale tiene conto dell'efficacia complessiva

dell'intervento farmacologico con PDE5i, con la possibilità di effettuare uno switch verso un'altra molecola della stessa classe o un aumento di dosaggio. Non si può escludere, tuttavia, nel nostro campione, una compliance non ottimale al trattamento, tenuto anche in considerazione il basso numero di rapporti dichiarato durante il follow-up (in media 3 rapporti durante le 4 settimane precedenti la prima visita e 4 rapporti durante le 4 settimane successive). Ricordiamo, tuttavia, che nei criteri di inclusione, durante l'arruolamento, il maggiore disturbo tra i soggetti era il calo della libido. Si segnala, infine, che al momento dell'analisi dei dati non risultavano ancora disponibili i dati relativi all'ultima visita di controllo di buona parte dei pazienti, e che pertanto i risultati del nostro studio andranno integrati con gli esiti delle valutazioni a 8 settimane.

Alla luce dei dati preliminari che abbiamo ottenuto dal nostro studio, riteniamo che la valutazione di una popolazione più numerosa, introducendo uno schema di trattamento più controllabile, potrebbe permettere di confermare la nostra ipotesi, fornendo un'ulteriore evidenza sull'influenza del polimorfismo CAG nella funzione sessuale.

## Bibliografia

(1): [www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)

(2): I. Goldstein, T. F. Lue, H. Padma-Nathan, R. C. Rosen, W. D. Steers, and P. A. Wicker, "Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group [see comments] [published erratum appears in N Engl J Med 1998 Jul 2;339(1):59]," *N.Engl. J. Med.*

(3): R. Shamloul and H. Ghanem, "Erectile dysfunction.," *Lancet* (London, England), vol. 381, no. 9861, pp. 153–65, 2013.

(4): R. Rosen et al., "Lower Urinary Tract Symptoms and Male Sexual Dysfunction: The Multinational Survey of the Aging Male (MSAM-7)," *Eur. Urol.*, 2003.

(5): <https://www.siams.info/erezione-eiaculazione-e-orgasmo/>

(6): Physiological regulation of penile arteries and veins D Prieto *International Journal of Impotence Research* volume 20, pages17–29 (2008)

(7): 4 fattori causali e fattori di rischio della sindrome de/luts: ipotesi patogenetiche aldo e. Calogero<sup>1</sup>, luigi cormio<sup>2</sup>, rosita a. Condorelli<sup>1</sup>, Sandro La Vigneral<sup>1</sup>, Paolo Massenio<sup>2</sup>, Enzo Vicari<sup>1</sup> <sup>1</sup> Sezione di Endocrinologia, Andrologia e Medicina Interna, Dipartimento di Scienze Mediche e Pediatriche, Università di Catania <sup>2</sup> Clinica Urologica e Centro Trapianti di Rene, Università degli Studi di Foggia

(8): M. Burchardt *et al.*, "Hypertension is associated with severe erectile dysfunction," *J. Urol.*, 2000.

(9): The Princeton III Consensus Recommendations for the Management of Erectile Dysfunction and Cardiovascular Disease Ajay Nehra, MD Graham Jackson, FRCP, FESC; Martin Miner, MD; Kevin L. Billups, MD; Arthur L. Burnett, MD, MBA; Jacques Buvat, MD; Culley C. Carson, MD; Glenn R. Cunningham, MD; Peter Ganz, MD; Irwin Goldstein, MD; Andre T. Guay, MD; Geoff Hackett, MD; Robert A. Kloner, MD, PhD; John Kostis, MD; Piero Montorsi, MD; Melinda Ramsey, PhD; Raymond Rosen, PhD; Richard Sadovsky, MD; Allen D. Seftel, MD; Ridwan Shabsigh, MD; Charalambos Vlachopoulos, MD; and Frederick C. W. Wu, MD

(10): M. Böhm *et al.*, "Erectile dysfunction predicts cardiovascular events in high-risk patients receiving telmisartan, ramipril, or both: The ongoing telmisartan alone and in

combination with ramipril global endpoint trial/telmisartan randomized assessment study in ace intoler,” *Circulation*, 2010.

(11): A. A. *et al.*, “Early endothelial dysfunction as a marker of vasculogenic erectile dysfunction in young habitual cannabis users,” *International Journal of Impotence Research*. 2008.

