

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO
Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

***“Feedback negativo degli steroidi anabolizzanti androgeni sull’asse
ipotalamo-ipofisi-gonadi: meccanismi molecolari e conseguenze
sulla funzione riproduttiva”***

Relatore

Prof.ssa Silvia Garavaglia

Candidato

Alessia Paroni

Anno Accademico 2025-2026

Sessione estiva

Abbreviazioni, acronimi e sigle

17OHPROG: 17 α -idrossiprogesterone

AAS: Anabolic Androgenic Steroids

AF: Activation Function

AgRP: Agouti-related protein

Ais: aromatase inhibitors

AKR1C3: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5

AKT: Proteina chinasi B

ALT: alanina aminotransferasi

AMH: Anti-Mullerian Hormone

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: AMP-activated protein kinase

AP1: Activator protein 1

AR: Recettore Androgenico

ARC: nucleo arcuato

ARE: Androgen Response Elements

ASF1: Alternative Splicing Factor 1

ASIH: Anabolic Steroid-Induced Hypogonadism

AST: aspartato aminotransferasi

ATF3: Activating Transcription Factor 3

AVPV: AnteroVentral PeriVentricular nucleus

BPCO: Broncopneumopatia cronica ostruttiva

CAMKK2: calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2

cAMP: Adenosina Monofosfato ciclico

CBG: Corticosteroid-Binding Globulin

CBP: CREB binding protein

ChIP: Chromatin immunoprecipitation

CREB: cAMP response element-binding protein

CREs: enhancer *cis*-regulatory elements

CYB5: Citocromo b5

DAG: diacilglicerolo

DBD: DNA Binding Domain

DDC: Dopa Decarboxylase

DDX3: Dead-box helicase 3 X-linked

DHEA: Deidroepiandrosterone

DHT: Diidrotestosterone

Dlx2: Distal-less homeobox 2

DNA: Acido Desossiribonucleico

EBP1: ErbB3-binding protein 1

Egr1: early growth response 1

EMSA: Electrophoretic Mobility Shift Assay

ER: Estrogen Receptor

ERE: Estrogen Response Elements

ERK: Extracellular signal-regulated kinases

ESE: Exonic Splicing Enhancers

EZH2: Enhancer of zeste homolog 2

FDA: Food and Drug Administration

FGF21: Fibroblasts Growth Factor 21

FOXA1: Forkhead box protein A1

FOXO1: Forkhead box protein O1

FOXP3: Forkhead box P3

FSH: Follicle-Stimulating Hormone

FSHR: FSH receptor

GABA: Acido γ -amminobutirrico

GATA2: GATA-binding factor 2

GATA-4: GATA-binding protein

GEFs: Guanine nucleotide Exchange Factors

GGT: gamma-glutamyl transpeptidase

GLP1: Glucagon-Like Peptide 1

GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone

GnRH-E1/2/3: Gonadotropin-Releasing Hormone Enhancer 1/2/3

GnRH-P: Gonadotropin-Releasing Hormone Promoter

GnRHR: GnRH receptor

GnRH-RE: GnRH response element

GPCRs: G protein-coupled receptors

GPR54: orphan G-protein coupled receptor 54

GRG: Groucho-Related Gene

GRK2: G-protein-coupled receptor kinase-2

hCG: human Chorionic Gonadotropin

HDAC4: histone deacetylase 4

HDL: high-density lipoprotein

HIV: Human Immunodeficiency Virus

hnRNPA1: Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1

HPG axis: Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis

HSD17B3: 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3

HSD3B2: 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II

HSPs: Heat Shock Proteins

HuR: Hu antigen R

IGF-1: insulin-like growth factor 1

IP₃: inositol 1,4,5-trisphosphate

ISE: Intronic Splicing Enhancers

KCC2: Potassium-chloride transporter member 5

KLK2/3: Kallikrein-2/3

KNDy neurons: Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin neurons

LBD: Ligand Binding Domain

LDL: Low-Density Lipoproteins

LH: Luteinizing Hormone

LHCGR: LH/choriogonadotropin receptor

lncRNAs: long non-coding RNAs

LSD1: Lysine-specific histone demethylase 1

MAPKs: Mitogen-Activated Protein Kinases

MED1: mediator complex subunit 1

mRNA: RNA messenger

MSI2: Musashi2

Msx1: Muscle segment homeobox 1

mTOR: mechanistic target of rapamycin

N/OFQ: Nociceptin/Orphanin-FQ

NADPH: Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate

NCC1: cotransporter Na-K-Cl

NCoR: nuclear receptor corepressor

NFAT: Nuclear Factor of Activated T-cells

NGFI-A: Nerve growth factor-induced gene A

NK3R: Neurokinin 3 receptor

NKB: Neurokinin B

Nkx2.1: NK2 homeobox 1

NLS: Nuclear Localization Signal

NPFFR1: Neuropeptide FF Receptor 1

NPY: neuropeptide Y

NTD: N-Terminal Domain

Oct1: Octamer-binding transcription factor-1

Otx2: Orthodenticle homeobox 2

PA: phosphatidic acid

Pbx: Pre-B cell leukemia transcription factor

Pbx1: Pre-B-cell leukemia transcription factor 1

PCBP1/2: poly(C)-binding proteins 1 and 2

PCT: post cycle-therapy
PET: phosphatidylethanol
PF: pioneer factors
PGBE: pituitary glycoprotein basal element
PI3K: fosfoinositide 3-chinasi
PIP₂: fosfatidilinositol 4,5 bisphosphate
PKA: protein chinasi A
PKC: protein kinase C
PL A₂: fosfolipasi A₂
PLC: fosfolipasi C
PLC β : fosfolipasi C β
PLD: fosfolipasi D
POA: area preottica
polyQ: poly-glutamine
POMC: arcuate pro-opiomelanocortin
POR: Cytochrome P450 oxidoreductase
POU: Pit-1 Ott-1 Unc-86
Prep1: Pbx-regulating-protein 1
Ptx1: pituitary homeobox1
Raf-1: fibrosarcoma protein kinase 1
RBPs: RNA-Binding Proteins
RFRP-3: RFamide-Related Peptide 3
Sam68: Src associated in mitosis of 68 kDa
SEDDS: Self-Emulsifying Drug Delivery Systems
SERMs: selective estrogen receptor modulators
SF1: nuclear receptor steroidogenic factor 1
SHBG: Sex Hormone-Binding Globulin
SOX2: sex determining region Y-box 2
SRC-1: Steroid Receptor Coactivator 1

StAR: Steroidogenic Acute Regulatory Protein

STARD1: steroidogenic acute regulatory protein

SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non-Fermentable

T: Testosterone

TAU: Transcriptional Activation Units

Tfm: AR-deficient testicular feminisation

TPA: *O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate

TRT: Testosterone Replacement Therapy

TSH: Thyroid-Stimulating Hormone

U2AF65: U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor, 65-kd subunit

UTRs: Untranslated Regions

VCaP: Vertebral-Cancer of the Prostate

vGAT: Vesicular inhibitory amino acid transporter

WADA: World Anti-Doping Agency

INDICE

1. Introduzione.....	10
2. Androgeni e Anabolic-Androgenic Steroids.....	11
2.1 Gli androgeni	
2.2 Gli steroidi anabolizzanti androgeni	
2.3 Uso e abuso degli AAS	
2.4 Il ruolo del farmacista	
3. Il recettore androgenico.....	23
3.1 Il gene codificante il recettore androgenico e la sua espressione	
3.2 La struttura proteica del recettore	
3.3 Meccanismo d'azione del recettore	
3.4 Effetti cellulari mediati da AR	
3.5 L'interazione tra AAS e AR	
4. Regolazione molecolare dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi.....	35
4.1 Generalità	
4.2 Gonadotropin-Releasing Hormone	
4.3 Follicle-Stimulating Hormone	
4.4 Luteinizing Hormone	
4.5 Kisspeptina	
4.6 GABA	
5. Meccanismi biochimici del feedback negativo dato dagli steroidi anabolizzanti androgeni.....	51
5.1 Feedback negativo mediato dal recettore androgenico	
5.2 Feedback negativo mediato dagli estrogeni	
5.3 Ruolo dei neuroni KNDy e della kisspeptina	
5.4 Ruolo del GABA	
6. Conseguenze e recupero.....	63
6.1 Ipogonadismo ed infertilità	
6.2 Recovery	
6.3 Altri effetti avversi dell'abuso di AAS	

1. Introduzione

Gli androgeni sono ormoni steroidei prodotti principalmente dai testicoli negli uomini, dalle ovaie nelle donne e, in quantità minore, dalle ghiandole surrenali in entrambi i sessi. Sono essenziali per lo sviluppo e il mantenimento delle caratteristiche sessuali maschili e per la regolazione di numerosi processi fisiologici, molti dei quali sono fondamentali per la funzionalità riproduttiva. A partire dalla seconda metà del XX secolo, si è iniziato a sintetizzare derivati androgenici con maggiori proprietà anabolizzanti, arrivando alla produzione degli steroidi anabolizzanti androgeni (AAS). Questi composti, sono stati inizialmente impiegati in ambito terapeutico per trattare diverse condizioni, ma presto ha iniziato a diffondersi il loro utilizzo anche al di fuori delle indicazioni cliniche. Infatti, essi hanno trovato impiego inizialmente negli sport competitivi per il miglioramento della performance, e successivamente anche tra la popolazione generale per fini di miglioramento estetico e di aumento della forza fisica. L'uso improprio di queste sostanze a dosi sovr fisiologiche però, è associato allo sviluppo di numerosi effetti avversi, che coinvolgono diversi organi ed apparati. Tra le conseguenze più rilevanti c'è la profonda alterazione che avviene a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG), componente chiave del sistema endocrino che regola una vasta gamma di funzioni biologiche legate alla salute riproduttiva e ormonale. L'esposizione prolungata agli AAS, infatti, determina una massiccia attivazione dei meccanismi di feedback negativo, che conducono ad una riduzione dei livelli di GnRH e, di conseguenza, delle gonadotropine FSH ed LH. Avviene quindi una compromissione della steroidogenesi gonadica e della fertilità. L'entità della soppressione dipende da diversi fattori, tra cui il tipo di composto utilizzato, il dosaggio, la durata dell'esposizione e la predisposizione individuale. Nei casi più severi, si può andare incontro ad una condizione detta *Anabolic Steroid-Induced Hypogonadism* (ASIH), caratterizzata da bassi livelli di testosterone endogeno, associati a diversi sintomi come calo della libido, disfunzione erettile e alterazioni dell'umore. In molti casi il recupero avviene spontaneamente dopo la sospensione del trattamento, mentre in alcuni soggetti si osserva un prolungamento della soppressione, che rappresenta una problematica clinica di interesse crescente. Negli ultimi anni, infatti, l'attenzione della comunità scientifica verso questo fenomeno è aumentata considerevolmente. Le evidenze attualmente disponibili dimostrano il coinvolgimento di diversi livelli di

regolazione, che comprendono un'azione diretta degli androgeni e degli estrogeni sul sistema nervoso, la modulazione dell'attività di neuroni che controllano la secrezione di GnRH e l'interazione con diversi sistemi neurotrasmettitoriali. Tuttavia, i meccanismi molecolari e neuroendocrini attraverso cui gli AAS esercitano il proprio feedback negativo risultano ancora non completamente chiariti.

La presente tesi si propone di svolgere un'analisi dei principali meccanismi molecolari coinvolti nel feedback negativo svolto dagli steroidi anabolizzanti androgeni sull'asse HPG. Dopo una panoramica sugli androgeni e sugli AAS ed una descrizione dei meccanismi fisiologici che regolano l'asse HPG, verranno esaminati i processi cellulari e neuroendocrini coinvolti nella soppressione dell'asse. Infine, verranno analizzate anche le principali conseguenze cliniche associate all'utilizzo di AAS, sia a livello del sistema riproduttivo che di altri organi e apparati.

2. Androgeni e Anabolic-Androgenic Steroids

2.1 Gli androgeni

Gli androgeni sono una classe importante di ormoni steroidei C19. Essi svolgono un ruolo essenziale per lo sviluppo sessuale e la riproduzione nell'uomo, ma risultano rilevanti anche in altri sistemi, come il tessuto adiposo, osseo o muscolare, nella pelle, nei capelli, nel cervello e nel sistema cardiovascolare. Gli androgeni, come tutti gli ormoni steroidei, sono sintetizzati a partire dal colesterolo. Per questo motivo, tutti gli steroidi condividono un nucleo comune, il ciclopentanoperidrofenantrene, struttura identificata negli anni '30 del secolo scorso [1]. La sintesi endogena avviene in diversi tessuti e organi, ma principalmente a livello dei testicoli negli uomini, in particolare nelle cellule di Leydig, mentre nelle donne a livello ovarico, anche se in misura minore [2]. Il colesterolo è trasportato dalla membrana esterna del mitocondrio a quella interna dalla proteina Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR). All'interno del mitocondrio, esso rappresenta il substrato del primo step della steroidogenesi, infatti viene convertito in pregnenolone grazie ad un sistema enzimatico composto da CYP11A1, ferredossina e ferredossina riduttasi. Nella via classica, il pregnenolone viene quindi convertito in 17 α -idrossipregnenolone e deidroepiandrosterone (DHEA), attraverso il citocromo CYP17A1, supportato dall'enzima Cytochrome P450 oxidoreductase (POR) e, nella seconda reazione, anche

dal citocromo b5 (CYB5). Dal DHEA vengono sintetizzati poi l'androstenedione (A4), precursore più importante per la sintesi del testosterone nelle cellule surrenali, testicoli e ovaie, tramite l'azione dell'enzima 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type II (HSD3B2), oppure l'androstenediolo, grazie all'attività di 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 (HSD17B3) o di 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (AKR1C3). L'azione coordinata di questi enzimi porta infine alla produzione di testosterone (T), che viene convertito a diidrotestosterone (DHT) dalla 5 α -reduttasi di tipo 2, enzima NADPH dipendente [3,8] (Figura 1). Oltre alla via classica, abbiamo anche una via alternativa [5]. In questa, il 17 α -idrossiprogesterone (17OHPROG) viene ridotto a 17 α -idrossi-allopregnanolone e successivamente ad androsterone, tramite il CYP17A1. L'androsterone è quindi convertito in androstenediolo e poi in DHT. La via alternativa può anche partire dalla riduzione del progesterone, producendo diidroprogesterone [6]. Sono state inoltre descritte ulteriori vie che portano alla produzione di androgeni C11-ossigenati, una classica e una alternativa [7].

pro-ormone, in quanto può essere convertito in estradiolo a livello periferico, grazie all'azione dell'aromatasi. Negli uomini, infatti, circa l'80% dell'estradiolo circolante origina dall'aromatizzazione del T, mentre solo il 20% è prodotto direttamente dai testicoli [12]. Gli androgeni esercitano la loro azione tipicamente attraverso il recettore AR, che verrà descritto più nello specifico nel capitolo successivo, modulando così numerosi processi biologici. Gli AR sono presenti nel citoplasma dove è associato a diverse proteine chaperon, tra cui abbiamo HSP40, HSP90 e p23. La formazione del complesso tra l'androgeno e il recettore androgenico (A-AR) porta ad un segnale di attivazione che è dato da un cambiamento conformazionale di AR e dal distacco delle proteine chaperon. Quando AR è attivo, può agire attraverso un meccanismo genomico o non genomico [13]. Nella via genomica, il complesso A-AR passa attraverso il complesso proteico del poro nucleare, arrivando così nel nucleo, dove si lega, sottoforma di dimero, al DNA, in particolare agli Androgen Response Elements (ARE), presenti nei promotori dei geni bersaglio [14]. Quindi, molti co-regolatori si legano al complesso, portando alla trascrizione dei geni bersaglio. Questi co-regolatori hanno effetto sulla formazione del complesso e la sua stabilità, oltre che sul rimodellamento della cromatina, andando così a modulare l'azione di AR [15]. Il signaling di AR nella cellula può avvenire anche attraverso meccanismi non-genomici, che coinvolgono proteine di membrana o recettori, i quali attivano cascate di chinasi intracellulari. Una delle vie più studiate è il sistema di segnalazione MAPK/ERK, dove il complesso tra androgeno e recettore androgenico si lega alla tirosin-chinasi Src, che va incontro ad apertura ed auto-fosforilazione, portando ad una modulazione della cascata segnalazione [16] e regolando così la trascrizione. Inoltre, il complesso A-AR può interagire direttamente con altre molecole di segnalazione, come le fosfoinositide 3-chinasi (PI3K), attivando così la via della proteina chinasi B (Akt). Uno dei bersagli più importanti a valle di queste segnalazioni è il fattore di trascrizione CREB, la cui attivazione contribuisce alla regolazione dell'espressione di geni coinvolti nei processi di proliferazione, sopravvivenza e adattamento cellulare [17]. L'azione del testosterone e dei suoi derivati si esercita su diversi tessuti:

- nel muscolo scheletrico aumentano la massa muscolare, la forza e la potenza, oltre a migliorare la sensibilità insulinica [18];
- nel tessuto adiposo dove svolgono un'azione anti-adipogenica, riducendo l'accumulo di grasso, in particolare a livello viscerale, e favorendo la lipolisi [19];

- modulano la funzione delle cellule β del pancreas, stimolando la produzione di insulina [20];
- aumentano la densità e la resistenza meccanica del tessuto osseo [21];
- diminuiscono il rischio cardiovascolare. Il testosterone è infatti un potente vasodilatatore, aumenta il flusso coronarico e stimola la produzione di ossido nitrico a livello endoteliale [22];
- inoltre stimolano l'eritropoiesi [23].

Gli steroidi sono molecole lipofile, hanno quindi necessità di conversioni metaboliche che aumentino la loro solubilità in acqua per essere efficientemente escreti. Questo metabolismo è normalmente diviso in due step sequenziali: le reazioni di fase 1 e quelle di fase 2 [24]. Il maggior contributo al metabolismo degli steroidi è dato dal fegato, ma anche diversi tessuti periferici possiedono enzimi utili all'attivazione e alla successiva inattivazione degli steroidi. Normalmente, le due fasi sono conseguenti, ma in diversi studi recenti si è notato che esse possono talvolta avvenire in ordine inverso [25], o può avvenire un metabolismo di fase 2 senza che siano avvenute reazioni di fase 1. Le reazioni di fase 1 includono principalmente: la riduzione dell'anello A, che porta a metaboliti tetraidro come 5 α e 5 β , caratterizzati da attività biologica minima, ossidazioni nelle posizioni 11 β , 17 β o 21, riduzioni nelle posizioni 11 β , 17 β o 20, idrossilazioni e scissioni del legame C17–C20. Inoltre, tra le trasformazioni extra-epatiche si osservano reazioni ad opera del microbiota intestinale, come la diidrossilazione in posizione 21, che contribuisce a modificare ulteriormente i metaboliti steroidei prima della loro escrezione [26]. Le classiche reazioni di coniugazione di fase 2, tra cui ricordiamo come più importanti la solfatazione e glucuronidazione, aumentano la polarità e la solubilità acquosa, in modo da facilitare l'escrezione e la concentrazione dei metaboliti nelle urine e nella bile. Altre reazioni di coniugazione comprendono la metilazione dei catecol-estrogeni, coniugazioni con cisteina o glutatione, ed esterificazioni con acidi grassi. Queste reazioni di coniugazione avvengono attraverso due reazioni che si susseguono: l'attivazione del gruppo da trasferire e successivamente il trasferimento di questo gruppo ad un idrossile dello steroide. Il prodotto coniugato è spesso biologicamente inattivo, ma sono state identificate diverse eccezioni [27]. È importante ricordare che la solfatazione degli steroidi è reversibile e gli steroidi solfatati possono essere idrolizzati a steroidi liberi da solfatasi steroidee, mentre la glucuronidazione è irreversibile negli umani. Sono anche

possibili coniugazioni doppie con lo stesso gruppo [28] o due gruppi differenti [29]. Per quanto riguarda l'escrezione, essa avviene, sottoforma di coniugati, prevalentemente nelle urine, per circa l'80%, e nella bile [30]. È da specificare anche che la clearance è solitamente più veloce per i glucuronidi rispetto ai solfati [31]. Nel rene, gli steroidi coniugati sono trasportati dal sangue, dopo filtrazione, al lume del nefrone e quindi nelle urine, mentre quelli che passano attraverso la membrana degli epatociti sono escreti nella bile. L'escrezione fecale è però bassa, in quanto gli steroidi sono in gran parte riassorbiti dall'intestino [32]. Si è anche dimostrato che i bi-solfati sono escreti principalmente con la bile, mentre i glucuronidi a livello renale [33]. Una frazione di steroidi è anche escreta attraverso la saliva, per questo motivo essa viene anche usata come campione biologico per la diagnosi e il monitoraggio di disordini della steroidogenesi [34].

2.2 Gli Steroidi Anabolizzanti Androgeni

Gli Steroidi Anabolizzanti Androgeni (AAS) comprendono il testosterone e i suoi derivati sintetici o semisintetici, sviluppati con l'obiettivo di modulare selettivamente il rapporto tra attività anabolica e androgena. In ambito clinico e farmacologico, questo termine è usato per indicare principalmente i composti sintetici, ma è incluso anche il testosterone quando soggetto a somministrazione esogena. Gli AAS sono così chiamati a causa delle loro proprietà, infatti il termine "anabolizzanti" si riferisce alla loro capacità di promuovere la sintesi proteica e la crescita del muscolo scheletrico, mentre "androgeni" si riferisce alla promozione e al mantenimento dei caratteri sessuali maschili secondari [35]. La conoscenza e lo studio degli AAS iniziano già negli anni '70 dell'800, quando il fisico e scienziato Charles-Edouard Brown-Sequard si somministrò autonomamente un estratto acquoso derivante da testicoli canini e bovini. Egli riportò di aver avuto un aumento significativo dell'energia e del vigore, contribuendo alla diffusione di questi preparati nel pubblico, nonostante successivamente sia stato dimostrato che contenessero solo dosi omeopatiche di testosterone. Più di sessant'anni dopo, venne sintetizzato per la prima volta il testosterone. Da qui, negli anni '50 vennero prodotti diversi derivati sintetici, che iniziarono ad essere molto usati, o meglio abusati, in ambito sportivo [36]. Gli AAS vennero proibiti per la prima volta nelle competizioni internazionali nelle olimpiadi del 1968, mentre solo nel 1996 vennero dimostrati definitivamente, con uno studio

rigoroso, i loro effetti sulla performance [37]. Gli AAS sono stati progettati in modo da ottenere analoghi che avessero un'azione più prolungata nel tempo e che avessero maggior attività anabolizzante rispetto a quella androgenica [38]. Come illustrato in Figura 2, la maggior parte degli AAS mantiene la struttura base dell'androstano, costituita da 3 anelli cicloesanici fusi (A, B e C) e un anello ciclopentanico (D).

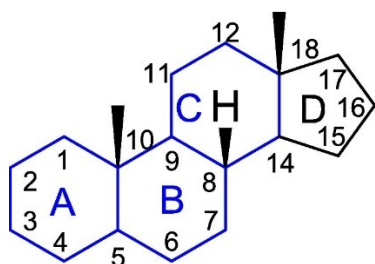


Figura 2: struttura base dell'androstano [39]

Su questa struttura possono essere fatte modifiche in diversi siti, che vanno a influenzare l'affinità al recettore, la potenza, la farmacocinetica e la selettività tissutale come verrà spiegato di seguito.

- Esistono modifiche a livello del carbonio in posizione 17, che sono le più rilevanti. Abbiamo la 17 α -alchilazione, che aumenta l'azione anabolica ma soprattutto la stabilità della molecola, in quanto previene la dealchilazione data dal metabolismo epatico di primo passaggio, vengono così prodotti composti che sono attivi quando somministrati per via orale. Tra gli AAS che posseggono questa modifica ricordiamo il metiltestosterone [40]. La seconda modifica più comune è l'esterificazione dell'idrossile in C17 β , normalmente con un gruppo acido [41]. Questo porta ad una maggior lipofilia e durata d'azione, risultando particolarmente utile per formulazioni a lento rilascio da veicolo oleoso. La velocità di rilascio nella circolazione è normalmente tanto minore quanto più lunga è la catena. Tra i composti con gruppo funzionale dato da esteri si annoverano ad esempio il nandrolone decanoato, laurato o fenilpropionato, il testosterone acetato, cipionato, enantato o undecanoato, oppure il trenbolone acetato.
- La rimozione del carbonio in posizione 19, andando a formare i derivati del 19-nortestosterone. Questa modifica ha un impatto significativo sulle proprietà dei composti, andando a ridurre l'attività androgenica e ad aumentare invece quella

anabolizzante [42]. Questi derivati possono poi subire altre modifiche, come l'introduzione di gruppi funzionali, alchilazioni, arilazioni o esterificazioni in C17, andando a formare diverse molecole, tra cui ricordiamo il trenbolone o il nandrolone.

- Si possono fare modifiche sull'anello A, in particolare vengono introdotti doppi legami, producendo un aumento della stabilità metabolica e dell'attività anabolica. Tra i derivati che presentano due doppi legami in questo anello abbiamo il boldenone.
- Si possono rimpiazzare uno o più carboni con eteroatomi. L'anello eterociclico è solitamente introdotto al posto dell'anello A nel nucleo steroideo [43]. Questa modificazione può influire sulla biodisponibilità, l'azione e gli effetti avversi dello steroide. Un esempio molto conosciuto è lo stanozololo, che contiene un anello pirazolico. Ciò gli conferisce maggiori proprietà anaboliche e riduce gli effetti androgenici. Altri AAS con eterocicli sono il danazolo e l'oxandrolone

Esiste anche una classe di steroidi noti come "designer steroids". Questo termine si riferisce a composti che sono ingegnerizzati per non essere analiticamente rilevabili nei campioni richiesti dai test antidoping [44]. Steroidi di questo tipo sono ad esempio il tetraidrogestrinone e il norboletone. Gli AAS sono spesso somministrati per via intramuscolare o orale. Le formulazioni intramuscolari consistono generalmente in soluzioni oleose formate da AAS dissolti in oli vegetali, come quello di arachidi, spesso addizionati con composti come il benzoil benzoato o l'alcol benzilico, che hanno proprietà batteriostatiche e conferiscono maggior solubilità in olio all'AAS. Gli steroidi diffondono in modo graduale da questo tipo di formulazioni a lento rilascio, arrivando nel liquido interstiziale. Come detto precedentemente, il rilascio è ritardato dall'esterificazione dell'idrossile in 17β , ma anche il sito di iniezione può influenzare la farmacocinetica [45]. Gli AAS somministrati per via orale sono rapidamente assorbiti nel tratto gastrointestinale, ad esempio nel caso del metiltestosterone il picco di concentrazione si raggiunge dopo 1-2 ore dall'ingestione [46]. Dopo assorbimento, gli steroidi raggiungono il fegato tramite la vena porta, per questo è importante fare delle modifiche che aumentino la lipofilia della molecola, in modo da ridurre il metabolismo di primo passaggio. Sono state create anche formulazioni ancora più stabili, ad esempio il testosterone undecanoato è stato introdotto in un sistema auto-emulsionante (SEDDS), in modo da aumentare l'assorbimento linfatico e ridurre le

variazioni intra e interindividuali [47]. Questo sistema necessita comunque di due somministrazioni giornaliere per mantenere stabile il livello fisiologico di testosterone. Altra strategia può essere quella di ritardare il metabolismo, ad esempio, come già detto, attraverso metilazione in posizione 17 α , che aumenta la biodisponibilità orale, ma aumenta anche il rischio di epatotossicità [48]. Una volta arrivati alla circolazione sistemica, gli AAS sono trasportati nei tessuti legati a diverse proteine plasmatiche, tra cui ricordiamo l'albumina, l'SHBG, la CBG e la proteina orosomucoide. Molto importante è l'SHBG, che riveste un ruolo importante nel modulare la frazione libera, e quindi biologicamente attiva, degli ormoni steroidei. È presente nella circolazione come omodimero, in cui ogni monomero ha un sito di legame per gli steroidi [49]. In condizioni fisiologiche, circa un terzo dei siti di legame è occupato dal testosterone, mentre il resto da diversi altri steroidi. Dosi sovrafisiologiche di testosterone risultano in livelli più elevati di molecola libera, e quindi attiva, sia perché saturano la capacità di legame di SHBG, sia perché hanno la capacità di ridurre i livelli di SHBG circolante [50]. Dalla circolazione sanguigna, gli AAS si spostano nel compartimento extravascolare e diffondono fino alle cellule target. Possono quindi subire una biotrasformazione o agire direttamente su AR. Gli AAS stimolano l'ipertrofia muscolare e l'aumento della forza, promuovendo la sintesi proteica muscolare e il recupero dopo allenamento contro resistenza. Gli effetti anabolizzanti degli AAS sono principalmente mediati dalla modulazione della trascrizione genica nei tessuti bersaglio, attraverso il legame con AR nel muscolo scheletrico. Hanno anche altre azioni non genomiche e antagonizzano l'effetto dei glucocorticoidi, determinando un effetto anti-catabolico. Nel complesso, gli AAS agiscono in modo analogo agli androgeni endogeni, tuttavia, le modifiche strutturali introdotte nelle molecole sintetiche determinano differenze in termini di affinità recettoriale, metabolismo e durata di azione e possono anche influenzare qualitativamente la risposta cellulare. In particolare, evidenze recenti suggeriscono che diversi AAS siano in grado di indurre un'attivazione differenziale delle vie genomiche e non-genomiche dell'AR, contribuendo ad effetti tessuto-specifici e alla parziale dissociazione tra l'attività anabolizzante e quella androgenica. Gli effetti fisiologici dati dagli AAS sono diversi:

- a livello muscolare promuovono la crescita del tessuto grazie ad un aumento della sintesi proteica. Inoltre, c'è anche una diminuzione dell'effetto catabolico dei glucocorticoidi, data dalla down regulation del loro recettore e da

interferenze funzionali sulla sua attività [51]. È dimostrato che la supplementazione di AAS aumenta la massa muscolare, la dimensione delle fibre e la forza totale;

- possono determinare effetti epatotossici, soprattutto quelli somministrati per via orale e con modificazioni strutturali in posizione C17 α [52]. In particolare, possono portare a colestasi, aumento degli enzimi epatici come le transaminasi e danno epatocellulare;
- aumentano la densità ossea inibendo il riassorbimento da parte degli osteoclasti e stimolando la formazione [53];
- possono aumentare il rischio cardiovascolare attraverso diversi meccanismi, tra cui uno squilibrio nel metabolismo dei grassi, con aumento delle LDL, un aumento, anche se temporaneo, della pressione arteriosa, ipertrofia ventricolare ed aumento dell'aggregazione piastrinica [54];
- stimolano l'ematopoiesi, sia in modo diretto che attraverso l'eritropoietina, ed aumentano il rilascio di ossigeno dall'emoglobina, con maggior ossigenazione tissutale;
- gli AAS agiscono anche a livello del sistema nervoso centrale, modulando sistemi neurotrasmettitoriali, in particolare quello dopaminergico. Questo risulta in modifiche comportamentali come l'aumento dell'aggressività, irritabilità, ansia e depressione, e può anche portare a fenomeni di dipendenza;
- dosi sovrafisiologiche di AAS sopprimono la produzione endogena di testosterone attraverso l'inibizione dell'asse ipotalamo-ipofisi. Questo si traduce in disfunzione erettile e libido ridotta, oltre ad ipogonadismo, con azoospermia e atrofia testicolare [55].

