



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE
BIOMEDICHE
CICLO XXIX**

Curriculum: Biotecnologie Endocrinologiche, Molecolari e Rigenerative

COORDINATORE Prof. Persio dello Sbarba

**Effetti del trattamento sostitutivo con testosterone sulla
disfunzione del tessuto adiposo e sull'epatopatia
steatosica non alcolica (NAFLD) nel paziente obeso di
sesso maschile candidato a chirurgia bariatrica**

Dottorando

Dott. Enrico Facchiano

Tutor

Prof. Mario Maggi

Coordinatore

Prof. Persio Dello Sbarba

Introduzione

Le conseguenze dell'obesità sulla salute sono ben documentate ed è dimostrato che l'aumento dell'Indice di Massa Corporea (BMI) rappresenta un fattore di rischio responsabile dell'aumento dei tassi di mortalità e morbilità¹. Un elevato BMI, ed in particolare un aumento del grasso viscerale (VAT) che configura il quadro di obesità "centrale", è spesso associato con fattori di rischio cardiovascolari e metabolici come ipertensione, iperglicemia e dislipidemia aterogena. L'associazione di questi fattori definisce il concetto di Sindrome Metabolica (MetS) ed identifica una categoria diagnostica predittiva per lo sviluppo di patologie cardiovascolari e diabete mellito di tipo 2 (T2DM)².

Numerose definizioni sono state proposte per la MetS. Una di quelle più utili dal punto di vista clinico è quella proposta nel 2001 (ATP III), secondo cui si parla di MetS in presenza di almeno 3 delle seguenti condizioni^{3,4}:

1. Obesità centrale: circonferenza addominale >102 cm (uomo) o >88 cm (donna)
2. Ipertrigliceridemia: trigliceridi $\geq 1,7$ mmol/L
3. Bassi livelli di colesterolo HDL: <1,0 mmol/L (uomo) o < 1,3 mmol/L (donna)
4. Ipertensione: pressione arteriosa $\geq 135/85$ mmHg o assunzione di farmaci antiipertensivi
5. Iperglicemia a digiuno: $\geq 6,1$ mmol/L

Una delle ipotesi per descrivere la fisiopatologia della MetS riconosce un ruolo centrale all'insulino-resistenza (IR). Uno dei ruoli fondamentali dell'insulina è l'inibizione della lipolisi nel tessuto adiposo⁵. Lo svilupparsi dell'IR conduce a

un eccesso di lipolisi che permette il passaggio in circolo di acidi grassi liberi (FFA) che, a loro volta, inibiscono in maniera aggiuntiva l'effetto antilipolitico dell'insulina, creando ulteriore lipolisi. Gli FFA in circolo contribuiscono ad alimentare l'IR creando un circolo vizioso che finisce per autoalimentarsi⁴.

La MetS è stata riconosciuta come una complicanza della disfunzione del tessuto adiposo e numerosi studi hanno dimostrato come tale disfunzione partecipi attivamente alla sua genesi. La disfunzione del tessuto adiposo comincia quando quest'ultimo si trova nell'impossibilità di accumulare i nutrienti in seguito ad un sovraccarico nutrizionale assunto con la dieta. Recentemente è stato evidenziato come le anomalie dei preadipociti (PADs) costituiscano uno dei processi principali alla base delle anomalie del VAT con conseguente alterazione del processo adipogenico⁶.

Nella MetS il tessuto adiposo non risulta soltanto aumentato in volume, ma è anche disfunzionale e caratterizzato dalla presenza di adipociti ipertrofici ed insulino-resistenti, incapaci di incamerare ulteriori trigliceridi. L'eccesso di trigliceridi alla fine porta all'accumulo di grasso in aree ectopiche (fegato, cuore e muscolo scheletrico) amplificando l'IR e interferendo con le funzioni cellulari⁶⁻⁸

Biochimica e patologia del tessuto adiposo

Il tessuto adiposo, originariamente considerato soltanto un semplice organo di deposito, non è più ritenuto un tessuto inerte con l'unica funzione di immagazzinare riserve^{9, 10}. Nei mammiferi sono stati identificati due tipi di tessuto adiposo: grasso bruno e grasso bianco. Il grasso bruno è specializzato

nella termogenesi nel neonato ed è quasi completamente assente nell'adulto. Il tessuto adiposo bianco, invece, ha una distribuzione estensiva nell'organismo ed è quello che esercita il maggior numero di funzioni agendo sia come tessuto inerte che come tessuto biologicamente attivo. Tra le varie funzioni esercitate, infatti, esso ha un ruolo di sostegno ed offre protezione meccanica ai differenti organi, contribuisce all'isolamento termico, accumula e restituisce energia adattandosi ai differenti stati nutrizionali dell'individuo e, infine, svolge la sua funzione endocrina regolando un gran numero di funzioni biologiche^{11,12}.

L'accumulo di energia, la principale funzione del tessuto adiposo, ha luogo attraverso un processo definito *adipogenesi*, termine che indica la differenziazione dei preadipociti in cellule adipose mature. Gli adipociti sono cellule specializzate che si differenziano dalle cellule fusiformi o stellate, precursori di origine mesenchimale. Tutti i cambiamenti che hanno luogo nel corso dell'adipogenesi corrispondono ad una variazione nell'espressione e nell'attività dei fattori di trascrizione che conducono la cellula da uno stadio iniziale multipotente ad un fenotipo finale caratterizzato da una variazione nelle dimensioni della cellula e dall'accumulo di lipidi al suo interno^{9, 13}. I preadipociti possono differenziarsi in adipociti maturi nel corso della vita dando origine ad un'espansione iperplastica del tessuto adiposo quando vi è un eccesso di energia proveniente dai nutrienti e vi è necessità di un aumentato accumulo. Inoltre, gli adipociti maturi possono aumentare di dimensioni in caso di ipernutrizione e divenire a loro volta ipertrofici. Entrambi i processi portano ad un accumulo di lipidi nell'organismo in risposta ad un'aumentata assunzione di nutrienti con la dieta o ad una diminuzione della spesa

energetica^{9, 14}. La funzione di riserva del tessuto adiposo, quindi, si esplica attraverso l'immagazzinamento dell'eccesso di nutrienti sotto forma di trigliceridi e dal rilascio di acidi grassi liberi (FFA) durante il digiuno¹⁵.

Al di là della sua ben studiata funzione di deposito per le riserve energetiche, il tessuto adiposo è ormai ritenuto anche una struttura metabolicamente attiva che si comporta come un vero e proprio *organo endocrino* capace di sintetizzare un gran numero di sostanze che regolano l'omeostasi metabolica ed energetica dell'organismo¹⁶. Tali composti, isolati in gran quantità dal tessuto adiposo, partecipano alla regolazione di numerose funzioni biologiche (**Fig. 1 e 2**)⁹.

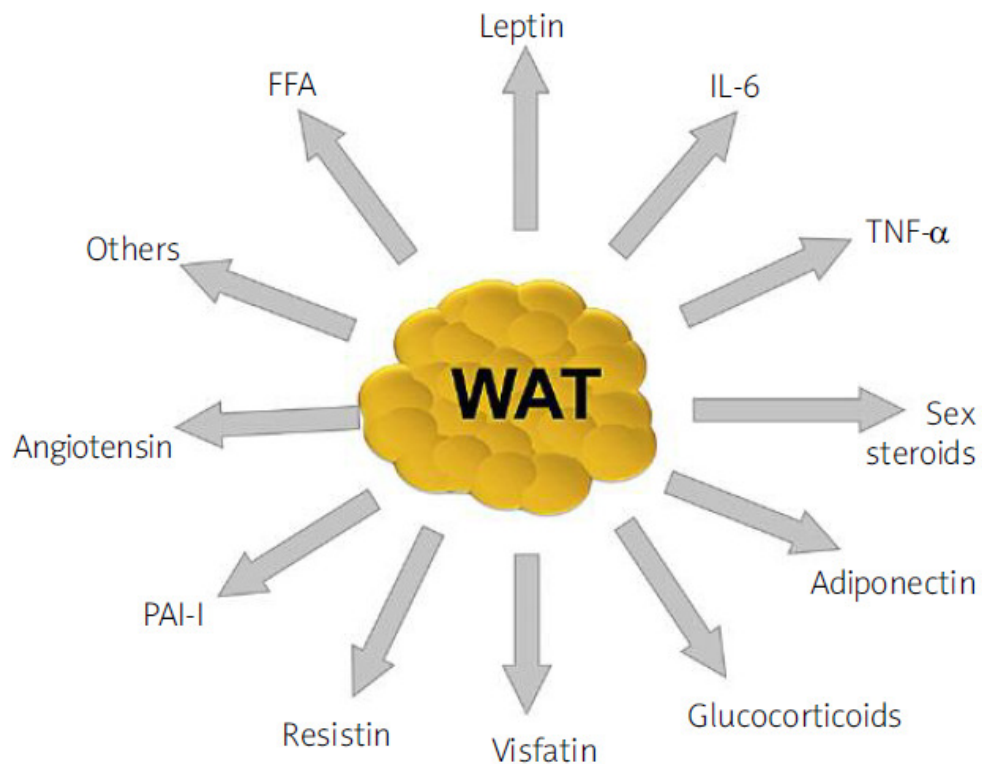


Fig.1 Fattori secreti dal tessuto adiposo nel suo ruolo di organo endocrino.

