

INDICE

CAPITOLO 1	3
ANATOMIA DELLE VIE SEMINALI	3
1.1) TESTICOLO.....	3
1.2) TUBULI RETTI E RETE TESTIS	6
1.3) EPIDIDIMO.....	6
1.4) CONDOTTI DEFERENTI	7
1.5) CONDOTTI EIACULATORI.....	8
1.6) VESCICHETTE SEMINALI.....	8
1.7) PROSTATA.....	9
1.8) PENE.....	11
CAPITOLO 2	13
SPERMA	13
2.1) NATURA E COMPOSIZIONE	13
2.2) LA SPERMATOGENESI	14
CAPITOLO 3	16
FISIOPATOLOGIA GONADICA MASCHILE	16
3.1) IL GnRH.....	16
3.2) LE GONADOTROPINE IPOFISARIE	17
3.3) REGOLAZIONE DELL'ASSE.....	18
3.4) IPOGONADISMO.....	19
CAPITOLO 4	27
INFERTILITA'	27
4.1) DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA	27
4.2) CAUSE DI INFERTILITA'	29
4.3) DIAGNOSI INFERTILITA'	44
4.4) TRATTAMENTO DELL'INFERTILITA'	54
CAPITOLO 5	58
PROTOCOLLO DI STUDIO	58
5.1) INTRODUZIONE.....	58

5.2) PAZIENTI.....	59
5.3) SCOPO DELLO STUDIO	60
5.4) MATERIALI E METODI.....	60
5.5) ANALISI STATISTICA DEI DATI.....	61
CAPITOLO 6.....	62
RISULTATI.....	62
6.1) STATISTICHE DESCRITTIVE.....	62
6.2) CORRELAZIONE TRA LIVELLI DI CORTISOLO NELLE TRE MATRICI	66
6.3) CORRELAZIONE TRA LIVELLI DI CORTISOLO SPERMATICO E PARAMETRI SEMINALI	69
6.4) DISCUSSIONE	74
6.5) CONCLUSIONI	78
BIBLIOGRAFIA	79

CAPITOLO 1

ANATOMIA DELLE VIE SEMINALI

L'apparato genitale maschile è costituito da organi esterni come pene e testicoli (contenuti nello scroto) e da organi interni come epididimi, condotti deferenti, prostata, vescichette seminali e uretra prossimale. Per la corretta funzione sessuale e riproduttiva maschile, ciascuno di questi organi dovrà essere necessariamente integro da un punto di vista anatomico-funzionale.

1.1) TESTICOLO

Anatomia macroscopica

I testicoli sono organi pari di forma ellissoidale, leggermente appiattiti in senso trasversale, contenuti in un sacco cutaneo che prende il nome di borsa scrotale, dal quale si diparte il setto scrotale che divide il testicolo destro dal testicolo sinistro (quest'ultimo posto leggermente più in basso). I testicoli sono appesi al funicolo spermatico, presentano un asse maggiore di circa 4-4,5 cm, un diametro anteroposteriore di 3 cm e uno trasversale pari a 2,5 cm. Il peso varia dai 10,5 ai 15 grammi, che raggiunge i 25 g considerando anche l'epididimo. Le facce anteriore, laterale e mediale sono convesse, anche se quest'ultima in maniera meno evidente rispetto alle prime due. La faccia posteriore, invece, sulla quale si inserisce il funicolo spermatico, risulta essere rettilinea e ospita per tutta la sua lunghezza l'epididimo. Entrambi i testicoli sono orientati in modo obliquo

nella sacca scrotale, nella fattispecie la faccia anteriore guarda avanti e in basso mentre quella posteriore è rivolta in dietro e in alto (1).

Anatomia microscopica

Il testicolo è rivestito da tre tonache, andandole a descrivere dall'esterno all'interno troviamo la tonaca vaginale, la tonaca albuginea ed in fine la tonaca vascolare. La tonaca vaginale deriva dalla porzione inferiore del processo peritoneovaginale ed è costituita da due componenti: il foglietto viscerale, altrimenti denominato epiorchio, e il foglietto parietale (periorchio). L'epiorchio contrae un intimo rapporto con la tonaca albuginea sottostante e a livello del margine mediale del testicolo si va a riflettere (in una linea di riflessione chiamata mesorchio) nel periorchio. Tra il foglietto viscerale e quello parietale si viene così a formare la cavità vaginale, uno spazio fisiologicamente virtuale che solo in condizioni patologiche, come nel caso di idrocele, diventa reale.

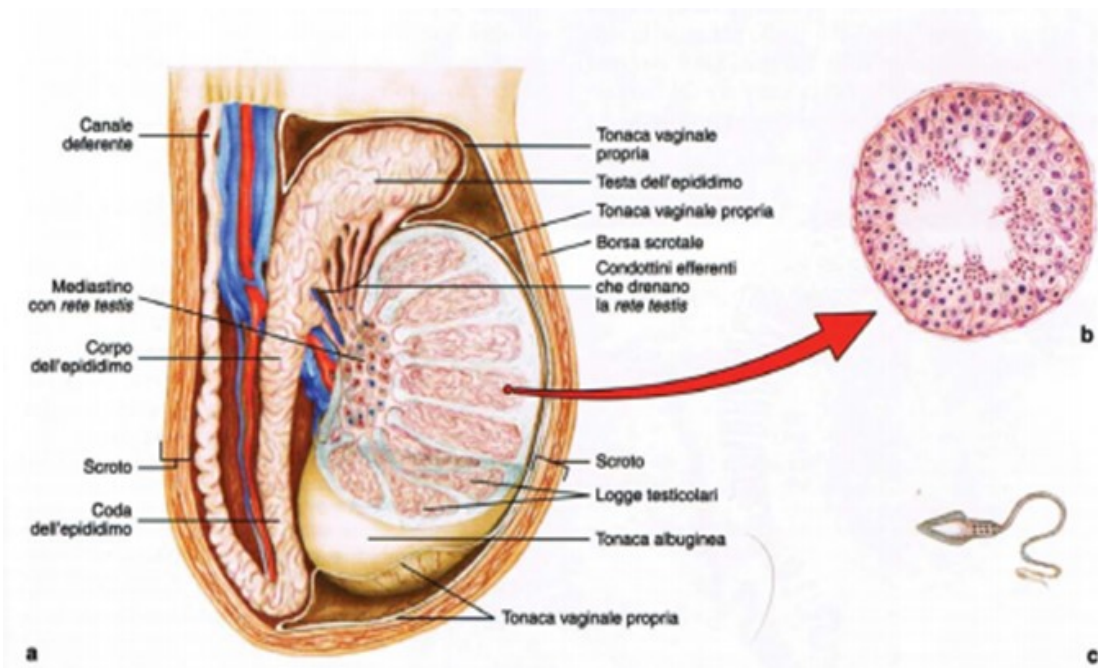


Figura 1: a. struttura complessiva testicolo e tratto iniziale vie spermatiche. b. sezione trasversale tubulo seminifero.

Normalmente, invece, a livello della cavità vaginale sarà presente soltanto una piccola quantità di liquido sieroso. Subito al di sotto dell'epiorchio troviamo la tonaca albuginea, costituita fundamentalmente da fasci intrecciati di fibre collagene e caratterizzata da uno spessore di 0,5-1 mm, che va progressivamente incrementandosi posteriormente dove contribuisce alla formazione del mediastino testicolare. Nella sua porzione più profonda origina la tonaca vascolare, costituita da tessuto connettivo lasso e da un plesso di vasi sanguigni. Dalla tonaca albuginea, a livello dell'ilo testicolare, si distaccano dei sepiamenti che prendono il nome di setti testicolari e che vanno a dividere il testicolo in circa 300 lobuli. Ogni lobulo è costituito da fino a quattro tubuli seminiferi (da 400 a 600 per testicolo) che rappresentano la componente parenchimatosa del testicolo; tali tubuli sboccano a livello dei tubuli retti e di conseguenza nella rete testis. Questi tubuli seminiferi, presi singolarmente, hanno una lunghezza che può arrivare a 70 cm, la quale moltiplicata per il loro numero ci porta a una lunghezza totale di circa 250 metri. Nel testicolo, oltre alla componente parenchimatosa, troviamo quella stromale, costituita da cellule interstiziali di Leydig, deputate alla produzione di androgeni, e cellule mioidi, presentanti un'attività contrattile in grado di favorire lo spostamento degli spermatozoi lungo il tubulo seminifero modificando il diametro del tubulo stesso (1).

1.2) TUBULI RETTI E RETE TESTIS

L'inizio vero e proprio delle vie spermatiche è rappresentato dai tubuli retti contenuti del testicolo. Qui, infatti, da a uno a sei tubuli seminiferi si continuano in un tubulo retto, ognuno dei quali ha un diametro compreso tra i 20 e i 90 μm e decorre per 200 – 400 μm nel mediastino, andando poi a formare delle anastomosi che danno vita alla rete testis. Dalla rete testis emergono 15-20 piccoli condotti efferenti che si inseriscono nel condotto dell'epididimo formando in questa maniera la testa dell'epididimo (1)

1.3) EPIDIDIMO

L'epididimo è un organo pari caratterizzato da una forma a virgola con lunghezza di 5 cm, larghezza di 1 cm e spessore di 0,5 cm. Contrae un intimo rapporto con il margine posteriore e con l'estremità superiore del corrispettivo testicolo e viene diviso in testa, corpo e coda. La testa è la porzione che contrae rapporti con il polo superiore del testicolo attraverso i piccoli condotti efferenti, e sopra di essa, può essere talvolta presente una piccola massa sferica definita appendice dell'epididimo, ritenuta dai più come il residuo dell'estremità cefalica del dotto mesonefrico. La coda contrae invece intimi rapporti con la parte inferiore del margine posteriore del testicolo e si continua nel canale deferente. L'epididimo è caratterizzato da un andamento tortuoso e ha il compito di raccogliere gli spermatozoi prodotti dal testicolo, questi verranno poi trasportati nel canale deferente grazie alla contrazione dell'epididimo mediata da sistema ortosimpatico ed endocrino, in tal senso importanti in questo tipo di regolazione saranno estrogeni, ossitocina ed endotelina-1 (2)

1.4) CONDOTTI DEFERENTI

Il condotto deferente segue immediatamente la coda dell'epididimo, ha un calibro di 2-3 mm caratterizzato da una parete particolarmente spessa (il lume circa 0,5 mm) e una lunghezza media di 40 cm. Possiamo distinguere il suo percorso in quattro tratti principali. Il più prossimale prende il nome di parte testicolare, addossata alla faccia posteromediale della coda e del corpo dell'epididimo, ha un iniziale decorso sinuoso che si fa poi rettilineo per entrare nel funicolo spermatico, dando origine alla seconda porzione del dotto deferente, ovvero la parte funicolare. Il dotto deferente a questo punto prosegue verso l'alto, penetra nel canale inguinale (parte inguinale) e una volta superato l'orifizio interno va a formare l'ultimo tratto del dotto deferente, la parte addominopelvica. Qui il dotto costeggia la faccia laterale della vescica e decorre lungo la parete laterale della piccola pelvi fino a portarsi verso la base della prostata, convergendo con il deferente del lato opposto. Questa ultima porzione descritta è caratterizzata da una dilatazione che va a costituire l'ampolla deferenziale. Le due ampolle si andranno poi a unire con le rispettive vescichette seminali andando a formare i condotti eiaculatori (1).