(12): A. Serretti and A. Chiesa, “A meta-analysis of sexual dysfunction in psychiatric patients taking antipsychotics,” *International Clinical Psychopharmacology*. 2011.

(13): A. Thomas, C. Woodard, E. S. Rovner, and A. J. Wein, “Urologic complications of nonurologic medications,” *Urologic Clinics of North America*. 2003.

(14): A. Ponholzer, C. Temml, K. Mock, M. Marszalek, R. Obermayr, and S. Madersbacher, “Prevalence and risk factors for erectile dysfunction in 2869 men using a validated questionnaire,” *Eur. Urol.*, 2005.

(15): S. Di Francesco and R. L. Tenaglia, “Mediterranean diet and erectile dysfunction: A current perspective,” *Cent. Eur. J. Urol.*, vol. 70, no. 2, pp. 185–187, 2017.

(16): R. C. Rosen, A. Riley, G. Wagner, I. H. Osterloh, J. Kirkpatrick, and A. Mishra, “The international index of erectile function (IIEF): A multidimensional scale for assessment of erectile dysfunction,” *Urology*, 1997.

(17): L. Petrone *et al.*, “Structured interview on erectile dysfunction (SIEDY©): A new, multidimensional instrument for quantification of pathogenetic issues on erectile dysfunction,” *Int. J. Impot. Res.*, 2003.

(18): <https://www.siams.info/disfunzione-erettile-inquadramento-diagnostico/>

(19): A. L. Burnett *et al.*, “Erectile Dysfunction: AUA Guideline,” *J. Urol.*, 2018.

(20): Assessment of the efficacy of combination therapy with folic acid and tadalafil for the management of erectile dysfunction in men with type 2 diabetes mellitus Ali Hamidi Madani 2013

(21): F. Lombardo *et al.*, “Treatment of erectile dysfunction due to C677T mutation of the MTHFR gene with vitamin B6 and folic acid in patients non responders to PDE5i,” *J. Sex. Med.*, vol. 7, no. 1 PART 1, pp. 216–223, 2010.

- (22): J. D. Dean *et al.*, “The International Society for Sexual Medicine’s Process of Care for the Assessment and Management of Testosterone Deficiency in Adult Men,” *J. Sex. Med.*, 2015.
- (23): A. Aversa *et al.* “The use of dynamic Doppler color ultrasonography of the penis in the study of erectile dysfunction” *Radiol Med.* 1999 Jun;97(6):499-505
- (24): A. Aversa and L. M. Sarteschi, “The role of penile color-duplex ultrasound for the evaluation of erectile dysfunction,” *J. Sex. Med.*, 2007.
- (25): G. Corona *et al.*, “Penile doppler ultrasound in patients with erectile dysfunction (ED): Role of peak systolic velocity measured in the flaccid State in predicting Arteriogenic ED and silent coronary artery disease,” *J. Sex. Med.*, vol. 5, no. 11, pp. 2623–2634, 2008.
- (26): K. Sairam, E. Kulinskaya, D. Hanbury, G. Boustead, and T. McNicholas, “Oral sildenafil (Viagra™) in male erectile dysfunction: Use, efficacy and safety profile in an unselected cohort presenting to a British district general hospital,” *BMC Urol.*, 2002.
- (27): K. Esposito *et al.*, “Effect of lifestyle changes on erectile dysfunction in obese men: A randomized controlled trial,” *J. Am. Med. Assoc.*, 2004.
- (28): G. Maio, S. Saraeb, and A. Marchiori, “Physical activity and pde5 inhibitors in the treatment of erectile dysfunction: Results of a randomized controlled study,” *J. Sex. Med.*, 2010.
- (29): W. O. Brant, A. J. Bella, and T. F. Lue, “Treatment Options for Erectile Dysfunction,” *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America.* 2007.
- (30): M. Kendirci, O. Tanriverdi, L. Trost, and W. J. G. Hellstrom, “Management of sildenafil treatment failures,” *Current Opinion in Urology.* 2006.
- (31): D. Behr-Roussel *et al.*, “Chronic sildenafil improves erectile function and endothelium-dependent cavernosal relaxations in rats: Lack of tachyphylaxis,” *Eur. Urol.*, 2005.
- (32): C. G. McMahon, “Treatment of Erectile Dysfunction with Chronic Dosing of Tadalafil,” *European Urology.* 2006.