2.3 Uso e abuso degli AAS

Gli AAS sono stati inizialmente sviluppati per scopi medici, ad esempio per trattare deficienze ormonali e condizioni caratterizzate da perdita di massa muscolare. Tuttavia, nel corso del tempo, il loro impiego si è esteso al di fuori dell'ambito medico, assumendo un ruolo rilevante nel contesto sportivo. Per quanto riguarda l'uso terapeutico, diversi AAS hanno avuto approvazione da parte dell'FDA per il trattamento di diverse condizioni come osteoporosi, anemia, catabolismo proteico prolungato o perdita di peso significativa data da traumi severi, infezioni croniche o operazioni

chirurgiche. Alcuni AAS sono inoltre impiegati nel trattamento di specifiche neoplasie, come alcune forme di carcinoma mammario. Ad esempio, l'oxandrolone si è dimostrato efficace nel trattamento di disordini che portano a cachessia, grazie ai suoi effetti anabolizzanti, così come il nandrolone decanoato può risultare utile negli individui con BPCO o che vanno incontro a *wasting* associato all'HIV [56]. L'oximetholone è stato autorizzato per gestire l'anemia causata da una scarsa produzione di globuli rossi, mentre il danazolo per il trattamento dell'angioedema. Inoltre, alcune sostanze come il dimetandrolone e il testolone sono anche soggette a trials clinici come contraccettivi maschili e per la terapia sostitutiva del testosterone (TRT) [57]. Anche gli esteri del testosterone presentano numerose applicazioni cliniche: ad esempio il testosterone undecanoato formulato in capsule orali (JATENZO®) è stato approvato per il trattamento dell'ipogonadismo maschile. Questa molecola inoltre, come già detto precedentemente, è stata formulata anche sotto forma di *Self-Emulsifying Drug Delivery Systems* (SEDDS), soggetto a diversi studi controllati con placebo. Accanto agli impieghi terapeutici, si è verificata e si verifica però un'alta frequenza di uso improprio e abuso degli AAS, a fini di doping. Tali sostanze hanno acquisito popolarità per il loro impatto sulla composizione corporea e sulla performance, grazie alla loro capacità di aumentare la massa muscolare e la forza, ridurre la massa grassa ed ottimizzare i tempi di recupero. Sono quindi usati in diversi sport, quali bodybuilding e weightlifting, ma anche baseball, calcio, ciclismo, wrestling, e molti altri. Questo uso improprio è iniziato a diventare oggetto di attenzione a metà del XX secolo. Uno dei primi casi documentati risale al torneo mondiale di weightlifting che si tenne a Vienna nel 1954, in cui fu accertato l'impiego di testosterone da parte della squadra dell'Unione Sovietica. Dal 1964, il comitato olimpico internazionale ne vietò l'utilizzo, ma questo non fu sufficiente a fermarne l'abuso, che ebbe il suo picco negli anni '70. Molti atleti iniziarono a fare uso di AAS per diverse ragioni, tra cui la pressione esercitata da uno scenario sportivo altamente competitivo. In tale contesto, il timore di rimanere svantaggiati rispetto ad avversari che potrebbero farne uso, genera addirittura una percezione di necessità. In seguito al progressivo aumento dei casi di doping e alla necessità crescente di un coordinamento internazionale nelle politiche di contrasto, nel 1999 fu istituita la World Anti-Doping Agency (WADA), che si occupa di redigere e aggiornare la lista delle sostanze proibite, della supervisione e della promozione dell'educazione in ambito sportivo. Nel corso degli anni, l'uso degli

steroidi anabolizzanti androgeni si è esteso dall'ambito sportivo agonistico a contesti anche non competitivi, interessando, con utilizzo ricreazionale, la popolazione generale e soprattutto frequentatori di palestre e individui orientati al miglioramento estetico. Gli AAS sono ottenuti soprattutto attraverso canali illegali, tra cui il mercato nero e piattaforme online, spesso con distribuzione tramite servizi postali [58]. Tuttavia, è stato riportato anche il coinvolgimento, in misura non trascurabile, di operatori sanitari nella prescrizione o fornitura di queste sostanze, e, almeno in passato, sono stati documentati programmi statali segreti finalizzati alla fornitura di AAS ad atleti di élite. Si stima che a livello mondiale, gli AAS siano usati, nel corso della vita, da circa un 6,4% della popolazione maschile e da un 1,6% di quella femminile. Un importante rischio è rappresentato anche dal fatto che le dosi di AAS usate nel doping arrivino ad essere fino a 10-20 volte più alte di quelle utilizzate negli studi clinici.

2.4 Il ruolo del farmacista

Il farmacista può svolgere un ruolo rilevante nella prevenzione dell'uso improprio degli AAS. Una responsabilità chiave è quella di identificare le sostanze proibite ed educare gli atleti alla riduzione del loro uso [59]. Il ruolo del farmacista nella prevenzione del doping è stato anche riconosciuto a livello internazionale, infatti la International Pharmaceutical Federation (FIP) ha delineato, all'interno delle sue linee guida, una serie di responsabilità [60] specifiche, tra cui l'aggiornamento continuo sul contenuto del codice WADA, la capacità di distinguere tra uso terapeutico appropriato e pratiche illecite, e la fornitura di informazioni agli atleti riguardo ai farmaci e agli integratori contenenti sostanze proibite. Il farmacista è inoltre chiamato a promuovere l'attività fisica e, più in generale, uno stile di vita sano, ad informare sui rischi associati all'uso di determinate sostanze e, ove appropriato, a rifiutarsi di dispensare di medicinali quando vi è il sospetto di un uso illecito. Nell'esercizio della sua professione, il farmacista dovrebbe raccogliere informazioni rilevanti sul paziente, analogamente a come vengono poste domande su altre condizioni cliniche, al fine di identificare i soggetti coinvolti in attività sportive a livello competitivo, e quindi personalizzare i consigli forniti nel migliore interesse del paziente specifico. Tale pratica spesso non viene attuata, e questa mancanza di indagine può essere attribuita all'assenza di queste responsabilità specifiche nelle linee guida nazionali e negli standard di pratica professionale.

3. Il recettore androgenico

3.1 Il gene codificante il recettore androgenico e la sua espressione

L'azione degli androgeni e degli AAS è mediata principalmente dal recettore androgenico (AR), un fattore di trascrizione ligando-dipendente, facente parte della famiglia dei recettori nucleari. Il gene codificante si trova sul cromosoma X, in particolare sul suo braccio lungo (Figura 3).

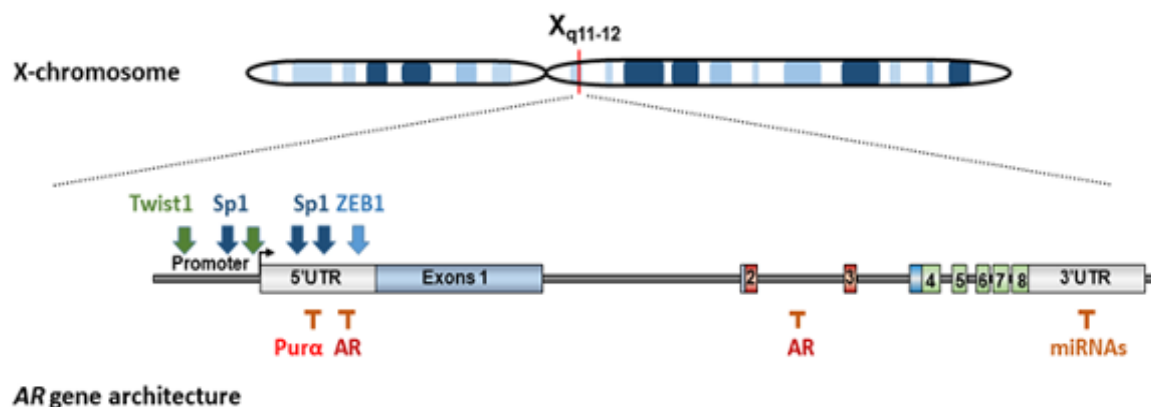


Figura 3: Struttura del gene del recettore androgenico umano [64]

È composto da 186,587 kb e la proteina codificata ha una massa molecolare di circa 110 kDa. Il gene è formato da 8 esoni codificanti, che hanno una struttura molto conservata se paragonati agli esoni degli altri recettori degli ormoni steroidei, e ha anche UTRs decisamente lunghe in 5' e 3'. Il trascritto può subire uno splicing differenziale a livello della regione non tradotta in 3', che risulta in due molecole differenti di mRNA, una di circa 7,5 kb e l'altra di 10 kb [61]. Inoltre, è stato identificato anche un numero importante di micro-RNAs, i quali legano la regione non tradotta in 3' e modulano stabilità, traducibilità, esportazione e localizzazione subcellulare, influenzando così in ultima analisi la traduzione della proteina AR e la successiva funzione. Per quanto riguarda il promotore del gene del recettore androgenico, la trascrizione è guidata principalmente dal fattore di trascrizione Sp1, che possiede un dominio zinc-finger. Sp1 lega sequenze GC-boxes, situate a monte del sito di inizio della trascrizione e all'interno della regione 5' UTR. Inoltre, è presente un'isola CpG,

situata in una regione che comprende il promotore e la zona che racchiude la 5' UTR e l'esone 1. Questa isola è caratterizzata da pattern di metilazione tessuto-specifici [62], suggerendo un ruolo nella regolazione epigenetica dell'espressione del gene. La trascrizione del gene del recettore è soggetta sia a regolazione positiva sia negativa. È stata dimostrata anche la possibilità di auto-regolazione del gene, ed infatti sono stati infatti identificati, mediante la tecnica di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), siti di legame per il recettore degli androgeni. Questi sono presenti all'interno del secondo introne e della regione 5' UTR del gene [63]. Oltre alla regolazione ormonale, è stata anche evidenziata l'importanza del bilancio tra i fattori di trascrizione positivi (Sp1) e negativi (Purα), che si legano alla regione 5' UTR, determinando i livelli di espressione dell'mRNA in diversi modelli cellulari. L'espressione del gene di AR è regolata da molteplici livelli di controllo che coinvolgono non solo la trascrizione, ma anche processi post-trascrizionali. L'mRNA è infatti legato da una serie di RNA-Binding Proteins (RBPs), che hanno effetto sulla funzione cellulare, regolando lo splicing dell'mRNA, la poliadenilazione, la traduzione, la degradazione e la localizzazione. Pertanto, alterazioni dell'espressione di queste proteine possono influenzare in modo significativo i principali processi cellulari regolati dagli mRNAs. Tali alterazioni nell'espressione e funzione delle RBPs sono state associate allo sviluppo di patologie come il cancro, attraverso la modulazione di processi come la divisione cellulare, migrazione e proliferazione [65]. Tra queste proteine figurano DDX3, EBP1, HuR, PCBP1/2 e MSI2, che legano differenti regioni dell'mRNA, incluse la 5'UTR, la 3'UTR e la regione codificante, influenzandone l'efficienza di traduzione e la stabilità. Sono molto importanti anche i fattori di splicing, tra cui proteine come U2AF65 e hnRNPA1 si legano a enhancer di splicing intronici (ISE), mentre Sam68 e ASF1 ad enhancer di splicing esonici (ESE), localizzati in corrispondenza del sito di splicing 3' dell'esone 3b. Queste interazioni favoriscono l'utilizzo dei cosiddetti esoni criptici, portando alla generazione di varianti di splicing del recettore. Tra queste varianti ricordiamo AR-V7, caratterizzata dall'assenza degli esoni 5-8, che codificano per il dominio di legame dell'androgeno, determinando così la produzione di una forma recettoriale strutturalmente e funzionalmente distinta [66], perché costitutivamente attiva, anche in assenza del ligando.

3.2 La struttura proteica del recettore

A seguito della traduzione, il recettore androgenico (AR) si presenta come una proteina modulare di 919 amminoacidi, composta da 4 domini strutturali distinti, ciascuno caratterizzato da specifiche funzioni biologiche: il dominio N-terminale (NTD), il dominio di legame al DNA (DBD), una regione a cerniera (hinge region) e un dominio di legame al ligando (LBD), presente all'estremità C-terminale [67] (Figura 4).

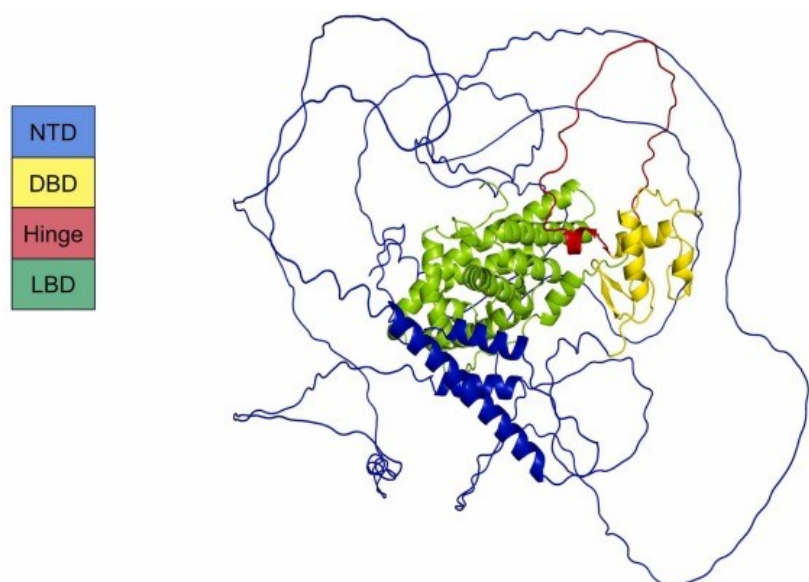


Figura 4: Struttura tridimensionale del recettore androgenico (AlphaFold)[68]

Il dominio N-terminale (NTD) dell'AR è intrinsecamente disordinato e costituisce da solo metà della lunghezza del recettore. L'NTD contiene una regione di attivazione (AF-1), costitutivamente attiva e ligando-indipendente, a differenza di AF-2 sul dominio C-terminale, la cui attivazione richiede la presenza di un ligando. AF-1 contiene due unità di attivazione trascrizionale: TAU-1 e TAU-5 [69]. L'NTD contiene molte sequenze ripetute, tra cui ripetizioni di poli-glutamina (polyQ), poli-glicina e poli-prolina. Alterazioni nelle sequenze polyQ sono associate a diverse patologie, tra cui cancro alla prostata, infertilità o malattie neurodegenerative [70]. Nonostante l'NTD sia di base disordinato, contiene due corte α -eliche, che rappresentano piccoli elementi strutturati. Esse sono associate a motivi idrofobici conservati e interagiscono con l'LBD, formando la base dell'interazione tra i domini N-terminale e C-terminale. Queste eliche si legano all'LBD, precisamente sul sito AF-2, una regione deputata al reclutamento di cofattori contenenti il motivo canonico LXXLL. Tuttavia, l'AF-2 dell'AR si distingue rispetto a quello di altri recettori nucleari per la sua capacità di riconoscere preferenzialmente

sequenze non canoniche, come motivi FXXLF e WXXLF, motivi presenti nel suo stesso N-terminale [71], che può quindi occupare il sito di attivazione AF-2, regolandone l'attività. Questa auto-inibizione viene superata quando i cofattori competono con successo per il legame ad AF-2. L'AR lega una sequenza consenso di sei nucleotidi (5'-AGAACA-3') e un secondo esamero disposto come ripetizione invertita, la cui sequenza può variare. Esistono sequenze specifiche che sono riconosciute selettivamente da AR, chiamate ARE. È interessante ricordare che il DBD dell'AR ha la capacità di legare sequenze caratterizzate da ripetizioni invertite più degenerate rispetto agli altri membri della famiglia dei recettori steroidei. Il DBD dell'AR contiene due motivi a dita di zinco, in cui ciascuno coordina un catione Zn^{2+} tramite residui di cisteina. Il primo di questi domini contiene una sequenza denominata P-box, prossimale, che riconosce e lega una sequenza specifica di DNA a livello dell'ARE, mentre il secondo dominio a dita di zinco contiene la D-box, distale, che forma l'interfaccia di dimerizzazione tra due recettori, mediata da legami a idrogeno e forze elettrostatiche [72]. Recenti studi hanno evidenziato, mediante cristallografia a raggi X, che l'AR si lega come dimero in configurazione head-to-head, che rappresenta la modalità canonica di interazione con gli ARE [73]. È importante sottolineare che ci sono contatti specifici tra il DBD e gli ARE, e le differenze di tali interazioni hanno conseguenze funzionali. La regione a cerniera o hinge region è un corto tratto di residui amminoacidici che collega DBD e LBD. Quella dell'AR è risultata essere più lunga di circa 20 amminoacidi rispetto a quella di altri recettori nucleari, caratteristica che è stata associata ad una maggiore plasticità strutturale della proteina [74]. Questa regione è inoltre dotata di un segnale di localizzazione nucleare (NLS), che viene legato da una proteina importina per trasportare successivamente il recettore nel nucleo. A livello strutturale, l'LBD è la regione più caratterizzata dell'AR. Esso presenta una struttura "a sandwich" costituita da tre strati di α -eliche, in particolare è formato da 11 α -eliche e 4 foglietti β . La tasca di legame per il ligando è costituita principalmente dalle eliche 3, 7, 11 e 12, dove l'elica 12 agisce come un coperchio dopo il legame dell'androgeno. Le eliche 3, 4 e 12, inoltre, formano la superficie idrofobica di AF-2, coinvolta nel legame dei cofattori. È stata anche identificata una tasca idrofobica separata, BF3, che regola allostericamente il legame dei cofattori in questo sito [75].

3.3 Meccanismo d'azione del recettore

A livello della proteina, il recettore androgenico può essere regolato da modificazioni post-traduzionali, tra cui sono incluse la fosforilazione, la metilazione, l'acetilazione, l'ubiquitinazione e la sumoilazione. Le fosforilazioni sono state osservate maggiormente sull'NTD, e diversi studi hanno rilevato che esse regolano la localizzazione, la stabilità e l'attività trascrizionale dell'AR. L'acetilazione e la metilazione, invece, avvengono soprattutto su residui della hinge region, e regolano rispettivamente l'attivazione ligando dipendente e la localizzazione nucleare. Anche l'ubiquitinazione a livello dell'LBD e la sumoilazione nell'NTD alterano l'attività trascrizionale e la stabilità [76]. Il legame di un androgeno all'AR regola lo spostamento del recettore dal citoplasma al nucleo. Quando l'AR non è legato da un ligando, chaperon e co-chaperon, che sono principalmente proteine facenti parte della famiglia delle heat shock proteins (Hsp23, Hsp40, Hsp56, Hsp70 e Hsp90), si associano al dominio LBD del recettore. Ad esse si associa anche la proteina p23, che stabilizza il complesso. Quest'ultimo è fondamentale perché il recettore si stabilizzi in una conformazione adatta per il legame con il ligando e mantenga anche la sua solubilità nella cellula. Inoltre, il complesso contenente Hsp90 mantiene il recettore in uno stato trascrizionalmente inattivo, prevenendo la localizzazione nucleare, la dimerizzazione, il legame al DNA e l'interazione con co-attivatori. L'androgeno principale circolante nel sangue è il testosterone ma, una volta entrato nelle cellule prostatiche, una buona parte di esso è convertita in DHT dalla 5 α -reduttasi. Questa forma chimica è più potente in quanto stabilizza maggiormente l'AR e ha una più lenta dissociazione dall'LBD. Le strutture cristallografiche del legame tra androgeni e AR hanno evidenziato un pattern conservato di interazioni, in particolare legami a idrogeno, tra il ligando e specifici residui del sito di legame, talvolta mediati anche da molecole d'acqua. Alcune interazioni osservate nel complesso con testosterone non sono invece presenti nel complesso con DHT, suggerendo che queste possano contribuire alla stabilità del legame, ma senza essere completamente indispensabili. La maggiore affinità del DHT rispetto al testosterone sembra invece dipendere da differenze strutturali del ligando, in particolare alla saturazione del legame tra C4 e C5, che consente un orientamento più favorevole del gruppo chetonico e un'interazione più efficiente con il recettore. In entrambi i casi, il legame è ulteriormente stabilizzato da numerosi contatti idrofobici di tipo Van der Waals con le pareti della tasca di legame

[77]. L'attività trascrizionale del recettore androgenico dipende da una complessa rete di interazioni con coregolatori, pioneer factors ed elementi coinvolti nel rimodellamento della cromatina, che ne modulano la capacità di attivare o reprimere l'espressione genica. Infatti, perché la maggior parte dei siti diventino disponibili per il legame dell'AR, la cromatina deve prima essere "aperta", questo avviene grazie al legame dei "pioneer factors" (PF). Diversi studi hanno individuato il ruolo centrale di FOXA1 come PF, che lega la cromatina condensata e la apre, in modo da permettere il legame dei successivi fattori di trascrizione [81]. Questa capacità delle proteine FOXA è data dalla loro somiglianza strutturale agli istoni linker, che permette loro di inserirsi tra i nucleosomi nella cromatina condensata e di promuovere un'apertura locale della struttura cromatinica. Un altro PF importante e molto caratterizzato è GATA2, il quale aumenta l'accessibilità ai siti di legame per l'AR. A differenza di FOXA1, la famiglia delle proteine GATA necessita dell'azione di altre proteine rimodellanti, come il complesso SWI/SNF, per alterare l'accessibilità [82]. Infine, ricordiamo anche HOXB13, un membro della famiglia delle proteine HOX, il quale sembra avere un'attività come PF, in virtù della sua capacità di legarsi preferenzialmente al DNA metilato, tipicamente associato a regioni di eterocromatina, caratteristica che suggerisce un potenziale ruolo nella modulazione dell'accessibilità cromatinica. Il legame degli androgeni porta ad un cambiamento conformazionale dell'AR, con distacco delle HSPs, esposizione dell'NLS e promozione della traslocazione verso il nucleo, supportata da interazioni dirette con la proteina adattatrice importina- α e la proteina trasportatrice importina- β , che portano al transito attraverso il complesso del poro nucleare [78]. Nel nucleo, l'AR si lega sotto forma di dimero, attraverso i domini DBD, agli ARE (Figura 5). Molti co-regolatori si legano a questo dimero, governando il programma trascrizionale dell'AR. È importante ricordare che la tipica sequenza degli ARE è costituita da due esameri asimmetrici, separati da uno spacer di tre nucleotidi. Tuttavia, i dati ottenuti in condizioni fisiologiche indicano che solo una minoranza, circa l'8-30% dei siti di legame per l'AR contiene un ARE canonico, mentre la maggior parte contiene motivi parziali, il cui ruolo funzionale rimane controverso.

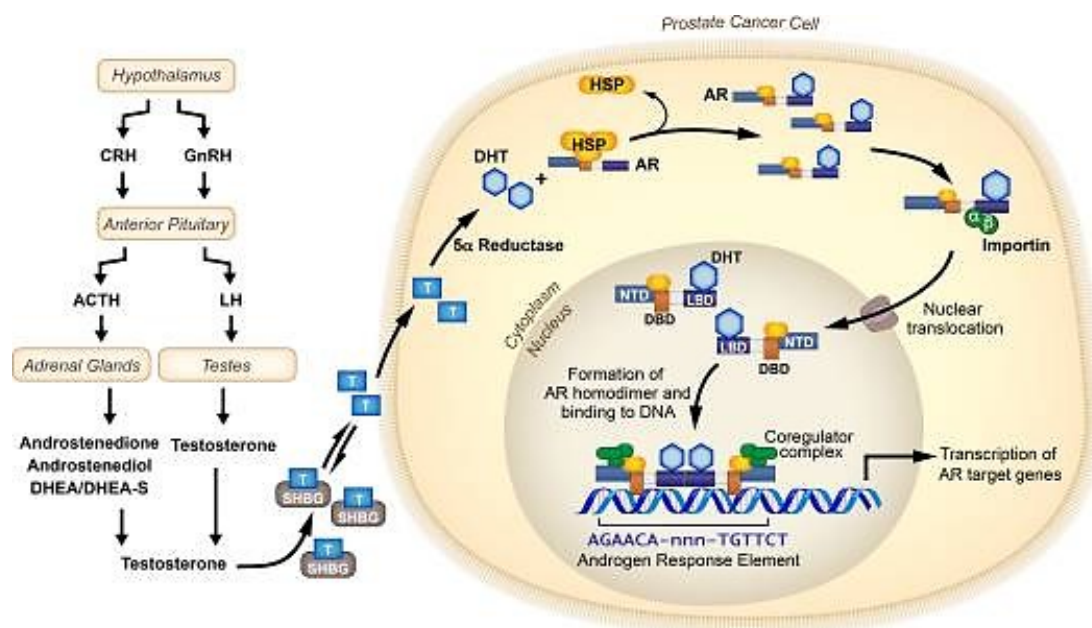


Figura 5: Asse di segnalazione del recettore androgenico [94]

A differenza degli altri recettori steroidei, nel recettore degli androgeni l'attività trascrizionale è mediata principalmente da AF-1 nell'NTD, mentre AF-2 mostra una ridotta capacità di reclutare co-attivatori e sembra svolgere un ruolo più di piattaforma per l'ingaggio e l'organizzazione di questi verso la regione N-terminale. Questo implica un meccanismo di regolazione dell'espressione genica basato su interazioni e comunicazioni intra-dominio, che rappresenta una caratteristica distintiva del recettore degli androgeni rispetto agli altri membri della famiglia dei recettori nucleari [79]. Una volta legato alla cromatina, l'AR forma un complesso con diversi coregolatori per attivare gli enhancers e alterare l'espressione di geni bersaglio. Questo processo coinvolge diverse proteine, inclusi coattivatori come CBP/p300 e SRC-1 [83], enzimi che modificano la cromatina e che ne alterano l'accessibilità, e proteine che stabilizzano il legame di AR. Il recettore degli androgeni interagisce con MED1 e altri membri del complesso Mediator, contribuendo a stabilizzare le interazioni tra enhancer e promotori, e facilitando l'attivazione trascrizionale. Oltre a queste proteine coregolatrici, ci sono anche dei long non-coding RNAs e degli RNA enhancer, i quali impattano sulla trascrizione genica mediata da AR. Sebbene ancora oggetto di ricerca, alcune specie di RNA non codificante sembrano in grado di reclutare complessi proteici nei siti di trascrizione [84]. Per quanto riguarda la downregulation mediata dall'AR, essa può avvenire sia tramite meccanismi di repressione diretta, mediante il

reclutamento di corepressori, sia tramite meccanismi indiretti di “squelching”, in cui il recettore sequestra coattivatori, limitando la loro disponibilità per altri geni. Nella repressione diretta, l'AR interagisce con corepressori come SMRT e NcoR, i quali reclutano istone deacetilasi come HDAC4. L'attività di questi enzimi determina la rimozione del gruppo acetile dagli istoni, promuovendo la compattazione della cromatina e conseguente repressione della trascrizione genica [85]. Gli androgen response elements (ARE) rappresentano un tipo specifico di tra gli elementi regolatori denominati CREs o *enhancer cis-regulatory elements*, localizzati in regioni di eucromatina. Tali elementi sono caratterizzati da specifiche modificazioni istoniche, indicative di uno stato trascrizionalmente attivo o permissivo. Gli enhancer rappresentano piattaforme altamente dinamiche, occupate da molteplici fattori di trascrizione, RNA polimerasi II e coattivatori, tra cui complessi come CBP/p300, contribuendo alla regolazione fine dell'espressione dei geni bersaglio. Numerosi enhancer possono in realtà risultare attivi anche senza queste modificazioni specifiche, quindi queste correlazioni non sono assolute. Pertanto, risulta necessaria una caratterizzazione funzionale per comprendere il ruolo dei siti di legame del recettore degli androgeni nella regolazione trascrizionale [86]. Evidenze crescenti indicano che tali siti non agiscono in maniera isolata, ma cooperano tra loro, contribuendo congiuntamente all'attivazione dell'espressione genica. Terminata la fase attiva trascrizionale, in assenza del ligando, il recettore degli androgeni viene nuovamente esportato dal nucleo al citoplasma, ristabilendo lo stato inattivo del recettore. Questa fase è mediata da un segnale di esportazione nucleare (NES), la cui esposizione è regolata da cambiamenti conformazionali indotti dalla dissociazione del ligando [80].

3.4 Effetti cellulari mediati da AR

Nel complesso, il recettore androgenico agisce come regolatore trascrizionale, coordinando l'espressione di ampie reti geniche, coinvolte in molteplici processi cellulari. Nell'organismo umano sono presenti una serie di geni i cui livelli di espressione sono significativamente alterati dagli androgeni, noti come geni responsivi agli androgeni o regolati dagli androgeni. I prodotti di questi geni sono essenziali, ad esempio, nei processi biologici responsabili dello sviluppo, funzione e disturbi prostatici. Per decenni sono stati identificati pochissimi geni androgeno-responsivi,

limitati principalmente a KLK3, KLK2 e NKX3-1. L'avvento di nuove tecnologie ha permesso di analizzare l'espressione di migliaia di geni contemporaneamente. Questo tipo di analisi, svolta sulle cellule LNCaP, una linea cellulare dell'adenocarcinoma prostatico umano, ha rivelato più di 500 geni differentemente regolati dagli androgeni [87]. Da ulteriori studi è stato scoperto che circa 300 geni erano up-regolati, mentre altri 300 down-regolati. A livello funzionale, è stato rilevato che la maggior parte di questi geni è coinvolta nella regolazione della trascrizione, nel metabolismo energetico, nella proliferazione e nella differenziazione cellulare. Anche molti geni che regolano il ciclo cellulare, la traduzione del segnale e il traffico proteico cellulare sono indotti dagli androgeni, cosa che dimostra il ruolo di questi ultimi nel promuovere la sopravvivenza e la crescita delle cellule epiteliali prostatiche. Inoltre, diversi geni regolati dagli androgeni sono coinvolti nella produzione di liquido seminale. È stato evidenziato anche come la protein-chinasi 2 calcio/calmodulina-dipendente (CAMKK2) risulti iperespressa nel carcinoma prostatico e rappresenti un importante effettore del segnale mediato dal recettore degli androgeni, contribuendo alla regolazione del metabolismo anabolico, della proliferazione e della capacità invasiva delle cellule tumorali [88]. Queste evidenze suggeriscono che il signalling androgenico rappresenti un elemento chiave nell'innescare e nella progressione del carcinoma prostatico. Di conseguenza, la comprensione dei geni e delle vie regolate dagli androgeni costituisce un punto di partenza importante per l'identificazione di nuovi biomarcatori e target terapeutici. In generale, possiamo dire che una quota rilevante dei geni indotti dagli androgeni è coinvolta in processi quali la sintesi, la modificazione e secrezione proteica, il controllo del ciclo cellulare, il metabolismo e le vie biosintetiche. Infine, il recettore degli androgeni regola l'espressione di numerosi fattori di trascrizione, tra cui GATA2, HOXB13 e NKX3.1, evidenziando il suo ruolo centrale nel coordinare reti trascrizionali complesse. Sebbene la maggior parte degli studi sul signalling dell'AR e sulla regolazione genomica si sia concentrata sui geni indotti dagli androgeni, le analisi mediante microarray hanno costantemente evidenziato anche l'esistenza di geni la cui espressione è spenta dagli androgeni. Il numero di studi dedicati ai geni downregolati rimane limitato, tra questi geni sono inclusi c-MET, SOX2 e DDC. Anche lo stesso recettore androgenico può subire una downregolazione da parte degli androgeni, come osservato nelle cellule VCaP [92]. È stato infatti individuato un sito di legame dell'AR all'interno della regione intragenica del gene dello stesso AR. Il legame del

recettore a tale sito determina una limitazione della propria espressione, attraverso il reclutamento di LSD1 e la demetilazione degli istoni H3K4me1 e H3K4me2. L'effetto downregolatorio è mediato dal legame del recettore agli ARE, ed è facilitato da meccanismi di rimodellamento della cromatina, in particolare attraverso l'azione della proteina EZH2, che coopera con il recettore androgenico nella regolazione trascrizionale dei geni bersaglio. Diverse analisi riguardanti l'espressione genica in cellule di carcinoma prostatico trattate con androgeni hanno permesso di identificare numerosi geni significativamente downregolati dall'AR [93]. Tali geni svolgono funzioni cellulari rilevanti e la loro mancata espressione può rappresentare un elemento chiave nella fisiologia prostatica e nella patogenesi del carcinoma prostatico, costituendo potenziali biomarcatori e target terapeutici. Oltre agli effetti a livello prostatico, gli androgeni svolgono un ruolo rilevante anche in altri tessuti, ad esempio nella protezione da stimoli dannosi e nella regolazione di diverse funzioni del sistema nervoso centrale, inclusa l'attività dei circuiti neuronali. Tuttavia, a causa dell'interazione tra diversi ormoni steroidei e delle numerose connessioni tra le vie di segnalazione, risulta complesso definire effetti esclusivamente androgeno-dipendenti. Il recettore androgenico è espresso in diverse regioni del sistema nervoso, tra cui il midollo spinale e l'ipotalamo [90], e presenta differenze di distribuzione tra i sessi. In particolare, è stato osservato che il numero di neuroni androgeno-sensibili è generalmente inferiore nelle femmine rispetto ai maschi in specifiche aree cerebrali. Oltre al sistema nervoso, il recettore androgenico è espresso anche nel tessuto osseo, sia negli osteoblasti e sia negli osteoclasti, dove contribuisce alla regolazione del rimodellamento osseo. In questo contesto, l'azione degli androgeni è strettamente interconnessa con quella degli estrogeni, rendendo difficile isolare il contributo specifico dei singoli ormoni. È stato però dimostrato che l'attivazione dell'AR svolge un ruolo importante nella prevenzione della perdita ossea, in particolare in situazioni di carenza estrogenica, come nella post-menopausa. Nel muscolo scheletrico, gli steroidi anabolizzanti androgeni esercitano i loro effetti promuovendo la sintesi proteica attraverso l'attivazione del recettore androgenico e la modulazione di diverse vie di segnalazione intracellulari. Tra queste spiccano i pathways Wnt e Notch, che svolgono un ruolo centrale nella regolazione dei processi miogenici, inclusi proliferazione, differenziazione e mantenimento dell'omeostasi cellulare. In particolare, l'attivazione di tali pathway contribuisce all'induzione di geni chiave per la crescita muscolare, come

MyoD e il fattore di crescita insulino-simile, IGF-1, che attiva a sua volta la via di segnalazione PI3K/Akt [91], favorendo l'ipertrofia muscolare. L'interazione tra gli androgeni e queste vie di segnalazione rappresenta un meccanismo fondamentale alla base degli effetti anabolici. Alcuni steroidi anabolizzanti, inoltre, come il nandrolone, sono in grado di modulare specifici pathway intracellulari, tra cui il sistema calcineurina-NFAT, contribuendo alla crescita cellulare e alla protezione dall'atrofia muscolare. L'ampia distribuzione tissutale dell'AR è ulteriormente confermata dalla sua presenza in numerosi altri tipi cellulari, tra cui le cellule muscolari lisce, macrofagi, cellule endoteliali e fibre cardiache, suggerendo un ampio ruolo funzionale degli androgeni nell'organismo. Oltre a regolare l'espressione dei geni bersaglio, il recettore degli androgeni può influenzare eventi di splicing alternativo dell'mRNA. Inoltre, lo stesso AR è soggetto a splicing alternativo, generando varianti recettoriali con proprietà funzionali distinte [89]. Alcune di queste isoforme risultano sovraesprese nelle forme più aggressive di carcinoma prostatico e sono state associate allo sviluppo della resistenza alla terapia di deprivazione androgenica.