WAT: grasso bianco⁹

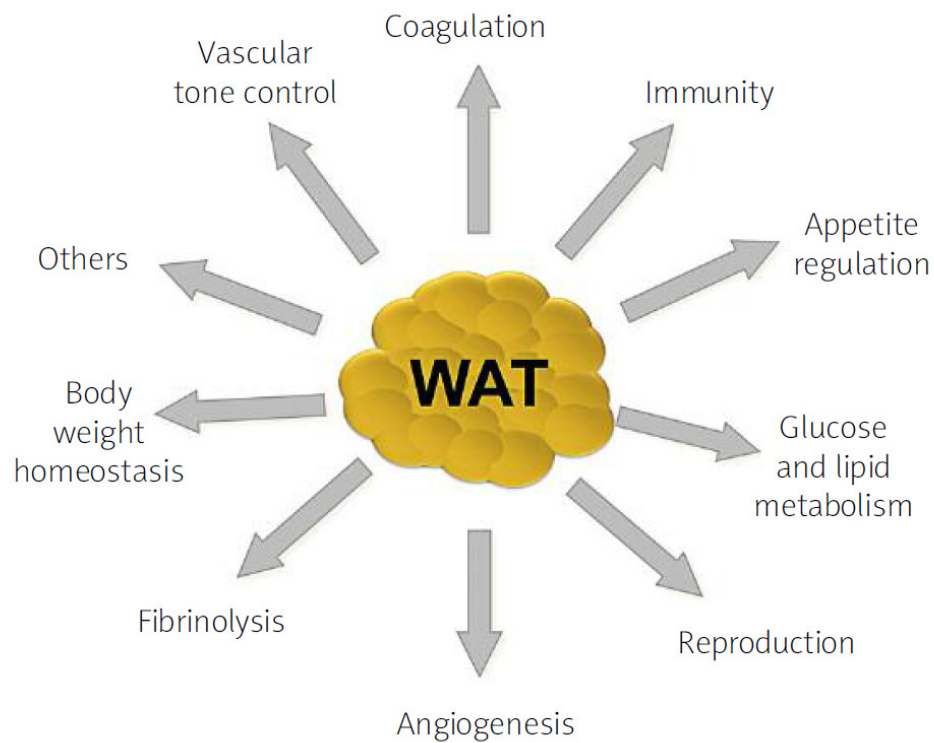


Fig.2: Funzioni fisiologiche del tessuto adiposo. WAT: grasso bianco⁹

Il tessuto adiposo secerne oltre 50 sostanze, chiamate genericamente *adipochine* che eseguono le loro funzioni biologiche in maniera autocrina, paracrina o sistemica ed influenzano numerosi processi metabolici riguardanti l'omeostasi energetica, il metabolismo del glucosio e l'immunità¹⁷.

Le sostanze biologicamente attive secrete dal sistema adiposo espletano numerose funzioni ed includono, tra le altre, alcune citochine con funzione pro-infiammatorie (TNF- α , IL-6) ed altre potenzialmente protettive nei confronti dell'infiammazione¹⁵.

È interessante osservare come il tessuto adiposo isolato da individui normopeso secerne preferenzialmente adipochine con funzione antiinfiammatoria mentre, al contrario, in individui con eccesso di peso e patologia metabolica, le

adipochine proinfiammatorie inducono e alimentano uno stato di infiammazione cronica e insulino-resistenza (IR)¹⁸.

Lo squilibrio nella produzione tra adipochine proinfiammatorie e antiinfiammatorie può contribuire, quindi, ad alcuni aspetti della MetS (Fig. 3 e 4)^{9, 15}.

Adipokine	Distribution	Function	Increased in obesity
Leptin	Secreted predominantly by WAT, to a lesser degree, in hypothalamus, gastric epithelium, placenta, and gonads	Regulates energy intake, expenditure and feeding behavior. Also regulates storage of fat and insulin signaling	Increased in mouse models of obesity. Increased in human obesity and correlated with BMI and decreased with weight loss
Resistin	In rodents, secreted by adipocytes. In humans, secreted predominantly by circulating macrophages and monocytes, to a lesser degree, by WAT	Implicated in glucose metabolism, in the regulation of neoglucogenesis and insulin resistance in rodents. More proinflammatory role in humans	Increased circulating concentrations in mouse models of obesity. Increased in human obesity and correlated with insulin resistance in diabetic patients
TNF- α	Expressed by macrophages and adipocytes (visceral WAT > subcutaneous WAT)	Affects insulin and glucose metabolism. Provokes insulin resistance and stimulates lipolysis	Increased in mouse models of obesity. Increased in human obesity and correlated with BMI
IL-6	One-third of total circulating levels are expressed predominantly by adipocytes. Also expressed in macrophages, skeletal muscle, endothelial cells, and fibroblasts	Controversial role in the development of insulin resistance. Affects glucose metabolism	Increased circulating levels in human obese subjects and correlated with adiposity and reduced with weight loss. Increased in plasma of T2D patients
IL-7	Secreted by stromal and vascular endothelial cells	Homeostatic immune cytokine. Also regulates body weight, adipose tissue mass and function, and insulin signaling	Increased in morbidly obese subjects
IL-8	Secreted by adipocytes (visceral WAT > subcutaneous WAT) and macrophages	Neutrophil chemotaxis	Increased in obese subjects and related to fat mass and TNF- α levels
IL-1	Secreted mainly by adipocytes and macrophages	Role in macrophages chemotaxis and thermogenesis	Increased in obese mice. Increased in human obesity and predictive of T2D
RBP4	Secreted by adipocytes, macrophages, and hepatocytes	Affects insulin sensitivity, hepatic glucose output, and muscle insulin signaling	Increased circulating levels in obese subjects and correlated with BMI and insulin resistance
MCP-1	Secreted by adipose tissue	Affects insulin sensitivity and increases macrophage recruitment in adipose tissue and inflammation	Increased in mouse models of obesity. Increased in T2D subjects
PAI-1	Expressed by WAT	Potent inhibitor of fibrinolytic pathway	Increased in human obesity and T2D subjects
CXCL5	Secreted by macrophages within the stromal vascular fraction	Interferes with insulin signaling in muscle	Circulating levels are higher in obese insulin-resistant individuals than in obese insulin-sensitive and decreased after a 4-week period on low-calorie diet
Visfatin	Expressed in liver, muscle, WAT, bone marrow, and lymphocytes	Role in insulin sensitivity, insulin secretion and inflammatory properties	Increased in obesity and correlates with visceral adiposity in humans
Chemerin	In rodents and humans, expressed in placenta and WAT	Regulates adipocyte development and metabolic function	Increased circulating levels in obese and T2D patients and correlated with body fat, glucose, and lipid metabolism
Vaspin	Secreted by WAT, hypothalamus, pancreatic islets, and skin	Improves insulin sensitivity	Increased in obesity and T2D patients

Fig.3: Adipochine aumentate nell'obesità e/o nel diabete¹⁵

Adipokine	Distribution	Function	Decreased in obesity
Adiponectin	Only secreted by adipose tissue. Lower production in men	Insulin sensitizing effect. Improves insulin resistance and glucose metabolism	Decreased in mouse models of obesity. Decreased in human obesity and correlated negatively with BMI. Increased after weight loss
IL-10	Secreted by monocytes, macrophages, dendritic cells, and B and T cells	Improves insulin sensitivity and glucose transport	Attenuated in T2D patients and increased with weight loss
Omentin	Expressed in heart, lungs, ovary, and placenta and predominantly produced by WAT	Improve glucose uptake in human adipocytes and has an anti-inflammatory effect	Decreased circulating levels in obese subjects. In impaired glucose tolerant (IGT) and subjects with T2D, circulating levels are lower those when compared with matched controls

Fig.4: Adipochine diminuite nell'obesità e/o nel diabete¹⁵

Sulla base di tali elementi emerge come l'obesità, e in particolar modo quella viscerale, rappresenti uno stato cronico di infiammazione sistemica di basso grado con un forte impatto sulla secrezione di adipochine e sull'IR^{9, 19, 20}.