(33): A. J. Bella, L. X. DeYoung, M. al-Numi, and G. B. Brock, "Daily Administration of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors for Urological and Nonurological Indications {A figure is presented}," *European Urology*. 2007.

(34): I. Gruenwald, R. Leiba, and Y. Vardi, "Effect of Sildenafil on Middle-Aged Sexually Active Males with No Erectile Complaints: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study," *Eur. Urol.*, 2009.

(35): I. Gruenwald, R. Leiba, and Y. Vardi, "Effect of Sildenafil on Middle-Aged Sexually Active Males with No Erectile Complaints: A Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study," *Eur. Urol.*, 2009.

(36): G. Kayık, N. Tüzün, and S. Durdagi, "Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 32, no. 1, pp. 311–330, 2017.

(37): G. McGwin, "Phosphodiesterase type 5 inhibitor use and hearing impairment," *Arch. Otolaryngol. - Head Neck Surg.*, 2010.

(38): S. T. Forgue *et al.*, "Tadalafil pharmacokinetics in healthy subjects," *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2006.

(39): J. Yuan *et al.*, "Comparative effectiveness and safety of oral phosphodiesterase type 5 inhibitors for erectile dysfunction: A systematic review and network meta-analysis," *European Urology*. 2013.

(40): M. Lee and R. Sharifi, "Non-invasive Management Options for Erectile Dysfunction When a Phosphodiesterase Type 5 Inhibitor Fails," *Drugs and Aging*, vol. 35, no. 3, pp. 175–187, 2018.

(41): R. Casella, M. R. Maduro, L. I. Lipshultz, and D. J. Lamb, "Significance of the polyglutamine tract polymorphism in the androgen receptor," *Urology*. 2001.

(42): G. Tirabassi *et al.*, "Influence of CAG repeat polymorphism on the targets of testosterone action," *International Journal of Endocrinology*. 2015.

- (43): The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. N L Chamberlain<sup>1</sup>, E D Driver, R L Miesfeld Doi: 10.1093/nar/22.15.3181
- (44): Tut TG, Ghadessy FJ, Trifiro MA, et al: Long polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with reduced trans-activation, impaired sperm production, and male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3777–3782, 1997.
- (45): Stepanet al., 1989
- (46): Erbenet al., 2000
- (47): Fukuda &Iida, 2000
- (48): Scopacasaet al., 2000
- (49): M. Zitzmann, M. Brune, B. Kornmann, J. Gromoll, R. Junker, and E. Nieschlag, “The CAG repeat polymorphism in the androgen receptor gene affects bone density and bone metabolism in healthy males,” *Clin. Endocrinol. (Oxf).*, 2001.
- (50): A. M. Kenny, D. McGee, C. Joseph, J. Covault, C. Abreu, and L. G. Raisz, “Lack of association between androgen receptor polymorphisms and bone mineral density or physical function in older men,” *Endocr. Res.*, 2005.
- (51): G. Tirabassi, N. Delli Muti, A. Gioia, A. Biagioli, A. Lenzi, and G. Balercia, “Effects of testosterone replacement therapy on bone metabolism in male post-surgical hypogonadotropic hypogonadism: Focus on the role of androgen receptor CAG polymorphism,” *J. Endocrinol. Invest.*, 2014.
- (52): J. T. Manning, “The androgen receptor gene: A major modifier of speed of neuronal transmission and intelligence?,” *Med. Hypotheses*, 2007.
- (53): L. T. Gettler *et al.*, “The role of testosterone in coordinating male life history strategies: The moderating effects of the androgen receptor CAG repeat polymorphism,” *Horm. Behav.*, 2017.
- (54): J. S. Sankar and E. Hampson, “Testosterone levels and androgen receptor gene polymorphism predict specific symptoms of depression in young men,” *Gend. Med.*, 2012.

(55): Z. L. Simmons and J. R. Roney, "Variation in CAG repeat length of the androgen receptor gene predicts variables associated with intrasexual competitiveness in human males," *Horm. Behav.*, 2011.

(56): S. Rajender, G. Pandu, J. D. Sharma, K. P. C. Gandhi, L. Singh, and K. Thangaraj, "Reduced CAG repeats length in androgen receptor gene is associated with violent criminal behavior," *Int. J. Legal Med.*, 2008.