3.5 L'interazione tra AAS e AR

Nonostante il meccanismo d'azione molecolare degli steroidi anabolizzanti androgeni sia sostanzialmente sovrapponibile a quello degli androgeni endogeni, l'esposizione a concentrazioni sovralfisiologiche e prolungate può determinare una stimolazione persistente del recettore androgenico e delle relative vie di segnalazione intracellulari. Questo effetto dipende molto dalle proprietà farmacocinetiche dei diversi composti, tra cui emivita e stabilità metabolica, che influenzano l'intensità e la durata del signalling androgenico nei tessuti bersaglio. È molto importante considerare il fattore dell'affinità di legame degli AAS all'AR, in quanto tale parametro può aiutare a chiarire le differenze funzionali tra i vari composti. Non è semplice prevedere il comportamento di uno steroide solo osservando la sua struttura, in quanto anche piccole modifiche possono modificare in modo significativo l'affinità e l'attività biologica [95]. Gli steroidi anabolizzanti, infatti, presentano differenti affinità di legame per il recettore androgenico. Uno studio del 1984 condotto da Saartok ha effettuato una comparazione dell'affinità relativa di diversi composti androgenici rispetto al methyltrienolone, usato come riferimento per la sua elevata capacità di legame al recettore. È stato dimostrato come il grado di legame fisico al recettore androgenico

non correla sempre con la potenza dell'attività anabolizzante. Infatti, tra i composti analizzati, quelli che presentavano maggior affinità erano nandrolone, methenolone, testosterone e mesterolone, mentre altri steroidi come fluoxymesterone, methandienone e stanozolo hanno mostrato una capacità di legame nettamente inferiore. In altri ancora, come l'oxymetholone e l'ethyestrenol, l'affinità risultava troppo bassa per essere determinata con precisione. Si è anche evidenziato che androgeni strutturalmente differenti sono in grado di indurre diversi profili di espressione genica mediati dall'AR. È stato condotto uno studio [96] che comprendeva tre AAS, ovvero nandrolone, oxandrolone e stanozolo, insieme a tre "androgeni virilizzanti", testosterone, DHT e methyltrienolone, e due precursori del testosterone, il DHEA e l'androstenedione. Tutti questi steroidi hanno mostrato una potente attività agonista nei confronti del recettore androgenico, ma portando ad effetti differenti. In particolare, gli AAS e i precursori androgenici hanno mostrato profili di attivazione dei promotori distinti rispetto agli androgeni maggiormente virilizzanti. Queste differenze sembrano dipendere dalla conformazione specifica del recettore androgenico che il ligando induce, la quale influenza l'interazione del complesso tra l'ormone e il recettore con coregolatori e fattori di trascrizione. Inoltre, la capacità di transattivazione dell'AR è influenzata anche dalla struttura degli ARE presenti nel DNA. Tali evidenze hanno portato ad ipotizzare una possibile dissociazione, almeno parziale, tra gli effetti androgenici e quelli anabolizzanti. La risposta mediata dal recettore androgenico, infatti, risulta altamente tessuto-specifica. La *tissue selectivity* degli androgeni e degli AAS non dipende esclusivamente dalla conformazione del recettore che il ligando induce, ma anche da fattori locali, come l'espressione tessuto-specifica di alcuni coregolatori trascrizionali [97] o degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli androgeni, come la 5 α -reduttasi [98]. In particolare, nei tessuti androgeno-sensibili, come la prostata o la cute, la conversione del testosterone in DHT amplifica significativamente il segnale androgenico, mentre in tessuti anabolici, come il muscolo scheletrico, questo meccanismo risulta meno rilevante.

4. Regolazione molecolare dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

4.1 Generalità

L'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG) è un sistema neuroendocrino cruciale, responsabile della regolazione delle funzioni riproduttive e della produzione di ormoni sessuali. Esso è costituito da tre componenti principali, ognuno dei quali ha un ruolo fondamentale nel funzionamento di questo asse: l'ipotalamo, l'ipofisi anteriore e le gonadi, rappresentate dai testicoli negli uomini e nelle ovaie per le donne. Il primo centro di controllo dell'asse HPG è l'ipotalamo, nel quale sono presenti, principalmente nell'area preottica, dei neuroni specializzati nella sintesi e secrezione di GnRH, che rilasciano questo ormone nel flusso sanguigno, sotto stimolazione da parte della kisspeptina. Il GnRH, a sua volta, agisce a livello dell'ipofisi anteriore, più nello specifico sulle cellule gonadotrope, regolando così la sintesi di due importanti gonadotropine: FSH ed LH. Esse sono essenziali per il funzionamento delle gonadi e, di conseguenza, per la produzione di ormoni sessuali. In particolare, l'FSH esercita la sua azione sulle gonadi e nelle donne stimola lo sviluppo e la maturazione follicolare, mentre negli uomini, agendo sulle cellule del Sertoli, stimola la spermatogenesi. L'LH, invece, scatena l'ovulazione nelle donne e la produzione di testosterone negli uomini. Il rilascio pulsatile di GnRH da parte dell'ipotalamo regola finemente la produzione di queste gonadotropine [99]. È importante anche sottolineare che la responsività al GnRH è notevolmente influenzata dalla densità dei recettori specifici per questo ormone presenti a livello ipofisario. Le cellule del Sertoli producono inoltre attivina e inibina, che esercitano rispettivamente effetti stimolatori e inibitori sulla secrezione di FSH, e possono contribuire alla modulazione della sensibilità delle cellule gonadotrope al GnRH. Successivamente le gonadi, rappresentate dai testicoli negli uomini e dalle ovaie nelle donne, sono responsabili della produzione di ormoni sessuali. Negli uomini, sotto l'influenza dell'LH, le cellule di Leydig dei testicoli producono principalmente testosterone, il quale rappresenta il principale ormone sessuale maschile, e in misura minore estradiolo. Il testosterone è fondamentale per lo sviluppo di caratteristiche sessuali secondarie, come la profondità vocale o la crescita dei peli del viso, per la regolazione del desiderio sessuale e per la funzione riproduttiva. Nelle donne invece, in risposta alle gonadotropine, le ovaie producono estrogeni e progesterone. Questi

ormoni sono responsabili della regolazione del ciclo mestruale, della promozione di caratteristiche sessuali secondarie e del mantenimento della gravidanza. L'attività dell'asse HPG è regolata da un sistema di feedback. Infatti, gli ormoni sessuali prodotti dalle gonadi esercitano un feedback negativo sull'ipotalamo e sull'ipofisi, regolando così la loro stessa produzione. Quando i livelli di ormoni sono bassi, aumenta il rilascio di GnRH da parte dell'ipotalamo, che stimola l'ipofisi a produrre le gonadotropine FSH ed LH. A loro volta, esse agiscono sulle gonadi e promuovono il rilascio di ormoni sessuali. Quando la concentrazione di questi ormoni aumenta però, porta ad una soppressione del rilascio di GnRH dall'ipotalamo e, di conseguenza, della secrezione di FSH ed LH dall'ipofisi, determinando così il mantenimento del bilancio ormonale (figura 6).

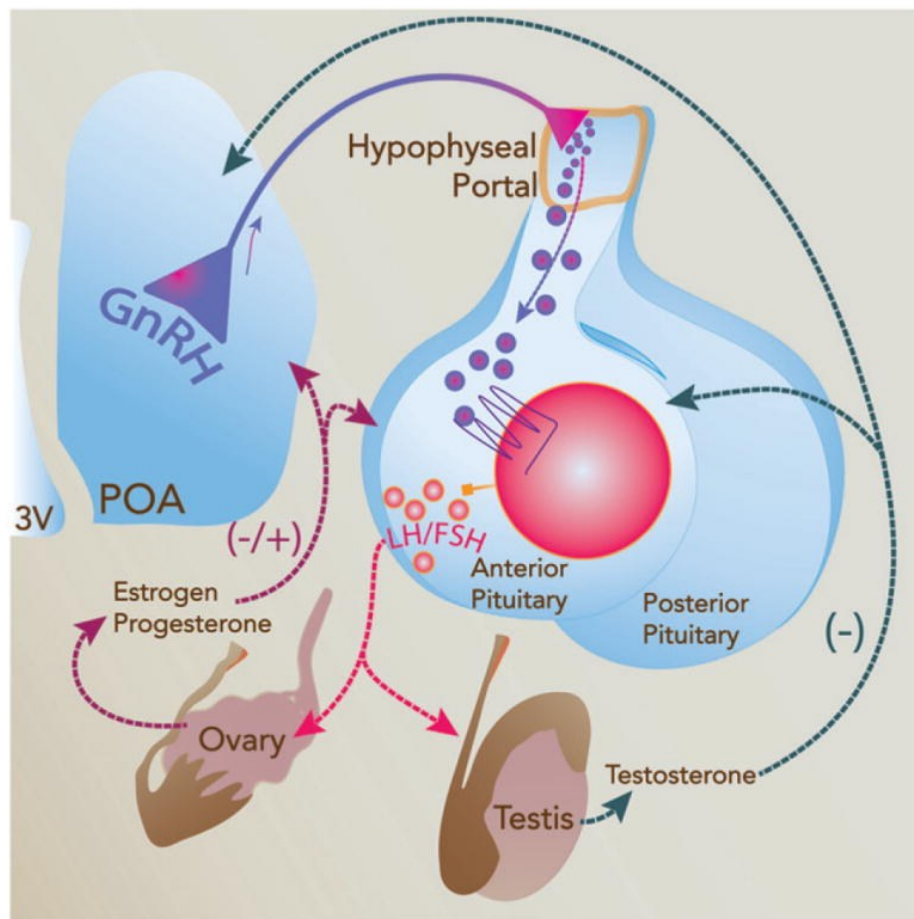


Figura 6: Diagramma schematico dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e dei fattori coinvolti nella sua regolazione [100]

La presenza di interruzioni nell'asse HPG può portare a diversi disordini riproduttivi, come irregolarità mestruali, sbilanci ormonali ed infertilità [101]. Ad esempio, la

deficienza di GnRH porta ad una condizione che prende il nome di “ipogonadismo ipogonadotropo”. Alterazioni in questo asse, inoltre, possono ripercuotersi anche su diversi altri sistemi, in quanto gli ormoni sessuali sono importanti in numerosi processi fisiologici che vanno al di là della riproduzione, come la salute ossea, la funzionalità cardiovascolare e la regolazione dell'umore. Diversi studi hanno dimostrato che il rilascio di GnRH è caratterizzato da una natura pulsatile. È inoltre sincronizzato con il rilascio di LH, anch'esso pulsatile [102]. Questa modalità di secrezione del GnRH è fondamentale per la produzione di gonadotropine e per la loro attività. Uno studio di Belchetz *et al.* [103] ha infatti dimostrato come, in femmine di macaco Rhesus con lesioni ipotalamiche, quindi prive del rilascio endogeno di GnRH, venivano mantenute concentrazioni normali di gonadotropine circolanti solo quando il GnRH veniva somministrato in maniera pulsatile. Paradossalmente invece, quando era somministrato in modo continuativo, il rilascio di gonadotropine risultava soppresso. Questo effetto paradosso è dato dal fatto che agonisti del GnRH a lunga durata, come la triptorelina, portano ad una riduzione dell'mRNA del recettore del GnRH, della subunità β dell'LH e della subunità β dell'FSH [104]. Questo tipo di somministrazione continua viene quindi utilizzato in situazioni in cui è desiderabile ridurre i livelli di gonadotropine e steroidi sessuali, come nell'endometriosi o nel carcinoma prostatico. Invece, nei pazienti con anovulazione ipogonadotropa vengono spesso usati regimi di somministrazione pulsatile del GnRH mediante pompe computerizzate, che rilasciano un impulso di GnRH ogni 60-120 minuti. Risulta infatti importante identificare il circuito neuronale che guida il rilascio pulsatile di GnRH, il cosiddetto “*GnRH pulse generator*”, in modo da migliorare gli approcci terapeutici e ottimizzare le tecnologie. Dopo diversi studi, condotti principalmente su animali, si sono ottenute evidenze sul fatto che i neuroni GnRH siano localizzati prevalentemente nell'area preottica, e proiettino le proprie terminazioni verso l'eminenza mediana. Pertanto, si ritiene che la secrezione pulsatile di GnRH venga generata attraverso l'azione di neuroni regolatori presenti nell'ipotalamo mediobasale, in particolare nel nucleo arcuato. Numerose evidenze raccolte negli ultimi decenni, inoltre, hanno dimostrato l'importanza dei neuroni KNDy, i quali esprimono kisspeptina, dinorfina A e neurochinina B. Tali neuroni sono oggi considerati come il principale network responsabile della generazione pulsatile del GnRH nei mammiferi e, grazie a prove ottenute in tempi recenti, il loro coinvolgimento diretto in questo meccanismo è stato ulteriormente confermato.

4.2 Gonadotropin-Releasing Hormone

Uno dei principali fattori che controllano l'asse HPG è il Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH), ovvero l'ormone di rilascio delle gonadotropine. Esso è un neurormone decapeptidico, prodotto nell'ipotalamo e rilasciato in maniera pulsatile nel sistema portale ipofisario. L'attivazione di specifici recettori per il GnRH (GnRHR), presenti sulla superficie delle cellule gonadotrope, attiva cascate di trasduzione del segnale, per stimolare la sintesi e la secrezione delle gonadotropine ipofisarie FSH ed LH, le quali a loro volta controllano la steroidogenesi gonadica, la proliferazione cellulare e la gametogenesi, agendo direttamente sulle gonadi. Sono infatti essenziali per la normale maturazione sessuale e la salute riproduttiva. Nel corso dell'evoluzione sono state identificate tre varianti di GnRH. Nell'uomo il principale regolatore dell'asse HPG è GnRH1, il cui gene codificante è presente sul cromosoma 8 ed è formato da 4 esoni. Anche GnRH2 è presente nella specie umana ed è formato da una sequenza amminoacidica molto simile a GnRH1, circa per il 70%, sebbene il suo ruolo fisiologico risulti meno definito. GnRH3, invece, è principalmente espresso in specie non mammifere [105]. A differenza di GnRH1, che vede un'espressione diffusa, GnRH2 appare concentrato in specifici nuclei come quello supraottico, soprachiasmatico o paraventricolare, oltre che nell'ipotalamo medio-basale. Inoltre, GnRH2 è espresso in diversi tessuti periferici, in particolare tessuti del sistema riproduttivo femminile come endometrio, ovaio e placenta. Numerosi studi hanno evidenziato il ruolo centrale di diversi fattori di trascrizione nella regolazione dell'espressione del gene GnRH1. In particolare, Oct1 e altre proteine appartenenti alla famiglia dei fattori di trascrizione POU-homeodomain sono in grado di legare regioni che agiscono come promotori o enhancer del gene GnRH1, aumentandone così l'attività trascrizionale [106]. Gli androgeni possono inibire l'attività del promotore di questo gene attraverso il recettore androgenico. Ci sono ulteriori fattori, come Msx1 e Dlx2, appartenenti alla famiglia dei fattori di trascrizione homeodomain non-Hox che si legano a specifiche sequenze consenso del DNA e modulano l'attività trascrizionale del gene; in particolare Msx1 agisce principalmente come repressore, mentre Dlx2 come attivatore. Esistono numerosi cofattori che cooperano con i fattori di trascrizione nella regolazione del gene GnRH1. Tra questi ricordiamo ad esempio la famiglia di corepressori GRG, che interagisce con Oct1 e Msx1, o altri fattori tra cui Pbx1, Prep1, Otx2 e GATA-4, che contribuiscono alla regolazione del gene legando regioni promotrici ed enhancer e

favorendo l'attività trascrizionale. In particolare, GATA-4 si lega a specifici motivi consenso, denominati GATA-A e GATA-B presenti nella regione enhancer del gene. Ci sono, inoltre, meccanismi di regolazione che coinvolgono modificazioni epigenetiche, come l'azione delle proteine istone deacetilasi [107], e vie di segnalazione intracellulari come quella della protein chinasi C (PKC). Quest'ultima agisce come repressore di numerosi fattori trascrizionali tramite la fosforilazione, riducendone quindi l'effetto positivo sulla trascrizione di GnRH1. Anche altre proteine come Fos e Jun possono agire come repressori. In particolare, l'aumento dell'espressione dei geni c-Fos e c-Jun è associato ad una riduzione dei livelli dell'mRNA di GnRH1. Infatti, Fos e CREB possono reprimere l'attività del promotore del gene GnRH1, mentre Fos e Jun interagiscono con il complesso AP1 nella regione promotrice prossimale, riducendo sintesi e secrezione di GnRH1. Anche la neurochinina B (NKB), regolatore importante dei neuroni KNDy, sembra essere coinvolta in questi meccanismi. Infatti, sue mutazioni o del suo recettore sono associate a ipogonadismo ipogonadotropo, suggerendo un ruolo positivo di NKB sulla secrezione di GnRH. Dagli esperimenti, però, sono stati ottenuti risultati contrastanti [108] per quanto riguarda l'influenza di NKB e del suo recettore sulla trascrizione di GnRH1, che sembra dipendere dalla durata dell'esposizione. Come abbiamo già precisato precedentemente, il rilascio pulsatile del GnRH è fondamentale per mantenere la spermatogenesi e la steroidogenesi. Sono stati fatti diversi studi su questo, i quali hanno rivelato che il meccanismo neurobiologico della modalità pulsatile funziona in concomitanza con il neuropeptide kisspeptina e il suo recettore [109]. I neuroni Kiss1, che producono kisspeptina, sono presenti soprattutto nella regione dell'ipotalamo mediobasale, in particolare a livello del nucleo arcuato nei roditori e nel nucleo infundibolare nei primati, tra cui gli umani. Essi producono le kisspeptine, una famiglia di neuropeptidi che agiscono come potenti stimolatori della secrezione di GnRH, grazie al legame con il loro recettore Gpr54, che è accoppiato a proteine G [110]. A livello neuroanatomico, i neuroni Kiss1 sono organizzati in differenti popolazioni neurali, che hanno ruoli fondamentali nel controllo dell'asse riproduttivo: nei roditori la popolazione dell'area anteroventrale periventricolare è responsabile per la generazione dell'impennata preovulatoria dell'LH, mentre la popolazione del nucleo arcuato, corrispondente al nucleo infundibolare nell'uomo, è fondamentale per la secrezione pulsatile di GnRH. Ci sono anche diversi altri neuropeptidi che sembrano avere un'influenza su GnRH. Nel nucleo

arcuato, ad esempio, sono presenti neuroni POMC e NPY/AgRP, che regolano l'omeostasi energetica e paiono avere effetto sui neuroni GnRH. In particolare, le evidenze disponibili dimostrano che i prodotti dei neuroni POMC tendono a stimolare l'attività dei neuroni GnRH [112], mentre l'attivazione dei neuroni NPY/AgRP è associata ad una riduzione dei pulse di LH [111], suggerendo un effetto inibitorio su GnRH. Tuttavia, la precisa organizzazione di questi circuiti resta ancora da chiarire. Anche i peptidi RF-amide, in particolare RFRP-3, hanno un ruolo importante, rappresentando dei mediatori che portano all'inibizione dell'asse riproduttivo durante condizioni di deficit energetico. Infatti, i neuroni GnRH esprimono il recettore NPFRR1 [114], recettore attraverso cui questi peptidi possono agire. È stato anche dimostrato che RFRP-3 induce direttamente il firing dei neuroni GnRH tramite un'azione post-sinaptica [113]. Esistono anche altri neuropeptidi che sembrano partecipare al controllo metabolico dei neuroni GnRH, ma la loro rilevanza è ancora oggetto di studio. Tra essi abbiamo la spexina [115], la quale potrebbe agire sul GnRH indirettamente, tramite riduzione di NPY/AgRP. IGF-1, invece, sembra aumentare l'attività di GnRH [116]. Anche GLP1 esercita effetti stimolatori sull'asse riproduttivo, aumentando l'attività dei neuroni GnRH mediante meccanismi sia pre che post-sinaptici [117]. Ulteriori neuropeptidi sono l'irisina, FGF21 o il neuropeptide N/OFQ. Oltre ai neuropeptidi, anche diversi sensori intracellulari sembrano contribuire alla regolazione metabolica dei neuroni GnRH. Tra essi, abbiamo AMPK [118], che media gli effetti inibitori del deficit energetico su questi neuroni. Al contrario, mTOR viene attivato in condizioni di disponibilità energetica, e sembra favorire la funzione riproduttiva [119], probabilmente anche agendo sui neuroni Kiss1. Infine, GRK2 modula la sensibilità del recettore della kisspeptina nei neuroni GnRH, contribuendo alla trasmissione delle informazioni metaboliche sull'asse riproduttivo [120]. Il GnRH, una volta rilasciato, si lega al proprio recettore GnRHR, recettore accoppiato a proteine G e presente sulla superficie delle cellule gonadotrope. Ha 7 domini transmembrana ed un dominio N-terminale extracellulare, è formato da 328 amminoacidi ed è codificato da un gene presente sul cromosoma 4, che si compone di tre esoni e due introni [121]. I 7 domini transmembrana (TM1-TM7) sono connessi tra loro da tre anse intracellulari (IL 1-3) e tre extracellulari (EL 1-3). Il dominio ammino-terminale è sul lato extracellulare, mentre quello carbossi-terminale è intracellulare. I domini transmembrana formano un core idrofobico, che permette al recettore di integrarsi nel doppio strato lipidico della

membrana cellulare. Specifici residui delle anse extracellulari formano il sito di legame per il ligando, che permette il legame del GnRH con un'alta specificità e il suo parziale inserimento nella parte transmembrana del recettore [122]. Le anse intracellulari, invece, sono coinvolte nel legame con la proteina G, grazie a specifici motivi. Il GRHR, a differenza degli altri GPCRs, non presenta una lunga coda carbossi-terminale, conferendo una desensibilizzazione recettoriale meno immediata, grazie ad un minor reclutamento delle β -arrestine. Nelle cellule gonadotrope ipofisarie, il legame del GnRH al suo recettore porta a cambiamenti strutturali nel recettore e nelle proteine G eterotrimeriche, le quali sono formate da tre subunità: $G\alpha$, di cui esistono diverse sottoclassi, $G\beta$, e $G\gamma$. In queste cellule, il GnRHR è associato con la subunità $G\alpha_{q/11}$ e $G\alpha_s$ [123]. Questi cambiamenti strutturali della proteina G portano ad un'alterazione dell'affinità del GDP e alla sua sostituzione con GTP. Ciò promuove il distacco della subunità $G\alpha$ dalle altre due subunità. Iniziali studi hanno dimostrato che la subunità $G\alpha_{q/11}$ scatena una serie di eventi di signaling a livello intracellulare, legandosi alla fosfolipasi $C\beta$ ($PLC\beta$). Successivamente è stato dimostrato che anche il dimero $G\beta\gamma$ può legare e attivare $PLC\beta$. Inoltre, dopo stimolazione prolungata da parte del GnRH, anche altri fattori come la fosfolipasi A_2 (PLA_2) o la fosfolipasi D (PLD) possono essere stimolati da queste subunità [124]. $PLC\beta$ catalizza l'idrolisi enzimatica del fosfolipide di membrana PIP_2 , sintetizzando IP_3 e diacilglicerolo (DAG). IP_3 porta al rilascio di calcio (Ca^{2+}) nel citosol, legando il suo recettore presente sulla membrana del reticolo endoplasmatico. Il Ca^{2+} , insieme al DAG , causa l'attivazione della protein chinasi C (PKC) e quindi alla produzione di gonadotropine [125]. PLD , che viene attivata successivamente, determina l'idrolisi della fosfatidilcolina, generando PET e PA , risultando in una maggiore produzione di DAG . Da questo deriva una attivazione prolungata di PKC , le cui isoforme α e β II fosforilano PLD , aumentandone l'attività con un meccanismo di feedback positivo. PKC induce anche l'attivazione di altri fattori, tra cui Raf-1, Src e MAPKs, che fanno parte della cascata MAPK/ERK. La via MAPK porta alla fosforilazione di fattori di trascrizione come Elk-1, Egr-1, c-Fos e c-Jun, che hanno effetto positivo sull'espressione di geni delle gonadotropine, come quello della subunità α . In aggiunta, PLA_2 produce acido arachidonico, convertito in leucotrieni dalle lipossigenasi. I leucotrieni sono a loro volta coinvolti nella produzione della subunità α delle gonadotropine, oltre che nell'espressione di $PKC\beta$ [126] (Figura 7).

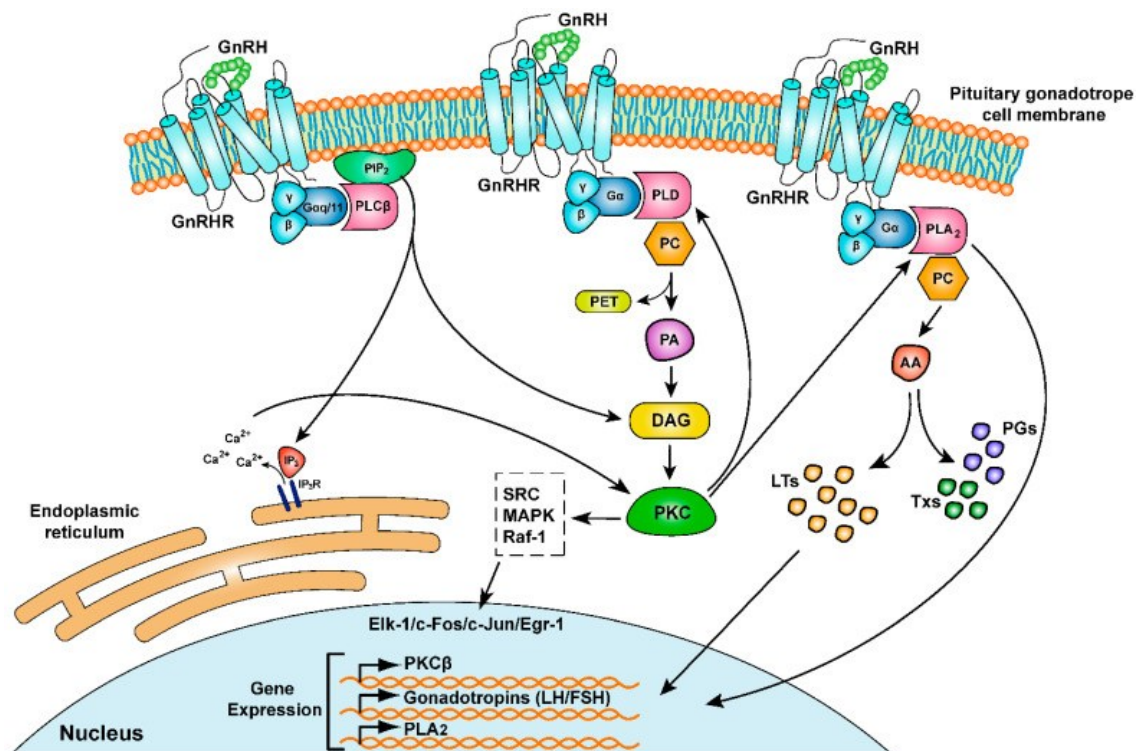


Figura 7: Vie di trasduzione del segnale mediate da GnRHR [127]

In sintesi, tutte le vie di signalling attivate dal legame del GnRH al suo recettore sono interconnesse e risultano nella produzione e secrezione di LH e FSH. In relazione alla differente frequenza pulsatile del GnRH, inoltre, vengono prodotte diverse subunità delle gonadotropine. Infatti, quando le cellule gonadotrope sono esposte ad una maggiore frequenza di GnRH, è indotta la produzione delle subunità α di LH ed FSH e della subunità β dell'LH mentre, quando la frequenza è più bassa, della subunità β dell'FSH [128].