1.5) CONDOTTI EIACULATORI

I condotti eiaculatori sono due brevi dotti con lunghezza compresa tra i 2 e i 2,5 cm, caratterizzati da una forma a cono allungato con diametro che parte dai 3 mm nel seno eiaculatorio fino a raggiungere 1 mm poco prima dello sbocco in uretra (1). Derivano, in entrambi i lati, dall'unione del dotto deferente e della vescichetta seminale, hanno un tragitto obliquo verso il basso, in avanti e in dentro. Originano alla base della prostata e decorrono tra la sua linea mediana e i lobi di destra o sinistra. Fiancheggiano l'utricolo prostatico e terminano sul collicolo seminale con due orifizi a fessura. Oltre a ridursi, verso la loro estremità i condotti convergono (3).



Figura 2: vie seminali

1.6) VESCICHETTE SEMINALI

Le vescichette seminali aderiscono alla parte posteriore della base della vescica, presentano una forma conica e appiattita con asse maggiore tra i 5 e gli 8 cm, larghezza di 2,5 cm e spessore di circa 1 cm, il volume massimo contenuto è di 6 ml. Sono due organi ghiandolari androgeno-dipendenti che infatti subiranno un incremento di dimensioni durante la pubertà e tenderanno invece ad una atrofizzazione in vecchiaia (1).

1.7) PROSTATA

La prostata è un organo situato a livello della piccola pelvi, è solido, impari e mediano. Più precisamente, la prostata è situata tra il diaframma urogenitale in basso e la base della vescica in alto. Dietro la prostata troviamo l'ampolla rettale e davanti, invece, la sinfisi pubica. La prostata ha una forma a tronco di cono rovesciato, inclinato verso il basso e in

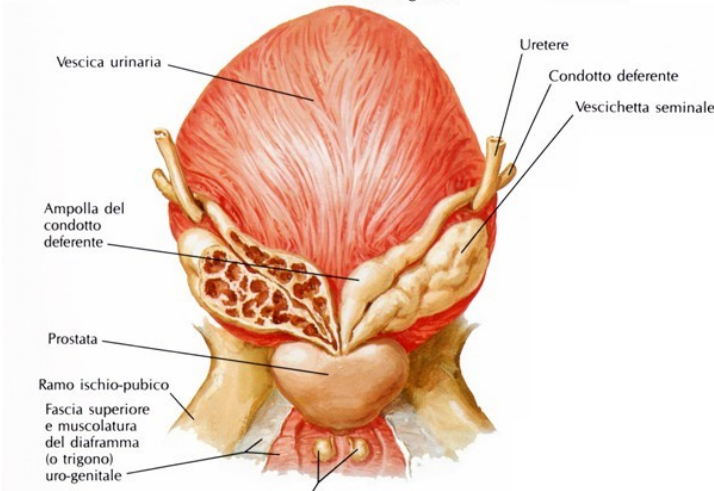
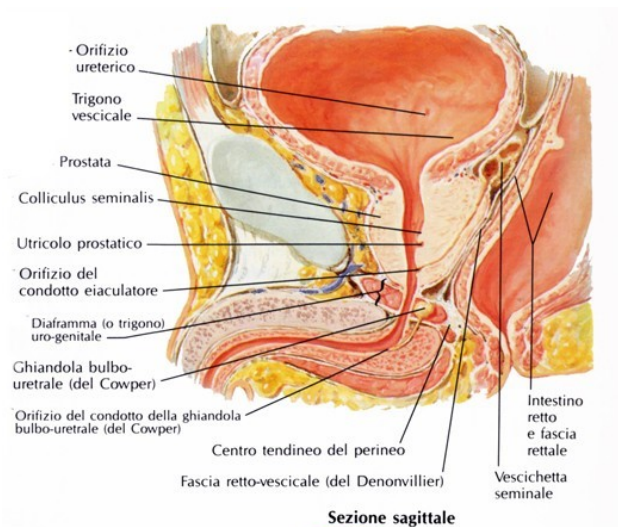


Figura 3: rapporti tra prostata, vescica e vescichette seminali visti posteriormente e in sezione sagittale.

avanti. Ha una consistenza duro-elastica e le sue dimensioni sono fortemente androgeno ed età-correlate. Tendenzialmente, intorno ai 20 anni la prostata avrà un'altezza di 3 cm, una larghezza nel suo punto più ampio (la base) di 4 cm, uno spessore di 2,5 cm e un peso di: circa 10 g, con il passare degli anni però la prostata tende ad andare in contro ad un'ipertrofia. La faccia vescicale che contrae

rapporto con il collo vescicale assume una forma triangolare e a livello dell'angolo anteriore presenta il punto di penetrazione dell'uretra che avvolge nella sua porzione prossimale (uretra prostatica). Mentre la faccia anteriore si presenta omogeneamente convessa, nella faccia posteriore troviamo un'escavazione trasversale nella quale

penetrano i dotti eiaculatori, porzione che rappresenta l'ilo della prostata. Storicamente, la prostata viene divisa in 4 lobi: anteriore, mediano, laterale destro e laterale sinistro. Ultimamente, però la suddivisione utilizzata maggiormente nella descrizione della struttura prostatica è quella in zona periferica, centrale, di transizione e quella fibromuscolare anteriore, che a differenza delle precedenti non presenta strutture ghiandolari. Strutturalmente, il parenchima prostatico è caratterizzato da ghiandole tubulo-alveolari che confluiscono in circa 20 dotti escretori che sboccano ai lati del collicolo seminale nei seni prostatici dell'uretra prostatica. Di fondamentale importanza, la funzione secretiva prostatica è caratterizzata da un secreto che rappresenta circa il 25% del liquido seminale. Il secreto prostatico in questione ha un ph di 6,4, si presenta lattescente e contiene al suo interno immunoglobuline, zinco, acido citrico, spermina, spermidina ed un numero considerevole di enzimi come fosfatasi acida, amilasi, proteasi, beta glucuronidasi e fibrolisina (3).

1.8) PENE

Il pene è un organo fondamentale sia da un punto di vista genitale, permettendo infatti la copulazione, sia da un punto di vista urinario, consentendo la minzione. Si compone di due corpi cavernosi e un corpo spongioso e può essere suddiviso in due parti: la radice e

il corpo. La radice è formata dalla base dei due corpi cavernosi, che si estendono dalle branche ischiopubiche e sono circondati dai muscoli ischiocavernosi e dal bulbo dell'uretra, la prima parte del corpo spongioso dall'aspetto rigonfio. Il corpo spongioso è circondato dai muscoli

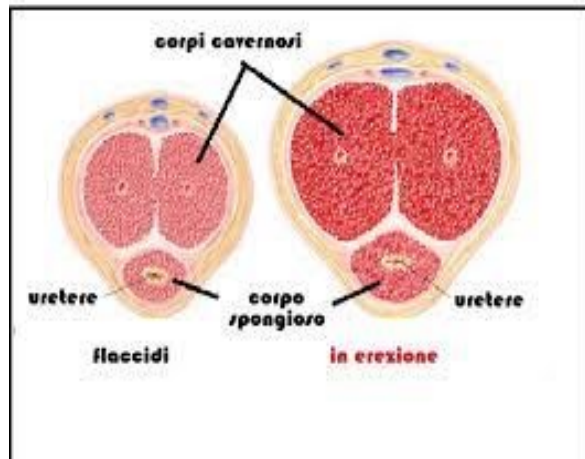


Figura 4: sezione trasversale pene.

bulbocavernosi, collegato al diaframma urogenitale ed è attraversato dall'uretra e dai dotti delle ghiandole bulbouretrali. Il corpo del pene è costituito dai due corpi cavernosi e dal corpo spongioso, con dimensioni di circa 10 cm di lunghezza e 9 cm di circonferenza a riposo.