(57): A. Aluja, L. F. García, A. Blanch, and J. Fibla, "Association of androgen receptor gene, CAG and GGN repeat length polymorphism and impulsive-disinhibited personality traits in inmates: The role of short-long haplotype," *Psychiatr. Genet.*, 2011.

(58): D. E. Comings, C. Chen, S. Wu, and D. Muhleman, "Association of the androgen receptor gene (AR) with ADHD and conduct disorder," *Neuroreport*, 1999.

(59): M. Mitas, "Trinucleotide repeats associated with human disease," *Nucleic Acids Research*. 1997.

(60): M. Katsuno, H. Banno, K. Suzuki, H. Adachi, F. Tanaka, and G. Sobue, "Clinical features and molecular mechanisms of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA)," *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2010.

(61): F. D., G. E.A., L. A., and A. A., "CAG repeat testing of androgen receptor polymorphism: Is this necessary for the best clinical management of hypogonadism?," *Journal of Sexual Medicine*. 2013.

(62): A comprehensive definition for metabolic syndrome (Paul L Huang) May-Jun 2009;2(5-6):231-7. doi: 10.1242/dmm.001180.

(63): Testosterone and Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis Studyjism\_1991 272..283 Giovanni Corona, MD,\*† Matteo Monami, MD,\*\* Giulia Rastrelli, MD,\* Antonio Aversa, MD,‡ Yuliya Tishova, MD,§ Farid Saad, MD,¶ Andrea Lenzi, MD,‡ Gianni Forti, MD,\* Edoardo Mannucci, MD,\*\* and Mario Maggi, MD\*

(64): B. C. Campbell, P. B. Gray, D. T. A. Eisenberg, P. Ellison, and M. D. Sorenson, "Androgen receptor CAG repeats and body composition among Ariaal men," *Int. J. Androl.*, 2009.

(65): CAG Repeats in the androgen receptor gene is associated with oligozoospermia and teratozoospermia in infertile men in Jordan Mazhar Salim Al Zoubi | Hamzah Bataineh |

Mitri Rashed | Bahaa Al-Trad | Alaa A. A. Aljabali | Raed M. Al-Zoubi | Mohammad Al Hamad | Manal Issam AbuAlArjah | Osamah Batiha | Khalid M. Al-Batayneh (Andrologia, 2020) DOI: 10.1111/and.13728

(66): A. Mifsud *et al.*, “Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: Molecular markers of risk for male infertility,” *Fertil. Steril.*, 2001.

(67) T. G. Tut, F. J. Ghadessy, M. A. Trifiro, L. Pinsky, and E. L. Yong, “ Long Polyglutamine Tracts in the Androgen Receptor Are Associated with Reduced Trans - Activation, Impaired Sperm

(68): P. Patrizio, D. G. B. Leonard, K. L. Chen, S. Hernandez-Ayup, and A. O. Trounson, “Larger trinucleotide repeat size in the androgen receptor gene of infertile men with extremely severe oligozoospermia,” *J. Androl.*, 2001.

(69): H. A. Nenonen, A. Giwercman, E. Hallengren, and Y. L. Giwercman, “Non-linear association between androgen receptor cag repeat length and risk of male subfertility - a meta-analysis,” *Int. J. Androl.*, 2011.

(70): G. Wilding, “The importance of steroid hormones in prostate cancer,” *Cancer Surveys*. 1992.

(71): P. V. Nantermet *et al.*, “Identification of Genetic Pathways Activated by the Androgen Receptor during the Induction of Proliferation in the Ventral Prostate Gland,” *J. Biol. Chem.*, 2004.

(72): C. C. Liu *et al.*, “The Impact of Androgen Receptor CAG Repeat Polymorphism on Andropausal Symptoms in Different Serum Testosterone Levels,” *J. Sex. Med.*, 2012.

(73): C. C. Liu *et al.*, “The interaction of serum testosterone levels and androgen receptor CAG repeat polymorphism on the risk of erectile dysfunction in aging Taiwanese men,” *Andrology*, vol. 3, no. 5, pp. 902–908, 2015.

(74): G. Tirabassi, N. delli Muti, G. Corona, M. Maggi, and G. Balercia, “Androgen receptor gene CAG repeat polymorphism independently influences recovery of male sexual function after testosterone replacement therapy in postsurgical hypogonadotropic hypogonadism,” *J. Sex. Med.*, 2014.