4.3 Follicle-Stimulating Hormone

Sul promotore del gene *Fshb*, che codifica per la subunità β dell'ormone Follicle-Stimulating Hormone (FSH), esiste una regione regolatoria responsiva al GnRH, la quale è altamente conservata nell'uomo. Essa contiene un elemento CRE/AP1, in grado di legare fattori di trascrizione attivati a valle della segnalazione del GnRH. La regolazione della trascrizione della subunità β è essenziale, in quanto rappresenta lo step limitante nella sintesi dell'ormone maturo. Infatti, la subunità α è condivisa con LH, TSH e hCG, ed è sempre prodotta in eccesso. L'espressione del gene *Fshb* è regolata anche da altri fattori, tra cui ricordiamo attivina, inibina e follistatina. L'attivina,

che appartiene alla famiglia di TGF- β , si lega a recettori serina/treonina chinasi sulle cellule gonadotrope, attivando principalmente la via di segnalazione delle proteine Smad e promuovendo così l'espressione del gene *Fshb* [130]. Al contrario, inibina e follistatina agiscono come antagonisti dell'activina [131]; l'inibina compete per il legame recettoriale, mentre la follistatina lega direttamente l'activina impedendo la sua interazione con il recettore e favorendone la degradazione. L'espressione della subunità α comune delle gonadotropine (α -GSU), invece, è regolata da specifici elementi presenti nel promotore del gene, tra cui il *pituitary glycoprotein basal element* (PGBE) e il *GnRH response element* (GnRH-RE). Il PGBE contiene siti di legame per i fattori di trascrizione della famiglia LIM-homeobox, in particolare LHX3, la cui attività può essere modulata da cofattori quali LMO1, LMO3, LMO4 e CLIM1 [140]. Nel GnRH-RE sono invece presenti siti di legame per fattori trascrizionali della famiglia Ets, che cooperano con Elk, fosforilato a valle della via ERK attivata da GnRH. Inoltre, IGF-1 stimola la secrezione della subunità α e aumenta i livelli di mRNA della α -GSU nelle cellule ipofisarie [141]. Anche ATF3, rapidamente indotto da GnRH, contribuisce alla regolazione trascrizionale di α -GSU. L'FSH è una glicoproteina eterodimerica prodotta dall'ipofisi, che comprende una subunità α e una subunità β specifica, che determina la specificità per il legame con il recettore. Il gene *Fshb* è localizzato sul cromosoma 11 ed è composto da tre esoni [129]. La subunità β prodotta consiste in un peptide segnale di 18 aminoacidi e da una proteina matura di 111 aa. L'FSH o follitropina, gioca un ruolo centrale nella funzionalità gonadica e nella riproduzione, ed esercita la sua funzione legandosi al proprio recettore. Il gene del recettore dell'FSH (FSHR) è localizzato sul cromosoma 2 ed è formato da 10 esoni, di cui i primi nove codificano per il dominio ammino-terminale del recettore. FSHR appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, in particolare alla sottofamiglia δ dei recettori della rodopsina [132], ed è formato da 695 amminoacidi. Esso contiene un largo dominio NH₂-terminale extracellulare, dove avviene il riconoscimento e il legame del ligando. Questo dominio è strutturalmente legato, grazie alla regione cerniera, al dominio transmembrana, composto da 7 α -eliche, connesse da anse intra ed extracellulari. L'FSHR ha poi un dominio terminale COOH, che si trova a livello intracellulare e contiene importanti motivi funzionali (Figura 8). Questo recettore è espresso principalmente dalle gonadi: nei testicoli, è localizzato sulla superficie basolaterale delle cellule del Sertoli, dove promuove la crescita e la maturazione cellulare, e quindi

anche la spermatogenesi; nelle ovaie, è invece espresso nelle cellule della granulosa, e la sua stimolazione regola la crescita e la maturazione dei follicoli ovarici e la produzione estrogenica [133].

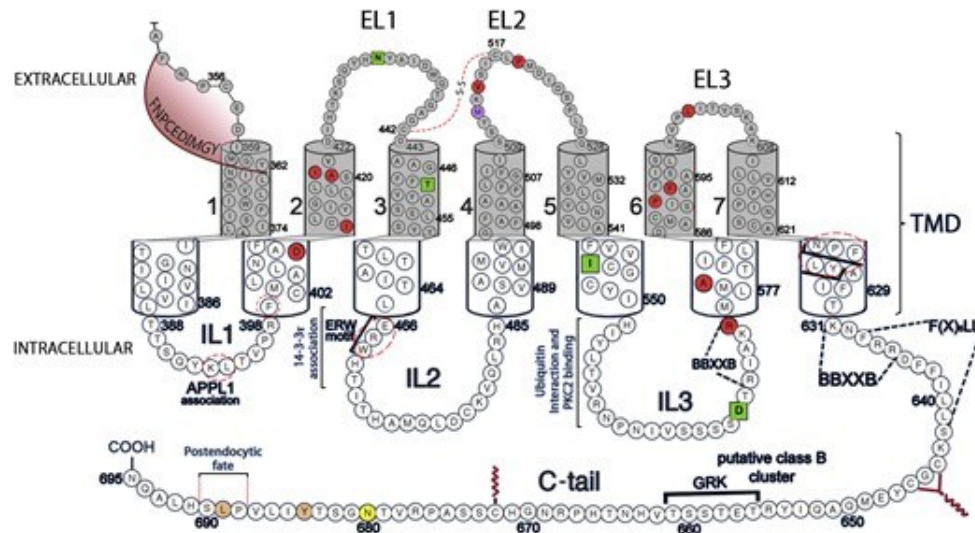


Figura 8: Rappresentazione schematica del recettore FSHR umano [134]

Diversi studi hanno dimostrato che l'FSH si lega primariamente al dominio ammino-terminale, mentre le anse 1 e 3, che sono proiezioni extracellulari del dominio transmembrana, rappresentano dei potenziali siti di legame secondari. Il legame dell'FSH induce un cambiamento conformazionale del recettore, in particolare a livello dei domini transmembrana 5 e 6, che causa la dissociazione della subunità $G\alpha$ dalle subunità $G\beta\gamma$ della proteina G eterotrimerica. Successivamente, la subunità $G\alpha$ si lega e attiva l'adenilato ciclasi, e questo porta ad un aumento dei livelli di cAMP. Ne consegue, quindi, l'attivazione della via cAMP-PKA, principale pathway di traduzione del segnale di FSHR. L'aumento di cAMP determina il rilascio della subunità catalitica della PKA, seguito dalla fosforilazione di numerosi enzimi e fattori regolatori. Questa via agisce anche su CREB, che attiva la trascrizione di geni FSH-dipendenti [135]. Il cAMP può oltretutto attivare i *guanine nucleotide exchange factors* (GEFs) e le proteine della famiglia Ras e attivare così la via metabolica MAPK/ERK. Sebbene la via cAMP/PKA rappresenti il principale pathway di trasduzione del segnale di FSHR, l'attivazione del recettore può coinvolgere anche ulteriori cascate intracellulari. I GEFs, infatti, possono attivare la via di PI3-K, con conseguente attivazione di PKB/AKT.

Questa via è importante nella regolazione di diversi processi biologici come l'uptake del glucosio o la mitogenesi. L'FSH causa anche un incremento intracellulare di calcio, collegato anch'esso al cAMP. Concentrazioni elevate di calcio attivano la calmodulina, e a sua volta le CaM-chinasi dipendenti da essa, portando a diversi effetti, tra cui la fosforilazione di CREB. L'FSH induce inoltre la fosfolipasi A2 (PLA2), il rilascio di acido arachidonico (AA) e l'attivazione degli eicosanoidi [136]. Questi pathway attivano diversi fattori di trascrizione e quindi stimolano la trascrizione dei geni bersaglio dell'FSH. Di conseguenza, le cellule del Sertoli traducono il segnale dell'FSH nella produzione di fattori necessari per la differenziazione cellulare. Inoltre, l'FSHR può interagire, in modo fisico o funzionale, con altri recettori di membrana, diversificando così la sua azione. Ad esempio, si può associare con altri FSHR a formare omodimeri o omotrimeri, oppure può avvenire una eterodimerizzazione con recettori differenti, come quello per l'LH, associazione che sembra svolgere un ruolo importante nella regolazione della crescita follicolare ovarica [137]. Anche altre classi di recettori, come quelli tirosin-chinasici, possono modulare l'attività di FSHR.

4.4 Luteinizing Hormone

L'attivazione di GnRHR da parte di GnRH induce principalmente le vie di segnalazione dipendenti da PKC e Ca^{2+} , che portano all'attivazione di fattori trascrizionali coinvolti nell'espressione del gene LHB, tra cui abbiamo Egr1 o *early growth response 1*. Nella regione prossimale del promotore del gene LHB ci sono due siti di legame per Egr1, ognuno dei quali è seguito da due siti di legame per SF1 o *nuclear receptor steroidogenic factor 1* [138]. Il fattore Elk-1, che è attivato tramite GnRH, è collegato con l'espressione del gene Egr1. Sue mutazioni, infatti, risultano in una mancata espressione di Egr1. Esiste anche un altro fattore, *pituitary homeobox1* o Ptx1 che contribuisce, insieme a SF1 ed Egr1, all'espressione del gene *LHB*. Egr1 può interagire con Ptx1 ed SF1, incrementando così l'espressione del gene *LHB* e la sintesi di LH, ma è anche in grado, in misura minore, di stimolare da solo questa sintesi. Sul promotore del gene LHB sono anche presenti siti di legame per il fattore SP1 che, se mutati, riducono in modo marcato la sensibilità della risposta al GnRH. Abbiamo anche repressori di Egr1, tra cui ricordiamo le NGFI-A o *Nerve growth factor-induced gene A binding proteins 1 e 2*, le quali sono indotte da una bassa frequenza degli impulsi di GnRH, che porta così ad una riduzione della sintesi di LH [139]. Infine,

anche i fattori della famiglia forkhead regolano l'espressione di LHB, nello specifico FOXO1 ha effetti positivi, mentre FOXO3 negativi (Figura 9).

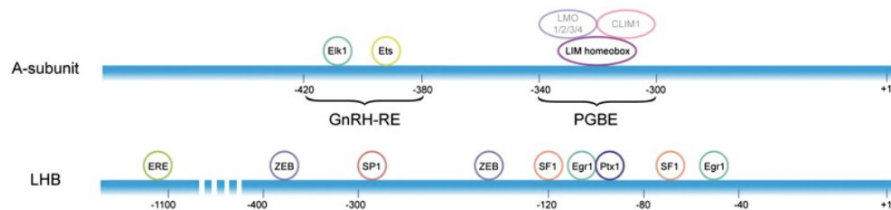


Figura 9: Regolazione della trascrizione dei geni delle subunità di LH [143]

La subunità α è invece comune ad altre gonadotropine, tra cui FSH, quindi i meccanismi di regolazione della sua espressione risultano sostanzialmente sovrapponibili a quelli già descritti. L'LH è una glicoproteina dimerica, rilasciata in maniera pulsatile dall'ipofisi, ed è fondamentale per lo sviluppo e la riproduzione. Come già detto, l'LH è formato da una subunità β , specifica per il legame al recettore, ed una subunità α , condivisa con altre glicoproteine strutturalmente simili, che ha un ruolo prevalentemente strutturale. La molecola matura ha un peso molecolare di circa 33 kDa ed è importante nella regolazione della steroidogenesi gonadica e nella modulazione dei segnali mitogenici ed anti-apoptotici. Nella donna, l'LH supporta la crescita follicolare, la maturazione ovocitaria, l'ovulazione e la luteinizzazione delle cellule della granulosa; Nell'uomo, invece, stimola principalmente la steroidogenesi testicolare a livello delle cellule di Leydig. L'LH agisce tramite il *LH/choriogonadotropin receptor* (LHCGR), che è comune per LH e hCG ed è espresso nelle gonadi [142]. Il gene che codifica per il recettore LHCGR appartiene alla famiglia dei GPCR, è presente sul cromosoma 2 ed è composto da 11 esoni e 10 introni. Il recettore ha 7 domini transmembrana, un largo dominio extracellulare N-terminale, una regione a cerniera e un corto dominio intracellulare. Il legame dell'ormone con il dominio extracellulare del recettore aziona un riarrangiamento conformazionale di tipo push/pull, che coinvolge la regione a cerniera e modifica l'organizzazione dei segmenti transmembrana [144], determinando l'attivazione di molteplici cascate di segnalazione intracellulari.

LHCGR media l'incremento intracellulare di cAMP e Ca^{2+} . Il cAMP è un secondo messaggero che induce l'attivazione di PKA e la fosforilazione di CREB, prima di essere degradato ad AMP dalle fosfodiesterasi. In diversi tipi di cellule, concentrazioni

elevate di cAMP sono state associate alla regolazione spaziale dei pathway coinvolti nella steroidogenesi, nella proliferazione cellulare e nei processi di sopravvivenza e apoptosi. CREB, una volta fosforilato, lega sequenze specifiche del DNA chiamate CRE, inducendo la trascrizione di geni coinvolti nella steroidogenesi. Tra essi ci sono *steroidogenic acute regulatory protein* (STAR/STARD1), fondamentale per il trasporto di colesterolo nei mitocondri, ed enzimi steroidogenici come CYP17A1, coinvolto nella biosintesi degli androgeni [145]. L'attivazione di PKA può portare anche alla fosforilazione di ERK1/2, che contribuisce alla modulazione della steroidogenesi, alla proliferazione cellulare e ai processi di sopravvivenza delle cellule. Inoltre, contribuisce alla regolazione del recettore LHCGR attraverso meccanismi di desensibilizzazione e internalizzazione mediati da chinasi GPCR e β -arrestine. Queste ultime, inoltre, possono anche attivare una seconda ondata di segnalazione ERK1/2, probabilmente coinvolta nel bilanciamento degli effetti cellulari mediati da LHCGR. Per quanto riguarda il Ca^{2+} , il suo incremento deriva dall'accoppiamento del recettore con la proteina G α_q , che induce l'attivazione della fosfolipasi C (PLC) e poi la produzione di IP3 [60]. Gli ioni calcio modulano l'attività delle CaM-chinasi, coinvolte nella proliferazione cellulare e nel trasporto di colesterolo al mitocondrio, step limitante della steroidogenesi. Questa via richiede concentrazioni di hCG molto più alte rispetto alla classica via cAMP/PKA. Evidenze più recenti hanno dimostrato che LHCGR è in grado di attivare altri pathway intracellulari. Il dimero $\beta\gamma$ della proteina G può portare ad un'attivazione indiretta di AKT, associata a sopravvivenza cellulare, proliferazione e modulazione della steroidogenesi, anche sostenendo l'espressione di STARD1 [146]. L'attivazione delle diverse vie di segnalazione dipende da molteplici fattori, tra cui la densità recettoriale, l'interazione con altri recettori di membrana e il coinvolgimento delle β -arrestine.

4.5 Kisspeptina

Il gene *KISS1*, che codifica per le kisspeptine, fu identificato nel 1996, come gene soppressore delle metastasi nel melanoma maligno umano. È localizzato sul cromosoma 1q32 ed è composto da quattro esoni, di cui i primi due non sono tradotti. Il precursore che ne deriva è un peptide di 145 amminoacidi, successivamente processato fino ad avere un peptide di 54 amminoacidi, noto come kisspeptina-54, che poi può essere ulteriormente scisso in peptidi di 14, 13 e 10 amminoacidi. La proteina

e questi peptidi più corti appartengono tutti al gruppo dei peptidi RF-amide, e ci si riferisce ad essi collettivamente con il nome di kisspeptine [147]. Il promotore del gene contiene molte regioni ricche in GC, che sono siti di legame per la famiglia delle proteine Sp1: tra esse, Sp1 attiva la trascrizione, mentre Sp3 la reprime. Queste regioni partecipano anche alla regolazione estrogeno-dipendente dell'espressione della kisspeptina. Nel 2001 la kisspeptina fu identificata come ligando per il *orphan G-protein coupled receptor 54* (GPR54), ora chiamato KISS1R, che è accoppiato a proteine G, in particolare Gq/11. KISS1R è codificato da un gene presente sul cromosoma 19, che include cinque esoni. La proteina matura è di 398 amminoacidi e ha sette domini transmembrana idrofobici [148]. KISS1R, nell'uomo, è presente nella corteccia cerebrale, talamo, cervelletto e nella regione ponto-bulbare, oltre che in diversi tessuti periferici, in particolare nelle ovaie. Dopo il legame della kisspeptina, avviene una dissociazione della proteina G in $G\alpha_{q/11}$ -GTP e $G\beta\gamma$. $G\alpha_{q/11}$ attiva la fosfolipasi C, la quale porta alla formazione di IP3 e DAG da PIP2. IP3 induce la mobilizzazione ed il rilascio di calcio, il cui incremento contribuisce agli effetti stimolatori della kisspeptina sulla secrezione ormonale. DAG, invece, attiva la PKC, che causa una cascata di fosforilazione e quindi l'attivazione della via MAPK/ERK e p38 [147]. I neuroni kisspeptinici rappresentano uno dei principali sistemi di regolazione della secrezione di GnRH. Tra essi, una delle sottopopolazioni più importanti è costituita dai neuroni KNDy, che sono ritenuti fondamentali nella generazione della secrezione pulsatile di GnRH [149]. Essi co-esprimono kisspeptina, neurochinina B, un neuropeptide stimolatorio facente parte delle tachichinine, e dinorfina, che è inibitoria e fa parte degli oppioidi endogeni. Nei roditori, tali neuroni sono presenti in particolare nel nucleo arcuato, mentre nell'uomo e nei primati nel nucleo infundibolare. Accanto ai neuroni KNDy, esistono anche popolazioni di neuroni prevalentemente kisspeptinici localizzate nell'area preottica (POA), particolarmente rilevanti nel feedback positivo esercitato dagli estrogeni e nella generazione del picco preovulatorio di LH. La kisspeptina agisce in modo diretto sui neuroni del GnRH, inducendone la depolarizzazione e aumentando l'attività elettrica ed il rilascio di GnRH. L'attività dei neuroni kisspeptinergici è fortemente modulata dagli steroidi sessuali, infatti estrogeni e progesterone modulano l'attività della kisspeptina a livello del nucleo infundibolare, tramite i recettori degli steroidi sessuali. In particolare, gli estrogeni esercitano azioni differenti a seconda della popolazione di neuroni kisspeptinergici su

cui agiscono: nel nucleo infundibolare esercitano prevalentemente un feedback negativo sui neuroni KNDy, riducendo l'espressione della kisspeptina e della neurochinina B, e potenziando l'azione inibitoria della dinorfina. Questo contribuisce alla soppressione fisiologica della secrezione pulsatile di GnRH e LH durante gran parte del ciclo mestruale. Al contrario, nei neuroni kisspeptinergici della regione preottica, elevati livelli di estradiolo determinano un marcato aumento del rilascio di GnRH e il conseguente picco preovulatorio di LH, responsabile dell'ovulazione [151]. Il progesterone, i cui livelli aumentano durante la fase luteale del ciclo ovarico, contribuisce alla modulazione della secrezione di LH, esercitando prevalentemente un effetto inibitorio sui neuroni KNDy. Studi condotti usando antagonisti del recettore del progesterone, hanno dimostrato che il blocco di tale recettore nei neuroni KNDy infundibolari aboliva l'effetto inibitorio del progesterone sulla secrezione di LH, effetto non osservato nei neuroni kisspeptinergici della POA [152]. Nei maschi, il numero dei neuroni kisspeptinergici presenti nella POA è inferiore rispetto alle femmine. Questo dimorfismo sessuale è stato ampiamente studiato nei roditori e sembra dipendere dagli effetti degli androgeni durante lo sviluppo neonatale. Inoltre, la maggior parte dei neuroni kisspeptinergici esprime sia il recettore per gli estrogeni che quello per gli androgeni [153]. Ciò suggerisce che il feedback negativo degli androgeni possa essere mediato sia direttamente tramite AR, sia indirettamente tramite l'aromatizzazione del testosterone in estradiolo. Il ruolo fisiologico della kisspeptina è stato dimostrato tramite studi condotti usando un suo antagonista, il quale ha portato ad un blocco del firing neuronale dei neuroni GnRH [150]. Inoltre, soggetti con mutazioni inattivanti di KISS1 o KISS1R, hanno mostrato ipogonadismo ipogonadotropo o ritardi nella pubertà. Si è visto anche che infusioni intravenose di peptidi kisspeptinici aumentano la frequenza pulsatile e l'ampiezza dell'LH, dimostrando un effetto anche su questo ormone.

4.6 GABA

Il rilascio di GnRH è strettamente collegato all'attività dei neuroni GnRH, i quali sono regolati da diversi neurotrasmettitori, ormoni steroidei e fattori di crescita. Tra essi troviamo il GABA, il quale contribuisce alla regolazione della secrezione di GnRH e, di conseguenza, al controllo dell'intero asse HPG. I neuroni GnRH, infatti, esprimono sia recettori GABA_A che GABA_B, e ricevono così input GABAergici. I neuroni GABAergici,

a loro volta, esprimono recettori per gli estrogeni. Questo suggerisce che una parte degli effetti esercitati dagli estrogeni sull'asse riproduttivo possa essere mediata indirettamente dalla modulazione GABAergica sui neuroni GnRH. Inoltre, la regolazione GABAergica dei neuroni GnRH appare strettamente integrata con altri circuiti neuroendocrini, tra cui la kisspeptina che, oltre ad agire direttamente sui neuroni GnRH mediante il recettore KISS1R, può influenzarne l'attività anche indirettamente, tramite la modulazione delle afferenze GABAergiche [158]. Diversi studi, che hanno identificato le sinapsi GABAergiche mediante il marcatore vGAT, hanno mostrato che i contatti inibitori sono più numerosi sul dendrite iniziale dei neuroni GnRH piuttosto che sul corpo cellulare. Questo suggerisce che un singolo neurone GABAergico possa influenzare simultaneamente più dendriti di neuroni GnRH. Grazie ad osservazioni tramite microscopio elettronico si è infatti potuta evidenziare la presenza di dendriti raggruppati che ricevono input sinaptici comuni [154]. Questo tipo di organizzazione potrebbe inoltre contribuire alla sincronizzazione dell'attività di gruppi di neuroni GnRH, fondamentale per la secrezione pulsatile dell'ormone. I neuroni GnRH sono soggetti sia ad una trasmissione GABAergica fasica, mediata dalle classiche sinapsi, sia a una modulazione tonica sostenuta dall'attivazione dei recettori GABA_A extrasinaptici. Una parte di questi recettori contiene la subunità δ , ed è particolarmente sensibile ai neurosteroidi, tra cui l'allopregnanolone, metabolita del progesterone. Sono stati infatti condotti studi sperimentali che hanno dimostrato la capacità dell'allopregnanolone di modificare il potenziale di membrana dei neuroni GnRH e potenziare la risposta al GABA [155]. Ciò suggerisce che le variazioni dei livelli di progesterone durante il ciclo ovarico potrebbero influenzare indirettamente l'attività dei neuroni GnRH attraverso la modulazione della trasmissione GABAergica. L'importanza della regolazione GABAergica è dimostrata dal suo coinvolgimento in diversi processi fisiologici dell'apparato riproduttivo, tra cui il controllo del ciclo ovarico e della pubertà. Nonostante ciò, la natura dell'azione del GABA è stata a lungo, ed è in parte ancora oggi, oggetto di dibattito. Molti studi hanno attribuito al GABA una funzione prevalentemente inibitoria nella regolazione dell'asse riproduttivo. Questo è dimostrato dal fatto che il picco preovulatorio di LH è accompagnato da una significativa riduzione della concentrazione di GABA nelle regioni che circondano i corpi cellulari dei neuroni GnRH [156], oltre che dal fatto che la somministrazione di agonisti del recettore GABA_A

è in grado di sopprimere il rilascio di LH. Successivamente, però, da diversi studi elettrofisiologici è stato dimostrato che, nei neuroni GnRH, il GABA può anche esercitare effetti depolarizzanti ed eccitatori, aumentando l'attività elettrica cellulare e la frequenza di scarica. È stato inoltre osservato che, in funzione del contesto fisiologico e della popolazione di neuroni GnRH a cui si fa riferimento, ci possono essere risposte eterogenee. Questo effetto sembra essere legato all'omeostasi intracellulare del cloro nei neuroni GnRH. In una sottopopolazione di essi, il trasportatore NKCC1, che porta all'accumulo intracellulare di ioni cloro, può essere espresso in misura maggiore rispetto al trasportatore KCC2, che ne favorisce l'estrusione. In questi neuroni, la concentrazione intracellulare di cloro può risultare relativamente elevata [157] e l'apertura dei recettori GABA_A può determinare la depolarizzazione della membrana, invece che alla classica iperpolarizzazione.

5. Meccanismi biochimici del feedback negativo dato dagli steroidi anabolizzanti androgeni

In condizioni fisiologiche, gli steroidi sessuali prodotti dalle gonadi, principalmente testosterone ed estradiolo, rappresentano i principali regolatori dell'asse HPG e agiscono attraverso un sistema di feedback negativo a lungo circuito definito *long-loop negative feedback*. Il segnale di feedback avviene solo in minima parte attraverso un'azione diretta sui neuroni GnRH, la cui espressione di recettori steroidei è relativamente bassa, ma principalmente mediante circuiti neuronali a monte, tra cui rivestono un ruolo centrale i neuroni kisspeptinergici. Gli steroidi anabolizzanti androgeni (AAS), somministrati a dosaggi sovrafisiologici, sfruttano e alterano questi normali meccanismi di regolazione endocrina, determinando una soppressione dell'asse HPG.

5.1 Feedback negativo mediato dal recettore androgenico

Sebbene i neuroni GnRH esprimano livelli limitati di recettore androgenico (AR), diversi studi sperimentali suggeriscono che gli androgeni siano in grado di esercitare un feedback negativo sull'asse HPG attraverso l'attivazione di questo recettore. In particolare, sono stati condotti studi sulla linea cellulare GT1-7, un modello sperimentale di neuroni GnRH, i quali hanno dimostrato che l'attivazione dell'AR

determini una riduzione dell'espressione del gene *GnRH1*. Questo effetto è stato attribuito all'interazione del recettore con complessi trascrizionali associati a regioni regolatorie, localizzate nel promotore prossimale del gene GnRH (GnRH-P) e contenenti siti di legame per diversi fattori di trascrizione e proteine, importanti per l'espressione di GnRH o lo sviluppo dei neuroni GnRH. Tra essi abbiamo *Octamer-binding transcription factor-1* (Oct1), che fa parte della famiglia delle proteine POU, Pre-B cell leukemia transcription factor (Pbx)/Prep e NK2 homeobox 1 (Nkx2.1) [159]. Ulteriori studi di mutagenesi hanno dimostrato che la repressione androgenica del promotore GnRH richiede la partecipazione coordinata di molti elementi cis-regolatori. In particolare, la mutazione simultanea di tre siti di legame per Oct1 presenti nel promotore aboliva la risposta repressiva degli androgeni. Invece, un cluster contenente i siti di legame per Oct1, Pbx e Nkx2.1 risultava sufficiente a mediare la repressione trascrizionale [159]. I risultati ottenuti da questi studi hanno suggerito che la repressione mediata dall'AR non dipenda dal riconoscimento di classici *androgen response elements* o ARE, ma piuttosto è basata sul tethering del recettore androgenetico e sull'interazione del recettore con complessi trascrizionali già associati al DNA, in particolare sul promotore e sugli enhancer del gene. Successivamente è stato dimostrato che la repressione androgenica coinvolge anche l'enhancer conservato GnRH-E1, che si trova nella regione regolatoria del gene GnRH insieme a GnRH-E2 e GnRH-E3 [160]. Infatti, studi condotti usando saggi di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP), hanno dimostrato un aumento dell'associazione dell'AR con questa regione regolatoria in seguito al trattamento con un agonista androgenico, denominato R1881. Inoltre, è stato rilevato che, qualora fosse presente una mutazione a livello di una specifica sequenza localizzata all'interno di GnRH-E1, precedentemente indicata come TPA-responsive site, veniva abolita la risposta repressiva agli androgeni, indicando che tale regione è necessaria per l'inibizione della trascrizione del gene GnRH. Tramite esperimenti di electrophoretic mobility shift assay (EMSA) si è anche visto che l'AR è parte dei complessi che si associano alla sequenza -1796/-1791 di GnRH-E1 (Figura 10). Sebbene questa sequenza contribuisca alla repressione trascrizionale, l'effetto degli androgeni sull'enhancer GnRH-E1 non sembra dipendere da un unico elemento regolatorio, ma dal contributo coordinato di diverse regioni. L'analisi funzionale delle diverse regioni dell'AR ha evidenziato che il dominio di legame al DNA (DBD) è fondamentale per la

repressione della trascrizione mediata dagli androgeni, mentre il dominio di legame al ligando (LBD) non sembra essere indispensabile. Nel complesso, tali evidenze indicano che l'AR può reprimere direttamente la trascrizione del gene GnRH attraverso l'interazione con specifiche regioni promotrici ed enhancer. Questo meccanismo sembra dipendere principalmente dal reclutamento dell'AR all'interno di complessi trascrizionali multiproteici, e non dal legame diretto a sequenze ARE canoniche. Sebbene la rilevanza di questa azione diretta sia ancora oggetto di studio, tali risultati suggeriscono che l'attivazione dell'AR possa concorrere alla soppressione dell'asse HPG indotta dagli androgeni e dagli steroidi anabolizzanti androgeni.