All'interno, sono presenti due solchi, il solco dorsale attraversato dalla vena dorsale del pene e il solco ventrale che ospita il corpo spongioso. Ogni corpo cavernoso è rivestito dalla tonaca albuginea, che si fonde per formare il setto del pene. Il corpo cavernoso è composto principalmente da tessuto connettivo, fibre elastiche e cellule muscolari lisce, formando le trabecole che delimitano delle cavità chiamate cavernule, rivestite da cellule

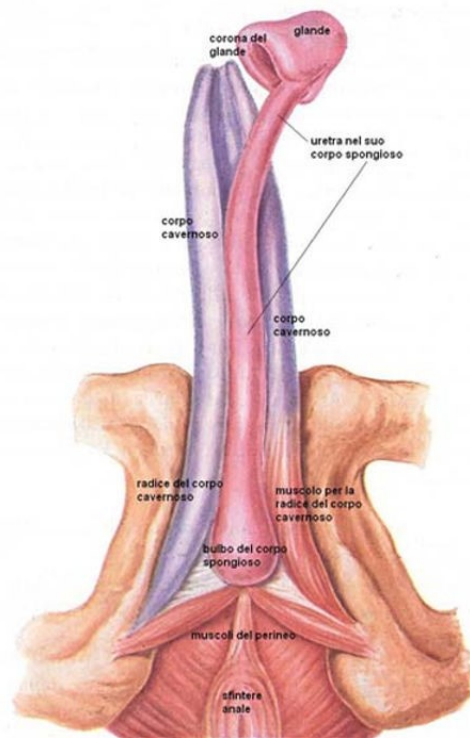


Figura 5: anatomia pene.

endoteliali. Durante l'erezione, le arterie elicine si dilatano, permettendo l'afflusso di sangue nelle cavernule e causando l'erezione. Il corpo spongioso è singolo e contiene un bulbo nella parte prossimale, che si restringe lungo la lunghezza del corpo del pene fino a formare un secondo rigonfiamento chiamato glande, che include il meato uretrale esterno. Il glande è separato dal collo del pene dal solco balanoprepuziale, coperto dal prepuzio solo a riposo. Il pene è ancorato all'apparato sospensore del pene, composto dal legamento fundiforme e dal legamento sospensore. La vascolarizzazione è fornita dalle arterie pudende esterne, che irrorano gli involucri del pene, e dalle arterie pudende interne, che esitano nelle arterie bulbouretrali, nelle arterie uretrali e nelle arterie profonde del pene. Il drenaggio venoso avviene attraverso le vene pudende interne, la vena dorsale superficiale e il plesso pudendo nel quale convergono vene uretrali, bulbouretrali e la vena dorsale profonda. L'innervazione è composta da nervi superficiali e profondi, l'innervazione ortosimpatica proviene dal plesso ipogastrico e quella parasimpatica dal parasimpatico sacrale.

CAPITOLO 2

SPERMA

2.1) NATURA E COMPOSIZIONE

Lo sperma è un liquido biologico di aspetto biancastro, vischioso, con un PH di natura lievemente alcalina, di volume variabile tra 1,5 e 5 ml, costituito da una componente corpuscolata diluita nel fluido seminale prodotto dalle vescichette seminali un (50 – 80%), dalla prostata (25%) e dalle ghiandole bulbouretrali, le quali sono responsabili della componente volumetricamente più variabile. La parte corpuscolata dello sperma è rappresentata soprattutto da spermatozoi, con

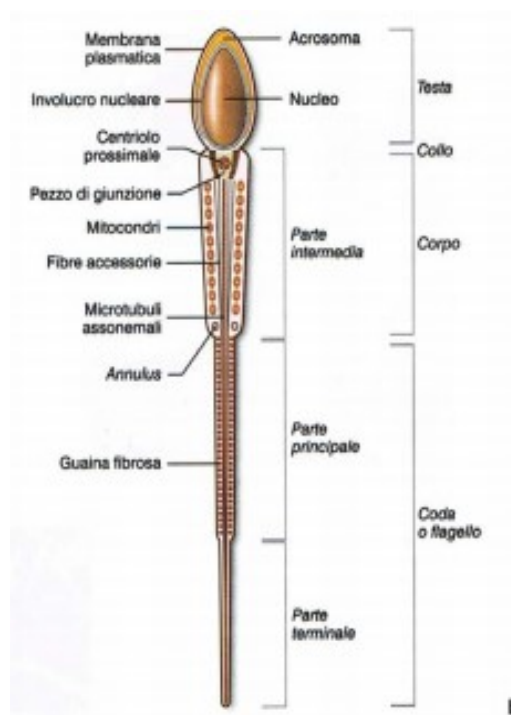


Figura 6: gamete maschile.

una concentrazione che secondo le linee guida WHO 2021 deve essere fisiologicamente sopra i 16 milioni per ml. Oltre agli spermatozoi troviamo leucociti, cellule di sfaldamento e cellule germinali immature. Nel liquido seminale, invece, troviamo sostanze fondamentali per il mantenimento della vitalità degli spermatozoi come sorbitolo, fruttosio e tutte le componenti di origine prostatica descritte nel capitolo precedente.

2.2) LA SPERMATOGENESI

La spermatogenesi è un processo altamente complesso che si verifica all'interno dei tubuli seminiferi e che culmina nella produzione dei gameti maschili maturi. È importante notare che l'intero processo spermatogenico richiede circa 74 giorni, anche se diversi recenti studi suggeriscono che il tempo totale necessario per la produzione di spermatozoi eiaculati potrebbe variare tra 42 e 76 giorni (4). Tale processo è costituito da diverse fasi caratterizzate da una distribuzione caratteristica: le prime avverranno nei compartimenti più profondi del tubulo seminifero, poi successivamente le cellule implicate nel processo verranno sospinte verso il lume del tubulo. La prima fase, come detto, avviene quindi nel compartimento basale del tubulo seminifero (sotto la barriera ematotesticolare) dove avremo una mitosi con relativa moltiplicazione delle cellule germinali staminali e degli spermatogoni più differenziati, con formazione degli spermatociti di 1° ordine. Gli spermatogoni, infatti sono situati proprio in questo compartimento basale, in delle nicchie circondate da cellule di Sertoli e sono distinti in tre popolazioni derivanti da fenomeni mitogeni e differenziativi. Sono quindi tre popolazioni cronologicamente successive, che si distinguono in spermatogoni di tipo A, spermatogoni intermedi e spermatogoni di tipo

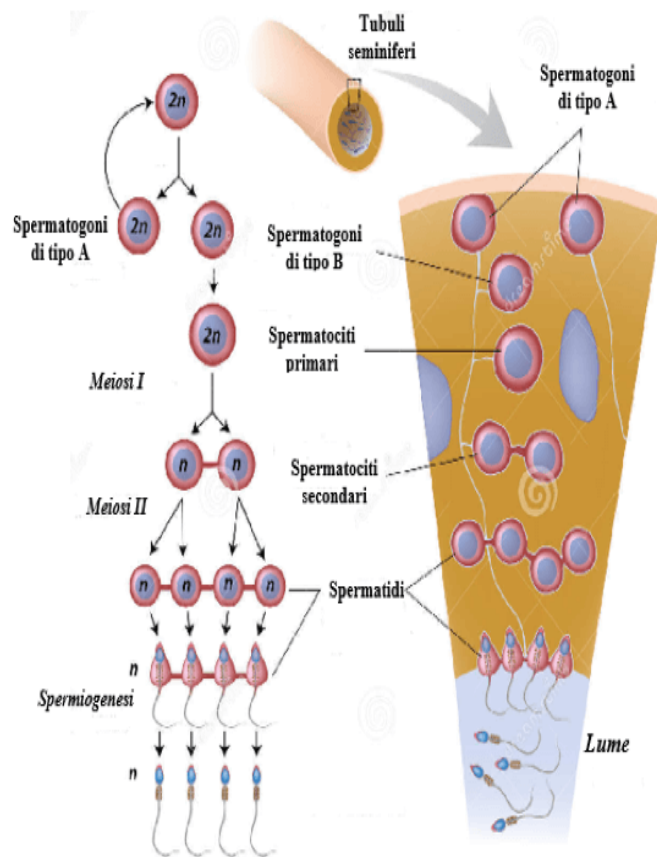


Figura 7: spermatogenesi

(equazionale) degli spermatociti di 2° ordine che esita nella formazione di spermatidi aploidi. Nella fase successiva, la terza, andremo incontro alla trasformazione da spermatidi a spermatozoi, fase che avviene superficialmente nell'epitelio seminifero e non prevede divisioni, bensì un composito processo di differenziazione, la spermatogenesi vera e propria. A partire da spermatidi rotondi avremo così la formazione di spermatozoi passando per spermatidi in allungamento e spermatidi allungati.

B. Dagli spermatogoni di tipo B avranno origine gli spermatociti in preleptotene (spermatociti di 1° ordine che attraversano la barriera ematotesticolare). In seconda istanza, al di sopra della barriera ematotesticolare, avremo una prima divisione meiotica (riduzionale) degli spermatociti di 1° ordine con formazione di due spermatociti di 2° ordine contenenti 23 cromosomi ciascuno, poi una seconda divisione meiotica

CAPITOLO 3

FISIOPATOLOGIA GONADICA MASCHILE

3.1) IL GnRH

Il primum movens dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, diretto responsabile per quanto concerne la regolazione della funzione gonadica, è il GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone), un ormone peptidico costituito da 10 aminoacidi, prodotto da neuroni derivanti dall'epitelio olfattivo embrionale che nel corso dello sviluppo fetale vanno incontro a una migrazione lungo i nervi olfattivi fino ad arrivare all'ipotalamo, dove si appoggiano ai vasi portali ipofisari che saranno dunque i primi a ricevere l'ormone in questione. Abbiamo dunque visto quello che avviene fisiologicamente, è importante tuttavia ricordare che se dovessero esserci dei problemi in questo processo di migrazione potremmo andare incontro a condizioni patologiche di ipogonadismo ipogonadotropo (5). Il GnRH viene quindi prodotto dai neuroni ipotalamici a livello dell'area preottica, della zona del setto e del nucleo arcuato (6) in maniera pulsatile. La suddetta pulsatilità della secrezione è fondamentale per la corretta funzione dell'asse descritto, come riscontrabile anche nella pratica clinica dove la terapia sostitutiva con GnRH-analoghi deve rispettare questo presupposto, mentre la somministrazione continua può essere invece utilizzata per ridurre i livelli di ormoni steroidei gonadici attraverso il blocco dell'asse (7). A livello dei vasi portali ipofisari, il GnRH subisce una fine regolazione dettata da afferenze noradrenergiche, dopaminergiche, serotoninergiche e neuropeptidiche quali TRH e CRH, lasciando intendere come diverse situazioni legate al sistema nervoso, siano esse

fisiologiche, patologiche o farmacologiche, possano interferire con la secrezione di questo polipeptide (8).