(75): G. Tirabassi *et al.*, “Influence of Androgen Receptor CAG Polymorphism on Sexual Function Recovery after Testosterone Therapy in Late-Onset Hypogonadism,” *J. Sex. Med.*, 2015.

(76): K. Härkönen *et al.*, “The polymorphic androgen receptor gene CAG repeat, pituitary-testicular function and andropausal symptoms in ageing men,” *Int. J. Androl.*, 2003.

(77): P. Crabbe, V. Bogaert, D. De Bacquer, S. Goemaere, H. Zmierzak, and J. M. Kaufman, “Part of the interindividual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: Contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2007.

(78): K. Krithivas *et al.*, “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.

(79): T. G. Travison *et al.*, “Frailty, serum androgens, and the cag repeat polymorphism: Results from the massachusetts male aging study,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2010.

(80): J. W. Kim, Y. D. Bae, S. T. Ahn, J. W. Kim, J. J. Kim, and D. G. Moon, “Androgen Receptor CAG Repeat Length as a Risk Factor of Late-Onset Hypogonadism in a Korean Male Population,” *Sex. Med.*, vol. 6, no. 3, pp. 203–209, 2018.

(81): A. Aversa, Y. Duca, R. A. Condorelli, A. E. Calogero, and S. La Vignera, “Androgen deficiency and phosphodiesterase type 5 expression changes in aging Male: Therapeutic implications,” *Front. Endocrinol. (Lausanne)*, vol. 10, no. APR, pp. 1–11, 2019.

(82): N. L. Chamberlain, E. D. Driver, and R. L. Miesfeld, “The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 22, no. 15, pp. 3181–3186, Aug. 1994.

(83): Nieschlag *et al.*, “Clinical experience with azoospermia: aetiology and chances for spermatozoa detection upon biopsy” *Int J Androl*, 2010 doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01087.x

(84): Rastrelli *et al.*, “Erectile dysfunction and central obesity: an Italian perspective” *Asian Journal of Andrology* (2014) 16, 581-591; doi: 10.4103/1008-682X.126386; published online: 28 March 2014

(85): M. B. Holgersson *et al.*, “Androgen receptor polymorphism-dependent variation in prostate-specific antigen concentrations of European men,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 23, no. 10, pp. 2048–2056, Oct. 2014.

(86): W.-M. Xue *et al.*, “Genetic Determinants of Serum Prostate-specific Antigen levels in Healthy Men from a Multiethnic Cohort 1,” 2001.

(87): A. S. Zakaria, A. Dragomir, W. Kassouf, S. Tanguay, and A. Aprikian, “Changes in the levels of testosterone profile over time in relation to clinical parameters in a cohort of patients with prostate cancer managed by active surveillance,” *World J. Urol.*, vol. 36, no. 8, pp. 1209–1217, Aug. 2018.

(88): P. Joong Gyo Lee, MDa, Byung Duk Kim, MDa, Chang Hee Han, MD, PhDb, Kang Kon Lee, MD, PhDa, Keun Sang Yum, MD, “Evaluation of the effectiveness and safety of a daily dose of 5mg of tadalafil, over an 8-week period, for improving quality of life among Korean men with andropause symptoms, including erectile dysfunction A pilot study,” *Medicine (Baltimore)*., vol. 5, no. 51, p. 233339281878958, 2018.

(89): M. Spitzer, S. Bhasin, T. G. Travison, M. N. Davda, H. Stroh, and S. Basaria, “Sildenafil increases serum testosterone levels by a direct action on the testes,” *Andrology*, vol. 1, no. 6, pp. 913–918, 2013.

(90): D. Santi *et al.*, “Six months of daily treatment with vardenafil improves parameters of endothelial inflammation and of hypogonadism in male patients with type 2 diabetes and erectile dysfunction: A randomized, double-blind, prospective trial,” *Eur. J. Endocrinol.*, 2016.

(91): A. Aversa, D. Francomano, and A. Lenzi, “Does testosterone supplementation increase PDE5-inhibitor responses in difficult-to-treat erectile dysfunction patients?,” *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 16, no. 5, pp. 625–628, 2015.

(92): K. van Rooij *et al.*, “Efficacy of testosterone combined with a PDE5 inhibitor and testosterone combined with a serotonin (1A) receptor agonist in women with SSRI-induced sexual dysfunction. A preliminary study.,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 753, pp. 246–51, Apr. 2015.