A questo processo patologico concorrono in maniera importante i macrofagi che rivestono, a loro volta, un ruolo importante nella funzione secretoria del tessuto adiposo⁹. Vi è evidenza sperimentale, infatti, che i macrofagi sono presenti a livello del tessuto adiposo e rappresentano, almeno in parte, la fonte delle citochine proinfiammatorie che espletano la loro azione localmente e a livello sistemico²¹. L'aumentata produzione di citochine infiammatorie nell'obesità, del resto, riflette l'aumentata produzione da parte del tessuto adiposo come conseguenza della sua abnorme espansione²².

Fisiopatologia e genesi dell'epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD)

L'epatopatia steatosica non alcolica (NAFLD) è definita come l'accumulo di grasso nel fegato in assenza di eccessivo consumo di alcool o altre cause secondarie e rappresenta la patologia epatica più comune nel mondo con una prevalenza stimata tra il 25% e il 45%²³⁻²⁵. In generale, la steatosi epatica è presente nel 10%-15% degli individui normopeso e in percentuali fino al 70%

nei pazienti obesi²⁶. La distribuzione dell'eccesso di grasso è importante, dal momento che è il grasso viscerale che aumenta il rischio di sviluppare una steatosi epatica, sia negli individui magri che in quelli sovrappeso o obesi^{27, 28}.

La NAFLD si può dividere in due distinte categorie istologiche: 1) la steatosi epatica non alcolica (NAFL), che include i pazienti con steatosi epatica isolata senza infiammazione (o con infiammazione aspecifica di grado lieve), danno tissutale o fibrosi e 2) la steatoepatite non alcolica (NASH) che si distingue dalla precedente per la presenza di segni di danno epatocellulare con o senza fibrosi^{24, 29}. La NASH è considerata uno stadio di progressione avanzato rispetto alla NAFLD e presenta una morbilità più alta rispetto alla semplice steatosi, con un rischio stimato di progressione verso la cirrosi epatica di circa il 20%^{24, 28}. Al contrario, la NAFL ha una storia naturale più benigna, è considerata reversibile, e ha un rischio di progressione verso la cirrosi <4%²⁴.

La NAFLD è strettamente legata all'obesità, all'iperglicemia e alla dislipidemia, al punto da essere considerata una manifestazione epatica della MetS³⁰⁻³².

La patogenesi della NAFLD trova molti elementi in comune con la MetS. Il contenuto di grassi nel fegato è regolato da un equilibrio tra assorbimento, sintesi, ossidazione ed eliminazione dei lipidi. La maggior parte dei lipidi che arrivano al fegato sono acidi grassi re-esterificati che provengono dalla lipolisi nel tessuto adiposo. L'IR gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo di tale processo patologico. Come già detto, in condizioni fisiologiche, l'insulina inibisce la lipolisi nel tessuto adiposo e, di conseguenza, l'IR risulta in un incremento della lipolisi con aumento di acidi grassi liberi nel plasma e

immagazzinamento degli stessi negli epatociti²³. Un tessuto adiposo con IR è presente nella maggior parte dei pazienti con NAFLD (siano essi normopeso o obesi) e la lipolisi proveniente da tessuto adiposo rappresenta la fonte di circa il 60% degli acidi grassi usati per la sintesi dei trigliceridi a livello epatico^{27, 33}. Altri fattori implicati nell'accumulo di lipidi negli epatociti includono l'assunzione con la dieta (15%) e la sintesi epatica di grassi (25%). Nel primo caso i chilomicroni assorbiti attraverso l'apparato digerente apportano FFA al fegato, mentre nel secondo caso il metabolismo dei carboidrati assunti con la dieta porta alla sintesi *de novo* di FFA.

Infine, il tessuto adiposo viscerale genera multipli segnali (adipochine) che alterano il metabolismo dei lipidi e del glucosio, e alimentano uno stato proinfiammatorio che promuove il danno cellulare a livello del fegato e degli altri tessuti²⁴. Inoltre, il danno tissutale è alimentato anche dalla produzione di radicali liberi e dallo stress ossidativo come prodotti dell'aumentata β -ossidazione degli acidi grassi conseguente ad una aumentata lipolisi nel tessuto adiposo dei pazienti con IR e NAFLD³⁴.

L'accumulo di lipidi a livello del fegato e gli stress intracellulari attivano la trascrizione ed il rilascio di fattori pro-infiammatori come l'IL-6, il TNF- α e la proteina C-reattiva (PCR)^{27, 35-37}.

I macrofagi sono direttamente implicati nella genesi del danno epatico. I macrofagi epatici sono una popolazione di cellule immunitarie notevolmente eterogenea e rivestono un ruolo importante nell'omeostasi, nella progressione del danno tissutale e nella sua regressione³⁸. Inoltre, essendo legati al danno epatico cronico sono stati più volte indicati come possibili obiettivi nella

prevenzione e nel trattamento della fibrosi epatica³⁹. Studi sperimentali, infatti, hanno mostrato che il processo di progressione verso la fibrosi epatica non è un processo irreversibile ed i macrofagi epatici possono esercitare una duplice funzione, promuovendo o inibendo il deposito eccessivo di matrice extracellulare, alla base della patogenesi del danno epatico⁴⁰. L'eterogenità dei macrofagi epatici è espressa dal gran numero di citochine prodotte e dalla loro differente origine. Allo scopo di classificare l'ampio spettro di funzioni e fenotipi di tali cellule, sono state identificate due classi: un fenotipo proinfiammatorio M1 e un fenotipo antiinfiammatorio M2. Sebbene tale classificazione non rifletta completamente la complessa biologia dei macrofagi, è molto utile nel distinguere un fenotipo M1 che produce essenzialmente citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL-1 β , IL-12) con effetto induttivo e promotore sul danno epatico ed un fenotipo M2 che produce mediatori immuno-modulatori (IL-10, TGF- β , IL-4 e IL-3) con effetto protettivo sul danno epatico^{38,41}.

Sebbene esami radiologici e di laboratorio possano orientare sulla diagnosi di NAFLD, la biopsia epatica rappresenta l'esame di scelta per la diagnosi e la valutazione del grado di NAFLD^{24, 29, 42}.

Nel 1999 venne proposto un sistema semi-quantitativo di *grading* e di *staging* per descrivere e uniformare l'approccio degli anatomopatologi alle lesioni da NASH e alla fibrosi epatica non alcolica⁴³. Nel 2005 tale sistema venne modificato in seguito alla pubblicazione dei risultati di una ricerca dal NASH Clinical Research Network e sostituito dal "NAFLD Activity Score" (NAS). Il vantaggio principale del sistema di classificazione aggiornato era quello di

comprendere tutto lo spettro delle lesioni da NAFLD e non soltanto, come avveniva in precedenza, dare un *grading* delle lesioni da NASH. Tale sistema valuta il grado di steatosi (punteggio 0-3), l'infiammazione lobulare (punteggio 0-3) e la presenza di *ballooning* epatocitario (punteggio 0-2) e restituisce uno score finale (NAFLD Activity Score - NAS) da 0 a 8 (Fig. 5)²⁹

Table 3 Nonalcoholic steatohepatitis clinical research network nonalcoholic fatty liver disease scoring system

Steatosis grade	Lobular inflammation	Liver cell ballooning
0: < 5%	0: No foci	0: None
1: 5%-33%	1: < 2 foci per 200 × field	1: Few ballooned hepatocytes
2: 34%-66%	2: 2-4 foci per 200 × field	2: Many ballooned hepatocytes
3: > 66%	3: > 4 foci per 200 × field	

Fig. 5: Nonalcoholic fatty liver disease Activity Score (NAS) risultante dalla somma di Steatosi + Infiammazione + Ballooning^{29, 42}

Testosterone e MetS

In numerosi studi clinici e sperimentali, bassi livelli di testosterone nei soggetti di sesso maschile sono risultati associati con obesità, T2DM e MetS, al punto che l'ipogonadismo è stato proposto come uno dei possibili meccanismi di legame tra obesità e MetS^{44, 45}. L'obesità, dal canto suo, è associata ad un'alta prevalenza di ipogonadismo e la presenza del diabete (o della diminuita tolleranza glicemica) aumenta tale rischio. D'altro canto, l'ipogonadismo contribuisce all'accumulo di eccesso di grasso stabilendo un circolo vizioso⁴⁶. In tale contesto emerge sempre più l'evidenza che indica un effetto benefico del trattamento con Testosterone sull'accumulo eccessivo di grasso viscerale e

sugli altri componenti della MetS, anche se i meccanismi biochimici attraverso cui si espleta tale effetto non sono chiaramente definiti⁴⁷.