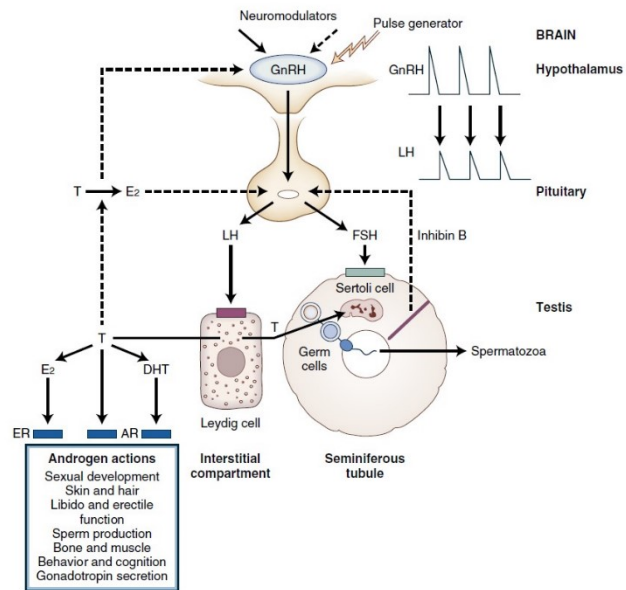
3.2) LE GONADOTROPINE IPOFISARIE

Tramite un recettore di membrana (GnRH-R) posto su cellule ipofisarie che prendono il nome di gonadotrope, il GnRH regola la secrezione dell'ormone follicolo stimolante (FSH) e dell'ormone luteinizzante (LH), che rappresentano le gonadotropine ipofisarie. Queste sono ormoni glicoproteici costituiti da una subunità alfa, identica per entrambe, e da una subunità beta. Il GnRH sarà dunque il principale protagonista nel regolare la secrezione delle gonadotropine agendo in special modo sulla secrezione dell'LH. Un concetto precedentemente anticipato e che andiamo a riprendere per la sua straordinaria importanza è quello relativo alla pulsatilità nella secrezione del GnRH: infatti saranno proprio variazioni della stessa in termini di ampiezza e frequenza a regolare fenomeni come l'induzione della pubertà e, nella donna, la comparsa e il mantenimento dell'ovulazione. LH ed FSH agiscono sulle gonadi tramite dei recettori accoppiati a proteine G e nell'uomo il primo avrà un'azione trofica sulle cellule di Leydig, favorendo la steroidogenesi locale con produzione di testosterone, il secondo invece esplicherà la sua funzione stimolando le cellule di Sertoli.

3.3) REGOLAZIONE DELL'ASSE

L'asse in questione è finemente regolato da un sofisticato meccanismo costituito da più feedback che intervengono su vari livelli. Gli ormoni sessuali possono infatti intervenire sia a livello ipofisario, modulando quindi la secrezione di LH, ma anche più a monte,

andando dunque ad agire sulla secrezione di GnRH a livello ipotalamico. Gli steroidi sessuali non sono però gli unici fattori a regolare l'asse. Ad esempio, è noto come prolattina e dopamina abbiano effetti soppressivi sull'asse (9) e come ci siano fattori gonadici quali attivina, fosfolistina e inibina



anch'essi in grado di regolare l'asse: *Figura 7: asse ipotalamo-ipofisi-gonadi*

in caso di danno testicolare, infatti, si riducono i livelli di inibina B circolante (10), con conseguente minore inibizione sul rilascio di FSH, i cui livelli plasmatici incrementano in modo inversamente proporzionale.

Un altro aspetto di vitale importanza quando si parla di asse-ipotalamo-ipofisi-gonadi è di come il suo funzionamento possa variare in particolari momenti della vita. Soffermandoci sul periodo dell'età riproduttiva vediamo come, nella donna, siano proprio queste oscillazioni periodiche a determinare il ciclo mestruale che è specchio di queste variazioni ormonali, per l'appunto cicliche, che avvengono a monte.

3.4) IPOGONADISMO

L'ipogonadismo maschile è una condizione patologica caratterizzata da un'alterata funzione testicolare che si riflette in una riduzione o assenza della produzione di testosterone e/o della spermatogenesi. Le cause di ipogonadismo maschile vengono distinte in primarie (o testicolari), secondarie (ipofisarie o ipotalamiche) o da resistenza periferica agli androgeni (11). L'ipogonadismo, inoltre, può essere classificato in base all'età di insorgenza in pre-puberale e post-puberale, con differenti manifestazioni cliniche.

L'ipogonadismo primario trova come causa un'alterazione organica o funzionale dei testicoli e sarà caratterizzato da alti livelli di gonadotropine (ipogonadismo ipergonadotropo), dipendenti da un mancato feedback negativo dell'asse.

L'ipogonadismo ipergonadotropo può essere conseguenza di cause congenite come criptorchidismo, Sindrome di Klinefelter e Sindrome di Noonan o anomalie dei cromosomi, oppure può dipendere da fattori acquisiti come l'età, traumi, radiazioni, neoplasie testicolari, torsioni testicolari, malattie autoimmuni, ma anche varicocele, sarcoidosi, emocromatosi, insufficienza renale e cirrosi epatica.

La causa primaria dell'ipogonadismo secondario, invece, risiede nel tratto più a monte dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Anche in questo caso, le cause possono essere distinte in congenite, come Sindrome di Prader-Willy e Sindrome di Kallmann, oppure acquisite, come tumori che portano ad un danno ipofisario, apoplezia pituitaria, patologie infiltrative dell'ipofisi, iperprolattinemia, trauma cranico, cirrosi epatica, esercizio fisico particolarmente intenso, diabete mellito, obesità ma anche farmaci quali oppioidi, GnRH agonisti, GnRH antagonisti o glucocorticoidi.

Questi quadri di ipogonadismo si manifestano poi in maniera differente a seconda del tipo, della gravità e dell'età d'insorgenza del difetto funzionale. Se l'ipogonadismo si presenta in epoca post-puberale, infatti, la sintomatologia caratteristica sarà rappresentata da disfunzione erettile, riduzione di fantasie erotiche e di erezioni spontanee al mattino.

Una manifestazione prepuberale, invece, sarà contraddistinta da alterazioni dei caratteri sessuali secondari, con assenza o comunque riduzione dei peli corporei soprattutto nelle zone più tipicamente associate al sesso maschile come ad esempio la barba. Inoltre, possiamo osservare una redistribuzione in senso femminile del grasso corporeo, con un'aumentata deposizione a livello dei fianchi. A questo si associa anche una riduzione della massa muscolare, che insieme a quanto detto prima porta il soggetto ad avere una conformazione fisica con caratteristiche tipicamente ginoidi.

Il testosterone, infatti, ha un ruolo di vitale importanza proprio all'inizio della pubertà, dove, oltre allo sviluppo dei caratteri sessuali trattati in precedenza, è fondamentale per la chiusura delle epifisi ossee e per la crescita puberale. L'aumento dei livelli di testosterone in questo periodo è dettato da un importante incremento delle gonadotropine che si riflette anche nell'attivazione della spermatogenesi. Oltre alle caratteristiche fenotipiche viste prima quindi possiamo riscontrare, ginecomastia, storia di criptorchidismo, infertilità, ipotrofia testicolare e ridotta massa ossea.

Se la carenza di testosterone, invece, si colloca in era prenatale, il quadro che ci troviamo davanti può passare da micropene e testicolo ritenuto (se il difetto si manifesta nel terzo trimestre di gravidanza) fino a quadri di testicoli intraddominali e femminilizzazione dei genitali esterni (se il difetto insorge nelle prime 14 settimane di gestazione).

Per diagnosticare l'ipogonadismo sarà importante andare ad eseguire un attento esame obiettivo atto a valutare fundamentalmente tutti gli aspetti fenotipici visti in precedenza. Detto ciò, il criterio diagnostico per ipogonadismo rimane la misurazione del livello di testosterone sierico misurato in almeno due occasioni.

Il testosterone è un ormone liposolubile, il che significa che non è solubile in acqua. Solo una piccola parte dell'ormone, approssimativamente il 2% del totale, circola liberamente nel sangue, mentre la maggioranza del testosterone misurabile nel plasma (circa il 98%) è legata a proteine di trasporto.

Queste proteine includono:

1. SHBG (Sex Hormone Binding Globulin, globulina legante gli ormoni sessuali):
Questa proteina è appositamente prodotta per legarsi al testosterone attraverso un legame molto forte. Circa il 44% del testosterone totale è legato a SHBG.
2. Albumina: È la proteina più abbondante nel plasma e il legame con il testosterone avviene in modo non specifico e meno stabile. Circa il 50% del testosterone circolante è trasportato dall'albumina.
3. CBG (Corticosteroid Binding Globulin, globulina legante i corticosteroidi):
Questa proteina è responsabile del legame e del trasporto degli ormoni corticosteroidi prodotti dalle ghiandole surrenali. Una piccola percentuale di testosterone (circa il 4%) è legato a CBG nel plasma.

Il testosterone libero, che circola nel sangue senza essere legato alle proteine, è la forma attiva dell'ormone ed è pronto ad agire sulle cellule bersaglio per svolgere le sue funzioni. La quota di testosterone legato a SHBG, a causa del suo forte legame, ha difficoltà a raggiungere immediatamente le cellule bersaglio ed è considerata una riserva senza attività metabolica immediata, a differenza del testosterone legato all'albumina che grazie ad un legame più debole, è considerato biodisponibile. È deducibile, quindi, come sia fondamentale andare a valutare il livello di testosterone totale ma è altresì importante considerare quanto di questo sia effettivamente libero; per farlo sono disponibili dei calcolatori che prendono in considerazione oltre, ovviamente, al testosterone totale anche il valore di albumina e di SHBG.

Si riportano di seguito i valori di riferimento del testosterone totale in relazione all'età del soggetto stesso.