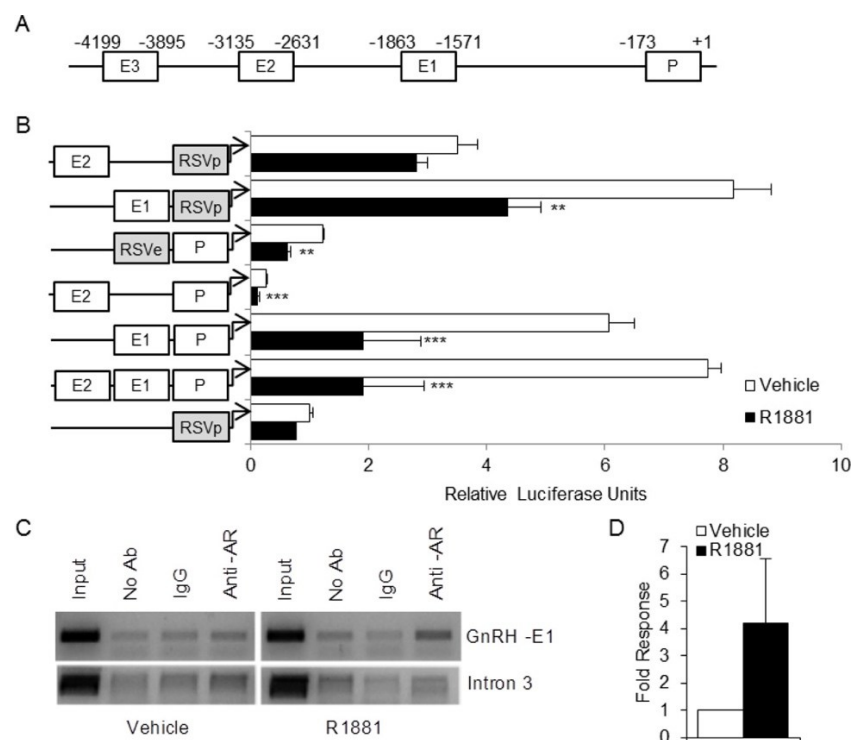


Figura 10: L'AR si associa con la regione GnRH-E1 del gene GnRH e ne reprime la trascrizione. (A) Schema della regione regolatoria del gene GnRH, estesa per circa 5 kb, con indicazione della posizione degli enhancer noti e del promotore prossimale. (B) Le cellule GT1-7 sono state trasfettate transitoriamente con costrutti reporter usando il gene della luciferasi associato a GnRH-P, a GnRH-E1, a GnRH-E2 e/o al promotore RSVp o all'enhancer RSVe del virus del sarcoma di Rous, insieme ad un vettore di espressione per l'AR. Le cellule sono state trattate per 24 ore con 100 nM di R1881 o con etanolo come veicolo, e poi sottoposte al saggio della luciferasi. La trascrizione da GnRH-P è repressa dal trattamento con R1881, indifferentemente dall'enhancer usato. (C) Le cellule GT1-7 sono state trasfettate transitoriamente con il recettore androgenico (AR) e trattate per due ore con 100 nM di R1881 o con etanolo come veicolo. I nuclei cellulari sono stati isolati e sottoposti a ChIP non usando nessun anticorpo (No Ab), usando un anticorpo specifico per AR (Anti-AR) e usando un anticorpo IgG di controllo. La cromatina risultante è stata analizzata tramite PCR con primer specifici per GnRH-E1 o per l'introne 3. (D) Sui campioni ottenuti dalla ChIP è stata eseguita una PCR quantitativa real-time, usando primer specifici per la regione GnRH-E1. [161]

5.2 Feedback negativo mediato dagli estrogeni

Oltre all'attivazione diretta del recettore androgenico, il feedback negativo esercitato dagli steroidi anabolizzanti androgeni (AAS) può essere mediato dalla loro conversione in estrogeni [162]. Molti di questi composti, infatti, conservano la struttura steroidea necessaria per essere metabolizzati dall'enzima aromatasi, che catalizza la conversione irreversibile degli androgeni in estrogeni biologicamente attivi, principalmente estradiolo. Tra gli AAS aromatizzabili rientrano il testosterone e diversi suoi derivati. Altri composti, come il nandrolone, presentano una capacità di aromatizzazione ridotta, mentre alcuni AAS sintetici non possono essere aromatizzati. Questa aromatizzazione rappresenta un meccanismo particolarmente rilevante, in quanto l'estradiolo esercita un potente feedback negativo sull'asse HPG. Esistono infatti diverse vie estrogeno-dipendenti responsabili della soppressione dell'asse HPG. Questa azione soppressiva si esplica sia a livello ipotalamico e sia a livello ipofisario. Nel primo gli estrogeni riducono la secrezione di GnRH attraverso diversi sistemi neuroendocrini, mentre a livello ipofisario modulano la sensibilità delle cellule gonadotrope alla stimolazione esercitata dal GnRH, riducendo la secrezione di LH ed FSH. Questo è anche dimostrato da numerose evidenze sperimentali, in cui si denota che l'inibizione dell'aromatasi attenua parzialmente la capacità del testosterone di sopprimere la secrezione gonadotropinica. Ulteriori conferme derivano anche dall'osservazione di soggetti con deficit congenito dell'aromatasi, in cui una marcata riduzione della sintesi di estrogeni si associa a concentrazioni elevate di LH ed FSH [174]. La somministrazione di estradiolo, invece, determina una riduzione delle gonadotropine. Gli estrogeni hanno in realtà un effetto bimodale sull'ipotalamo, con un'influenza sia stimolatoria e sia inibitoria sulla secrezione di GnRH. L'effetto stimolatorio degli estrogeni si verifica principalmente durante la fase follicolare tardiva, momento in cui concentrazioni elevate e persistenti di estradiolo inducono il feedback positivo che precede il picco preovulatorio di LH [163]. L'effetto inibitorio sulla secrezione di GnRH e sull'espressione del suo gene è stato osservato in molti studi, condotti su diverse specie mammifere. Evidenze ottenute sia *in vitro* e sia *in vivo* indicano infatti che l'estradiolo è in grado di ridurre i livelli di mRNA del GnRH e di sopprimere l'attività trascrizionale del suo promotore. Studi condotti sull'ipotalamo di ratto hanno localizzato tale effetto prevalentemente nell'area preottica rostrale, suggerendo che i meccanismi responsabili del feedback negativo siano distinti da

quelli del feedback positivo. Le evidenze *in vitro* della regolazione negativa esercitata dagli estrogeni sull'espressione del gene GnRH nel ratto derivano da studi di trasfezione condotti sia in cellule placentari JEG-3, sia in cellule neuronali GT1-7 esprimenti GnRH, co-trasfettate con il cDNA del recettore estrogenico ER α , i quali hanno dimostrato che gli estrogeni riducono l'attività del promotore del gene GnRH. Evidenze analoghe sono state poi ottenute anche nell'uomo [164]. Ulteriori studi condotti da Roy e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento delle cellule neuronali GT1-7 con 17 β -estradiolo determina la riduzione dei livelli di mRNA del GnRH nell'arco di 48 ore [165]. Successivamente, è stato confermato che l'estradiolo riduce sia l'espressione sia la secrezione di GnRH nelle linee cellulari GN11, linea cellulare immortalizzata di neuroni GnRH immaturi, e GT1-7, con effetti mediati prevalentemente da ER α per quanto riguarda le cellule GT1-7, mentre nelle cellule GN11 contribuiscono sia ER α che ER β . Diverse evidenze sperimentali, inoltre, indicano la presenza di recettori estrogenici funzionali nei neuroni GnRH. Molti di questi studi hanno usato linee cellulari neuronali immortalizzate esprimenti GnRH, le quali sono in grado di esprimere ER α e/o ER β e rispondono al trattamento con estrogeni attraverso modificazioni dell'espressione genica, ad esempio della galanina [170] o del gene del recettore androgenico. Tali osservazioni supportano l'esistenza di un'azione diretta degli estrogeni sui neuroni GnRH e suggeriscono la presenza di vie di segnalazione estrogenica funzionalmente attive in queste cellule. Da successivi studi, inoltre, è stata confermata nell'uomo una co-localizzazione tra ER β e GnRH [172]. Nonostante ER β sembri rappresentare l'isoforma predominante nei neuroni GnRH, alcuni studi hanno identificato anche la presenza di trascritti di ER α in popolazioni specifiche di neuroni nell'area preottica [171]. Gli effetti biologici dell'estradiolo sono mediati attraverso il legame con i recettori estrogenici, membri della super famiglia dei recettori nucleari coinvolti nella regolazione della trascrizione genica. Sono state identificate due isoforme principali di questi recettori, ER α ed ER β , che hanno una distribuzione tissutale differente. Questi sono costituiti da sei domini funzionali denominati A-F [166]:

- il dominio A/B contiene la funzione di attivazione trascrizionale AF-1, che è indipendente dal ligando;
- il dominio C contiene i motivi a dita di zinco responsabili del legame agli estrogen response elements (ERE);

- il dominio D costituisce la regione a cerniera coinvolta nella modulazione del legame al DNA:
- i domini E/F comprendono l'LBD e la funzione di attivazione trascrizionale AF-2, dipendente dal ligando.

Le due isoforme, ER α ed ER β , condividono un'elevata omologia nei domini di legame al DNA e al ligando, mentre differiscono nella regione N-terminale. ER α , inoltre, ha anche un'affinità lievemente maggiore per il legame alle sequenze ERE. Entrambe le isoforme sono in grado di attivare promotori estrogeno-responsivi.

Nella via classica di segnalazione estrogenica l'estradiolo si lega al recettore, questo induce un cambiamento conformazionale seguito dalla dimerizzazione del recettore e poi dal legame agli ERE presenti nelle regioni regolatorie dei geni bersaglio. Il complesso recettore-DNA promuove quindi la trascrizione genica attraverso le funzioni AF-1 e AF-2 [167], che possono agire in maniera indipendente o sinergizzare per stimolare una regolazione positiva della trascrizione genica. L'efficienza di questo processo dipende inoltre dal reclutamento di numerosi cofattori trascrizionali. Sono stati anche identificati numerosi corepressori. Attraverso studi condotti mediante ligandi selettivi per le diverse isoforme recettoriali, è stato dimostrato che ER α rappresenta il principale mediatore del feedback negativo estrogenico [168]. Le azioni di ER α sembrano coinvolgere sia meccanismi genomici classici dipendenti dal legame agli ERE, sia meccanismi ERE-indipendenti, basati su interazioni proteina-proteina [173]. Tuttavia, ER α ed ER β possono formare omodimeri o eterodimeri, la cui formazione è facilitata dall'estradiolo e a cui esso si lega, nei tessuti in cui vengono co-espressi, suggerendo così una cooperazione funzionale tra le due isoforme. Questo potrebbe spiegare perché i topi privi in contemporanea di ER α ed ER β presentino concentrazioni ancora più elevate di LH rispetto a quelli privi del solo ER α [169].

Nel complesso, tali evidenze suggeriscono che gli estrogeni possano esercitare almeno una parte del proprio feedback negativo attraverso meccanismi diretti di regolazione trascrizionale dei neuroni GnRH. Tuttavia, la rilevanza fisiologica di questo meccanismo risulta inferiore rispetto a quella esercitata da circuiti neuronali a monte, come quello dei neuroni kisspeptinergici.

5.3 Ruolo dei neuroni KNDy e della kisspeptina

Come già descritto nel capitolo precedente, i neuroni KNDy, che coesprimono kisspeptina, neurochinina B (NKB) e dinorfina, rappresentano uno tra i principali regolatori della secrezione pulsatile di GnRH. Per questo motivo, essi costituiscono anche uno dei principali bersagli su cui gli steroidi sessuali esercitano il feedback negativo sull'asse HPG. Secondo il modello attualmente accettato, la neurochinina B agisce sui neuroni KNDy promuovendo la generazione della pulsatilità, la dinorfina contribuisce alla terminazione degli impulsi del GnRH, esercitando un'influenza inibitoria sulla rete KNDy, mentre la kisspeptina rappresenta l'output finale diretto ai neuroni GnRH, i quali esprimono KISS1R. La NKB agisce in maniera autocrina e paracrina aumentando l'eccitabilità dei neuroni KNDy, incrementando la frequenza di scarica e inducendo oscillazioni intracellulari di calcio, le quali promuovono il rilascio di kisspeptina [175]. La generazione e l'interruzione degli impulsi di GnRH dipendono dall'equilibrio tra i segnali eccitatori di NKB e quelli inibitori della dinorfina. Per questo, i neuroni KNDy sono oggi considerati il principale circuito neuronale coinvolto nel cosiddetto "*GnRH pulse generator*", sistema responsabile della generazione e del mantenimento della secrezione pulsatile di GnRH. È importante sottolineare che la NKB non sembra stimolare direttamente i neuroni GnRH, in quanto questi ultimi non esprimono in modo significativo il recettore NK3R. Per questo, NKB agisce soprattutto attraverso connessioni reciproche tra neuroni KNDy, sincronizzandone l'attività e promuovendo il rilascio di kisspeptina verso i neuroni GnRH. Entrambe le principali sottopopolazioni di neuroni kisspeptinergici, quella del nucleo arcuato, corrispondente al nucleo infundibolare nei primati, e quella presente nella regione preottica, esprimono recettori per estrogeni [176], progesterone [177] e androgeni [178], ma partecipano a differenti modalità di regolazione dell'asse HPG. Infatti, come già detto, la popolazione preottica è coinvolta prevalentemente nel feedback positivo estrogenico, mentre i neuroni KNDy del nucleo infundibolare rappresentano uno dei principali mediatori del feedback negativo degli steroidi sessuali, modulando l'espressione di kisspeptina, NKB e dinorfina, determinando una riduzione della secrezione pulsatile di GnRH. Gli androgeni sembrano avere la capacità di modulare direttamente la frequenza degli impulsi di LH tramite un'azione sui neuroni kisspeptinergici nel nucleo arcuato (ARC). Questa ipotesi è supportata dal fatto che la maggior parte dei neuroni KNDy esprima il recettore androgenico AR e, come osservato in diverse evidenze sperimentali, sia

sensibile agli androgeni. A sostegno di questa ipotesi, è stato osservato come la somministrazione a topi adulti femmina di DHT, che è un androgeno non aromatizzabile, determini una notevole riduzione dell'espressione di *Kiss1* e *Tac2*, un gene murino che codifica per NKB, nei neuroni kisspeptinergici dell'ARC, e di conseguenza ad una diminuzione della frequenza degli impulsi di LH [179]. Risultati congruenti sono successivamente emersi anche da studi su ratti. Nonostante questi modelli sperimentali presentino dei limiti metodologici, supportano l'ipotesi che gli androgeni esogeni possano sopprimere l'attività dei neuroni kisspeptinergici e contribuire alla riduzione della secrezione gonadotropica, anche in modo diretto. Tali evidenze suggeriscono che gli steroidi anabolizzanti androgeni possano, almeno in parte, esercitare il proprio feedback negativo tramite un'azione diretta sui neuroni KNDy. Tuttavia, nel caso del testosterone e degli AAS aromatizzabili, una quota significativa della loro azione deriva dall'aromatizzazione in estradiolo e quindi dall'attivazione dei recettori estrogenici espressi dai neuroni KNDy. Negli ultimi 20 anni, molti studi hanno dimostrato l'espressione di ER α nei neuroni kisspeptinergici ipotalamici e, attualmente, è ampiamente accettato che essi siano uno dei principali mediatori del feedback esercitato dagli estrogeni sulla secrezione di GnRH. Sebbene ER α sia espresso in entrambe le popolazioni di neuroni kisspeptinergici ipotalamici, diverse osservazioni suggeriscono che, nei roditori, la popolazione dell'ARC rappresenti il principale bersaglio del feedback negativo estrogenico, mentre quella della regione AVPV è coinvolta nel feedback positivo. Analogamente, gli estrogeni reprimono l'espressione di *Kiss1* nei neuroni kisspeptinergici del nucleo infundibolare umano [180], suggerendo quindi che il feedback negativo esercitato dagli estrogeni su questi neuroni rappresenti un meccanismo ampiamente conservato nel corso dell'evoluzione. Grazie a studi condotti su roditori, è stato osservato che la downregolazione estrogenica di *Kiss1* nei neuroni dell'ARC avviene principalmente attraverso un meccanismo indipendente dagli ERE. Infatti, in seguito al legame dell'estradiolo a ER α avvengono modificazioni epigenetiche a livello del promotore di *Kiss1*. In particolare, studi condotti con tecnica ChIP hanno dimostrato che il trattamento con estrogeni determina una riduzione dell'acetilazione dell'istone H3 a livello della regione promotrice del gene *Kiss1*, che porta ad una repressione trascrizionale [181]. Inoltre, alcuni studi hanno portato all'ipotesi che il complesso tra estradiolo ed ER α possa contribuire alla soppressione di *Kiss1* anche interferendo

nell'interazione tra il promotore del gene e regioni enhancer distali necessarie nella sua espressione [182]. Questo effetto potrebbe essere dovuto a modificazioni nell'organizzazione tridimensionale della cromatina, con una riduzione della comunicazione funzionale tra queste regioni regolatorie ed il promotore di Kiss1. Nel complesso, i dati ottenuti suggeriscono che il complesso tra estradiolo ed ER α reprima l'espressione genica di Kiss1 tramite meccanismi epigenetici e regolatori non canonici, senza il classico legame a sequenze ERE (Figura 11).

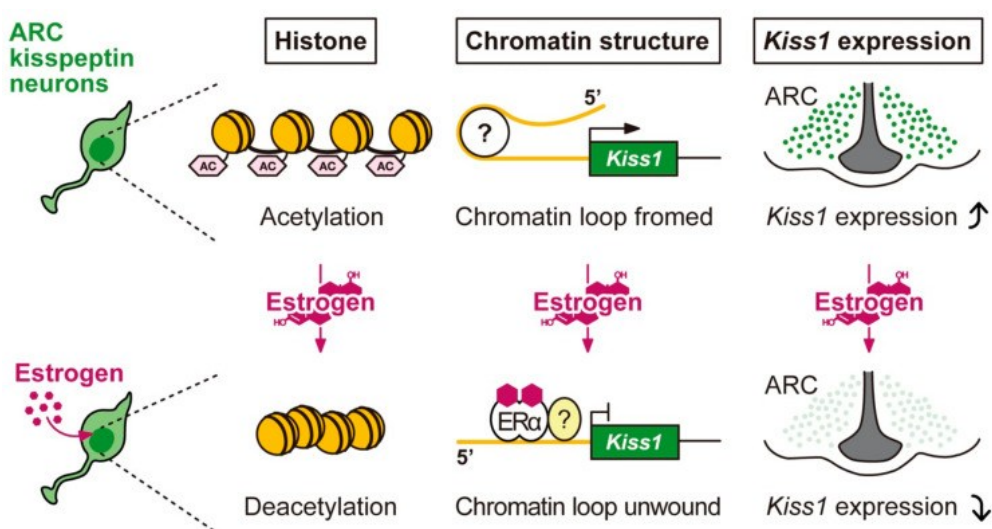


Figura 11: Presunto meccanismo d'azione del feedback negativo svolto dagli estrogeni tramite modificazioni dell'espressione di Kiss1 nell'ARC [183]

Diverse osservazioni indicano la ripercussione del feedback negativo esercitato dagli estrogeni sul circuito neuronale responsabile della generazione degli impulsi di GnRH, che determina una riduzione della frequenza e della conseguente secrezione di gonadotropine. Il ruolo dei neuroni KNDy come sorgente del GnRH pulse generator, infatti, è stato ulteriormente confermato da studi elettrofisiologici e di imaging funzionale. In particolare, registrazioni dell'attività multiunitaria (MUA), tecnica che consente di monitorare l'attività elettrica sincronizzata di gruppi di neuroni, hanno dimostrato la sincronia tra gli aumenti del ritmo dell'attività neuronale nei neuroni KNDy e gli impulsi di LH [184]. Inoltre, studi di fotometria a fibra ottica hanno evidenziato oscillazioni ritmiche delle concentrazioni intracellulari di Ca²⁺ nei neuroni KNDy, collegate anche loro alla pulsatilità della secrezione di LH [185]. È importante anche sottolineare che, oltre alla repressione di Kiss1, gli estrogeni sono in grado di modulare

anche altri componenti del circuito KNDy, come NKB e dinorfina. In particolare, il trattamento con estrogeni riduce l'espressione di *Tac2/Tac3* dove *Tac3* è il gene umano di NKB [186], e di *Pdyn*, che codifica invece per la dinorfina [187]. Gli estrogeni, quindi, modulano anche l'equilibrio tra i segnali eccitatori della neurochinina B e quelli inibitori della dinorfina. È anche interessante notare che, nonostante il feedback estrogenico agisca principalmente attraverso l'attivazione diretta di ER α espresso dai neuroni KNDy, alcune evidenze dimostrino l'esistenza di circuiti indiretti. Si è visto che il trattamento con estrogeni, infatti, è in grado di ridurre le concentrazioni plasmatiche di LH anche in modelli animali privi del recettore ER α nei neuroni kisspeptinergici. Tra questi meccanismi indiretti, è stato ipotizzato che i neuroni dinorfinergici localizzati nel nucleo paraventricolare possano contribuire all'inibizione dei neuroni KNDy attraverso l'attivazione dei recettori oppioidi K (KOR) espressi da questi ultimi, partecipando così alla soppressione della secrezione pulsatile di GnRH ed LH [188]. In sintesi, le numerose evidenze a disposizione indicano che i neuroni KNDy rappresentano uno dei principali nodi neuroendocrini attraverso cui gli steroidi anabolizzanti androgeni esercitano il proprio feedback negativo sull'asse HPG, sia tramite azione diretta sul recettore androgenico, sia attraverso la loro aromatizzazione in estrogeni.

5.4 Ruolo del GABA

Come discusso nel capitolo precedente, il GABA è uno dei neurotrasmettitori principali coinvolti nella regolazione dell'attività dei neuroni GnRH. Per questo, diverse evidenze suggeriscono che gli AAS possano esercitare una parte del proprio feedback negativo anche tramite la modulazione della trasmissione GABAergica. Il GABA agisce a livello di diversi recettori, classificati in GABA_A, GABA_B e GABA_C. Diversi studi dimostrano che il principale recettore coinvolto negli effetti esercitati dagli AAS è GABA_A, recettore ionotropico pentamerico, costituito da diverse combinazioni di subunità. A livello del cervello adulto prevalgono recettori contenenti le subunità $\alpha 1$, $\beta 2/\beta 3$ e $\gamma 2$, ma alcune regioni coinvolte nel controllo neuroendocrino della riproduzione, tra cui l'area preottica (POA), esprimono elevati livelli di recettori che contengono la subunità $\alpha 2$ e subunità meno comuni come ϵ e $\gamma 1$. La composizione in subunità del recettore è importante, in quanto produce differenze significative sia nelle proprietà biologiche del recettore, sia nella loro sensibilità alla modulazione allosterica, inclusa quella svolta dagli AAS. Ad esempio, è stato osservato che il 17 α -

metiltestosterone potenzia la risposta al GABA nei recettori contenenti la subunità $\alpha 2$, mentre esercita effetti minimi nei recettori contenenti la subunità $\alpha 1$ [189]. Al contrario, nei recettori contenenti la subunità ϵ , lo stesso AAS determina una modulazione allosterica negativa [190], riducendo le correnti evocate dal GABA e le aperture spontanee del recettore. Questi risultati suggeriscono che gli effetti degli AAS sulla trasmissione GABAergica dipendano fortemente dalla composizione in subunità del recettore. Sia nei modelli animali che nell'uomo, l'esposizione cronica agli AAS determina alterazioni della funzione riproduttiva, con una riduzione della frequenza di scarica dei neuroni GnRH e di conseguenza delle concentrazioni sieriche di LH ed FSH. È stato osservato che il trattamento con AAS aumenta in modo significativo la frequenza delle correnti postsinaptiche spontanee mediate da GABA_A, nonostante non modifichi l'espressione delle subunità di questi recettori, né le proprietà dei recettori postsinaptici presenti sui neuroni GnRH [191]. Questo suggerisce che il bersaglio principale degli AAS non siano direttamente i recettori GABA_A postsinaptici espressi sui neuroni GnRH, bensì il sito della loro azione si trovi sui neuroni presinaptici che forniscono afferenze GABAergiche a tali cellule. Tra le principali sorgenti di afferenze GABAergiche dirette ai neuroni GnRH ci sono popolazioni neuronali localizzate nella POA. A sostegno di questa ipotesi è stato visto che, nei topi maschi adolescenti, l'aumento degli input GABAergici ai neuroni GnRH è associato ad una maggior attività elettrica a livello dei neuroni localizzati nella POA, la quale rappresenta una delle regioni principali da cui originano afferenze dirette verso i neuroni GnRH. Inoltre, l'isolamento farmacologico o fisico delle afferenze GABAergiche nella POA, aboliva l'aumento della trasmissione GABAergica e la riduzione dell'attività dei neuroni GnRH indotti dagli AAS [191]. Complessivamente, questi risultati indicano che gli AAS agiscono principalmente sui neuroni GABAergici sensibili agli steroidi localizzati nella POA, determinando un aumento del tono GABAergico diretto ai neuroni GnRH. Anche nelle femmine, conseguentemente al trattamento con AAS, si verifica una riduzione dell'attività dei neuroni GnRH. Tuttavia, a differenza dei maschi, questi effetti sembrano dipendere maggiormente da alterazioni nel nucleo periventricolare e da una riduzione dell'espressione della kisspeptina, piuttosto che dai neuroni GABAergici della POA [192]. Gli AAS possono influenzare la trasmissione GABAergica non solo attraverso la modulazione diretta dei recettori GABA_A, ma anche attraverso il recettore androgenico (AR) o quello estrogenico (ER). È stato dimostrato che i neuroni della regione preottica

esprimono elevati livelli di AR, oltre che ER α ed aromatasi. Per valutare questo effetto, sono stati condotti studi usando topi privi di recettore androgenico funzionante (topi Tfm). Nei topi normali, il trattamento cronico con AAS portava ad un aumento dell'attività elettrica ed una modificazione nell'espressione di alcune subunità del recettore GABA_A [193], effetti invece assenti nei topi Tfm. Tuttavia, anche in questi topi il trattamento con AAS continuava a produrre effetti, tra cui una riduzione della trasmissione GABAergica nella POA e una diminuzione dell'espressione di GAD65, enzima coinvolto nella sintesi del GABA. Sono stati condotti diversi studi in cui è stato osservato che effetti simili venivano prodotti sia dal tamoxifene, antagonista dei recettori estrogenici, che dall'inibitore dell'aromatasi formestano, mentre la somministrazione di estradiolo aboliva gli effetti degli AAS. Queste evidenze hanno portato all'ipotesi che gli AAS interferiscano con la segnalazione estrogenica locale tramite una riduzione dell'attività dell'aromatasi a livello cerebrale [194]. Tale interpretazione è supportata anche da studi in vitro in cui è stata dimostrata la capacità di vari AAS di inibire l'aromatasi [195]. Nel complesso, questi risultati suggeriscono che gli AAS possano influenzare i circuiti neuroendocrini anche attraverso effetti diretti sugli enzimi coinvolti nella steroidogenesi. Infine, è importante sottolineare che la regolazione GABAergica dei neuroni GnRH è strettamente collegata con il sistema kisspeptinergico. La kisspeptina, infatti, è in grado anche di modulare indirettamente l'attività dei neuroni GnRH attraverso la regolazione della trasmissione GABAergica diretta a questi ultimi [196]. Questa relazione risulta però bidirezionale: la kisspeptina ha effetto sui neuroni GABAergici, ma a sua volta anche il GABA è in grado di modulare l'attività dei neuroni kisspeptinergici. Nei neuroni kisspeptinergici del nucleo arcuato, infatti, il GABA sembra contribuire, in parte, al feedback negativo esercitato dagli estrogeni, riducendo l'eccitabilità neuronale e di conseguenza la secrezione di kisspeptina [197]. Inoltre, è stato osservato che una parte dei neuroni kisspeptinergici, soprattutto nella POA, coesprime marcatori tipici dei neuroni GABAergici, cosa che suggerisce un'integrazione funzionale tra questi due sistemi.

Nel loro insieme, le evidenze disponibili dimostrano come il feedback negativo indotto dagli steroidi anabolizzanti androgeni sia il risultato di una complessa integrazione tra meccanismi genomici e non genomici, che possono essere mediati dall'attivazione diretta dei recettori androgenici ed estrogenici, ma anche dalla

modulazione di circuiti neuroendocrini, tra cui i neuroni KNDy e la trasmissione GABAergica. L'alterazione di tutti questi sistemi contribuisce alla soppressione della secrezione pulsatile di GnRH e alla conseguente riduzione della produzione di LH ed FSH. Queste modificazioni endocrine sono alla base delle alterazioni della funzione riproduttiva osservate negli utilizzatori di AAS, tra cui ipogonadismo ed infertilità.

6. Conseguenze e recupero

6.1 Ipogonadismo ed infertilità

Come descritto nel capitolo precedente, gli AAS, soprattutto dopo un utilizzo prolungato, sono in grado di esercitare un marcato feedback negativo sull'asse HPG attraverso molteplici meccanismi neuroendocrini. La conseguente soppressione della secrezione di GnRH e delle gonadotropine ipofisarie LH ed FSH determina una riduzione della produzione endogena di testosterone da parte delle cellule di Leydig e compromette il mantenimento fisiologico della spermatogenesi. Tali modificazioni rappresentano il principale meccanismo che porta allo sviluppo di ipogonadismo ed infertilità da parte degli utilizzatori di AAS. Inoltre, la gravità di queste alterazioni è influenzata da diversi fattori, tra cui il tipo di composto utilizzato, i dosaggi impiegati e la durata dell'esposizione. La soppressione di questo asse non sempre si risolve con la sospensione del trattamento, ma può persistere per periodi variabili, dando origine ad un quadro noto come ipogonadismo indotto da AAS (ASIH). L'ipogonadismo è una delle conseguenze endocrine più frequenti dell'abuso di AAS. Dal punto di vista endocrinologico, l'ASIH si presenta come una forma di ipogonadismo ipogonadotropo, con bassi livelli di testosterone associati a concentrazioni ridotte di LH ed FSH. Dopo la sospensione degli AAS, molti soggetti presentano bassi livelli di testosterone circolante, che sono associati a diversi sintomi come la riduzione della libido, disfunzione erettile, affaticamento, perdita di massa muscolare ed alterazioni dell'umore. La durata di questa condizione è molto variabile. Nella maggior parte dei soggetti si osserva un recupero completo della funzionalità gonadica nei mesi successivi alla sospensione, ma sono riportati in letterature numerosi casi di ASIH persistente [198]. Anche la spermatogenesi, come la produzione di testosterone, è governata dall'asse HPG. L'FSH agisce in maniera diretta su essa, attivando i propri recettori sulle cellule del Sertoli, mentre l'LH agisce in modo indiretto stimolando la

produzione di testosterone tramite l'azione sui recettori LHCGR sulle cellule di Leydig. Il testosterone a sua volta attiva l'AR espresso dalle cellule del Sertoli e promuove così l'espressione di geni essenziali per lo sviluppo e la maturazione delle cellule germinali. La somministrazione esogena di AAS risulta in livelli di androgeni circolanti molto elevati, ma per il mantenimento della spermatogenesi è fondamentale il testosterone intratesticolare. Quest'ultimo si trova solitamente a concentrazioni da 50 a 100 volte superiori rispetto a quelle presenti nel circolo sistemico mentre, in seguito all'abuso di AAS, si può osservare una drastica riduzione ed una sua caduta al di sotto dei livelli necessari per mantenere una normale produzione di spermatozoi [199]. Questo risulta in una condizione di oligozoospermia o, nei casi più gravi, anche azoospermia. La soppressione della spermatogenesi si associa anche ad atrofia testicolare. Infatti, i tubuli seminiferi, che sono la sede della produzione di spermatozoi, costituiscono circa due terzi del volume del testicolo. Per cui, quando la spermatogenesi viene inibita, si osserva una progressiva riduzione del volume testicolare, che si aggira tra il 16 e il 30% [200]. È stata anche rilevata una correlazione inversa tra la durata dell'abuso ed il volume testicolare, suggerendo che esposizioni più prolungate possano portare ad una compromissione più marcata della funzione gonadica e della spermatogenesi. La deficienza di testosterone può condurre anche allo sviluppo di disfunzione erettile, uno dei sintomi più frequenti derivanti dalla cessazione dell'utilizzo di AAS, per quanto non tutti gli uomini ipogonadici sperimentino questo sintomo. La riduzione della libido associata al deficit androgenico è uno dei principali meccanismi coinvolti. Uno studio ha riportato un calo del desiderio sessuale nel 57% dei soggetti coinvolti e circa nel 27% dei casi anche disfunzione erettile [202]. Questa problematica però, può avere anche cause psicologiche, si possono infatti osservare insoddisfazione sessuale, difficoltà relazionali e preoccupazione per il recupero della funzione sessuale, che possono aggravare il problema o protrarlo nel tempo. È stato infatti notato che, in alcuni soggetti, le alterazioni della libido e la disfunzione erettile persistevano anche dopo la normalizzazione dei livelli di testosterone, suggerendo il coinvolgimento anche di fattori psicologici e neurobiologici [203]. Sebbene meno frequenti, sono stati riportati episodi di disfunzione erettile anche durante il trattamento con AAS, il cui meccanismo non è del tutto chiarito, ma potrebbe dipendere da uno squilibrio tra androgeni ed estrogeni, in quanto anche l'estradiolo contribuisce alla funzionalità erettile [201]. Sebbene la maggioranza dei dati disponibili si riferisca ad utilizzatori di sesso maschile, anche

nelle donne l'abuso di AAS può portare ad alterazioni della funzione riproduttiva. Si verifica infatti una soppressione della produzione di gonadotropine che determina irregolarità mestruali, anovulazione ed una riduzione della fertilità.