Una possibile base ormonale per lo sviluppo dell'obesità e per la disfunzione degli adipociti è stata suggerita da studi preclinici su un modello animale di coniglio nutrito con dieta ad alto contenuto di grassi che sviluppa MetS e ipogonadismo ipogonadotropo⁶. In tale modello animale il tessuto adiposo viscerale (VAT) appare aumentato di volume e patologico, dal momento che mostra alterazioni istomorfometriche e metaboliche associate ad alterata sensibilità all'insulina e capacità di differenziazione dei preadipociti. La somministrazione *in vivo* di testosterone in tale modello è in grado di restaurare la capacità di differenziazione dei preadipociti attraverso un chiaro effetto positivo sulla loro sensibilità all'insulina e risulta nella correzione di IR, ipossia e infiammazione cronica nel VAT⁶.

L'effetto positivo della somministrazione di testosterone nel modello animale sembra manifestarsi anche sull'accumulo di grasso a livello epatico, coerentemente con il fatto che vi è sempre maggiore evidenza clinica e sperimentale che la NAFLD possa essere considerata un aspetto della MetS^{31, 32, 48}.

Nonostante l'evidenza degli effetti benefici della somministrazione di testosterone sulla MetS nel modello animale, gli studi sull'uomo sono ancora scarsi e, per quanto riguarda gli effetti sulla NAFLD, si basano in prevalenza sullo studio degli effetti indiretti sugli enzimi epatici o su criteri morfologici alla risonanza magnetica (MRI)^{48, 49}.

Scopo dello studio

Lo scopo del presente studio è quello di analizzare gli effetti del testosterone sulla disfunzione del tessuto adiposo e sulla NAFLD nei pazienti obesi di sesso maschile candidati a chirurgia bariatrica, comparando i pazienti sottoposti a terapia sostitutiva con testosterone (TRT) con i pazienti ipogonadici non trattati e con quelli eugonadici.

Materiali e metodi

Arruolamento e selezione dei pazienti

Il presente studio è stato concepito come uno studio prospettico osservazionale ed autorizzato dal Comitato Etico locale [**Protocollo numero: 2013/0006753 e successiva integrazione**].

Sono stati considerati potenzialmente arruolabili tutti i pazienti obesi di sesso maschile per cui è stata eseguita valutazione per intervento di Chirurgia Bariatrica. La valutazione di idoneità alla Chirurgia Bariatrica è stata eseguita presso l'ambulatorio dell'Unità di Chirurgia Bariatrica e Metabolica, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze fino ad Agosto 2014. A partire da Settembre 2014 la valutazione è stata eseguita presso l'ambulatorio dell'Unità di Chirurgia Generale, Bariatrica e Metabolica dell'Ospedale Santa Maria Nuova, Firenze.

Ai pazienti risultati idonei ad un intervento di Chirurgia Bariatrica secondo le linee guida della Consensus Conference del NIH del 1991⁵⁰ e successive revisioni da parte della Società Italia di Chirurgia Bariatrica e Metabolica è stato proposto l'arruolamento nel presente studio. In caso di accordo

all'arruolamento, dopo colloquio di esplicitazione del protocollo di studio, è stato ottenuto il consenso informato ed è stato chiesto ai pazienti di firmare l'apposito modulo. Tra gli esami di studio regolarmente previsti per l'intervento bariatrico è stato richiesto il dosaggio del Testosterone totale (TT) e sex hormon binding globulin (SHBG). I pazienti sono stati, quindi, sottoposti a prima visita (V0) presso l'Unità di Medicina della Sessualità, Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze e valutati per la presenza di ipogonadismo (TT<12nmol/l o Testosterone Libero <225 pmol/l) ed eventuali sintomi sessuali associati. La presenza di sintomi relati all'ipogonadismo è stata valutata utilizzando il questionario IIEF-5 (International Index for Erectile Function-5) integrato da due interviste strutturate, SIEDY e ANDROTEST⁵¹⁻⁵³. Sulla base della presenza dell'ipogonadismo con o senza sintomi associati i pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: Eugonadici (EU), Ipogonadici non sintomatici (IPO-NS) e Ipogonadici sintomatici (IPO-TRT). I pazienti ipogonadici che presentavano almeno un sintomo sessuale legato alla deficienza di androgeni (disfunzione erettile, bassa libido, riduzione delle erezioni mattutine) sono stati trattati con Terapia Sostitutiva con Testosterone (TRT) secondo le raccomandazioni per il trattamento dell'ipogonadismo della International Society of Andrology (ISA), della International Society for the Study of the Aging Male (ISSAM) e della European Association of Urology (EAU)^{48, 54}.

La TRT è stata realizzata utilizzando una preparazione di Testosterone a lunga durata di azione (Testosterone Undecanoato 1000 mg – una iniezione IM ogni

12 settimane) per 6-8 mesi ed i pazienti sono stati sottoposti all'intervento chirurgico programmato immediatamente dopo la fine del trattamento^{55, 56}.

La disfunzione del tessuto adiposo è stata studiata tramite valutazione della sensibilità insulinica su campioni di preadipociti (PADs) estratti dal campione di grasso viscerale.

La NAFLD è stata studiata attraverso: 1) Analisi dell'espressione genica dell'interleuchina 10 (IL-10); 2) Analisi del rapporto dell'espressione genica dei markers macrofagici M1/M2; 3) Esame istologico sulle biopsie epatiche.

Raccolta e prelievo di campioni biologici

Al momento della prima visita (V0), come da linee guida per la valutazione dei pazienti candidati a chirurgia bariatrica integrate dal presente protocollo di studio sono stati raccolti i seguenti parametri fisici, metabolici e ormonali: peso, altezza, circonferenza addominale, pressione arteriosa, glicemia, insulina, OGTT (se necessario), colesterolo totale, HDL, trigliceridi, emoglobina glicata (HbA1c), testosterone, SHBG, HDL, FSH, LH. Gli stessi parametri ormonali sono stati dosati da campioni ematici prelevati al momento dell'intervento chirurgico, prima dell'induzione dell'anestesia generale e prima che venissero somministrati eventuali farmaci di premedicazione anestesiológica.

Durante l'intervento chirurgico sono stati prelevati campioni di tessuto adiposo viscerale (VAT), con prelievi eseguiti con dissektore ad ultrasuoni a livello del margine libero del grande omento ed è stata eseguita una biopsia epatica, utilizzando lama fredda senza coagulazione preventiva, a livello del margine libero del III segmento epatico.

Il frammento di biopsia epatica è stato in seguito diviso in due parti: una parte è stata conservata in formalina ed inviata per studio istologico presso il laboratorio di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Firenze, o presso il laboratorio di Anatomia Patologica dell'Ospedale Santa Maria Annunziata, Azienda Sanitaria di Firenze e una parte è stata conservata in Soluzione Fisiologica 0,9%; il campione di VAT è stato conservato in Soluzione Fisiologica 0,9%. I campioni di fegato e VAT conservati in Soluzione Fisiologica 0,9% sono stati inviati entro 60 minuti dal prelievo presso il laboratorio dell'Unità di Medicina della Sessualità e Andrologia, Dipartimento di Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali, Università degli Studi di Firenze per il processamento e le successive analisi.

Isolamento, caratterizzazione e differenziazione dei preadipociti dai campioni di VAT

I campioni di VAT sono stati usati per l'isolamento di preadipociti (PADs). L'isolamento dei PADs è stato ottenuto con la seguente metodica: i campioni di VAT sono stati digeriti con collagenasi di tipo 2 1 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) per 1 ora, trattati con un tampone per lisi eritrocitaria (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA; 10 minuti a temperatura ambiente), in seguito centrifugati a 2000 g per 10 minuti a temperatura ambiente, risospesi in un terreno completo (DMEM contenente 10% di siero bovino fetale (FBS), 100 µg/ml di streptomicina, 100 U/ml di penicillina, 2 nM di L-glutamina e 1 µg/ml di amfotericina- B; Sigma-Aldrich) e filtrati attraverso un filtro a maglie da 150 µm per eliminare i residui. Infine, le cellule sono state coltivate in un

terreno di coltura completo a 37°C in atmosfera umidificata con 95% di aria e 5% di CO₂. La differenziazione dei PADs è stata indotta esponendoli a una mistura di differenziazione (DIM) contenente insulina 5 µg/ml, desametasone 1 µM e 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0,5 mM in terreno di coltura completo DMEM (glucosio 4,5 g/l, penicillina/streptomicina, L-glutamina) supplementato con 5% di FBS. Il terreno di coltura è stato sostituito ogni 48 ore e in seguito le cellule sono state trasferite in un terreno contenente insulina 5 µg/ml per 48 ore.