Età	Testosterone medio	Valore minimo (5% percentile)	Valore massimo (95% percentile)
< 25	24.2 nmol/L 6.98 ng/mL	14.2 nmol/L (4.10 ng/mL)	33.1 nmol/L (9.55 ng/mL)
25 - 35	21.6 nmol/L 6.23 ng/mL	13.1 nmol/L (3.78 ng/mL)	33.0 nmol/L (9.52 ng/mL)
35 - 45	20.3 nmol/L 5.85 ng/mL	11.2 nmol/L (3.23 ng/mL)	32.6 nmol/L (9.40 ng/mL)
45 - 55	18.1 nmol/L 5.22 ng/mL	10.7 nmol/L (3.09 ng/mL)	31.5 nmol/L (9.09 ng/mL)
55 - 65	17.9 nmol/L 5.16 ng/mL	10.4 nmol/L (3.00 ng/mL)	29.8 nmol/L (8.59 ng/mL)

Figura 8: valori testosterone totale in base all'età

A livello diagnostico i valori di riferimento stabiliti da linee guida internazionali (ISA, ISSAM, EAU, ASA) che dobbiamo assolutamente tenere a mente ci informano che con un testosterone totale > 12nmol/L (3.5 ng/ml) possiamo ragionevolmente escludere l'ipogonadismo. Abbiamo invece una diagnosi di certezza con valori < 8 nmol/L (2.3 ng/ml) mentre con valori compresi tra 8 e 12 nmol/L ci troviamo in una zona grigia.

Abbiamo appena visto i valori di riferimento inerenti al testosterone totale, come anticipato però sappiamo della rilevanza clinica che assume la frazione libera del testosterone e proprio per tale motivo andiamo di seguito a riportare quelli che sono i valori desiderabili declinati in base all'età,

anche per quanto concerne il testosterone libero, è giusto ricordare però, che in questo caso non siamo probabilmente ancora arrivati ad avere valori di riferimento standardizzati.

La misurazione dei livelli di testosterone libero è consigliata quando sussiste un sospetto di anomalia nella proteina legante SHBG o quando i livelli totali di testosterone sono al limite inferiore del range di normalità per gli uomini. Le concentrazioni di testosterone libero possono essere determinate direttamente utilizzando uno dei vari metodi disponibili oppure calcolate in base alle concentrazioni totali di testosterone,

Età	Valori di riferimento (ng/dL)
20-25	5.25-20.7
25-30	5.05-19.8
30-35	4.85-19.0
35-40	4.65-18.1
40-45	4.46-17.1
45-50	4.26-16.4
50-55	4.06-15.6
55-60	3.87-14.7
60-65	3.67-13.9
65-70	3.47-13.0
70-75	3.28-12.2
75-80	3.08-11.3
80-85	2.88-10.5

Figura 9: valori testosterone libero in base all'età

SHBG e albumina. I metodi per la misurazione diretta, come la dialisi all'equilibrio e l'ultrafiltrazione centrifuga, risultano però particolarmente macchinosi e complessi, per questi motivi la Endocrine Society ritiene accettabile l'utilizzo dei suddetti algoritmi, specialmente nella comune pratica clinica (12).

Altre indagini che possono essere utili nell'indagare un potenziale ipogonadismo sono ad esempio quelle relative al dosaggio dei livelli plasmatici di LH, che risultano essere bassi nell'ipogonadismo secondario ed elevati nell'ipogonadismo primario. Ad oggi, però, non abbiamo univoci valori di riferimento per l'LH anche se lo studio EMAS ci indica come range di normalità quello di 1-7 IU/L. Se in pratica clinica dovessimo riscontrare valori nell'intorno dei limiti superiori, anche se accompagnati da testosterone normale dovremo procedere con un accurato follow-up dettato dalla necessità di scoprire quelle forme di ipogonadismo subclinico che potrebbero evolvere in futuro in un ipogonadismo franco (13).

Per quanto riguarda le possibilità terapeutiche dobbiamo distinguere l'ipogonadismo ipergonadotropo da quello ipogonadotropo. Nel primo caso, infatti, la terapia sarà sicuramente di tipo sostitutivo con testosterone, atta a garantire un senso di benessere generale, migliorare la densità ossea, il desiderio e la funzione sessuale oltre che al mantenimento dei caratteri sessuali secondari (14). Tra le possibili formulazioni abbiamo quella iniettiva effettuata con testosterone enantato, testosterone propionato e testosterone undecanoato. La terapia iniettiva può essere effettuata sia per via intramuscolare che per via sottocutanea la quale sembrerebbe avere un profilo di sicurezza potenzialmente preferibile rispetto alla prima. Un'altra possibile via di somministrazione può essere quella orale, effettuata con testosterone undecanoato, che ha dalla sua la grande maneggevolezza, ma risulta attualmente poco utilizzata a causa del rapido metabolismo

epatico e della potenziale epatotossicità. Tutti i metodi di sostituzione del testosterone hanno dimostrato di essere efficaci come dimostrato dalla normalizzazione dei livelli sierici di testosterone (15).

Una via di somministrazione sempre più utilizzata in pratica clinica, specialmente per i pazienti in età avanzata, è quella transdermica. Il farmaco in questa maniera risulta facilmente assorbibile e privo dell'effetto di primo passaggio epatico che riscontriamo invece nella formulazione orale. Inoltre, data la sua emivita relativamente breve, la somministrazione può essere sospesa con rapido ritorno ai valori basali di testosterone, con ovvio vantaggio in condizioni come ipertrofia prostatica benigna in cui i sintomi ostruttivi possono essere peggiorati dalla terapia ormonale sostitutiva. Possiamo somministrare questi farmaci sottoforma di creme spalmabili o tramite cerotti medicati, queste applicazioni sono in grado di evitare i picchi di testosterone raddoppiando la stessa dopo le prime ore di applicazione e raggiungendo lo steady-state in circa 2-3 giorni.

Il trattamento dell'ipogonadismo ipogonadotropo, invece varia in base alle preferenze del paziente in merito alla futura fertilità. La terapia sostitutiva con testosterone rappresenta il trattamento di scelta per gli uomini che già hanno figli o non hanno intenzione di procreare e serve ad alleviare i sintomi e i segni dell'ipogonadismo. D'altra parte, per gli uomini che desiderano avere figli, le terapie con GnRH o gonadotropine rappresentano le migliori opzioni. In caso di ipogonadismo ipogonadotropo, è importante sottolineare che un trattamento medico di questo genere può effettivamente contribuire a risolvere la condizione di infertilità (16).

Un'altra condizione meritevole di trattazione è quella dell'ipogonadismo late-onset (LOH) che fino a qualche anno fa veniva impropriamente chiamato "andropausa". Questa particolare condizione viene definita come sindrome clinica e biochimica associata all'avanzare dell'età, caratterizzata da sintomi specifici e una carenza di testosterone sierico. La sintomatologia associata dipende fondamentalmente dai livelli di testosterone: in una grande coorte di pazienti affetti da LOH, è stato dimostrato che la perdita di libido e vigore può verificarsi a livelli di testosterone inferiori a 15 nmol/L, obesità addominale a livelli inferiori ai 12 nmol/L, umore depresso, disturbi del sonno, mancanza di concentrazione e diabete mellito di tipo 2 a livelli sotto i 10 nmol/L mentre vampate di calore e disfunzione erettile per valori inferiori a 8 nmol/L (17). Per fare diagnosi è necessario quindi associare alla sintomatologia tipica i livelli di testosterone totale e libero e andare ad escludere cause patologiche di ipogonadismo. Il trattamento prevede l'utilizzo di preparati naturali di testosterone (cioè senza androgeni sintetici). All'inizio, i preparati a breve durata d'azione (transdermici, orali) dovrebbero essere preferiti ai preparati a lunga durata d'azione (intramuscolari, sottocutanei) (18).

CAPITOLO 4

INFERTILITA'

4.1) DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

L'infertilità è una condizione medica caratterizzata dalla mancanza di successo nel concepire una gravidanza dopo 12 mesi di rapporti sessuali regolari e non protetti. Questa condizione colpisce tra l'8 e il 12% delle coppie in età riproduttiva in tutto il mondo (19). Tale criterio dei 12 mesi è frutto del fatto che circa l'85% delle coppie raggiunge una gravidanza entro un anno, più nel dettaglio l'80% delle gravidanze avviene entro i primi 6 mesi di rapporti regolari, mirati e non protetti, mentre un ulteriore 10% si verifica tra il sesto e il dodicesimo mese con queste caratteristiche. Tuttavia, superato il limite di 12 mesi, solo la metà delle coppie riesce a concepire spontaneamente entro i successivi 36 mesi, e questa probabilità diminuisce ulteriormente nei successivi 48 mesi. Detto ciò, non dobbiamo aspettare che trascorra un anno prima di eseguire degli accertamenti, questo soprattutto se ci sono fattori anamnestici (anche l'età avanzata della donna) che ci fanno propendere per un quadro di infertilità (20).

La condizione di infertilità può essere inoltre distinta in primaria e secondaria, la prima nel mondo maschile (che ci interessa particolarmente in questo studio) si traduce in un uomo che non è mai riuscito a fecondare una donna, a prescindere dall'evoluzione della gravidanza (21). Per quanto riguarda invece l'infertilità secondaria, sempre nel maschio si ha quando l'uomo ha fecondato almeno una donna nella sua vita, uno studio a riguardo ci riporta come a quest'ultima possa contribuire la disfunzione erettile (22).

Un concetto fondamentale e chiarificatore quando si tratta questo argomento è la distinzione tra la condizione di infertilità appena descritta e quella di sterilità; infatti, con quest'ultimo termine si intende una condizione di impossibilità nell'ottenere una gravidanza, ed è un quadro molto più raro rispetto al precedente (dato ad esempio da un'orchietomia bilaterale).

Il concetto di "fecondità", ovvero della probabilità di concepire per ogni ciclo ci fa da apripista per introdurre un'altra distinzione importante: quella tra infertilità e sub-fertilità. Quest'ultima è infatti descritta con un indice di fecondità 3-4 volte più basso della media che presuppone tempi più lunghi per arrivare ad una gravidanza (23). Nella fattispecie descriviamo la sub-fertilità come una condizione in cui la funzionalità degli organi riproduttivi risulta compromessa ma non assente, tale quadro nel maschio può essere stadiato con la tecnica della capacitazione o separazione nemaspermica in 3 gradi a seconda del numero degli spermatozoi recuperati: lieve (>5 milioni), moderato (2-5 milioni) e grave (<2milioni).