6.2 Recovery

Esistono numerosi approcci utilizzabili per ripristinare la funzionalità dell'asse HPG e la spermatogenesi dopo l'utilizzo di AAS o dopo terapia con testosterone. Tra essi possiamo elencare i più importanti:

- interruzione dell'uso di questi ormoni sperando in un recovery spontaneo;
- utilizzo di diverse terapie farmacologiche come hCG, FSH, SERMs e inibitori di aromatasi (AIs), che possono essere usate in monoterapia o in combinazione [204];
- modificazioni dello stile di vita, come l'adozione di una dieta ricca di antiossidanti, vitamine e minerali, attività fisica regolare e riduzione dello stress;
- usare strategie per preservare la fertilità anche durante il trattamento con AAS o durante la terapia sostitutiva del testosterone.

La strategia tradizionalmente raccomandata è la sospensione del trattamento. Infatti, nella maggior parte dei soggetti, l'interruzione degli AAS è seguita da una graduale riattivazione spontanea dell'asse HPG, con recupero della funzione gonadica e riproduttiva. I tempi di recupero però risultano estremamente variabili e dipendenti da diversi fattori, tra cui età, durata del trattamento, dosaggi, tipo di composto utilizzato e funzionalità testicolare prima dell'uso degli AAS. Non esiste un intervallo temporale universalmente accettato per il recupero completo, ma è stato osservato che il recupero delle normali concentrazioni di LH avviene generalmente prima di quelle di FSH, mentre la spermatogenesi è di solito l'ultimo parametro ad andare incontro a normalizzazione. È stato fatto uno studio che prendeva in considerazione i livelli di inibina B ed Anti-Müllerian Hormone (AMH), usati come marker della funzionalità delle cellule del Sertoli e della spermatogenesi [205]. Da esso è stato visto che, anche dopo due anni e mezzo dalla sospensione, il 27,2% degli ex utilizzatori di AAS presentava livelli plasmatici di testosterone totale inferiori al limite di riferimento, ed una riduzione anche delle gonadotropine, oltre che dell'inibina B e di AMH. Liu e colleghi hanno svolto una metanalisi di 30 studi, comprensiva di oltre 1500 soggetti, azoospermici a causa

dell'utilizzo della terapia ormonale sostitutiva per la contraccezione maschile, la quale ha invece dimostrato che il recupero della spermatogenesi avviene nella maggior parte dei casi entro due anni dalla sospensione [206]. È necessario considerare però che tali dati derivano principalmente da studi sulla contraccezione ormonale maschile e potrebbero non essere completamente sovrapponibili all'uso degli steroidi anabolizzanti androgeni, spesso impiegati a dosaggi molto più elevati e per periodi prolungati. Molti ex utilizzatori ricorrono invece alla cosiddetta post-cycle therapy (PCT), ovvero all'impiego di farmaci volti a stimolare il recupero dell'asse HPG. È importante però sottolineare che, per nessun regime di PCT, esistono studi randomizzati controllati robusti che dimostrino l'efficacia di questi protocolli nel contesto dell'ipogonadismo e dell'infertilità derivanti dall'abuso di AAS, ma sono farmaci comunemente usati in altre forme di ipogonadismo. Tra le terapie utilizzate abbiamo l'utilizzo di gonadotropine, tra cui la gonadotropina corionica umana (hCG) ed FSH. hCG ha una struttura molto simile all'LH, e per tale motivo agisce come agonista del recettore LHCGR (Figura 12).

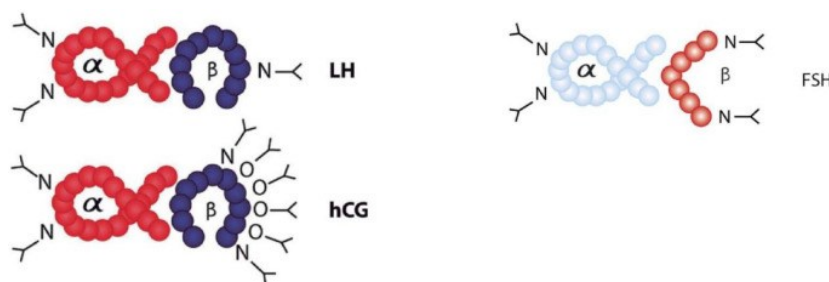


Figura 12: Struttura molecolare di LH, FSH e hCG [212]

In questo modo, hCG promuove un aumento del testosterone intratesticolare, promuovendo la spermatogenesi. Può essere utilizzata per via intramuscolare o sottocutanea, due o tre volte a settimana, e può essere somministrata in monoterapia oppure insieme a FSH/rFSH [207]. L'analogo dell'FSH deriva dall'urina delle donne in post-menopausa, ed è definito come gonadotropina menopausale umana. Questa proteina però, nella sua forma naturale è relativamente inattiva sul recettore dell'FSH. Ciò ha quindi portato allo sviluppo di una forma più specifica e biologicamente attiva sul recettore, soprattutto a livello delle cellule del Sertoli, chiamata rFSH o recombinant FSH [208]. Diversi studi hanno evidenziato che l'hCG da sola è in grado di preservare

o ripristinare la spermatogenesi in pazienti affetti da ipogonadismo ipogonadotropo. In alcuni casi però, la sola stimolazione delle cellule di Leydig non sia sufficiente per ottenere un recupero ottimale della fertilità, per questo l'hCG viene frequentemente associato a rFSH o alla gonadotropina menopausale umana. Le evidenze disponibili suggeriscono che l'associazione hCG-FSH possa risultare più efficace rispetto ad una monoterapia con hCG. In particolare, è stato visto che circa il 65% dei pazienti che avevano sviluppato azoospermia dopo la terapia sostitutiva del testosterone, è stato in grado, dopo un anno dalla sospensione, di recuperare una produzione spermatica significativa, mentre percentuali superiori al 90% sono state osservate nei soggetti con cryptozoospermia [209]. L'efficacia di tali strategie terapeutiche però, rimane supportata da studi su pazienti affetti da ipogonadismo ipogonadotropo o da infertilità derivante dalla terapia sostitutiva del testosterone. Per cui, ad oggi non esistono evidenze robuste e linee guida universalmente condivise per quanto riguarda l'applicazione di questi risultati ai pazienti affetti da ASIH. Altri farmaci utilizzati nel recovery sono i *selective estrogen receptor modulators* (SERMs), i quali competono con gli estrogeni per il legame al recettore estrogenico. Il normale legame degli estrogeni a questo recettore funziona come meccanismo di feedback negativo indiretto della produzione endogena di testosterone, pertanto i SERMs agiscono bloccando questo feedback e aumentando così i livelli di testosterone intratesticolare [210] e contribuiscono nel recupero della spermatogenesi. L'antagonismo esercitato su tali recettori, infatti, determina un aumento della secrezione di GnRH e di conseguenza delle gonadotropine LH ed FSH, favorendo il ripristino della steroidogenesi testicolare e della funzionalità riproduttiva. I SERMs più utilizzati sono il tamoxifene e il clomifene citrato, i quali agiscono prevalentemente a livello ipotalamico ed ipofisario. Il clomifene citrato rappresenta uno dei farmaci più utilizzati nella pratica clinica per il trattamento dell'ipogonadismo secondario e dell'infertilità maschile, sebbene questa seconda indicazione sia un uso off-label. È importante però sottolineare che il trattamento con clomifene presenta anche effetti indesiderati, tra cui cefalea, alterazione dell'umore, disturbi visivi e ginecomastia. Sono anche stati paradossalmente descritti rari casi di peggioramento della spermatogenesi, paradosso probabilmente spiegato dal fatto che il clomifene è venduto normalmente come miscela racemica ed uno dei suoi isomeri, il zuclomifene, è stato visto avere effetti come agonista del recettore estrogenico. Negli ultimi anni, infatti, si è avuto un particolare interesse per l'enclomifene [211], l'altro

isomero del clomifene. Esso è caratterizzato da un'attività antiestrogenica più selettiva e, in alcuni studi, si è dimostrato capace di aumentare i livelli di testosterone preservando contemporaneamente la spermatogenesi, per quanto siano necessari studi ulteriori per definirne il ruolo nel trattamento dell'ASIH.

L'ultima classe di farmaci utilizzati nel recupero della spermatogenesi sono gli inibitori di aromatasi (Als), tra cui ricordiamo anastrozolo e letrozolo. Essi funzionano inibendo l'enzima aromatasi, che converte il testosterone in estrogeni a livello dei testicoli, del fegato, del cervello e del tessuto adiposo [213]. Dato che gli estrogeni sono mediatori indiretti della soppressione dell'asse HPG, l'inibizione dell'aromatasi risulta infine in un aumento della produzione di gonadotropine. Sono quindi usati per migliorare la fertilità e i sintomi dell'ipogonadismo negli uomini, per quanto questo sia un uso off label. Sono principalmente usati in soggetti con un rapporto testosterone/estradiolo (T/E) basso o con aumentata aromatizzazione periferica. In questi soggetti hanno dimostrato di essere capaci di migliorare il rapporto T/E ed anche alcuni parametri seminali [214], soprattutto in persone affette da oligozoospermia. Possono essere inoltre prescritti insieme a testosterone esogeno o hCG, in modo da mitigare gli effetti avversi di iperestrogenemia o ginecomastia. Tuttavia, le evidenze relative al loro impiego nell'ipogonadismo ed infertilità associati all'utilizzo di AAS rimangono limitate. Sono infatti disponibili pochi studi ed in essi questi farmaci sono spesso usati in aggiunta ad altre terapie, come hCG o SERMs, rendendo difficile valutarne il contributo specifico. Oltre a questi trattamenti volti a favorire il recupero della funzione riproduttiva, sono stati proposti diversi approcci preventivi, in modo da preservare la spermatogenesi durante l'esposizione al testosterone esogeno. In particolare, vengono utilizzate basse dosi di hCG in concomitanza al testosterone, che si sono dimostrate in grado di mantenere la produzione di testosterone intratesticolare e sostenere la spermatogenesi, anche in presenza di soppressione delle gonadotropine endogene [216]. Un altro approccio consiste nell'utilizzo di formulazioni di testosterone a breve durata d'azione, come quella intranasale Natesto [215], che ha la capacità di mantenere livelli relativamente normali di LH ed FSH. Queste strategie sono però utilizzate principalmente durante la terapia sostitutiva del testosterone, piuttosto che nell'ambito dell'abuso di AAS.

6.3 Altri effetti avversi dell'abuso di AAS

Oltre alle problematiche derivanti dalla soppressione dell'asse HPG, tra cui ipogonadismo ed infertilità, l'abuso di AAS è associato anche a molti altri effetti avversi, che coinvolgono diversi organi e apparati (Figura 13). La gravità di questi ultimi dipende molto dal tipo di composto utilizzato, dal dosaggio, dal tempo di esposizione e dalla predisposizione individuale.

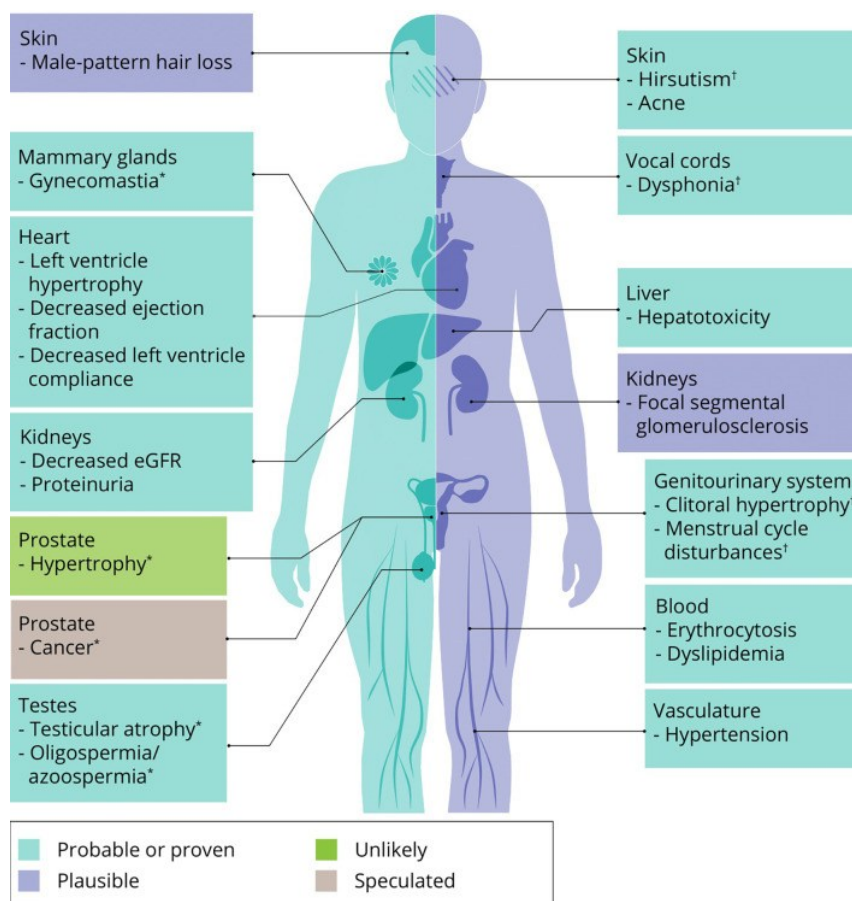


Figura 13: Panoramica degli effetti avversi potenzialmente causati dagli AAS, con classificazione della loro probabilità in base all'opinione degli autori. * = specifici per gli uomini, † = specifici per le donne [217]

Tra questi abbiamo la ginecomastia, definita come la crescita del tessuto ghiandolare del petto [218]. La causa di questa condizione è ormonale e deriva da uno squilibrio tra la concentrazione di androgeni e quella di estrogeni. In particolare, abbiamo una deficienza di androgeni ed un eccesso di estrogeni, che possono essere assoluti o relativi. Durante un ciclo con AAS, ne vengono somministrate dosi elevate, che risultano in un aumento dell'azione estrogenica in seguito ad aromatizzazione,

causando ginecomastia. Tuttavia, l'aumento è di entità proporzionalmente minore con l'aumentare delle dosi, a causa della saturazione dell'aromatasi. Per quanto non siano approvati per il trattamento della ginecomastia, i farmaci antiestrogenici come gli AIs e i SERMs sono utilizzati off label per trattare questa condizione. Un altro effetto avverso molto comune in seguito all'utilizzo di AAS è l'eritrocitosi o policitemia, ovvero un aumento dell'ematocrito o dell'emoglobina. È un effetto dose-dipendente ed è il più comune negli uomini anziani in terapia sostitutiva con testosterone. Il meccanismo non è completamente compreso, si ipotizza che con la somministrazione di testosterone ci sia la creazione di un nuovo punto di equilibrio tra emoglobina ed eritropoietina, con contemporanea soppressione dell'epcidina, un inibitore dell'assorbimento intestinale di ferro [219]. L'incidenza di questo effetto avverso dipende anche dalla formulazione di testosterone utilizzata: le iniezioni intramuscolari a breve durata di azione sono infatti associate ad un'incidenza più alta di eritrocitosi rispetto alle formulazioni a come gel, cerotti transdermici e iniezioni intramuscolari a lunga durata d'azione [220]. Tuttavia, questi dati si riferiscono alla terapia sostitutiva del testosterone e probabilmente non sono significativi nel contesto dell'abuso di AAS. Un aumento dell'ematocrito è una condizione clinicamente rilevante, in quanto è correlato ad una più elevata viscosità del sangue e di conseguenza maggior incidenza di eventi tromboembolici. Per quanto riguarda gli utilizzatori di AAS, inoltre, il rischio potrebbe essere aggravato da altri effetti dannosi come quelli sui lipidi ematici o sulla struttura e funzionalità cardiaca. Alcune persone utilizzano aspirina per trattare questa problematica. Essa non riduce i livelli di ematocrito ma agisce come anticoagulante, riducendo presumibilmente il rischio di trombosi. Tuttavia, il suo utilizzo a lungo termine può portare ad effetti collaterali, anche gravi. È noto che gli AAS esercitino un effetto dannoso anche sul fegato, in particolare quelli 17 α -alchilati. Essi portano infatti ad un aumento degli enzimi epatici aspartato aminotransferasi (AST) e alanina aminotransferasi (ALT), oltre che dell'enzima lattato deidrogenasi e alla gamma-glutamyl transpeptidasi (GGT). A volte si manifestano anche ittero e prurito, che fanno presupporre un aumento della bilirubina. Altri studi hanno documentato casi di carcinoma epatocellulare, adenoma e peliosi epatica in associazione all'uso di AAS. Il meccanismo di tossicità si ipotizza che derivi dall'attivazione del recettore androgenico, con conseguente produzione di reattivi dell'ossigeno e quindi danno epatico [221]. I marcatori AST, ALT e lattato deidrogenasi subiscono un aumento anche in risposta all'esercizio fisico e rimangono elevati per

circa 7 giorni. Quindi, considerando una media di 3-6 sessioni di allenamento da parte degli utilizzatori di AAS, l'interpretazione dei risultati richiede attenzione. Tuttavia, l'aumento di GGT non dipende dall'esercizio fisico, ma è indicatore di malattia epatica colestatica [222]. L'aumento complessivo di questi marcatori sierici, quindi, dovrebbe essere interpretato come segno di danno epatico. Tra gli effetti avversi più rilevanti abbiamo anche quelli a carico dell'apparato cardiovascolare. Diversi studi hanno infatti evidenziato un aumento della mortalità e della morbidità cardiovascolare negli utilizzatori di AAS rispetto alla popolazione generale, con maggior rischio di cardiomiopatia, fibrillazione atriale ed altre patologie. Le alterazioni cardiache coinvolte possono essere sia di tipo strutturale, con aumento della massa ventricolare sinistra, inspessimento della parete posteriore e del setto intraventricolare, che funzionali, soprattutto nella diastole, come una ridotta capacità di rilassamento del ventricolo sinistro e maggior rigidità della parete cardiaca [223]. Anche la funzione sistolica può essere compromessa. Alcune evidenze dimostrano che queste alterazioni possano essere, almeno in parte, reversibili dopo la sospensione degli AAS, ma non è ancora del tutto chiaro se esposizioni prolungate o cicli ripetuti possano dare danni permanenti. Gli AAS sembrano essere associati anche ad un aumento dei valori pressori. Sebbene non tutti gli studi abbiano osservato questo effetto, le evidenze più solide sembrano suggerire che l'uso di queste sostanze possa determinare un aumento della pressione arteriosa sistolica e diastolica. I meccanismi non sono completamente chiariti, ma sembrano coinvolgere fenomeni di vasocostrizione e il sistema renina-angiotensina-aldosterone [226]. Spesso gli AAS si associano anche ad alterazioni del profilo lipidico, considerate uno dei meccanismi principali attraverso cui queste sostanze aumentano il rischio cardiovascolare. In particolare, diversi studi hanno evidenziato una riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo HDL [227], soprattutto nel caso degli AAS 17 α -alchilati, e un aumento di quello LDL. Queste modificazioni portano ad un maggior rischio di sviluppo dell'aterosclerosi. Non sono ancora certi i meccanismi responsabili, ma sembrano coinvolgere un aumento dell'attività della lipasi epatica [227], che contribuisce al catabolismo delle HDL. In generale, le alterazioni a livello lipidico risultano più marcate con le formulazioni orali di AAS rispetto a quelle iniettabili, e sembrano comunque reversibili dopo la sospensione del trattamento. L'abuso di AAS è associato anche a diverse manifestazioni neuropsichiatriche, che sono probabilmente bidirezionali, infatti, da un

lato avviene il ricorso a queste sostanze proprio a causa di condizioni psichiatriche come la dismorfia muscolare [224], dall'altro lato l'esposizione a dosi sovrafisiologiche di androgeni può portare a sintomi neuropsichiatrici. Tra essi abbiamo euforia, aumento dell'energia e della libido, irritabilità, aggressività e alterazioni cognitive. In alcuni casi sono stati osservati anche stati di mania e sintomi psicotici [225]. I meccanismi non sono ancora completamente chiari, ma sembrano coinvolgere modificazioni a livello dei sistemi neurotrasmettitoriali ed alterazioni di aree cerebrali coinvolte nella regolazione delle emozioni. Alcune manifestazioni, inoltre, possono anche comparire o aggravarsi dopo la sospensione dell'utilizzo degli AAS. In questa fase possono infatti comparire sintomi depressivi, ansia e perdita di motivazione. Anche gli effetti renali sono stati oggetto di attenzione, sebbene le evidenze disponibili risultino meno solide. Alcuni studi hanno osservato un aumento dei livelli sierici di creatinina, la cui interpretazione risulta però complessa, poiché gli utilizzatori di tali sostanze fanno spesso ricorso ad una supplementazione con creatina [228]. Altri studi hanno invece evidenziato un aumento di marker potenzialmente indicativi dell'alterazione della funzionalità renale, come albuminuria e proteinuria [229]. In soggetti con storia di abuso prolungato di AAS sono anche stati descritti casi di glomerulosclerosi focale segmentaria [230], caratterizzata da danno glomerulare e perdita di proteine con le urine. È stato visto un miglioramento di questi parametri dopo la sospensione degli AAS, suggerendo un possibile ruolo causale di queste sostanze. Nonostante ciò, il numero limitato di studi e la presenza di molti fattori confondenti non consentono di definire con certezza il nesso tra queste sostanze e il danno renale cronico. L'abuso di AAS è associato anche ad effetti dermatologici, tra cui acne e alopecia androgenetica. L'acne è una delle manifestazioni più comuni e sembra essere dovuta all'aumento della produzione di sebo mediata dagli androgeni [231], oltre che da un'alterazione della normale cheratinizzazione follicolare. Anche l'alopecia androgenetica può essere favorita dall'uso di AAS, soprattutto nei soggetti geneticamente predisposti. Essa è correlata all'azione degli androgeni, soprattutto del DHT, sui follicoli piliferi del cuoio capelluto [232]. Gli AAS possono avere influenza anche sulla prostata e, per molti anni, è stato ipotizzato anche un legame tra l'esposizione agli androgeni e lo sviluppo di carcinoma prostatico. Tuttavia, ad oggi le evidenze disponibili non mostrano una chiara associazione, sebbene alcuni studi abbiano osservato lievi aumenti nei livelli di antigene prostatico specifico durante i cicli

di assunzione [233]. Infine, sebbene l'uso di AAS sia più frequente negli uomini, ricordiamo che anche un numero crescente di donne ricorre a queste sostanze. Nelle donne, oltre alle alterazioni della funzione riproduttiva, gli AAS possono indurre virilizzazione, a causa dell'aumento della concentrazione di androgeni. Tra le manifestazioni più frequenti abbiamo irsutismo, clitoridomegalia e abbassamento del tono della voce [234]. L'irsutismo è generalmente reversibile dopo sospensione [235], mentre gli altri effetti possono essere anche permanenti. Questi effetti sono particolarmente rilevanti anche perché possono comparire dopo brevi periodi di utilizzo degli AAS e avere un notevole impatto sulla vita delle utilizzatrici.

In conclusione, l'abuso di AAS rappresenta una problematica sanitaria complessa. Infatti, la profonda interferenza con i meccanismi di regolazione dell'asse HPG può determinare conseguenze riproduttive ed endocrine anche durature, a cui si associano anche numerosi effetti a livello di altri organi e apparati. Risulta quindi fondamentale, in futuro, arrivare ad una migliore comprensione dei meccanismi molecolari coinvolti nella soppressione dell'asse e nei processi di recupero, in modo sia da ottimizzare la gestione clinica dei soggetti affetti da ASIH, che per sviluppare strategie di prevenzione e informazione volte a contrastare l'uso non terapeutico di queste sostanze.

Bibliografia

1. Kendall EC, Mason HL, McKenzie BF, Myers CS, Koelsche GA. 1934. Isolation in crystalline form of the hormone essential to life from the supranetal cortex: its chemical nature and physiologic properties. *Trans Assoc Am Physicians* 49:147
2. Wang Y., Chen F., Ye L., Zirkin B., Chen H. Steroidogenesis in Leydig cells: Effects of aging and environmental factors. *Reproduction*. 2017;154:R111–R122. doi: 10.1530/REP-17-0064; PMID: 28747539; PMCID: [PMC5731485](#)
3. David W. Russell, Jean D. Wilson. 1994. STEROID 5 α -REDUCTASE: TWO GENES/TWO ENZYMES. *Annual Review Biochemistry*. 63:25-61. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.000325>
4. Naamneh Elzenaty R, du Toit T, Flück CE. Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022 Jul;36(4):101665. doi: 10.1016/j.beem.2022.101665. Epub 2022 May 6. PMID: 35595638.
5. Auchus RJ. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Nov;15(9):432-8. doi: 10.1016/j.tem.2004.09.004. PMID: 15519890.
6. Flück CE, Meyer-Böni M, Pandey AV, Kempná P, Miller WL, Schoenle EJ, Biason-Lauber A. Why boys will be boys: two pathways of fetal testicular androgen biosynthesis are needed for male sexual differentiation. *Am J Hum Genet*. 2011 Aug 12;89(2):201-18. doi: 10.1016/j.ajhg.2011.06.009. Epub 2011 Jul 28. Erratum in: *Am J Hum Genet*. 2011 Aug 12;89(2):347. PMID: 21802064; PMCID: PMC3155178.
7. Turcu AF, Rege J, Auchus RJ, Rainey WE. 11-Oxygenated androgens in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2020 May;16(5):284-296. doi: 10.1038/s41574-020-0336-x. Epub 2020 Mar 16. PMID: 32203405; PMCID: PMC7881526.
8. Russell DW, Wilson JD 1994 Steroid 5 alpha-reductase: Two genes/two enzymes. *Annu Rev Biochem* 63:25-61
9. Fang H., Tong W., Branham W.S., Moland C.L., Dial S.L., Hong H., Xie Q., Perkins R., Owens W., Sheehan D.M. Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem. Res. Toxicol*. 2003;16:1338–1358. doi: 10.1021/tx030011g.
10. Auchus R.J. The backdoor pathway to dihydrotestosterone. *Trends Endocrinol. Metab*. 2004;15:432–438. doi: 10.1016/j.tem.2004.09.004.
11. Schiffer L., Arlt W., Storbeck K.H. Intracrine androgen biosynthesis, metabolism and action revisited. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2018;465:4–26. doi: 10.1016/j.mce.2017.08.016.
12. Mauvais-Jarvis, F. & Lindsey, S. H. Metabolic benefits afforded by estradiol and testosterone in both sexes: clinical considerations. *J. Clin. Invest.* **134**, e180073 (2024)
13. Chaturvedi AP, Dehm SM. Androgen Receptor Dependence. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1210:333-350. doi: 10.1007/978-3-030-32656-2_15. PMID: 31900916; PMCID: PMC8990348.
14. Sutinen, P., Malinen, M., Palvimäki, J.J. (2016). Androgen Receptor. In: Simoni, M., Huhtaniemi, I. (eds) *Endocrinology of the Testis and Male Reproduction*. Endocrinology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-29456-8_12-1
15. Hannelore V. Heemers, Donald J. Tindall, Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex, *Endocrine Reviews*, Volume 28, Issue 7, 1 December 2007, Pages 778–808, <https://doi.org/10.1210/er.2007-0019>
16. Leung JK, Sadar MD. Non-Genomic Actions of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017 Jan 17;8:2. doi: 10.3389/fendo.2017.00002. PMID: 28144231; PMCID: PMC5239799.
17. Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids*. 2009 Jul;74(7):602-7. doi: 10.1016/j.steroids.2008.11.017. Epub 2008 Nov 27. PMID: 19095000.
18. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, Chen X, Yarasheski KE, Magliano L, Dzekov C, Dzekov J, Bross R, Phillips J, Sinha-Hikim I, Shen R, Storer TW. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Dec;281(6):E1172-81. doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1172. PMID: 11701431.
19. Sebo ZL, Rodeheffer MS. Testosterone metabolites differentially regulate obesogenesis and fat distribution. *Mol Metab*. 2021 Feb;44:101141. doi: 10.1016/j.molmet.2020.101141. Epub 2020 Dec 9. PMID: 33307216; PMCID: PMC7772371.
20. Xu W, Schiffer L, Qadir MMF, Zhang Y, Hawley J, Mota De Sa P, Keevil BG, Wu H, Arlt W, Mauvais-Jarvis F. Intracrine Testosterone Activation in Human Pancreatic β -Cells Stimulates Insulin Secretion. *Diabetes*. 2020 Nov;69(11):2392-2399. doi: 10.2337/db20-0228. Epub 2020 Aug 27. PMID: 32855171; PMCID: PMC7576567.
21. Khosla S, Monroe DG. Regulation of Bone Metabolism by Sex Steroids. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 Jan 2;8(1):a031211. doi: 10.1101/cshperspect.a031211. PMID: 28710257; PMCID: PMC5749141.
22. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de Zeigler D, Collins P. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*. 1999 Oct 19;100(16):1690-6. doi: 10.1161/01.cir.100.16.1690. PMID: 10525487.
23. Bachman E, Travison TG, Basaria S, Davda MN, Guo W, Li M, Connor Westfall J, Bae H, Gordeuk V, Bhasin S. Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin:

- evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun;69(6):725-35. doi: 10.1093/gerona/glt154. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24158761; PMCID: PMC4022090.
24. Williams R.T. Wiley; New York: 1959. Detoxication Mechanisms; the Metabolism and Detoxication of Drugs, Toxic Substances, and Other Organic Compounds.
 25. Jin Y., Duan L., Lee S.H., Kloosterboer H.J., Blair I.A., Penning T.M. Human cytosolic hydroxysteroid dehydrogenases of the aldo-ketoreductase superfamily catalyze reduction of conjugated steroids: implications for phase I and phase II steroid hormone metabolism. *J. Biol. Chem*. 2009;284:10013–10022. doi: 10.1074/jbc.M809465200.
 26. Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, Gilligan LC, Taylor AE, Arlt W, Shackleton CHL, Storbeck KH. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019 Nov;194:105439. doi: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439. Epub 2019 Jul 27. PMID: 31362062; PMCID: PMC6857441.
 27. David Josephy P., Peter Guengerich F., Miners J.O. "Phase I and phase II" drug metabolism: terminology that we should phase out? *Drug Metab. Rev*. 2005;37:575–580. doi: 10.1080/03602530500251220.
 28. Janne O., Vihko R., Sjövall J., Sjövall K., Jänne O., Vihko R., Sjövall J., Sjövall K. Determination of steroid mono- and disulfates in human plasma. *Clin Chim Acta*. 1969;23:405–412. doi: 10.1016/0009-8981(69)90340-4
 29. Miyabo S., Kornel L. Corticosteroids in human blood—VI. Isolation, characterization and quantitation of sulfate conjugated metabolites of cortisol in human plasma. *J. Steroid Biochem*. 1974;5:233–247. doi: 10.1016/0022-4731(74)90137-x.
 30. van Kammen E., Thijssen J.H., Donker G.H., Schwarz F. The excretion of metabolites of testosterone and of estradiol in male patients with chronic renal failure. *Steroids*. 1975;26:508–515. doi: 10.1016/0039-128x(75)90070-7.
 31. Hellman L., Rosenfeld R.S. Metabolism of testosterone-1,2-³H in man. Distribution of the major 17-ketosteroid metabolites in plasma: relation to thyroid states. *J Clin Endocrinol Metab*. 1974;38:424–435. doi: 10.1210/jcem-38-3-424.
 32. Sanberg A., Slaunwhite W.R. The metabolic fate of C14 -progesterone in human subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1958;18:253–265. doi: 10.1210/jcem-18-3-253.
 33. Laatikainen T. Quantitative studies on the excretion of glucuronide and mono- and disulphate conjugates of neutral steroids in human bile. *Ann Clin Res*. 1970;2:338–349.
 34. Keevil B.G. Novel liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods for measuring steroids, *Best Pr. Res Clin Endocrinol Metab*. 2013;27:663–674. doi: 10.1016/j.beem.2013.05.015.
 35. Handelsman DJ. Commentary: androgens and "anabolic steroids": the one-headed janus. *Endocrinology* (2011) 152:1752–4. doi: 10.1210/en.2010-1501
 36. Kanayama G, Pope HG Jr. History and epidemiology of anabolic androgens in athletes and non-athletes. *Mol Cell Endocrinol*. 2018;464:4–13.
 37. Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A, Casaburi R. The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med*. 1996;335(1):1–7.
 38. McBride, J Abram; Coward, Robert M. Recovery of spermatogenesis following testosterone replacement therapy or anabolic-androgenic steroid use. *Asian Journal of Andrology* 18(3):p 373-380, May–Jun 2016. | DOI: 10.4103/1008-682X.173938
 39. Sinha A, Deb VK, Datta A, Yadav S, Phulkar A, Adhikari S. Evaluation of structural features of anabolic-androgenic steroids: entanglement for organ-specific toxicity. *Steroids*. 2024 Dec;212:109518. doi: 10.1016/j.steroids.2024.109518. Epub 2024 Sep 24. PMID: 39322097.
 40. Schänzer W, Horning S, Donike M. Metabolism of anabolic steroids in humans: synthesis of 6 beta-hydroxy metabolites of 4-chloro-1,2-dehydro-17 alpha-methyltestosterone, fluoxymesterone, and metandienone. *Steroids*. 1995 Apr;60(4):353-66. doi: 10.1016/0039-128x(95)00008-e. PMID: 8539789.
 41. van der Vies J. Pharmacokinetics of anabolic steroids. *Wien Med Wochenschr*. 1993;143(14-15):366-8. PMID: 8256448.
 42. A.J. Birch, Hydroaromatic steroid hormones. Part I. 10-Nortestosterone. *J. Chem. Soc.* (1950)367-368. <https://doi.org/10.1039/JR9500000367>. A.J. Birch, Hydroaromatic steroid hormones. Part I. 10-Nortestosterone. *J. Chem. Soc.* (1950)367-368. <https://doi.org/10.1039/JR9500000367>.
 43. Lee WJ, Thompson RW, McClung JM, Carson JA. Regulation of androgen receptor expression at the onset of functional overload in rat plantaris muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2003 Nov;285(5):R1076-85. doi: 10.1152/ajpregu.00202.2003. PMID: 14557238.
 44. R. Kazlauskas, Designer steroids. In: *Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis*. (2010)155-185.
 45. Minto CF, Howe C, Wishart S, Conway AJ, Handelsman DJ. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of nandrolone esters in oil vehicle: effects of ester, injection site and injection volume. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Apr;281(1):93-102. PMID: 9103484.
 46. Alkalay D, Khemani L, Wagner WE Jr, Bartlett MF. Sublingual and oral administration of methyltestosterone. A comparison of drug bioavailability. *J Clin Pharmacol New Drugs*. 1973 Apr;13(4):142-51. doi: 10.1002/j.1552-4604.1973.tb00075.x. PMID: 4487164.