Valutazione dell'uptake di glucosio da parte dei PAD

I PAD esposti alla DIM sono stati coltivati per 24 ore in un terreno privo di siero e in seguito incubati in concentrazioni crescenti di insulina (1, 5, 10 e 50 nM) diluite in una soluzione tampone fosfato (Ca²⁺ 2,5 mM e BSA 1 mg/ml) per valutare la stimolazione insulino-dipendente. Alla fine del periodo di incubazione i PADs sono stati incubati con ³H-2-deossi-D-glucosio [16 µM (1µCi/µl)]; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) per 5 minuti. Le cellule sono quindi state lavate con tampone fosfato salino (PBS) e lisate con NaOH 0,5 M e la radiattività incorporata è stata con spettrometria a scintillazione usando un contatore β (Perkin-Elmer, Waltham, MA).

I dati sono stati normalizzati per il contenuto proteico.

Analisi istologica della biopsia epatica

Una volta prelevate, le biopsie epatiche sono state fissate in formalina. Dopo inclusione in paraffina, sono state ottenute delle sezioni di 5-10 µM. I vetrini

sono stati allestiti con colorazione Ematossilina e Eosina (EE) e con la colorazione tricromica di Van Gieson (TVG).

I vetrini così allestiti sono stati analizzati al microscopi ottico e valutati per steatosi, infiammazione e ballooning secondo la seguente classificazione:

Grado di steatosi	Infiammazione lobulare	Ballooning epatocitario
0: <5%	0: no foci	0: nessuno
1: 5%-33%	1: >2 foci per campo 200X	1: pochi epatociti con ballooning
2: 34%-66%	2: 2-4 foci per campo 200X	2: numerosi epatociti con ballooning
3: >66%	3: >4 foci per campo 200X	

Dalla somma di Steatosi + Infiammazione + Ballooning è stato calcolato il NAS (Nonalcoholic fatty liver disease Activity Score)²⁹.

Estrazione di RNA e RT-PCR quantitativa su tessuto epatico

L'isolamento del mRNA è stato realizzato utilizzando reagenti TRIZOL (Invitrogen S.r.l., Carlsbad, CA) e/o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), secondo le istruzioni dei produttori. La sintesi di cDNA è stata realizzata utilizzando iScriptTM cDNA Synthesis Kit acquistato da Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). La RT-PCR è stata realizzata usando SsoFastTM Evagreen[®] Supermix (Bio-Rad Laboratories) con le seguenti con i seguenti cicli: 40 cicli a 95°C per 30 secondi e 60°C per 1 minuto seguiti dall'analisi della curva di dissociazione per verificare la specificità del primer. Sono stati utilizzati primer specifici per IL-10, M1 (ITGAX/CD11c) e M2 (MRC1/CD206).

La NAFLD è stata studiata mediante: 1) analisi dell'espressione genica per IL-10; 2) analisi del rapporto dell'espressione genica dei markers M1/M2 come misura indiretta della presenza di fenotipo macrofagico pro-infiammatorio 3) analisi istologica delle biopsie epatiche.

La disfunzione del tessuto adiposo è stata studiata tramite test di uptake del glucosio sui preadipociti isolati dai campioni di VAT.

Analisi statistica

I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD). L'analisi statistica è stata eseguita con il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Dunn per l'analisi post hoc. Un valore $p < 0,05$ è stato considerato significativo. Le correlazioni sono state analizzate usando il test di Spearman di correlazione dei ranghi. L'analisi statistica è stata realizzata con il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, IL) per Windows e con il software GraphPad Prism versione 4.00 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA).

Risultati

Tra i pazienti obesi di sesso maschile visti in prima visita, 70 ad oggi hanno ricevuto una valutazione completa con studio ormonale e somministrazione del questionario IIEF-5 e delle interviste SIEDY e ANDROTEST. Tra questi è stata fatta diagnosi di ipogonadismo in 54 pazienti e in 13 è stata intrapresa TRT perché presentavano sintomi di natura sessuale legati all'ipogonadismo. I pazienti risultati eugonadici sono stati 16.

I dati antropometrici dei pazienti arruolati sono riassunti nella tabella 1:

	Totale	EU	IPO-NS	IPO-TRT	Kruskal-Wallis <i>p</i>
Numero	70	16	41	13	
Età (aa)	46,09±10,56	46,63±11,12	44,31±10,04	50,13±10,82	NS (0,22)
Altezza (m)	1,77±0,07	1,75±0,07	1,78±0,07	1,74±0,07	NS (0,08)
Peso (kg)	139,12±24,63	128,06±20,00	147,17±24,09	129,96±24,00	0,009
BMI (kg/m²)	44,60±7,48	41,56±5,80	46,65±8,35	42,51±4,84	0,048

I differenti gruppi risultavano omogenei per età e altezza, al limite dell'omogeneità per BMI (p 0,048); è emersa una differenza statisticamente significativa nei differenti gruppi per il solo peso. All'analisi *post hoc* (test di Dunn) la differenza è emersa tra i gruppi EU e IPO-NS ($p < 0,05$) e tra i gruppo IPO-NS e IPO-TRT ($p < 0,05$).

Tra i pazienti arruolati, 49 sono stati finora sottoposti ad intervento chirurgico e a relativi prelievi ematici, di VAT e biopsia epatica. Sono state analizzate un totale di 38 biopsie epatiche con valutazione del grado di steatosi e calcolo del NAS e così distribuite: pazienti EU 7, pazienti IPO-NS 23, pazienti IPO-TRT 8. In 32 casi è stata eseguita analisi di laboratorio sulla biopsia epatica con valutazione dei markers macrofagici pro-infiammatori (M1) e anti-infiammatori (M2). I pazienti sul cui tessuto epatico è stata effettuata questo tipo di analisi erano così distribuiti: EU 6, IPO-NS 18, IPO-TRT 8.

L'analisi sui PADs per la valutazione dell'insulino-resistenza è stata eseguita su un totale di 26 pazienti così distribuiti: EU 5, IPO-NS 12, IPO-TRT 9.

I dati sul numero di pazienti per ogni tipo di analisi sono riassunti nella tabella 2.

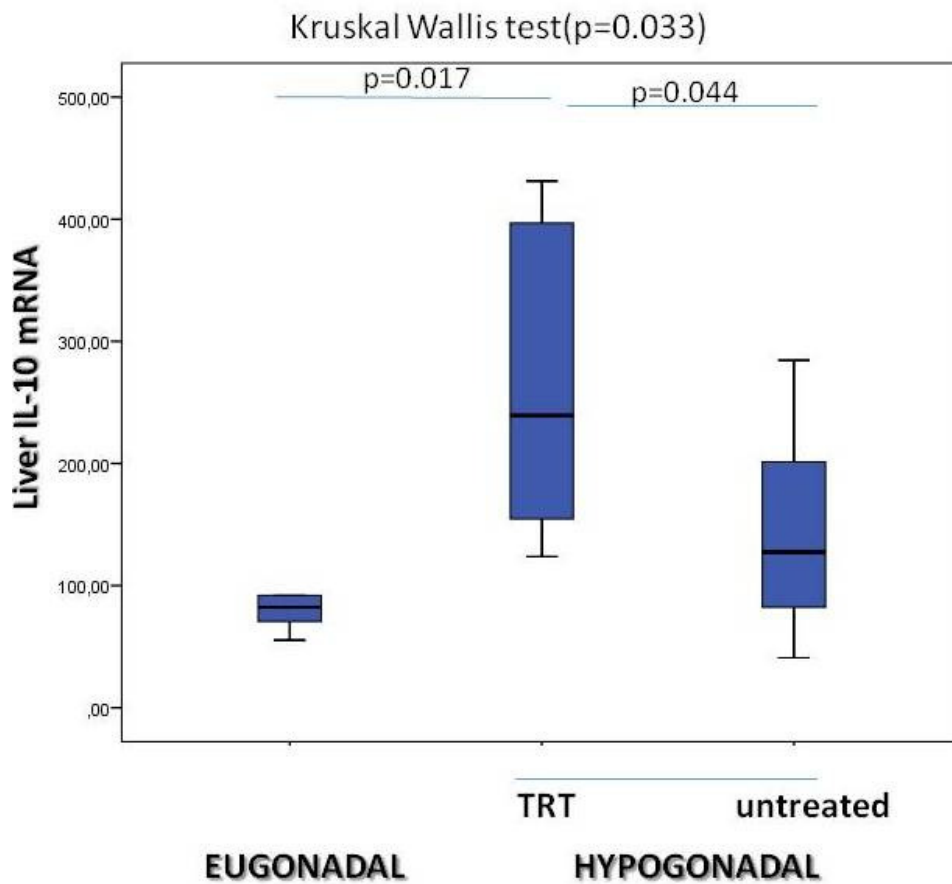
Tipo di analisi	Totale pazienti	N. pazienti EU	N. pazienti IPO-NS	N. pazienti IPO-TRT
Fegato: istologia	38	7	23	8
Fegato: mRNA IL-10 e markers M1/M2	32	6	18	8
VAT: glucose uptake essay	26	5	12	9