4.2) CAUSE DI INFERTILITA'

Andando a valutare invece le cause di infertilità di coppia, possiamo distinguere prima di tutto 4 macrocategorie: da cause femminili, cause maschili, coinvolgimento di entrambi i partners e cause idiopatiche.

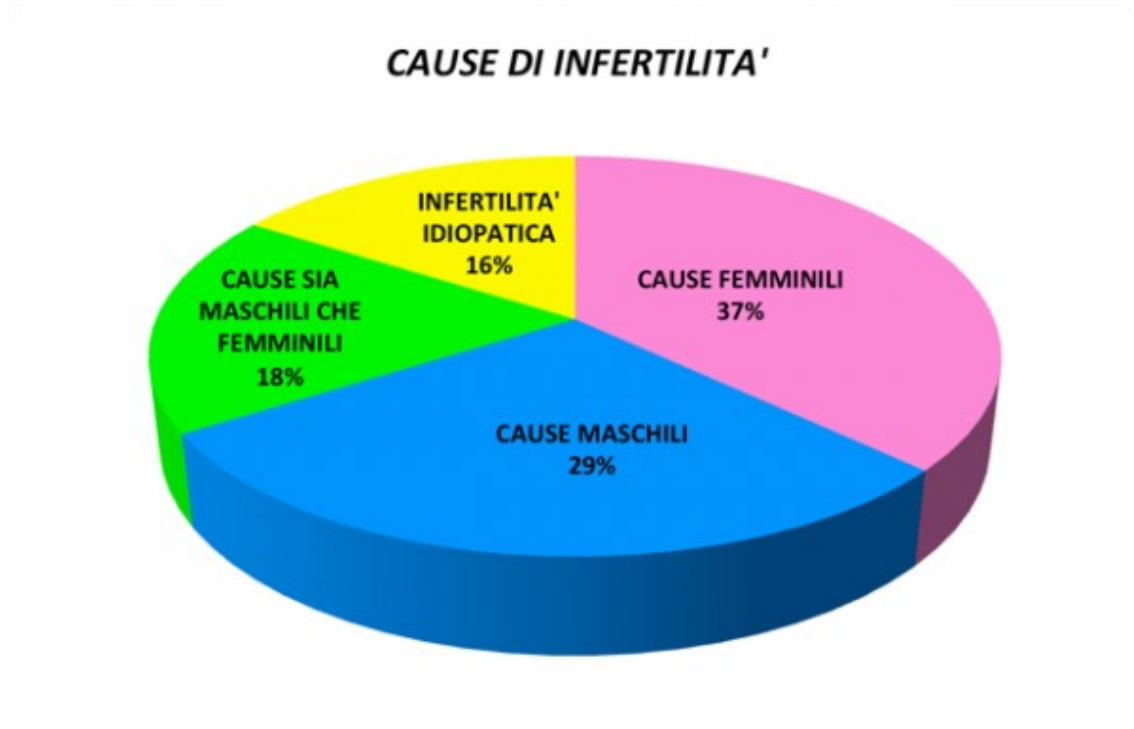


Figura 10: cause di infertilità

Queste ultime due, come possiamo vedere dal grafico a pagina precedente sono responsabili, insieme di circa il 34% dei casi di infertilità. La restante parte viene distinta in un cause squisitamente femminili (37%) e cause di origine maschile (29%).

Tra le cause di infertilità femminile ricordiamo quelle di origine anatomica come il danno tubarico post-infettivo, l'endometriosi e le anomalie uterine congenite o acquisite. Le anomalie uterine possono essere congenite, come ad esempio l'utero settato, o acquisite, come i miomi e le sinechie uterine. Queste condizioni possono contribuire all'infertilità,

alla perdita di gravidanza e a altre complicazioni legate alla gravidanza. Va notato, inoltre, che la malattia infiammatoria pelvica rappresenta la causa più comune di danni alle tube uterine (24). Tra le altre possibili cause ricordiamo quella di carattere endocrino-ovulatoria e molto significativa, specialmente in questo periodo storico, quella età correlata. Infatti, ricordiamo che l'età è ancora il miglior indicatore del potenziale riproduttivo, va annoverato inoltre che gravidanze in età avanzata, tra l'altro sempre più comuni, comportano rischi materno-fetali (25).

Dopo l'antecedente panoramica riguardante le cause di infertilità femminile, quello che ci preme trattare in maniera più approfondita in questa sede sono le cause predisponenti quadri di infertilità nel maschio. Queste, possono essere distinte in tre macrocategorie a seconda della sede affetta dal danno primitivo che può essere pre-testicolare, testicolare o post-testicolare.

CAUSE PRE-TESTICOLARI

Nelle cause pre-testicolari non troveremo alterazioni anatomiche dell'apparato riproduttivo maschile, il primum movens risiederà infatti in un'alterata funzione dell'asse gonadotropo che potrà essere congenita o acquisita. Oltre a queste condizioni possiamo ricordare la sindrome di cushing e altre endocrinopatie che poi andremo ad analizzare più nel dettaglio.

Le cause che vanno ad agire sull'asse gonadotropo si manifesteranno fundamentalmente con un ipogonadismo ipogonadotropo e possono essere distinte in forme congenite e forme acquisite, tra le prime annoveriamo ad esempio la Sindrome di Kallmann. Tale Sindrome è caratterizzata da un'alterata migrazione delle cellule GnRH secernenti

nell'ipotalamo; a monte di tale quadro c'è un difetto della proteina anosmina dato dalla mutazione del gene ad essa correlato (ANOS1). Avremo quindi un ipo/anosmia e un'insufficiente secrezione di GnRH da cui deriva il suddetto ipogonadismo ipogonadotropo con deficienza di ormone luteinizzante e ormone follicolostimolante. La terapia sostitutiva con gonadotropine deve essere iniziata all'inizio dello sviluppo puberale permettendo tendenzialmente il recupero della funzione riproduttiva. Una diagnosi tardiva invece può esitare in quadri più o meno severi come disturbi di natura psicologica, osteopenia, atrofia testicolare e alterazioni seminali (26).

Ricordiamo poi, tra le cause secondarie di ipogonadismo ipogonadotropo le neoplasie ipotalamiche o neoplasie ipofisarie, tra le quali ricordiamo macroadenomi e craniofaringiomi che portano a ridotta secrezione di LH ed FSH tramite un meccanismo compressivo.

L' ipogonadismo ipogonadotropo associato a valori normali di testosterone può essere secondario poi ad un abuso di androgeni anabolizzanti (6). Altre cause che possiamo citare sono quelle iatrogene da chirurgia o radioterapia della base cranica.

La Sindrome di Cushing invece coinvolge entrambi i sessi ed è caratterizzata da elevati valori di cortisolo nel sangue che alterano la secrezione pulsatile di GnRH con riduzione delle gonadotropine responsabile della ridotta fertilità che si associa a tale quadro.

In fine, altre cause di natura endocrina sono l'iperprolattinemia che inibisce il rilascio di gonadotropine con conseguente ridotta funzione testicolare e disfunzione erettile (27) e l'ipertiroidismo che risulta essere associato ad un aumento dei livelli di SHBG, proteina legante estradiolo, testosterone e diidrotestosterone che in alcuni casi si associa ad alterazioni spermatiche e ginecomastia (28).

CAUSE TESTICOLARI

Le cause testicolari sono caratterizzate da un'alterazione primitiva del testicolo con dirette conseguenze sulla spermatogenesi. La prognosi è caratterizzata da ridotte possibilità risolutive con probabilità riproduttive più scarse rispetto alle forme pre-testicolari. Possiamo distinguere le cause testicolari in cinque famiglie: le infezioni o infiammazioni del tratto genitale, le cause immunologiche, farmacologiche, le anomalie genetiche e quelle da danno testicolare che da sole rappresentano più della metà dei casi.

Cominciando proprio dalle cause legate a danno testicolare la prima per epidemiologia è sicuramente il varicocele. Si parla di varicocele quando abbiamo una dilatazione del plesso pampiniforme dato da un difetto dello scarico venoso con conseguente ectasia delle vene testicolari e formazione di una massa nell'apice del testicolo. Colpisce più del 10% della popolazione maschile, arriviamo a una prevalenza del 30-40% se analizziamo solo la popolazione affetta da problemi di fertilità (29). In circa il 90% dei casi il testicolo colpito è il sinistro, questa differenza deriva fondamentalmente da un fattore anatomico, infatti il plesso venoso di destra scarica, con un angolo acuto, nella vena cava inferiore che ha oltretutto un effetto di suzione. Il testicolo di sinistra invece scarica, con un angolo di 90 gradi sulla vena renale di sinistra predisponendo quindi a un difetto del ritorno venoso. Il varicocele può essere inoltre distinto in primario quando abbiamo un deficit delle valvole a nido di rondine e secondario quando invece è legato a processi espansivi addominali e/o pelvici che comprimono le vene spermatiche (tale forma va sospettata in caso di varicocele destro a rapida insorgenza). La clinica del varicocele è rappresentata da un senso di peso ad un emi-scroto, dalla presenza di una massa all'interno dello scroto e raramente da un vago dolore. La presenza di varicocele porta a una serie di alterazioni a livello testicolare, tra cui l'aumento della temperatura a cui è sottoposto il testicolo, il

riflusso di metaboliti dalle vene renali e surrenali, e la produzione intra-testicolare di specie reattive dell'ossigeno (ROS, Reactive Oxygen Species). Queste alterazioni hanno conseguenze sulla spermatogenesi, che possono essere osservate attraverso l'analisi del liquido seminale. In effetti, nel 70% dei pazienti affetti da varicocele, si riscontrano alterazioni qualitative nel liquido seminale. A livello diagnostico sarà importante indagare la sintomatologia, svolgere l'esame obiettivo con valutazione palpatoria della massa in posizione ortostatica a riposo e in seguito a manovra di Valsalva, ecodoppler per valutare l'entità del rigurgito e spermioγραμμα ripetuto più volte durante il follow-up per valutare la gravità di eventuali alterazioni. Il trattamento è indicato quando è presente una sintomatologia, quando la massa raggiunge dimensioni notevoli o quando è presente una diminuzione cronica della fertilità e viene effettuato scegliendo tra una scleroembolizzazione delle vene testicolari per via endovascolare passando dalla vena femorale o una legatura chirurgica che può essere alta a livello della spina iliaca superiore con tecnica di Ivanissevich o bassa a livello del meato inguinale esterno.