47. Patel M, Muthigi A, Ramasamy R. JATENZO®: Challenges in the development of oral testosterone. *Int J Impot Res*. 2022 Nov;34(7):721-724. doi: 10.1038/s41443-021-00461-4. Epub 2021 Aug 5. PMID: 34354245.
48. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses*. 2016 Aug;93:150-3. doi: 10.1016/j.mehy.2016.06.004. Epub 2016 Jun 5. PMID: 27372877.
49. Grishkovskaya I, Avvakumov GV, Sklenar G, Dales D, Hammond GL, Muller YA. Crystal structure of human sex hormone-binding globulin: steroid transport by a laminin G-like domain. *EMBO J*. 2000 Feb 15;19(4):504-12. doi: 10.1093/emboj/19.4.504. PMID: 10675319; PMCID: PMC305588.
50. Bhasin S, Woodhouse L, Casaburi R, Singh AB, Bhasin D, Berman N, Chen X, Yarasheski KE, Magliano L, Dzekov C, Dzekov J, Bross R, Phillips J, Sinha-Hikim I, Shen R, Storer TW. Testosterone dose-response relationships in healthy young men. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Dec;281(6):E1172-81. doi: 10.1152/ajpendo.2001.281.6.E1172. PMID: 11701431.
51. Albano GD, Amico F, Cocimano G, Liberto A, Maglietta F, Esposito M, Rosi GL, Di Nunno N, Salerno M, Montana A. Adverse Effects of Anabolic-Androgenic Steroids: A Literature Review. *Healthcare (Basel)*. 2021 Jan 19;9(1):97. doi: 10.3390/healthcare9010097. PMID: 33477800; PMCID: PMC7832337.
52. Park J, McIlvain V, Rosenberg J, Donovan L, Desai P, Kim JY. The mechanisms of anabolic steroids, selective androgen receptor modulators and myostatin inhibitors. *Korean J Sports Med*. 2022;40(2):67–85. doi: 10.5763/kjssm.2022.40.2.67
53. Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Mar 18;328(3):688-96. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.097. PMID: 15694402.
54. Vanberg P, Atar D. Androgenic anabolic steroid abuse and the cardiovascular system. *Handb Exp Pharmacol*. 2010;(195):411-57. doi: 10.1007/978-3-540-79088-4_18. PMID: 20020375.
55. Rahnema CD, Lipshultz LI, Crosnoe LE, Kovac JR, Kim ED. Anabolic steroid-induced hypogonadism: diagnosis and treatment. *Fertil Steril*. 2014 May;101(5):1271-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.002. Epub 2014 Mar 14. PMID: 24636400.
56. Gullett NP, Hebbard G, Ziegler TR. Update on clinical trials of growth factors and anabolic steroids in cachexia and wasting. *Am J Clin Nutr*. 2010 Apr;91(4):1143S-1147S. doi: 10.3945/ajcn.2010.28608E. Epub 2010 Feb 17. PMID: 20164318; PMCID: PMC2844687.
57. Nieschlag E, Kumar N, Sitruk-Ware R. 7 α -methyl-19-nortestosterone (MENTR): the population council's contribution to research on male contraception and treatment of hypogonadism. *Contraception*. 2013 Mar;87(3):288-95. doi: 10.1016/j.contraception.2012.08.036. Epub 2012 Oct 10. PMID: 23063338.
58. Brennan BP, Kanayama G, Pope HG Jr. Performance-enhancing drugs on the web: a growing public-health issue. *Am J Addict*. 2013 Mar-Apr;22(2):158-61. doi: 10.1111/j.1521-0391.2013.00311.x. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23414502; PMCID: PMC3578418.
59. Smith-Morris AD, Lien K, Arnold BE. Pharmacist assessment to prevent inadvertent prohibited substance use among competitive strength athletes. *Can Pharm J (Ott)*. 2018 Aug 17;151(6):372-376. doi: 10.1177/1715163518790990. PMID: 30559911; PMCID: PMC6293405.
60. Gudermann T, Nichols C, Levy FO, Birnbaumer M, Birnbaumer L. Ca²⁺ mobilization by the LH receptor expressed in *Xenopus* oocytes independent of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate formation: evidence for parallel activation of two signaling pathways. *Mol Endocrinol*. 1992 Feb;6(2):272-8. doi: 10.1210/mend.6.2.1314958. PMID: 1314958.
61. Lubahn DB, Joseph DR, Sar M, Tan J, Higgs HN, Larson RE, French FS, Wilson EM 1988 The human androgen receptor: Complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* 2(12):1265-1275
62. Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, Chang C, Herman JG, Isaacs WB, Nassif N.1998 Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells.*Cancer Res*. 58(23): 5310-4.
63. Hay CW, Watt K, Hunter I, Lavery DN, MacKenzie A, McEwan IJ 2014 Negative regulation of the androgen receptor gene through a primate-specific androgen response element present in the 5' UTR. *Horm Cancer* 5(5):299-311
64. McEwan IJ, Brinkmann AO. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders. 2021 Jul 2. In: Feingold KR, Adler RA, Ahmed SF, Anawalt B, Blackman MR, Chrousos G, Corpas E, de Herder WW, Dhatriya K, Dungan K, Hamilton E, Hofland J, Jan de Beur S, Kalra S, Kaltsas G, Kapoor N, Kim M, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, Muzumdar R, Purnell J, Rey R, Sahay R, Shah AS, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000–. PMID: 25905257.
65. Pereira B, Billaud M, Almeida R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. *Trends Cancer*. 2017 Jul;3(7):506-528. doi: 10.1016/j.trecan.2017.05.003. Epub 2017 Jun 20. PMID: 28718405.
66. Likos E, Bhattarai A, Weyman CM, Shukla GC. The androgen receptor messenger RNA: what do we know? *RNA Biol*. 2022 Jan;19(1):819-828. doi: 10.1080/15476286.2022.2084839. PMID: 35704670; PMCID: PMC9225383.
67. Xinze Yu, Ping Yi, Structural Insights of Transcriptionally Active, Full-Length Androgen Receptor Coactivator Complexes, *Journal of the Endocrine Society*, Volume 5, Issue Supplement_1, April-May 2021, Page A817, <https://doi.org/10.1210/jendso/bvab048.1665>

68. Li X, Xiong H, Mou X, Huang C, Thomas ER, Yu W, Jiang Y, Chen Y. Androgen receptor cofactors: A potential role in understanding prostate cancer. *Biomed Pharmacother.* 2024 Apr;173:116338. doi: 10.1016/j.biopha.2024.116338. Epub 2024 Feb 27. PMID: 38417290.
69. Eftekharzadeh B, Piai A, Chiesa G, Mungianu D, García J, Pierattelli R, Felli IC, Salvatella X. Sequence Context Influences the Structure and Aggregation Behavior of a PolyQ Tract. *Biophys J.* 2016 Jun 7;110(11):2361-2366. doi: 10.1016/j.bpj.2016.04.022. PMID: 27276254; PMCID: PMC4900447.
70. Schaufele F, Carbonell X, Guerbodot M, Borngraeber S, Chapman MS, Ma AA, Miner JN, Diamond MI. The structural basis of androgen receptor activation: intramolecular and intermolecular amino-carboxy interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Jul 12;102(28):9802-7. doi: 10.1073/pnas.0408819102. Epub 2005 Jul 1. PMID: 15994236; PMCID: PMC1168953.
71. He B, Kempainen JA, Wilson EM. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH2-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28;275(30):22986-94. doi: 10.1074/jbc.M002807200. PMID: 10816582.
72. Chen L, Zhang Z, Han Q, Maity BK, Rodrigues L, Zboril E, Adhikari R, Ko SH, Li X, Yoshida SR, Xue P, Smith E, Xu K, Wang Q, Huang TH, Chong S, Liu Z. Hormone-induced enhancer assembly requires an optimal level of hormone receptor multivalent interactions. *Mol Cell.* 2023 Oct 5;83(19):3438-3456.e12. doi: 10.1016/j.molcel.2023.08.027. Epub 2023 Sep 21. PMID: 37738977; PMCID: PMC10592010.
73. Zoppi S, Marcelli M, Deslypere JP, Griffin JE, Wilson JD, McPhaul MJ. Amino acid substitutions in the DNA-binding domain of the human androgen receptor are a frequent cause of receptor-binding positive androgen resistance. *Mol Endocrinol.* 1992 Mar;6(3):409-15. doi: 10.1210/mend.6.3.1316540. PMID: 1316540.
74. Jääskeläinen J, Mongan NP, Harland S, Hughes IA. Five novel androgen receptor gene mutations associated with complete androgen insensitivity syndrome. *Hum Mutat.* 2006 Mar;27(3):291. doi: 10.1002/humu.9405. PMID: 16470553.
75. Xu HE, Stanley TB, Montana VG, Lambert MH, Shearer BG, Cobb JE, McKee DD, Galardi CM, Plunket KD, Nolte RT, Parks DJ, Moore JT, Kliewer SA, Willson TM, Stimmel JB. Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha. *Nature.* 2002 Feb 14;415(6873):813-7. doi: 10.1038/415813a. PMID: 11845213.
76. van der Steen T, Tindall DJ, Huang H. Posttranslational modification of the androgen receptor in prostate cancer. *Int J Mol Sci.* 2013 Jul 16;14(7):14833-59. doi: 10.3390/ijms140714833. PMID: 23863692; PMCID: PMC3742275.
77. Pereira de Jesus-Tran K, Côté PL, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci.* 2006 May;15(5):987-99. doi: 10.1110/ps.051905906. PMID: 16641486; PMCID: PMC2242507.
78. Kaku N, Matsuda K, Tsujimura A, Kawata M. Characterization of nuclear import of the domain-specific androgen receptor in association with the importin alpha/beta and Ran-guanosine 5'-triphosphate systems. *Endocrinology.* 2008 Aug;149(8):3960-9. doi: 10.1210/en.2008-0137. Epub 2008 Apr 17. PMID: 18420738; PMCID: PMC2488236.
79. Klocker H, Gromoll J, Cato ACB, Nieschlag S. The androgen receptor: molecular biology. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Testosterone: Action, Deficiency, Substitution.* Cambridge University Press; 2004:39-92.
80. Saporita AJ, Zhang Q, Navai N, Dincer Z, Hahn J, Cai X, Wang Z. Identification and characterization of a ligand-regulated nuclear export signal in androgen receptor. *J Biol Chem.* 2003 Oct 24;278(43):41998-2005. doi: 10.1074/jbc.M302460200. Epub 2003 Aug 15. PMID: 12923188.
81. Augello MA, Hickey TE, Knudsen KE. FOXA1: master of steroid receptor function in cancer. *EMBO J.* 2011 Sep 20;30(19):3885-94. doi: 10.1038/emboj.2011.340. PMID: 21934649; PMCID: PMC3209791.
82. Wu D, Sunkel B, Chen Z, Liu X, Ye Z, Li Q, Grenade C, Ke J, Zhang C, Chen H, Nephew KP, Huang TH, Liu Z, Jin VX, Wang Q. Three-tiered role of the pioneer factor GATA2 in promoting androgen-dependent gene expression in prostate cancer. *Nucleic Acids Res.* 2014 Apr;42(6):3607-22. doi: 10.1093/nar/gkt1382. Epub 2014 Jan 13. PMID: 24423874; PMCID: PMC3973339.
83. Shang, Y.; Myers, M.; Brown, M. Formation of the Androgen Receptor Transcription Complex. *Mol. Cell* **2002**, *9*, 601–610.
84. Lee N, Steitz JA. Noncoding RNA-guided recruitment of transcription factors: A prevalent but undocumented mechanism? *Bioessays.* 2015 Sep;37(9):936-41. doi: 10.1002/bies.201500060. Epub 2015 Jul 22. PMID: 26200477; PMCID: PMC4721591.
85. Carascossa S, Gobinet J, Georget V, Lucas A, Badia E, Castet A, White R, Nicolas JC, Cavallès V, Jalaguier S. Receptor-interacting protein 140 is a repressor of the androgen receptor activity. *Mol Endocrinol.* 2006 Jul;20(7):1506-18. doi: 10.1210/me.2005-0286. Epub 2006 Mar 9. PMID: 16527872; PMCID: PMC2246011.
86. Huang CF, Lingadahalli S, Morova T, Ozturan D, Hu E, Yu IPL, Linder S, Hoogstraat M, Stelloo S, Sar F, van der Poel H, Altintas UB, Saffarzadeh M, Le Bihan S, McConeghy B, Gokbayrak B, Feng FY, Gleave ME, Bergman AM, Collins C, Hach F, Zwart W, Emberly E, Lack NA. Functional mapping of androgen receptor enhancer activity. *Genome Biol.* 2021 May 11;22(1):149. doi: 10.1186/s13059-021-02339-6. PMID: 33975627; PMCID: PMC8112059.
87. DePrimo SE, Diehn M, Nelson JB, Reiter RE, Matese J, Fero M, Tibshirani R, Brown PO, Brooks JD. Transcriptional programs activated by exposure of human prostate cancer cells to androgen. *Genome Biol.*

- 2002 Jun 14;3(7):RESEARCH0032. doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0032. Epub 2002 Jun 14. PMID: 12184806; PMCID: PMC126237.
88. Massie CE, Lynch A, Ramos-Montoya A, Boren J, Stark R, Fazli L, Warren A, Scott H, Madhu B, Sharma N, Bon H, Zecchini V, Smith DM, Denicola GM, Mathews N, Osborne M, Hadfield J, Macarthur S, Adryan B, Lyons SK, Brindle KM, Griffiths J, Gleave ME, Rennie PS, Neal DE, Mills IG. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* 2011 May 20;30(13):2719-33. doi: 10.1038/emboj.2011.158. PMID: 21602788; PMCID: PMC3155295.
 89. Dehm SM, Schmidt LJ, Heemers HV, Vessella RL, Tindall DJ. Splicing of a novel androgen receptor exon generates a constitutively active androgen receptor that mediates prostate cancer therapy resistance. *Cancer Res.* 2008 Jul 1;68(13):5469-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0594. PMID: 18593950; PMCID: PMC2663383.
 90. Yu WH, McGinnis MY. Androgen receptors in cranial nerve motor nuclei of male and female rats. *J Neurobiol.* 2001 Jan;46(1):1-10. doi: 10.1002/1097-4695(200101)46:1<1::aid-neu1>3.0.co;2-u. PMID: 11108611.
 91. Ikeda S, Kamikawa Y, Ohwatashi A, Harada K, Yoshida A. The effect of anabolic steroid administration on passive stretching-induced expression of mechano-growth factor in skeletal muscle. *ScientificWorldJournal.* 2013 Aug 25;2013:313605. doi: 10.1155/2013/313605. PMID: 24062630; PMCID: PMC3767052.
 92. Cai C, He HH, Chen S, Coleman I, Wang H, Fang Z, Chen S, Nelson PS, Liu XS, Brown M, Balk SP. Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1. *Cancer Cell.* 2011 Oct 18;20(4):457-71. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.001. PMID: 22014572; PMCID: PMC3225024.
 93. Wu L, Runkle C, Jin HJ, Yu J, Li J, Yang X, Kuzel T, Lee C, Yu J. CCN3/NOV gene expression in human prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor. *Oncogene.* 2014 Jan 23;33(4):504-13. doi: 10.1038/onc.2012.602. Epub 2013 Jan 14. PMID: 23318417; PMCID: PMC3796014.
 94. Chaturvedi AP, Dehm SM. Androgen Receptor Dependence. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1210:333-350. doi: 10.1007/978-3-030-32656-2_15. PMID: 31900916; PMCID: PMC8990348.
 95. Pereira de Jésus-Tran K, Côté PL, Cantin L, Blanchet J, Labrie F, Breton R. Comparison of crystal structures of human androgen receptor ligand-binding domain complexed with various agonists reveals molecular determinants responsible for binding affinity. *Protein Sci.* 2006 May;15(5):987-99. doi: 10.1110/ps.051905906. PMID: 16641486; PMCID: PMC2242507.
 96. Holterhus PM, Piefke S, Hiort O. Anabolic steroids, testosterone-precursors and virilizing androgens induce distinct activation profiles of androgen responsive promoter constructs. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002 Nov;82(4-5):269-75. doi: 10.1016/s0960-0760(02)00220-0. PMID: 12589933.
 97. Heinlein CA, Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev.* 2002 Apr;23(2):175-200. doi: 10.1210/edrv.23.2.0460. PMID: 11943742.
 98. Gao W, Kearbey JD, Nair VA, Chung K, Parlow AF, Miller DD, Dalton JT. Comparison of the pharmacological effects of a novel selective androgen receptor modulator, the 5alpha-reductase inhibitor finasteride, and the antiandrogen hydroxyflutamide in intact rats: new approach for benign prostate hyperplasia. *Endocrinology.* 2004 Dec;145(12):5420-8. doi: 10.1210/en.2004-0627. Epub 2004 Aug 12. PMID: 15308613; PMCID: PMC2098692.
 99. Hiller-Sturmhöfel S, Bartke A. The endocrine system: an overview. *Alcohol Health Res World.* 1998;22(3):153-64. PMID: 15706790; PMCID: PMC6761896.
 100. Oyola MG, Handa RJ. Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress.* 2017 Sep;20(5):476-494. doi: 10.1080/10253890.2017.1369523. Epub 2017 Aug 31. PMID: 28859530; PMCID: PMC5815295.
 101. Toufexis D, Rivarola MA, Lara H, Viau V. Stress and the reproductive axis. *J Neuroendocrinol.* 2014 Sep;26(9):263-86. doi: 10.1111/jne.12179. PMID: 25040027; PMCID: PMC4166402.
 102. Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology.* 1982 Nov;111(5):1737-9. doi: 10.1210/endo-111-5-1737. PMID: 6751801.
 103. Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E. Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science.* 1978 Nov 10;202(4368):631-3. doi: 10.1126/science.100883. PMID: 100883.
 104. Lerrant Y, Kottler ML, Bergametti F, Mounni M, Blumberg-Tick J, Counis R. Expression of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene is altered by GnRH agonist desensitization in a manner similar to that of gonadotropin beta-subunit genes in normal and castrated rat pituitary. *Endocrinology.* 1995 Jul;136(7):2803-8. doi: 10.1210/endo.136.7.7789305. PMID: 7789305.
 105. Lee, V.H.Y., Lee, L.T.O. and Chow, B.K.C. (2008), Gonadotropin-releasing hormone: regulation of the *GnRH* gene. *The FEBS Journal*, 275: 5458-5478. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06676.x>
 106. Whyte, D & Lawson, Mark & Belsham, Denise & Eraly, Satish & Bond, Chris & Adelman, J & Mellon, Pamela. (1995). A neuron-specific enhancer targets expression of the gonadotropin-releasing hormone gene to hypothalamic neurosecretory neurons. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.). 9. 467-77. doi: 10.1210/me.9.4.467.
 107. Gan L, Ni PY, Ge Y, Xiao YF, Sun CY, Deng L, Zhang W, Wu SS, Liu Y, Jiang W, Xin HB. Histone deacetylases regulate gonadotropin-releasing hormone I gene expression via modulating Otx2-driven

- transcriptional activity. *PLoS One*. 2012;7(6):e39770. doi: 10.1371/journal.pone.0039770. Epub 2012 Jun 25. PMID: 22761896; PMCID: PMC3382570.
108. Gaskins GT, Glanowska KM, Moenter SM. Activation of neurokinin 3 receptors stimulates GnRH release in a location-dependent but kisspeptin-independent manner in adult mice. *Endocrinology*. 2013 Nov;154(11):3984-9. doi: 10.1210/en.2013-1479. Epub 2013 Aug 8. PMID: 23928373; PMCID: PMC3800761.
 109. Colledge, W. H., Aparicio, S. A. J. R., Crowley, W. F., Carlton, M. B. L., O'Rahilly, S., Gusella, J. F., Slaugenhaupt, S. A., Kaiser, U. B., Dixon, J., Zahn, D., Hendrick, A. G., Schwinof, K. M., Kuohung, W., Bo-Abbas, Y., Shagoury, J. K., Acierno, J. S., Thresher, R. R., Chatzidaki, E. E., Messenger, S., & Seminara, S. B. (2003). The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *New England Journal of Medicine*, 349(17), 1614–1627. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa035322>
 110. Pinilla L, Aguilar E, Dieguez C, Millar RP, Tena-Sempere M. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological Reviews*. 2012 Jul;92(3):1235-1316. DOI: 10.1152/physrev.00037.2010. PMID: 22811428.
 111. Coutinho, Eulalia & Prescott, Mel & Hessler, Sabine & Marshall, Christopher & Herbison, Allan & Campbell, Rebecca. (2019). Activation of a Classic Hunger Circuit Slows Luteinizing Hormone Pulsatility. *Neuroendocrinology*. 110. 10.1159/000504225.
 112. Juan Roa, Allan E. Herbison, Direct Regulation of GnRH Neuron Excitability by Arcuate Nucleus POMC and NPY Neuron Neuropeptides in Female Mice, *Endocrinology*, Volume 153, Issue 11, 1 November 2012, Pages 5587–5599, <https://doi.org/10.1210/en.2012-1470>
 113. Stephanie Constantin, Katherine Pizano, Kaya Matson, Yufei Shan, Daniel Reynolds, Susan Wray, An Inhibitory Circuit From Brainstem to GnRH Neurons in Male Mice: A New Role for the RFRP Receptor, *Endocrinology*, Volume 162, Issue 5, May 2021, bqab030, <https://doi.org/10.1210/endo/bqab030>
 114. Mohammed Z. Rizwan, Matthew C. Poling, Maggie Corr, Pamela A. Cornes, Rachael A. Augustine, Janette H. Quennell, Alexander S. Kauffman, Greg M. Anderson, RFamide-Related Peptide-3 Receptor Gene Expression in GnRH and Kisspeptin Neurons and GnRH-Dependent Mechanism of Action, *Endocrinology*, Volume 153, Issue 8, 1 August 2012, Pages 3770–3779, <https://doi.org/10.1210/en.2012-1133>
 115. Belsham, D., Chen, J., He, W., & Tran, A. (2022). Spexin: Its role, regulation, and therapeutic potential in the hypothalamus. *Pharmacology & Therapeutics*, 233, 108033. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.108033>
 116. Bálint F, Csillag V, Vastagh C, Liposits Z, Farkas I. Insulin-Like Growth Factor 1 Increases GABAergic Neurotransmission to GnRH Neurons via Suppressing the Retrograde Tonic Endocannabinoid Signaling Pathway in Mice. *Neuroendocrinology*. 2021;111(12):1219-1230. doi: 10.1159/000514043. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33361699.
 117. Vastagh C, Farkas I, Scott MM, Liposits Z. Networking of glucagon-like peptide-1 axons with GnRH neurons in the basal forebrain of male mice revealed by 3DISCO-based immunocytochemistry and optogenetics. *Brain Struct Funct*. 2021 Jan;226(1):105-120. doi: 10.1007/s00429-020-02167-7. Epub 2020 Nov 9. PMID: 33169188; PMCID: PMC7817561.
 118. Chyral-Castel, S., Tosca, L., Ferreira, G., Jeanpierre, E., Rame, C., Lomet, D., Caraty, A., Monget, P., Coubrolle, C. and Dupont, J. (2008), The Effect of AMP-Activated Kinase Activation on Gonadotrophin-Releasing Hormone Secretion in GT1-7 Cells and its Potential Role in Hypothalamic Regulation of the Oestrous Cyclicity in Rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 20: 335-346. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01643.x>
 119. Maruska KP, Sohn YC, Fernald RD. Mechanistic target of rapamycin (mTOR) implicated in plasticity of the reproductive axis during social status transitions. *Gen Comp Endocrinol*. 2019 Oct 1;282:113209. doi: 10.1016/j.ygcen.2019.113209. Epub 2019 Jun 18. PMID: 31226256; PMCID: PMC6718321.
 120. Cecilia Perdices-Lopez, María S. Avendaño, Alexia Barroso, Francisco Gaytán, Francisco Ruiz-Pino, Maria J. Vázquez, Silvia Leon, Yong Bhum Song, Veronica Sobrino, Violeta Heras, Antonio Romero-Ruiz, Juan Roa, Federico Mayor, Cristina Murga, Leonor Pinilla, Ursula B. Kaiser, Manuel Tena-Sempere, Connecting nutritional deprivation and pubertal inhibition via GRK2-mediated repression of kisspeptin actions in GnRH neurons, *Metabolism*, Volume 129, 2022, 155141, ISSN 0026-0495, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2022.155141>.
 121. Fan NC, Jeung EB, Peng C, Olofsson JI, Krisinger J, Leung PC. The human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor gene: cloning, genomic organization and chromosomal assignment. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Jul;103(1-2):R1-6. doi: 10.1016/0303-7207(94)90087-6. PMID: 7958384.
 122. Hoffmann SH, ter Laak T, Kühne R, Reiländer H, Beckers T. Residues within transmembrane helices 2 and 5 of the human gonadotropin-releasing hormone receptor contribute to agonist and antagonist binding. *Mol Endocrinol*. 2000 Jul;14(7):1099-115. doi: 10.1210/mend.14.7.0483. PMID: 10894158.
 123. Liu F, Usui I, Evans LG, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJ. Involvement of both G(q/11) and G(s) proteins in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated signaling in L beta T2 cells. *J Biol Chem*. 2002 Aug 30;277(35):32099-108. doi: 10.1074/jbc.M203639200. Epub 2002 Jun 5. PMID: 12050161; PMCID: PMC2930616.
 124. Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE. Molecular basis for interactions of G protein betagamma

- subunits with effectors. *Science*. 1998 May 22;280(5367):1271-4. doi: 10.1126/science.280.5367.1271. PMID: 9596582.
125. Naor Z, Harris D, Shacham S. Mechanism of GnRH receptor signaling: combinatorial cross-talk of Ca²⁺ and protein kinase C. *Front Neuroendocrinol*. 1998 Jan;19(1):1-19. doi: 10.1006/frne.1997.0162. PMID: 9465287.
 126. Ben-Menahem D, Shraga-Levine Z, Limor R, Naor Z. Arachidonic acid and lipoxygenase products stimulate gonadotropin alpha-subunit mRNA levels in pituitary alpha T3-1 cell line: role in gonadotropin releasing hormone action. *Biochemistry*. 1994 Nov 1;33(43):12795-9. doi: 10.1021/bi00209a010. PMID: 7524656.
 127. Fanis P, Neocleous V, Papapetrou I, Phylactou LA, Skordis N. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (GnRHR) and Hypogonadotropic Hypogonadism. *Int J Mol Sci*. 2023 Nov 4;24(21):15965. doi: 10.3390/ijms242115965. PMID: 37958948; PMCID: PMC10650312.
 128. Haisenleder DJ, Dalkin AC, Ortolano GA, Marshall JC, Shupnik MA. A pulsatile gonadotropin-releasing hormone stimulus is required to increase transcription of the gonadotropin subunit genes: evidence for differential regulation of transcription by pulse frequency in vivo. *Endocrinology*. 1991 Jan;128(1):509-17. doi: 10.1210/endo-128-1-509. PMID: 1702704.
 129. Laan M, Grigorova M, Huhtaniemi IT. Pharmacogenetics of follicle-stimulating hormone action. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012 Jun;19(3):220-7. doi: 10.1097/MED.0b013e3283534b11. PMID: 22499219; PMCID: PMC3348539.
 130. Bernard DJ, Tran S. Mechanisms of activin-stimulated FSH synthesis: the story of a pig and a FOX. *Biology of Reproduction*. 2013 Mar;88(3):78. DOI: 10.1095/biolreprod.113.107797. PMID: 23426431.
 131. Gray PC, Bilezikjian LM, Vale W. Antagonism of activin by inhibin and inhibin receptors: a functional role for betaglycan. *Mol Cell Endocrinol*. 2002 Feb 25;188(1-2):254-60. doi: 10.1016/s0303-7207(02)00037-0. PMID: 11911962.
 132. Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol*. 2003 Jun;63(6):1256-72. doi: 10.1124/mol.63.6.1256. PMID: 12761335.
 133. Richards JS, Pangas SA. The ovary: basic biology and clinical implications. *J Clin Invest*. 2010 Apr;120(4):963-72. doi: 10.1172/JCI41350. Epub 2010 Apr 1. PMID: 20364094; PMCID: PMC2846061.
 134. Ulloa-Aguirre A, Reiter E, Crépieux P. FSH Receptor Signaling: Complexity of Interactions and Signal Diversity. *Endocrinology*. 2018 Aug 1;159(8):3020-3035. doi: 10.1210/en.2018-00452. PMID: 29982321.
 135. Ilpo Huhtaniemi, Jorma Toppari, Chapter 10 - FSH Regulation at the Molecular and Cellular Levels: Mechanisms of Action and Functional Effects, *Sertoli Cell Biology*, Academic Press, 2005, Pages 155-169, ISBN 9780126477511, <https://doi.org/10.1016/B978-012647751-1/50011-8>.
 136. Walker WH, Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction*. 2005 Jul;130(1):15-28. doi: 10.1530/rep.1.00358. PMID: 15985628.
 137. Casarini L, Santi D, Simoni M, Potì F. 'Spare' Luteinizing Hormone Receptors: Facts and Fiction. *Trends Endocrinol Metab*. 2018 Apr;29(4):208-217. doi: 10.1016/j.tem.2018.01.007. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29429918.
 138. Wen-Hui Shen, Chris C.D. Moore, Yayoi Ikeda, Keith L. Parker, Holly A. Ingraham, Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates the müllerian inhibiting substance gene: A link to the sex determination cascade, *Cell*, Volume 77, Issue 5, 1994, Pages 651-661, ISSN 0092-8674, [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90050-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90050-7).
 139. Lawson MA, Tsutsumi R, Zhang H, Talukdar I, Butler BK, Santos SJ, Mellon PL, Webster NJ. Pulse sensitivity of the luteinizing hormone beta promoter is determined by a negative feedback loop involving early growth response-1 and Ngfi-A binding protein 1 and 2. *Mol Endocrinol*. 2007 May;21(5):1175-91. doi: 10.1210/me.2006-0392. Epub 2007 Feb 13. PMID: 17299135; PMCID: PMC2932486.
 140. Susa T, Ishikawa A, Cai LY, Kato T, Matsumoto K, Kitahara K, Kurokawa R, Ono T, Kato Y. The highly related LIM factors, LMO1, LMO3 and LMO4, play different roles in the regulation of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit (alpha GSU) gene. *Biosci Rep*. 2009 Oct 9;30(1):51-8. doi: 10.1042/BSR20090020. PMID: 19228115.
 141. Pazos F, Sánchez-Franco F, Balsa J, Escalada J, Cacicedo L. Differential regulation of gonadotropins and glycoprotein hormone alpha-subunit by IGF-I in anterior pituitary cells from male rats. *J Endocrinol Invest*. 2004 Jul-Aug;27(7):670-5. doi: 10.1007/BF03347501. PMID: 15505992.
 142. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev*. 2002 Apr;23(2):141-74. doi: 10.1210/edrv.23.2.0462. PMID: 11943741.
 143. Jin JM, Yang WX. Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*. 2014 Nov 1;551(1):15-25. doi: 10.1016/j.gene.2014.08.048. Epub 2014 Aug 26. PMID: 25168889.
 144. Duan J, Xu P, Cheng X, Mao C, Croll T, He X, Shi J, Luan X, Yin W, You E, Liu Q, Zhang S, Jiang H, Zhang Y, Jiang Y, Xu HE. Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes. *Nature*. 2021 Oct;598(7882):688-692. doi: 10.1038/s41586-021-03924-2. Epub 2021 Sep 22. PMID: 34552239.
 145. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011 Feb;32(1):81-151. doi: 10.1210/er.2010-0013. Epub 2010 Nov 4. Erratum in: *Endocr Rev*. 2011 Aug;32(4):579. PMID: 21051590; PMCID: PMC3365799.