Biopsia epatica: esame istologico

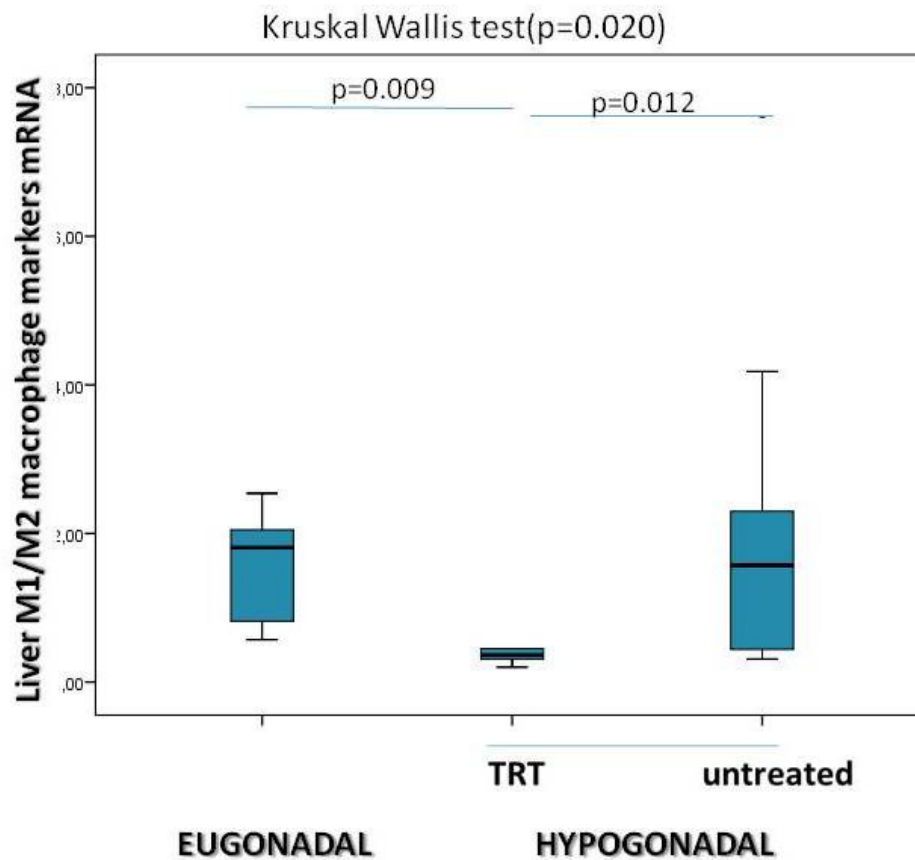
Le biopsie epatiche dei pazienti sottoposti ad intervento chirurgico non hanno dimostrato differenze statisticamente significative nei tre differenti bracci per quanto riguarda il NAS ($p=0,83$). Non è emersa alcuna correlazione tra NAS score e BMI ($r=0,16$; $p=0,35$); mentre si è osservata una correlazione statisticamente significativa tra concentrazioni di TT misurato al momento dell'intervento (V_1) e NAS score ($r=-0,42$; $p=0,008$). La correlazione tra TT misurato al momento dell'arruolamento (V_0) e NAS score non era significativa ($r=-0,12$; $p=0,45$)

Biopsia epatica: nRNA IL-10 e mRNA Marker M1/M2

All'analisi del mRNA dell'IL-10 è emersa una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi, EU, IPO-NS e IPO-TRT ($p=0.033$). Le differenze tra i singoli gruppi sono riportate nel grafico sottostante.



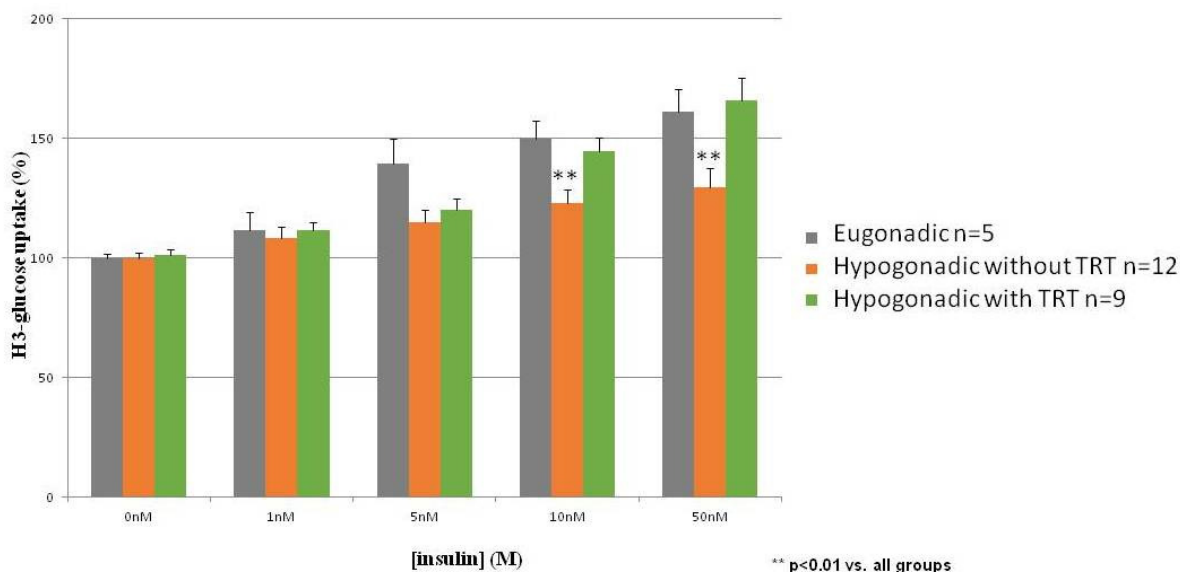
Anche all'analisi del mRNA del rapporto dei marker macrofagici M1/M2 è emersa una differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi, EU, IPO-NS e IPO-TRT ($p=0.02$). Le differenze tra i singoli gruppi sono riportate nel grafico sottostante.



Analisi dell'isulino-resistenza sui PADs

Gli effetti del TRT sulla disfunzione del tessuto adiposo sono stati studiati misurando l'uptake del glucosio marcato (^3H -2-deossi-D-glucosio) nei PADs esposti alla DIM. Come mostrato nella figura sottostante, insulina ha stimolato l'uptake di glucosio in maniera dose dipendente, con differenze tra i tre gruppi di pazienti. In particolare l'uptake di glucosio veniva stimolato maggiormente nei PADs dei pazienti appartenenti ai gruppi EU e IPO-TRT rispetto al solo gruppo dei pazienti IPO-NS che mostravano i livelli più bassi di testosterone. Tale differenza diventava statisticamente significativa a partire dalla concentrazione di insulina 5mM.

GLUCOSE UPTAKE ASSAY in human PADS



Discussione

I dati del presente studio mostrano come il TRT induca, nei pazienti affetti da ipogonadismo e con almeno un sintomo di natura sessuale legato all'ipogonadismo, un miglioramento della NAFLD e della disfunzione dei preadipociti in termini di sensibilità all'insulina.

L'associazione tra ipogonadismo e MetS è stata ben studiata nell'uomo^{46, 57}, come anche l'associazione tra ipogonadismo e NAFLD⁵⁸. Molti studi hanno dimostrato come il TRT abbia un ruolo protettivo nei confronti di differenti aspetti della MetS⁵⁹⁻⁶¹, sebbene alcuni altri hanno riportato un incremento del rischio cardiovascolare negli uomini sotto TRT^{62, 63}.

Analizzando i dati del presente studio, è emerso che i gruppi di pazienti, identificati dopo il dosaggio del TT in prima visita e la valutazione dei sintomi relati all'ipogonadismo durante la visita di approfondimento, sono risultati omogenei per età e per altezza. È emersa una differenza in termini di peso e, al

limite della significatività statistica, per il BMI. Tali differenze potrebbero essere dovute alla scarsa numerosità del campione e, in particolare, alla differenza del numero di individui nei differenti bracci.