Andiamo adesso a vedere invece un'altra condizione che si associa a danno gonadico, la torsione testicolare. Tale patologia si presenta prevalentemente nei soggetti tra i 15 e i 25 anni come scroto acuto. Un fattore predisponente fondamentale è la lassità del gubernaculum testis e della tonaca vaginale, la torsione del testicolo blocca prima il deflusso venoso e poi quello arterioso. Questa patologia è caratterizzata da un dolore improvviso irradiato all'addome che insorge tipicamente di notte o dopo uno sforzo, all'esame obiettivo riscontriamo tipicamente un testicolo più alto dell'altro con asse orizzontale invece che verticale e dolorabilità alla palpazione. L'ecografia risulta spesso l'esame dirimente per fare diagnosi differenziali con altre affezioni del testicolo quali ad esempio varicocele e appendiciti testicolari. E' un'emergenza che va trattata entro sei ore

con trattamento chirurgico che prevede esplorazione chirurgica, detorsione del testicolo e riposizionamento con ancoraggio del testicolo (orchidopessi). Questo trattamento spesso viene fatto come misura preventiva anche nel testicolo controlaterale. La potenziale infertilità può essere secondaria a complicanze come necrosi e atrofia testicolare.

Il criptorchidismo si definisce come la mancata discesa nello scroto di uno o entrambi i testicoli. Si presenta nel 3-5% dei maschi nati a termine e di fatto è l'anomalia dell'apparato urogenitale più frequente in età pediatrica. L'infertilità che si può associare a tale quadro deriva da una riduzione della spermatogenesi per danno alla gonade, anche se il fatto che il criptorchidismo monolaterale può provocare infertilità ci fa ipotizzare ci siano anche altri fattori responsabili.

Il cancro testicolare pur rappresentando solo l'1% di tutti i tumori nell'uomo rappresenta il 30% dei tumori giovanili dei maschi (30). La possibile infertilità può dipendere o dalla malattia stessa capace di compromettere il liquido seminale o dalle terapie a cui dovrà essere sottoposto il paziente, infatti, radioterapia e chemioterapia possono causare direttamente danno testicolare o in maniera indiretta interferire sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (31). Tale infertilità può risultare permanente per perdita delle cellule staminali, particolarmente sensibile è infatti l'epitelio germinale a chemioterapia e radioterapia, così come anche le cellule di Leydig sembrano essere particolarmente sensibile alla chemioterapia (32).

Le infezioni e le infiammazioni del tratto genitale rappresentano una delle cause più comuni di compromissione della fertilità negli uomini, ma purtroppo non esistono dati epidemiologici affidabili in proposito. Quando le cellule germinali sono esposte a

patogeni o ai componenti delle infezioni, insieme a mediatori infiammatori, si verifica spesso un danno irreversibile alla spermatogenesi, con conseguente deterioramento della qualità del liquido seminale, specialmente nel caso di infiammazione testicolare cronica. Studi istopatologici sistematici mostrano un'elevata prevalenza di reazioni infiammatorie asintomatiche nelle biopsie testicolari di uomini infertili, questi infiltrati sono prevalentemente linfocitari, hanno una distribuzione tipicamente focale e sono correlati in maniera diretta ad alterazione dei parametri clinici ed endocrinologici relativi alla funzione testicolare (33). Nella diagnosi delle orchiti, tendenzialmente secondarie a virus della parotite, Chlamydia o Neisserie Gonorrhoeae oltre ad anamnesi ed esame obiettivo possono essere dirimenti ecografia, esame delle urine ed urinocoltura.

Per quanto riguarda le cause farmacologiche vediamo come diversi farmaci oltre a quelli citotossici visti durante la trattazione del cancro al testicolo possono avere un impatto negativo sulla spermatogenesi. Possiamo citare ad esempio antidepressivi, antistaminici, spironolattone e dopaminergici e ci sono evidenze significative testosterone, sulfasalazina, steroidi anabolizzanti, ciproterone acetato, oppioidi, tramadolo, analoghi del GhRH. Un trattamento farmacologico può avere un impatto sulla spermatogenesi interferendo con la funzione esocrina dei testicoli e alterando le cellule germinali e/o le cellule di Sertoli. Le cellule di Sertoli svolgono un ruolo cruciale nel supportare la sopravvivenza e la differenziazione delle cellule germinali all'interno dei testicoli. Quando un farmaco interferisce con la funzione endocrina dei testicoli, ad esempio alterando le cellule di Leydig che producono il testosterone, o interrompendo il sistema di regolazione ormonale a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi, il risultante calo dei livelli di testosterone può anche influenzare negativamente la produzione di spermatozoi.

Inoltre, qualsiasi molecola in grado di alterare la vascolarizzazione all'interno dei testicoli o di compromettere la funzione dell'epididimo può avere un impatto sui parametri spermatici. È importante comprendere che tali influenze possono variare da individuo a individuo e possono dipendere dalla specifica azione del farmaco e dalla durata del trattamento (34). In sintesi, i farmaci possono incidere sulla fertilità maschile interferendo con la spermatogenesi, la produzione di testosterone o altri processi chiave all'interno del sistema riproduttivo maschile. Pertanto, è fondamentale considerare attentamente gli effetti potenziali di qualsiasi trattamento farmacologico, specialmente se si sta cercando di concepire una gravidanza.

Altre cause testicolari di infertilità sono quelle immunologiche, infatti ci possono essere dei quadri di reazioni autoimmuni con formazione di anticorpi anti-spermatozoo e più in generale le patologie che portano a danno tubulare con fuoriuscita di materiale antigenico possono portare a reazioni autoimmuni. Per questi motivi oltre alle analisi standard dello sperma, è possibile eseguire test estesi, tra cui la rilevazione di anticorpi anti-spermatozoo (ASA). L'infertilità immunitaria maschile è definita come infertilità causata da ASA, tuttavia, il più recente manuale di laboratorio dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ci dice che la semplice presenza di anticorpi spermatici non è sufficiente per diagnosticare l'autoimmunità spermatica. È necessario dimostrare che questi anticorpi interferiscono in modo significativo con la funzione degli spermatozoi (35). Ricordiamo inoltre che i disturbi infiammatori cronici e il loro trattamento possono anch'essi contribuire a quadri di sub-fertilità o infertilità vera e propria, arrivando a suggerire in alcuni casi ai soggetti affetti da tali patologie la crioconservazione del liquido seminale (36).

In ultima istanza andiamo ad analizzare quelle che sono invece le anomalie genetiche correlate ad infertilità maschile come la Sindrome di Klinefelter (XXY) e le microdelezioni del cromosoma Y. Queste ultime sono responsabili di circa il 5% delle oligozoospermie severe, è noto infatti come il materiale genetico del cromosoma Y sia direttamente implicato nello sviluppo del testicolo durante la vita fetale e nella spermatogenesi. Nel dettaglio le regioni implicate in questo processo sono fondamentalmente tre: AZFa, AZFb e AZFc dove l'acronimo AZF sta per "azoospermia factor" (37). Le delezioni di AZFa rappresentano il 5% dei casi e sono sempre associate alla Sindrome a sole cellule di Sertoli con assenza completa delle cellule germinali nei tubuli. Le microdelezioni di AZFb sono il 35% e possono essere anche in combinazioni con delezioni AZFa o con delezioni AZFa-AZFc, portano ad un arresto maturativo nel processo della spermatogenesi associato ad azoospermia. Le delezioni di AZFc vanno a costituire la rimanente parte (60%) e sono quindi le più comuni, sono correlate a quadri patologici molto variabili che vanno da oligozoospermia a Sindrome a sole cellule di Sertoli. Queste ultime sono anche quelle associate ad un miglior successo terapeutico delle tecniche di PMA. La Sindrome di Klinefelter è la più frequente tra le aneuploidie responsabili di infertilità maschile, la forma tipica è quella presentante un cromosoma X soprannumerario (47, XXY) tendenzialmente di origine materna, esistono però forme clinicamente più impattanti come ad esempio quella correlata alla presenza di due cromosomi X in eccesso (48, XXY). Questa anomalia cromosomica può portare a diversi segni e sintomi, con il segno principale rappresentato da testicoli ipotrofici. Nonostante i testicoli rimangano di dimensioni ridotte (volume < 4ml), durante la pubertà, la virilizzazione e lo sviluppo sessuale procedono in modo normale, ma il volume dei testicoli non aumenta come dovrebbe. Di conseguenza, molti uomini con la sindrome di

Klinefelter possono manifestare la tipica sintomatologia secondaria al suddetto ipogonadismo. Il grado di virilizzazione, cioè lo sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie maschili, può variare notevolmente tra gli uomini con questa sindrome e tende a diminuire con l'avanzare dell'età. Dopo i 25 anni, infatti, molti uomini con Klinefelter possono sperimentare sintomi legati all'ipogonadismo che non sono esclusivamente quelli legati alla fertilità e alla funzione sessuale ma possono compromettere anche lo stato di benessere generale del paziente (38). Le caratteristiche fenotipiche correlate a questa patologia e indagabili all'esame obiettivo oltre il ridotto volume testicolare sono la ginecomastia, scarsa presenza di barba e peli, spalle di ridotte dimensioni, altezza elevata con particolare lunghezza degli arti, tessuto adiposo con distribuzione ginoide, scarsa forza fisica e tono della voce particolarmente acuto. I soggetti affetti da tale patologia possono riscontrare inoltre problemi nell'acquisizione del linguaggio, della lettura e della scrittura. La diagnosi viene effettuata mediante indagine del cariotipo e la terapia è fondamentalmente di tipo sostitutivo che viene indicata dall'età puberale con testosterone per via transdermica o intramuscolare che permette lo sviluppo e il mantenimento dei caratteri sessuali secondari ed evita fenomeni di osteoporosi tipici di chi, magari per ritardo diagnostico, non viene sottoposto a terapia.