146. Light A, Hammes SR. Membrane receptor cross talk in steroidogenesis: recent insights and clinical implications. *Steroids*. 2013 Jun;78(6):633-8. doi: 10.1016/j.steroids.2012.12.016. Epub 2013 Feb 1. PMID: 23380369.
147. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem*. 2001 Sep 14;276(37):34631-6. doi: 10.1074/jbc.M104847200. Epub 2001 Jul 16. PMID: 11457843.
148. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL, Harrison DC. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):28969-75. doi: 10.1074/jbc.M102743200. Epub 2001 May 31. PMID: 11387329.
149. Cheng G, Coolen LM, Padmanabhan V, Goodman RL, Lehman MN. The kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cell population of the arcuate nucleus: sex differences and effects of prenatal testosterone in sheep. *Endocrinology*. 2010 Jan;151(1):301-11. doi: 10.1210/en.2009-0541. Epub 2009 Oct 30. PMID: 19880810; PMCID: PMC2803147.
150. Roseweir AK, Kauffman AS, Smith JT, Guerriero KA, Morgan K, Pielecka-Fortuna J, Pineda R, Gottsch ML, Tena-Sempere M, Moenter SM, Terasawa E, Clarke IJ, Steiner RA, Millar RP. Discovery of potent kisspeptin antagonists delineate physiological mechanisms of gonadotropin regulation. *J Neurosci*. 2009 Mar 25;29(12):3920-9. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5740-08.2009. PMID: 19321788; PMCID: PMC3035813.
151. Tsutsumi R, Webster NJ. GnRH pulsatility, the pituitary response and reproductive dysfunction. *Endocr J*. 2009;56(6):729-37. doi: 10.1507/endocrj.k09e-185. Epub 2009 Jul 17. PMID: 19609045; PMCID: PMC4307809.
152. Goodman RL, Holaskova I, Nestor CC, Connors JM, Billings HJ, Valent M, Lehman MN, Hileman SM. Evidence that the arcuate nucleus is an important site of progesterone negative feedback in the ewe. *Endocrinology*. 2011 Sep;152(9):3451-60. doi: 10.1210/en.2011-0195. Epub 2011 Jun 21. PMID: 21693677; PMCID: PMC3159787.
153. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, Clifton DK, Steiner RA. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005 Jul;146(7):2976-84. doi: 10.1210/en.2005-0323. Epub 2005 Apr 14. PMID: 15831567.
154. Campbell RE, Gaidamaka G, Han SK, Herbison AE. Dendro-dendritic bundling and shared synapses between gonadotropin-releasing hormone neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jun 30;106(26):10835-40. doi: 10.1073/pnas.0903463106. Epub 2009 Jun 17. PMID: 19541658; PMCID: PMC2705602.
155. Sullivan SD, Moenter SM. Neurosteroids alter gamma-aminobutyric acid postsynaptic currents in gonadotropin-releasing hormone neurons: a possible mechanism for direct steroidal control. *Endocrinology*. 2003 Oct;144(10):4366-75. doi: 10.1210/en.2003-0634. Epub 2003 Jul 17. PMID: 12960018.
156. Jarry H, Leonhardt S, Wuttke W. Gamma-aminobutyric acid neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area synchronize the phasic activity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1991 Mar;53(3):261-7. doi: 10.1159/000125727. PMID: 2041587.
157. DeFazio RA, Heger S, Ojeda SR, Moenter SM. Activation of A-type gamma-aminobutyric acid receptors excites gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol Endocrinol*. 2002 Dec;16(12):2872-91. doi: 10.1210/me.2002-0163. PMID: 12456806.
158. Pielecka-Fortuna J, Moenter SM. Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology*. 2010 Jan;151(1):291-300. doi: 10.1210/en.2009-0692. Epub 2009 Oct 30. PMID: 19880809; PMCID: PMC2803153.
159. Brayman MJ, Pepa PA, Berdy SE, Mellon PL. Androgen receptor repression of GnRH gene transcription. *Mol Endocrinol*. 2012 Jan;26(1):2-13. doi: 10.1210/me.2011-1015. Epub 2011 Nov 10. PMID: 22074952; PMCID: PMC3248321.
160. Iyer AK, Miller NL, Yip K, Tran BH, Mellon PL. Enhancers of GnRH transcription embedded in an upstream gene use homeodomain proteins to specify hypothalamic expression. *Mol Endocrinol*. 2010 Oct;24(10):1949-64. doi: 10.1210/me.2010-0156. Epub 2010 Jul 28. PMID: 20667983; PMCID: PMC2954641.
161. Brayman MJ, Pepa PA, Mellon PL. Androgen receptor repression of gonadotropin-releasing hormone gene transcription via enhancer 1. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Nov 5;363(1-2):92-9. doi: 10.1016/j.mce.2012.07.012. Epub 2012 Aug 2. PMID: 22877652; PMCID: PMC3447085.
162. Bagatell CJ, Dahl KD, Bremner WJ. The direct pituitary effect of testosterone to inhibit gonadotropin secretion in men is partially mediated by aromatization to estradiol. *J Androl*. 1994 Jan-Feb;15(1):15-21. PMID: 8188534.
163. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev*. 1998 Jun;19(3):302-30. doi: 10.1210/edrv.19.3.0332. PMID: 9626556.

164. Dong KW, Chen ZG, Cheng KW, Yu KL. Evidence for estrogen receptor-mediated regulation of human gonadotropin-releasing hormone promoter activity in human placental cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1996 Mar 25;117(2):241-6. doi: 10.1016/0303-7207(95)03760-8. PMID: 8737386.
165. Roy D, Angelini NL, Belsham DD. Estrogen directly respresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology.* 1999 Nov;140(11):5045-53. doi: 10.1210/endo.140.11.7117. PMID: 10537130.
166. Beato M, Herrlich P, Schütz G. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell.* 1995 Dec 15;83(6):851-7. doi: 10.1016/0092-8674(95)90201-5. PMID: 8521509.
167. Berry M, Metzger D, Chambon P. Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 1990 Sep;9(9):2811-8. doi: 10.1002/j.1460-2075.1990.tb07469.x. PMID: 2118104; PMCID: PMC551992.
168. Sánchez-Criado JE, de Las Mulas JM, Bellido C, Navarro VM, Aguilar R, Garrido-Gracia JC, Malagón MM, Tena-Sempere M, Blanco A. Gonadotropin-secreting cells in ovariectomized rats treated with different oestrogen receptor ligands: a modulatory role for ERbeta in the gonadotrope? *J Endocrinol.* 2006 Feb;188(2):167-77. doi: 10.1677/joe.1.06377. PMID: 16461544.
169. Couse JF, Yates MM, Walker VR, Korach KS. Characterization of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in estrogen receptor (ER) Null mice reveals hypergonadism and endocrine sex reversal in females lacking ERalpha but not ERbeta. *Mol Endocrinol.* 2003 Jun;17(6):1039-53. doi: 10.1210/me.2002-0398. Epub 2003 Mar 6. PMID: 12624116.
170. Shen ES, Meade EH, Pérez MC, Deecher DC, Negro-Vilar A, López FJ. Expression of functional estrogen receptors and galanin messenger ribonucleic acid in immortalized luteinizing hormone-releasing hormone neurons: estrogenic control of galanin gene expression. *Endocrinology.* 1998 Mar;139(3):939-48. doi: 10.1210/endo.139.3.5841. PMID: 9492023.
171. Butler JA, Sjöberg M, Coen CW. Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotrophin-releasing hormone-expressing neurones. *J Neuroendocrinol.* 1999 May;11(5):331-5. doi: 10.1046/j.1365-2826.1999.00347.x. PMID: 10320559.
172. Hrabovszky E, Kalló I, Szilávik N, Keller E, Merchenthaler I, Liposits Z. Gonadotropin-releasing hormone neurons express estrogen receptor-beta. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2827-30. doi: 10.1210/jc.2006-2819. Epub 2007 Apr 24. PMID: 17456575.
173. Christian CA, Glidewell-Kenney C, Jameson JL, Moenter SM. Classical estrogen receptor alpha signaling mediates negative and positive feedback on gonadotropin-releasing hormone neuron firing. *Endocrinology.* 2008 Nov;149(11):5328-34. doi: 10.1210/en.2008-0520. Epub 2008 Jul 17. PMID: 18635656; PMCID: PMC2584581.
174. Vanderschueren D, Bouillon R. Estrogen deficiency in men is a challenge for both the hypothalamus and pituitary. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3024-6. doi: 10.1210/jcem.85.9.6893. PMID: 10999780.
175. Ikegami K, Watanabe Y, Nakamura S, Goto T, Inoue N, Uenoyama Y, Tsukamura H. Cellular and molecular mechanisms regulating the KNDy neuronal activities to generate and modulate GnRH pulse in mammals. *Front Neuroendocrinol.* 2022 Jan;64:100968. doi: 10.1016/j.yfrne.2021.100968. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34808231.
176. Goubillon ML, Forsdike RA, Robinson JE, Ciofi P, Caraty A, Herbison AE. Identification of neurokinin B-expressing neurons as an highly estrogen-receptive, sexually dimorphic cell group in the ovine arcuate nucleus. *Endocrinology.* 2000 Nov;141(11):4218-25. doi: 10.1210/endo.141.11.7743. PMID: 11089556.
177. Foradori CD, Coolen LM, Fitzgerald ME, Skinner DC, Goodman RL, Lehman MN. Colocalization of progesterone receptors in parvicellular dynorphin neurons of the ovine preoptic area and hypothalamus. *Endocrinology.* 2002 Nov;143(11):4366-74. doi: 10.1210/en.2002-220586. PMID: 12399433.
178. Ciofi P, Krause JE, Prins GS, Mazzuca M. Presence of nuclear androgen receptor-like immunoreactivity in neurokinin B-containing neurons of the hypothalamic arcuate nucleus of the adult male rat. *Neurosci Lett.* 1994 Dec 5;182(2):193-6. doi: 10.1016/0304-3940(94)90795-1. PMID: 7715808.
179. Esparza LA, Terasaka T, Lawson MA, Kauffman AS. Androgen Suppresses In Vivo and In Vitro LH Pulse Secretion and Neural Kiss1 and Tac2 Gene Expression in Female Mice. *Endocrinology.* 2020 Dec 1;161(12):bqaa191. doi: 10.1210/endocr/bqaa191. PMID: 33075809; PMCID: PMC7671291.
180. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jul;92(7):2744-50. doi: 10.1210/jc.2007-0553. Epub 2007 May 8. PMID: 17488799.
181. Tomikawa J, Uenoyama Y, Ozawa M, Fukunuma T, Takase K, Goto T, Abe H, Ieda N, Minabe S, Deura C, Inoue N, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Tanaka S, Imamura T, Okamura H, Maeda K, Tsukamura H. Epigenetic regulation of Kiss1 gene expression mediating estrogen-positive feedback action in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 May 15;109(20):E1294-301. doi: 10.1073/pnas.1114245109. Epub 2012 Apr 13. PMID: 22505735; PMCID: PMC3356648.
182. Goto T, Tomikawa J, Ikegami K, Minabe S, Abe H, Fukunuma T, Imamura T, Takase K, Sanbo M, Tomita K, Hirabayashi M, Maeda K, Tsukamura H, Uenoyama Y. Identification of hypothalamic arcuate nucleus-specific enhancer region of Kiss1 gene in mice. *Mol Endocrinol.* 2015 Jan;29(1):121-9. doi: 10.1210/me.2014-1289. PMID: 25486239; PMCID: PMC5414766.

183. Uenoyama Y, Inoue N, Nakamura S, Tsukamura H. Kisspeptin Neurons and Estrogen-Estrogen Receptor α Signaling: Unraveling the Mystery of Steroid Feedback System Regulating Mammalian Reproduction. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 26;22(17):9229. doi: 10.3390/ijms22179229. PMID: 34502135; PMCID: PMC8430864.
184. Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda K, Steiner RA, Okamura H. Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat. *J Neurosci*. 2010 Feb 24;30(8):3124-32. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5848-09.2010. PMID: 20181609; PMCID: PMC6633939.
185. Clarkson J, Han SY, Piet R, McLennan T, Kane GM, Ng J, Porteous RW, Kim JS, Colledge WH, Iremonger KJ, Herbison AE. Definition of the hypothalamic GnRH pulse generator in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Nov 21;114(47):E10216-E10223. doi: 10.1073/pnas.1713897114. Epub 2017 Nov 6. PMID: 29109258; PMCID: PMC5703322.
186. Dellovade TL, Merchenthaler I. Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 2004 Feb;145(2):736-42. doi: 10.1210/en.2003-0894. Epub 2003 Oct 30. PMID: 14592957.
187. Kanaya M, Iwata K, Ozawa H. Distinct dynorphin expression patterns with low- and high-dose estrogen treatment in the arcuate nucleus of female rats. *Biol Reprod*. 2017 Nov 1;97(5):709-718. doi: 10.1093/biolre/iox131. PMID: 29069289.
188. Mostari P, Ieda N, Deura C, Minabe S, Yamada S, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. dynorphin-kappa opioid receptor signaling partly mediates estrogen negative feedback effect on LH pulses in female rats. *J Reprod Dev*. 2013;59(3):266-72. doi: 10.1262/jrd.2012-193. Epub 2013 Feb 8. Erratum in: *J Reprod Dev*. 2016;62(5):e1. doi: 10.1262/jrd.2012-193e. PMID: 23391862; PMCID: PMC3934128.
189. Yang P, Jones BL, Henderson LP. Role of the alpha subunit in the modulation of GABA(A) receptors by anabolic androgenic steroids. *Neuropharmacology*. 2005 Sep;49(3):300-16. doi: 10.1016/j.neuropharm.2005.03.017. Erratum in: *Neuropharmacology*. 2008 Oct;55(5):919. PMID: 15993433.
190. Jones BL, Whiting PJ, Henderson LP. Mechanisms of anabolic androgenic steroid inhibition of mammalian epsilon-subunit-containing GABAA receptors. *J Physiol*. 2006 Jun 15;573(Pt 3):571-93. doi: 10.1113/jphysiol.2006.106534. Epub 2006 Mar 16. PMID: 16543268; PMCID: PMC1779744.
191. Penatti CA, Davis MC, Porter DM, Henderson LP. Altered GABAA receptor-mediated synaptic transmission disrupts the firing of gonadotropin-releasing hormone neurons in male mice under conditions that mimic steroid abuse. *J Neurosci*. 2010 May 12;30(19):6497-506. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5383-09.2010. PMID: 20463213; PMCID: PMC2881304.
192. Penatti CA, Oberlander JG, Davis MC, Porter DM, Henderson LP. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters activity and synaptic function in neuroendocrine control regions of the female mouse. *Neuropharmacology*. 2011 Sep;61(4):653-64. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.008. Epub 2011 May 27. PMID: 21645530; PMCID: PMC3130628.
193. Penatti CA, Porter DM, Henderson LP. Chronic exposure to anabolic androgenic steroids alters neuronal function in the mammalian forebrain via androgen receptor- and estrogen receptor-mediated mechanisms. *J Neurosci*. 2009 Oct 7;29(40):12484-96. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3108-09.2009. PMID: 19812324; PMCID: PMC2782625.
194. Herbison AE. Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic area. *Brain Res Bull*. 1997;44(4):321-6. doi: 10.1016/s0361-9230(97)00210-4. PMID: 9370195.
195. Mor G, Eliza M, Song J, Wiita B, Chen S, Naftolin F. 17alpha-methyl testosterone is a competitive inhibitor of aromatase activity in Jar choriocarcinoma cells and macrophage-like THP-1 cells in culture. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001 Dec;79(1-5):239-46. doi: 10.1016/s0960-0760(01)00162-5. PMID: 11850230.
196. Pielecka-Fortuna J, Moenter SM. Kisspeptin increases gamma-aminobutyric acidergic and glutamatergic transmission directly to gonadotropin-releasing hormone neurons in an estradiol-dependent manner. *Endocrinology*. 2010 Jan;151(1):291-300. doi: 10.1210/en.2009-0692. Epub 2009 Oct 30. PMID: 19880809; PMCID: PMC2803153.
197. DeFazio RA, Elias CF, Moenter SM. GABAergic transmission to kisspeptin neurons is differentially regulated by time of day and estradiol in female mice. *J Neurosci*. 2014 Dec 3;34(49):16296-308. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3057-14.2014. PMID: 25471569; PMCID: PMC4252544.
198. Vilar Neto JO, da Silva CA, Bruno da Silva CA, Pinto DV, Caminha JSR, de Matos RS, Nunes Filho JCC, Alves FR, Magalhães SC, De Francesco Daher E. Anabolic androgenic steroid-induced hypogonadism, a reversible condition in male individuals? A systematic review. *Andrologia*. 2021 Aug;53(7):e14062. doi: 10.1111/and.14062. Epub 2021 Apr 22. PMID: 33887077.
199. Coviello AD, Bremner WJ, Matsumoto AM, Herbst KL, Amory JK, Anawalt BD, Yan X, Brown TR, Wright WW, Zirkin BR, Jarow JP. Intratesticular testosterone concentrations comparable with serum levels are not sufficient to maintain normal sperm production in men receiving a hormonal contraceptive regimen. *J Androl*. 2004 Nov-Dec;25(6):931-8. doi: 10.1002/j.1939-4640.2004.tb03164.x. PMID: 15477366.
200. Bebb RA, Anawalt BD, Christensen RB, Paulsen CA, Bremner WJ, Matsumoto AM. Combined administration of levonorgestrel and testosterone induces more rapid and effective suppression of spermatogenesis than testosterone alone: a promising male contraceptive approach. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Feb;81(2):757-62. doi: 10.1210/jcem.81.2.8636300. PMID: 8636300.

201. Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SA, Pallais JC, Yu EW, Borges LF, Jones BF, Barry CV, Wulczyn KE, Thomas BJ, Leder BZ. Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *N Engl J Med*. 2013 Sep 12;369(11):1011-22. doi: 10.1056/NEJMoa1206168. PMID: 24024838; PMCID: PMC4142768.
202. Harvey, O. (2021) "Libido as a motivator for starting and restarting non-prescribed anabolic androgenic steroid use among men: a mixed-methods study," *Drugs: Education, Prevention and Policy*. Informa UK Limited. doi: 10.1080/09687637.2021.1882940.
203. Kanayama G, Hudson JI, DeLuca J, Isaacs S, Baggish A, Weiner R, Bhasin S, Pope HG Jr. Prolonged hypogonadism in males following withdrawal from anabolic-androgenic steroids: an under-recognized problem. *Addiction*. 2015 May;110(5):823-31. doi: 10.1111/add.12850. Epub 2015 Feb 25. PMID: 25598171; PMCID: PMC4398624.
204. Tatem AJ, Beilan J, Kovac JR, Lipshultz LI. Management of Anabolic Steroid-Induced Infertility: Novel Strategies for Fertility Maintenance and Recovery. *World J Mens Health*. 2020 Apr;38(2):141-150. doi: 10.5534/wjmh.190002. Epub 2019 Mar 26. PMID: 30929329; PMCID: PMC7076311.
205. Rasmussen JJ, Selmer C, Østergren PB, Pedersen KB, Schou M, Gustafsson F, Faber J, Juul A, Kistorp C. Former Abusers of Anabolic Androgenic Steroids Exhibit Decreased Testosterone Levels and Hypogonadal Symptoms Years after Cessation: A Case-Control Study. *PLoS One*. 2016 Aug 17;11(8):e0161208. doi: 10.1371/journal.pone.0161208. PMID: 27532478; PMCID: PMC4988681.
206. Liu PY, Swerdloff RS, Christenson PD, Handelsman DJ, Wang C; Hormonal Male Contraception Summit Group. Rate, extent, and modifiers of spermatogenic recovery after hormonal male contraception: an integrated analysis. *Lancet*. 2006 Apr 29;367(9520):1412-20. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68614-5. PMID: 16650651.
207. Ishikawa T, Ooba T, Kondo Y, Yamaguchi K, Fujisawa M. Assessment of gonadotropin therapy in male hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2007 Dec;88(6):1697-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.11.022. Epub 2007 Feb 2. PMID: 17276437.
208. Liu PY, Turner L, Rushford D, McDonald J, Baker HW, Conway AJ, Handelsman DJ. Efficacy and safety of recombinant human follicle stimulating hormone (Gonal-F) with urinary human chorionic gonadotrophin for induction of spermatogenesis and fertility in gonadotrophin-deficient men. *Hum Reprod*. 1999 Jun;14(6):1540-5. doi: 10.1093/humrep/14.6.1540. PMID: 10357972.
209. Kohn TP, Louis MR, Pickett SM, Lindgren MC, Kohn JR, Pastuszak AW, Lipshultz LI. Age and duration of testosterone therapy predict time to return of sperm count after human chorionic gonadotropin therapy. *Fertil Steril*. 2017 Feb;107(2):351-357.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.004. Epub 2016 Nov 14. PMID: 27855957; PMCID: PMC5292276.
210. Goldstein SR, Siddhanti S, Ciaccia AV, Plouffe L Jr. A pharmacological review of selective oestrogen receptor modulators. *Hum Reprod Update*. 2000 May-Jun;6(3):212-24. doi: 10.1093/humupd/6.3.212. PMID: 10874566.
211. Hill S, Arutchelvam V, Quinton R. Enclomiphene, an estrogen receptor antagonist for the treatment of testosterone deficiency in men. *IDrugs*. 2009 Feb;12(2):109-19. PMID: 19204885.
212. Desai A, Yassin M, Cayetano A, Tharakan T, Jayasena CN, Minhas S. Understanding and managing the suppression of spermatogenesis caused by testosterone replacement therapy (TRT) and anabolic-androgenic steroids (AAS). *Ther Adv Urol*. 2022 Jun 26;14:17562872221105017. doi: 10.1177/17562872221105017. PMID: 35783920; PMCID: PMC9243576.
213. Moss JL, Crosnoe LE, Kim ED. Effect of rejuvenation hormones on spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2013 Jun;99(7):1814-20. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.04.003. Epub 2013 May 10. PMID: 23663992.
214. Clark RV, Sherins RJ. Treatment of men with idiopathic oligozoospermic infertility using the aromatase inhibitor, testolactone. Results of a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial with crossover. *J Androl*. 1989 May-Jun;10(3):240-7. doi: 10.1002/j.1939-4640.1989.tb00094.x. PMID: 2663800.
215. Kavoussi PK, Machen GL, Chen SH, Gilkey MS, Chen J, Hamzeh Y, Aston KI, Kavoussi SK. Direct conversion from long-acting testosterone replacement therapy to Natesto allows for spermatogenesis resumption: Proof of concept. *Andrologia*. 2022 Sep;54(8):e14453. doi: 10.1111/and.14453. Epub 2022 May 6. PMID: 35521891; PMCID: PMC9542608.
216. Hsieh TC, Pastuszak AW, Hwang K, Lipshultz LI. Concomitant intramuscular human chorionic gonadotropin preserves spermatogenesis in men undergoing testosterone replacement therapy. *J Urol*. 2013 Feb;189(2):647-50. doi: 10.1016/j.juro.2012.09.043. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23260550.
217. Bond P, Smit DL, de Ronde W. Anabolic-androgenic steroids: How do they work and what are the risks? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Dec 19;13:1059473. doi: 10.3389/fendo.2022.1059473. PMID: 36644692; PMCID: PMC9837614.
218. Narula HS, Carlson HE. Gynaecomastia--pathophysiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2014 Nov;10(11):684-98. doi: 10.1038/nrendo.2014.139. Epub 2014 Aug 12. PMID: 25112235.
219. Bachman E, Travison TG, Basaria S, Davda MN, Guo W, Li M, Connor Westfall J, Bae H, Gordeuk V, Bhasin S. Testosterone induces erythrocytosis via increased erythropoietin and suppressed hepcidin: evidence for a new erythropoietin/hemoglobin set point. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2014 Jun;69(6):725-35. doi: 10.1093/gerona/glt154. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24158761; PMCID: PMC4022090.
220. Ohlander SJ, Varghese B, Pastuszak AW. Erythrocytosis Following Testosterone Therapy. *Sex Med Rev*. 2018 Jan;6(1):77-85. doi: 10.1016/j.sxmr.2017.04.001. Epub 2017 May 16. PMID: 28526632; PMCID: PMC5690890.

221. Bond P, Llewellyn W, Van Mol P. Anabolic androgenic steroid-induced hepatotoxicity. *Med Hypotheses*. 2016 Aug;93:150-3. doi: 10.1016/j.mehy.2016.06.004. Epub 2016 Jun 5. PMID: 27372877.
222. Ruppin DC, Frydman MI, Lunzer MR. Value of serum gamma-glutamyltransferase activity in the diagnosis of hepatobiliary disease. *Med J Aust*. 1982 May 15;1(10):421-4. doi: 10.5694/j.1326-5377.1982.tb132397.x. PMID: 6124872.
223. Nottin S, Nguyen LD, Terbah M, Obert P. Cardiovascular effects of androgenic anabolic steroids in male bodybuilders determined by tissue Doppler imaging. *Am J Cardiol*. 2006 Mar 15;97(6):912-5. doi: 10.1016/j.amjcard.2005.10.026. Epub 2006 Feb 2. PMID: 16516601.
224. Pope HG Jr, Gruber AJ, Choi P, Olivardia R, Phillips KA. Muscle dysmorphia. An underrecognized form of body dysmorphic disorder. *Psychosomatics*. 1997 Nov-Dec;38(6):548-57. doi: 10.1016/S0033-3182(97)71400-2. PMID: 9427852.
225. Pope HG Jr, Katz DL. Affective and psychotic symptoms associated with anabolic steroid use. *Am J Psychiatry*. 1988 Apr;145(4):487-90. doi: 10.1176/ajp.145.4.487. PMID: 3279830.
226. Kienitz T, Quinkler M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney Blood Press Res*. 2008;31(2):71-9. doi: 10.1159/000119417. Epub 2008 Mar 4. PMID: 18319594.
227. Thompson PD, Cullinane EM, Sady SP, Chenevert C, Saritelli AL, Sady MA, Herbert PN. Contrasting effects of testosterone and stanozolol on serum lipoprotein levels. *JAMA*. 1989 Feb 24;261(8):1165-8. PMID: 2915439.
228. Harris RC, Söderlund K, Hultman E. Elevation of creatine in resting and exercised muscle of normal subjects by creatine supplementation. *Clin Sci (Lond)*. 1992 Sep;83(3):367-74. doi: 10.1042/cs0830367. PMID: 1327657.
229. Smit DL, Bond P, de Ronde W. Health effects of androgen abuse: a review of the HAARLEM study. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2022 Dec 1;29(6):560-565. doi: 10.1097/MED.0000000000000759. Epub 2022 Aug 4. PMID: 35938779.
230. Herlitz LC, Markowitz GS, Farris AB, Schwimmer JA, Stokes MB, Kunis C, Colvin RB, D'Agati VD. Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *J Am Soc Nephrol*. 2010 Jan;21(1):163-72. doi: 10.1681/ASN.2009040450. Epub 2009 Nov 16. PMID: 19917783; PMCID: PMC2799287.
231. Imperato-McGinley J, Gautier T, Cai LQ, Yee B, Epstein J, Pochi P. The androgen control of sebum production. Studies of subjects with dihydrotestosterone deficiency and complete androgen insensitivity. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Feb;76(2):524-8. doi: 10.1210/jcem.76.2.8381804. PMID: 8381804.
232. Hamilton, J.B. (1942), Male hormone stimulation is prerequisite and an incitant in common baldness. *Am. J. Anat.*, 71: 451-480. <https://doi.org/10.1002/aja.1000710306>
233. Smit DL, Buijs MM, de Hon O, den Heijer M, de Ronde W. Positive and negative side effects of androgen abuse. The HAARLEM study: A one-year prospective cohort study in 100 men. *Scand J Med Sci Sports*. 2021 Feb;31(2):427-438. doi: 10.1111/sms.13843. Epub 2020 Nov 4. PMID: 33038020.
234. Gerritsma EJ, Brocaar MP, Hakkesteegt MM, Birkenhäger JC. Virilization of the voice in post-menopausal women due to the anabolic steroid nandrolone decanoate (Decadurabolin). The effects of medication for one year. *Clin Otolaryngol Allied Sci*. 1994 Feb;19(1):79-84. doi: 10.1111/j.1365-2273.1994.tb01153.x. PMID: 8174308.
235. Sherwin BB. Randomized clinical trials of combined estrogen-androgen preparations: effects on sexual functioning. *Fertil Steril*. 2002 Apr;77 Suppl 4:S49-54. doi: 10.1016/s0015-0282(02)03002-9. PMID: 12007902.