All'analisi istologica delle biopsie epatiche non è emersa una differenza tra i tre differenti gruppi di pazienti per quanto riguarda il NAS score mentre è stata osservata una correlazione statisticamente significativa tra le concentrazioni di Testosterone misurate al momento dell'intervento chirurgico (V1) e il NAS score. Tale dato mostra come vi sia una relazione tra concentrazione di testosterone e grado della NAFLD misurato attraverso il NAS score e porta ad ipotizzare, se confermato su campioni più grandi, un possibile effetto diretto del TRT sul grado di NAFLD nei pazienti ipogonadici. L'osservazione che i tre gruppi inizialmente identificati non differiscano significativamente per NAS score mentre emerge una correlazione tra TT (al V1) e NAS score trova spiegazione nel fatto che l'assegnazione dei pazienti ad ognuno dei tre bracci avviene sulla base del dosaggio di TT eseguito in prima visita. Al contrario, la correlazione del TT con il NAS score è stata osservata considerando i prelievi ematici eseguiti al momento dell'intervento, vale a dire dopo che i pazienti in cui era stata posta indicazione al trattamento farmacologico erano stati effettivamente sottoposti a TRT. In questa fase, i pazienti inizialmente identificati come ipogonadici sintomatici (gruppo IPO-TRT) erano già stati sottoposti a TRT con conseguente aumento delle concentrazioni di TT. Tale dato è confermato dal fatto che i pazienti del gruppo IPO-TRT hanno una differenza statisticamente significativa tra concentrazioni plasmatiche medie di

Testosterone tra i prelievi eseguiti in prossimità della prima visita (prima del TRT) e quelli eseguiti al momento dell'intervento (dopo TRT).

L'osservazione di una correlazione tra concentrazione plasmatica di TT e NAS score sono in accordo con quanto pubblicato in uno studio da cui è emerso che la somministrazione di TRT in uomini ipogonadici con NAFLD è in grado di ridurre significativamente gli enzimi epatici, sebbene in tale studio non sia stata eseguita una misurazione diretta del grado di steatosi attraverso l'analisi del parenchima epatico⁴⁹. Al contrario, uno studio randomizzato del 2013 eseguito su 209 pazienti anziani di età >65 anni e ipogonadici non ha dimostrato una chiara influenza del TRT sulla quantità di grasso epatico misurato tramite MRI⁴⁸. I dati emersi dal presente studio, sebbene basati su un numero inferiore di pazienti, vanno valutati considerando che il legame tra TT e NAFLD è stato indagato sulla base del dato diretto fornito dell'analisi istologica del tessuto epatico, che costituisce l'esame di scelta per studiare la NAFLD e non basandosi su misure indirette (enzimi epatici) o radiologici (MRI)^{24, 29, 42}. Nel presente studio, inoltre, gli effetti del TRT sulla NAFLD sono stati studiati attraverso l'espressione genica dell'IL-10 e del rapporto dell'espressione genica dei markers macrofagici M1/M2.

L'IL-10 riveste un ruolo importante nella protezione dal danno tissutale epatico da parte di numerosi aggressori. Nel modello animale, infatti, è stato dimostrato come l'inibizione selettiva dell'IL-10 è associata con aumentata lipogenesi e diminuita sensibilità all'insulina nel fegato⁶⁴. Inoltre, sempre nel modello animale, l'osservazione che NAFLD e iperglicemia sono accompagnati da bassi livelli sistemici di IL-10 ha portato a ipotizzare che l'IL-

10 sia in grado di prevenire la steatosi epatica e altre patologie metaboliche⁶⁵. Tali dati sono confermati da studi sull'uomo in cui si osserva come la gravità del grado di NAFLD è associata a bassi livelli sierici di IL-10⁶⁶.

In aggiunta a ciò, vi è evidenza che la somministrazione di testosterone, almeno nel modello animale, è in grado di stimolare la produzione di IL-10 sebbene il meccanismo, conseguente a stimolazione diretta o indiretta, non sia completamente chiaro⁶⁷. I risultati del presente studio confermano i dati pubblicati finora in letteratura e dimostrano come nel fegato di pazienti ipogonadici a cui sia stata somministrata TRT vi sia una maggiore espressione di IL-10 rispetto ai pazienti ipogonadici non trattati e, sorprendentemente, a quelli eugonadici, suggerendo un ruolo diretto della somministrazione di testosterone nell'espressione genica di IL-10 nel tessuto epatico.

Dall'analisi dei dati del nostro studio, una differenza statisticamente significativa tra i pazienti trattati con TRT e gli altri due gruppi è emersa anche per quanto riguarda il rapporto dell'espressione di marker macrofagici M1/M2. Tale rapporto è risultato significativamente inferiore nei pazienti sottoposti a TRT rispetto a quelli eugonadici e a quelli ipogonadici. L'analisi dell'espressione dei marker macrofagici costituisce una misura indiretta dello stato infiammatorio ed è correlata con alcuni aspetti della MetS. Una stimolazione del fenotipo proinfiammatorio M1 e un concomitante decremento del fenotipo M2, infatti, è stato riportato nella NASH e nell'obesità^{68, 69}. I nostri dati mostrano che nei pazienti sottoposti a TRT si rileva una variazione nella polarizzazione macrofagica in favore del fenotipo M2 portando ad ipotizzare che il ruolo protettivo nei confronti della NAFLD possa essere

mediato, almeno in parte, dall'espressione di fenotipi macrofagici e produzione di citochine antiinfiammatorie.

Lo studio dell'insulino-sensibilità dei preadipociti fornisce una misura della disfunzione del tessuto adiposo legata alla MetS⁶. Questo studio dimostra come vi sia un legame diretto tra insulino-resistenza e ipogonadismo. Un dato interessante che emerge dai nostri risultati è costituito dal fatto che i pazienti ipogonadici presentano una significativamente maggiore insulino-resistenza rispetto ai pazienti eugonadici e a quelli sottoposti a TRT, facendo ipotizzare un ruolo potenziale da parte del TRT nella correzione dell'insulino-resistenza in pazienti obesi ipogonadici. L'associazione tra alterazione delle concentrazioni plasmatiche di steroidi sessuali e MetS, del resto, è ben dimostrata in letteratura e trova riscontro sia nel modello animale che nell'uomo^{57, 70}. I nostri dati dimostrano che è possibile ipotizzare di estendere all'uomo quanto osservato nel modello animale a proposito dell'influenza della TRT sulla disfunzione dei preadipociti, e in particolare sull'insulino-resistenza⁶. Già nel modello animale, infatti, era stato dimostrato che la somministrazione di testosterone in conigli nutriti con dieta ad alto contenuto di grassi ed affetti da sindrome metabolica, era in grado di indurre un miglioramento dell'insulino-sensibilità⁶. I meccanismi attraverso cui il testosterone regola l'adipogenesi e corregge la disfunzione del tessuto adiposo ad oggi sono compresi soltanto parzialmente⁷¹. Comunque, una azione diretta del testosterone sul VAT, mediata da recettori per gli androgeni, può essere ipotizzata, sia per quanto riguarda il ripristino delle normali caratteristiche morfologiche e funzionali che per la protezione dall'insulino-resistenza⁶.

In conclusione, i risultati ottenuti dal presente studio mostrano come vi sia una correlazione inversa tra concentrazioni plasmatiche di TT e grado di NAFLD. È emersa, inoltre, una differenza statisticamente significativa dell'espressione genica dell'IL-10 e nel rapporto tra i markers dei macrofagi M1/M2 tra pazienti ipogonadici trattati con testosterone, pazienti eugonadici e pazienti ipogonadici. Tali risultati portano ad ipotizzare un'azione protettiva da parte del TRT nei confronti della NAFLD e della disfunzione del tessuto adiposo in termini di insulino-resistenza nei pazienti obesi di sesso maschile affetti da ipogonadismo.

Bibliografia

1. Whitlock G, Lewington S, Sherliker P, et al. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. *Lancet* 2009; 373(9669):1083-96.
2. Ford ES. Risks for all-cause mortality, cardiovascular disease, and diabetes associated with the metabolic syndrome: a summary of the evidence. *Diabetes Care* 2005; 28(7):1769-78.
3. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *Jama* 2001; 285(19):2486-97.
4. Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365(9468):1415-28.

5. Jensen MD, Caruso M, Heiling V, Miles JM. Insulin regulation of lipolysis in nondiabetic and IDDM subjects. *Diabetes* 1989; 38(12):1595-601.
6. Maneschi E, Morelli A, Filippi S, et al. Testosterone treatment improves metabolic syndrome-induced adipose tissue derangements. *J Endocrinol* 2012; 215(3):347-62.
7. Despres JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature* 2006; 444(7121):881-7.
8. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1801(3):338-49.
9. Coelho M, Oliveira T, Fernandes R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Arch Med Sci* 2013; 9(2):191-200.
10. Ottaviani E, Malagoli D, Franceschi C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol* 2011; 174(1):1-4.
11. Kiess W, Petzold S, Topfer M, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22(1):135-53.
12. Saely CH, Geiger K, Drexel H. Brown versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontology* 2012; 58(1):15-23.
13. Fonseca-Alaniz MH, Takada J, Alonso-Vale MI, Lima FB. Adipose tissue as an endocrine organ: from theory to practice. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(5 Suppl):S192-203.
14. Gray SL, Vidal-Puig AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev* 2007; 65(6 Pt 2):S7-12.

15. Makki K, Froguel P, Wolowczuk I. Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines. *ISRN Inflamm* 2013; 2013:139239.
16. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab* 2000; 11(8):327-32.
17. Waki H, Tontonoz P. Endocrine functions of adipose tissue. *Annu Rev Pathol* 2007; 2:31-56.
18. Tilg H, Moschen AR. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. *Mol Med* 2008; 14(3-4):222-31.
19. Itoh M, Suganami T, Hachiya R, Ogawa Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflamm* 2011; 2011:720926.
20. Stepien M, Rosniak-Bak K, Paradowski M, et al. Waist circumference, ghrelin and selected adipose tissue-derived adipokines as predictors of insulin resistance in obese patients: preliminary results. *Med Sci Monit* 2011; 17(11):PR13-18.
21. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112(12):1796-808.
22. Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 2004; 92(3):347-55.
23. Ahmed M. Non-alcoholic fatty liver disease in 2015. *World J Hepatol* 2015; 7(11):1450-9.
24. Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *Jama* 2015; 313(22):2263-73.

25. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011; 140(1):124-31.
26. Vernon G, Baranova A, Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34(3):274-85.
27. Fotbolcu H, Zorlu E. Nonalcoholic fatty liver disease as a multi-systemic disease. *World J Gastroenterol* 2016; 22(16):4079-90.
28. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999; 116(6):1413-9.
29. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41(6):1313-21.
30. Fan JG, Peng YD. Metabolic syndrome and non-alcoholic fatty liver disease: Asian definitions and Asian studies. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2007; 6(6):572-8.
31. Musso G, Gambino R, Bo S, et al. Should nonalcoholic fatty liver disease be included in the definition of metabolic syndrome? A cross-sectional comparison with Adult Treatment Panel III criteria in nonobese nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 2008; 31(3):562-8.

32. Rector RS, Thyfault JP, Wei Y, Ibdah JA. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update. *World J Gastroenterol* 2008; 14(2):185-92.
33. Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, et al. Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005; 48(4):634-42.
34. Gentile CL, Pagliassotti MJ. The role of fatty acids in the development and progression of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2008; 19(9):567-76.
35. Asrih M, Jornayvaz FR. Inflammation as a potential link between nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *J Endocrinol* 2013; 218(3):R25-36.
36. Brunt EM. Pathology of fatty liver disease. *Mod Pathol* 2007; 20 Suppl 1:S40-8.
37. Pirgon O, Bilgin H, Cekmez F, et al. Association between insulin resistance and oxidative stress parameters in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013; 5(1):33-9.
38. Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *J Hepatol* 2014; 60(5):1090-6.
39. Schuppan D, Kim YO. Evolving therapies for liver fibrosis. *J Clin Invest* 2013; 123(5):1887-901.

40. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005; 115(1):56-65.
41. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2008; 11(11):723-37.
42. Nalbantoglu IL, Brunt EM. Role of liver biopsy in nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014; 20(27):9026-37.
43. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999; 94(9):2467-74.
44. Derby CA, Zilber S, Brambilla D, et al. Body mass index, waist circumference and waist to hip ratio and change in sex steroid hormones: the Massachusetts Male Ageing Study. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 65(1):125-31.
45. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, et al. The metabolic syndrome and smoking in relation to hypogonadism in middle-aged men: a prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):712-9.
46. Corona G, Mannucci E, Forti G, Maggi M. Hypogonadism, ED, metabolic syndrome and obesity: a pathological link supporting cardiovascular diseases. *Int J Androl* 2009; 32(6):587-98.
47. Dhindsa S, Miller MG, McWhirter CL, et al. Testosterone concentrations in diabetic and nondiabetic obese men. *Diabetes Care* 2010; 33(6):1186-92.

48. Huang G, Bhasin S, Tang ER, et al. Effect of testosterone administration on liver fat in older men with mobility limitation: results from a randomized controlled trial. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2013; 68(8):954-9.
49. Haider A, Gooren LJ, Padungtod P, Saad F. Improvement of the metabolic syndrome and of non-alcoholic liver steatosis upon treatment of hypogonadal elderly men with parenteral testosterone undecanoate. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2010; 118(3):167-71.
50. NIH conference. Gastrointestinal surgery for severe obesity. Consensus Development Conference Panel. *Ann Intern Med* 1991; 115(12):956-61.
51. Corona G, Mannucci E, Petrone L, et al. ANDROTEST: a structured interview for the screening of hypogonadism in patients with sexual dysfunction. *J Sex Med* 2006; 3(4):706-15.
52. Petrone L, Mannucci E, Corona G, et al. Structured interview on erectile dysfunction (SIEDY): a new, multidimensional instrument for quantification of pathogenetic issues on erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 2003; 15(3):210-20.
53. Rosen RC, Cappelleri JC, Smith MD, et al. Development and evaluation of an abridged, 5-item version of the International Index of Erectile Function (IIEF-5) as a diagnostic tool for erectile dysfunction. *Int J Impot Res* 1999; 11(6):319-26.
54. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, et al. Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society

- clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(6):1995-2010.
55. Corona G, Rastrelli G, Vignozzi L, Maggi M. Emerging medication for the treatment of male hypogonadism. *Expert Opin Emerg Drugs* 2012; 17(2):239-59.
 56. Saad F, Aversa A, Isidori AM, et al. Onset of effects of testosterone treatment and time span until maximum effects are achieved. *Eur J Endocrinol* 2011; 165(5):675-85.
 57. Corona G, Monami M, Rastrelli G, et al. Testosterone and metabolic syndrome: a meta-analysis study. *J Sex Med* 2011; 8(1):272-83.
 58. Mody A, White D, Kanwal F, Garcia JM. Relevance of low testosterone to non-alcoholic fatty liver disease. *Cardiovasc Endocrinol* 2015; 4(3):83-89.
 59. Finkelstein JS, Lee H, Burnett-Bowie SA, et al. Gonadal steroids and body composition, strength, and sexual function in men. *N Engl J Med* 2013; 369(11):1011-22.
 60. Jones TH. Effects of testosterone on Type 2 diabetes and components of the metabolic syndrome. *J Diabetes* 2010; 2(3):146-56.
 61. Marin P, Holmang S, Gustafsson C, et al. Androgen treatment of abdominally obese men. *Obes Res* 1993; 1(4):245-51.
 62. Basaria S, Coviello AD, Travison TG, et al. Adverse events associated with testosterone administration. *N Engl J Med* 2010; 363(2):109-22.

63. Vigen R, O'Donnell CI, Baron AE, et al. Association of testosterone therapy with mortality, myocardial infarction, and stroke in men with low testosterone levels. *Jama* 2013; 310(17):1829-36.
64. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, et al. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* 2008; 48(4):628-37.
65. den Boer MA, Voshol PJ, Schroder-van der Elst JP, et al. Endogenous interleukin-10 protects against hepatic steatosis but does not improve insulin sensitivity during high-fat feeding in mice. *Endocrinology* 2006; 147(10):4553-8.
66. Paredes-Turrubiarte G, Gonzalez-Chavez A, Perez-Tamayo R, et al. Severity of non-alcoholic fatty liver disease is associated with high systemic levels of tumor necrosis factor alpha and low serum interleukin 10 in morbidly obese patients. *Clin Exp Med* 2016; 16(2):193-202.
67. Liva SM, Voskuhl RR. Testosterone acts directly on CD4+ T lymphocytes to increase IL-10 production. *J Immunol* 2001; 167(4):2060-7.
68. Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, et al. Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes* 2009; 58(11):2574-82.
69. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest* 2007; 117(1):175-84.

70. Filippi S, Vignozzi L, Morelli A, et al. Testosterone partially ameliorates metabolic profile and erectile responsiveness to PDE5 inhibitors in an animal model of male metabolic syndrome. *J Sex Med* 2009; 6(12):3274-88.
71. Gupta V, Bhasin S, Guo W, et al. Effects of dihydrotestosterone on differentiation and proliferation of human mesenchymal stem cells and preadipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 296(1-2):32-40.