CAUSE POST-TESTICOLARI

In questi casi la spermatogenesi appare conservata ma ci saranno anomalie di natura organica o funzionale che si riflettono in forme ostruttive o in disfunzioni sessuali che riguardano l'erezione e l'eiaculazione. Queste cause post-testicolari di infertilità possono essere distinte in congenite o acquisite. Quelle congenite possono essere distinte in

prossimali come agenesia o malformazione di epididimo e dotti deferenti, distali quando riguardano le vescichette seminali, l'ampolla deferenziale i dotti eiaculatori oppure possono essere estese e riguardare quindi tratti prossimali e distali. Per quanto riguarda invece le forme acquisite, possono essere secondarie a patologie metaboliche come il diabete, a farmaci come alpha-litici o a cause iatrogene come TURP, interventi chirurgici sul collo vescicale, linfadenectomia retro-peritoneale o chirurgia del colon-retto. Le sequele che riscontreremo dipenderanno fondamentalmente dall'alterata innervazione adrenergica con conseguente perdita della contrazione dello sfintere uretrale interno che porta ad eiaculazione retrograda.

Le forme ostruttive sono tendenzialmente caratterizzate da azoospermia con volume eiaculatorio che può essere ridotto. Possono essere secondarie a vasectomia oppure a complicanze post-infettive di epididimiti o uretriti, un'altra forma è quella legata alla Sindrome di Young detta anche sindrome da sinusite-infertilità; infatti, si presenta in uomini di mezza età con storia di rinosinusite cronica, bronchiectasia e azoospermia secondaria appunto a secrezioni mucose che ostruiscono l'epididimo (39). Per certi versi la Sindrome di Young può somigliare alla Fibrosi Cistica, altra patologia notoriamente associata ad infertilità. Nella Fibrosi Cistica però riscontriamo mutazioni del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) che codifica per una proteina deputa al trasporto di ioni cloruro attraverso le membrane cellulari, tali mutazioni possono essere particolarmente variabile e anche se spesso si riscontrano anomalie delle vie seminali come ad esempio agenesia bilaterale dei dotti deferenti, non sempre mutazioni del gene CFTR portano ad infertilità (40).

Altra causa possibile di infertilità secondaria ad ostruzione delle vie seminali è quella data da cisti prostatiche mediane che ostruiscono completamente o in parte i dotti eiaculatori.

Questa si associa a dilatazione delle vescichette seminali ed è potenzialmente reversibile mediante agoaspirazione trans-rettale delle cisti.

Come accennato precedentemente una causa di infertilità post-testicolare è quella dell'eiaculazione retrograda che va sempre sospettata quando il paziente raggiunge l'orgasmo al quale si associa però un ipoposia o anche un'assenza dell'eiaculato, tale quadro potrà poi essere confermato con la presenza di liquido seminale in un campione di urine raccolto dopo l'eiaculazione. Questa condizione, come già detto, può essere legata a farmaci alpha-litici, a neuropatia diabetica o può essere iatrogena da TURP o chirurgia pelvica. A queste aggiungiamo la discinesia ciliare primitiva (PCD), patologia ereditaria autosomica recessiva che si associa ad un anomalo movimento ciliare dell'epitelio delle vie aeree e degli spermatozoi. È causa di bronchiectasia ereditaria e la diagnosi prevede esami chimici come la misurazione di ossido nitrico nasale che ci riporterà valori particolarmente bassi, il campionamento dell'epitelio nasale per valutare funzione ciliare, struttura ciliare e genotipizzazione. La diagnosi sarà poi eventualmente confermata dall'identificazione di un difetto ultrastrutturale caratteristico o di mutazioni patogene in uno dei geni associati alla PCD che ad oggi sono più di 45 (41).

Un capitolo importante è quello legato alle infezioni genitali, responsabili di circa il 15% dei casi di infertilità. Nella fattispecie parliamo tendenzialmente di infezioni batteriche ma sono importanti anche virus, miceti e le M.A.G.I. (male accessory gland infections) (42). Gli agenti infettivi possono raggiungere gli organi riproduttivi per via ematogena o per via diretta in caso di lesioni. I modi tramite i quali questi agenti possono potenzialmente compromettere la funzione riproduttiva sono l'infiltrazione di leucociti nell'apparato riproduttivo che si associa di fatto ad un tipo di infertilità che possiamo definire autoimmune, possono alterare la funzione delle cellule di Sertoli, di

Leydig e delle cellule germinali. In alcuni casi questi agenti infettivi sono responsabili addirittura di un'ostruzione parziale o totale dei dotti escretori. Le suddette infezioni possono decorrere asintomatiche o come nel caso di uretriti ed epididimiti manifestarsi con una tipica sintomatologia associata che nel caso delle uretriti sarà di carattere infiammatorio e tipica disuria, le epididimiti saranno caratterizzate invece da dolore, tumefazione e arrossamento locale. Tra i batteri annoveriamo *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Ureaplasma parvum* (43).

Per quanto riguarda invece la compagine virale ricordiamo Herpes simplex di tipo 2 che può associarsi ad azoospermia e oligozoospermia, il virus dell'immunodeficienza umana invece porta a fibrosi interstiziale, riduzione numerica delle cellule di Leydig e di quelle germinali, alterazioni della spermatogenesi ed infiltrato linfocitario (44).

Una menzione va fatta poi per la parotite, che quando colpisce un maschio in età post-puberale si associa molto frequentemente ad orchite (45), che ricordiamo può esitare in sclerosi dei tubuli seminiferi e atrofia del testicolo.

In fine vediamo le M.A.G.I, tendenzialmente dovute a *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis* che vanno a localizzarsi a livello di prostata (46) e vescichette seminali portando a prostatiti croniche responsabili di modificazioni biochimiche del secreto prostatico che impattano negativamente sulla viscosità e fluidificazione del liquido seminale esitando in una ridotta motilità degli spermatozoi.

Cause pre-testicolari		
Patologie ipotalamiche		
	Congenite	Acquisite
	Ipogonadismo ipogonadotropo congenito normosmico Sindrome di Kallmann Sindrome di Prader-Willi Sindrome di Laurence-Moon-Biedl	Tumori Radiazioni Traumi Sarcoidosi Emocromatosi
Patologie ipofisarie		
	Tumori (adenomi, craniofaringiomi) Radiazioni Sarcoidosi Emocromatosi Traumi Apoplessia	
Cause ormonali		
	Iperprolattinemia Ipercortisolismo Sindrome adrenogenitale Ipertiroidismo Ipotiroidismo Acromegalia Terapia androgenica sostitutiva Tumori secernenti ormoni sessuali	
Malattie sistemiche		
	Epatopatie Nefropatie Obesità Emocromatosi Malnutrizione HIV	
Cause testicolari		
	Congenite	Acquisite
	Sindrome di Klinefelter Microdelezioni del cromosoma Y Sindrome di Down Distrofia miotonica Criptorchidismo Anorchia congenita bilaterale	Varicocele Infezioni Traumi Farmaci Tumori
Cause post-testicolari		
	Congenite	Acquisite
	Agenesia congenita dei dotti deferenti Sindrome di Kartagener Sindrome di Young Ipospadi/epispadi	Infezioni delle ghiandole sessuali accessorie Cisti prostatiche mediane Vasectomia Traumi Disfunzione erettile Anomalie dell'eiaculazione

Figura 11: cause infertilità maschile

INFERTILITA' IDIOPATICA

L'infertilità idiopatica è per definizione l'insieme delle modificazioni della morfologia e/o della motilità e/o della concentrazione spermatica senza altre anomalie allo spermioγραμμα e senza altre alterazioni patologiche all'esame obiettivo, alle indagini strumentali e di laboratorio. Ha una rilevanza epidemiologica molto importante considerando che riguarda circa un terzo dei casi di infertilità, ad oggi la ricerca è prevalentemente incentrata nel trovare fattori genetici che possano spiegare tale fenomeno (47). In quest'ottica i fattori maggiormente sospettati come responsabili sono le SNP (Single Nucleotide Polymorphism) in geni coinvolti nel controllo dei livelli ormonali e della spermatogenesi. Queste potrebbero in futuro essere importanti per trattamenti personalizzati basati sulla farmacogenetica. Esistono inoltre delle mutazioni più rare che potrebbero essere correlate a infertilità anche se ad oggi non sono state indagate in maniera esaustiva e probabilmente dovranno essere ricercate tramite studi di sequenziamento genico e studi sugli esosomi (48).

Nonostante questi fattori genetici appena citati, sembrerebbero essere determinanti nei quadri di infertilità idiopatica i fattori ambientali. In particolare, facciamo riferimento a valori anomali di BMI e assunzione inadeguata di grassi essenziali, lo stesso discorso vale per soggetti con abitudine tabagica, per quelli che assumono sostanze stupefacenti o che abusano di alcolici (49).

Alcuni studi hanno suggerito l'ipotesi di una correlazione tra la sindrome delle apnee ostruttive nel sonno (OSAS) e un aumento del rischio di infertilità, suggerendo che questo rischio possa essere influenzato dalla durata della patologia. Inoltre, si è ipotizzato che la mancata gestione dell'OSAS possa essere associata a un aumento del rischio di infertilità (47).

Altri ricercatori inoltre hanno condotto studi sulle alterazioni ormonali nei pazienti con infertilità idiopatica, rilevando una correlazione inversa tra i livelli circolanti di LH e la motilità / morfologia spermatica (50).

4.3) DIAGNOSI INFERTILITA'

ANAMNESI

Quando siamo di fronte a un problema di infertilità di coppia è desiderabile che entrambi i partners vengano indagati con opportuni accertamenti. In questi casi le prime cose da valutare sono l'età del paziente, il periodo dal quale si cerca una gravidanza, la frequenza dei rapporti sessuali, se ci sono alla base noti problemi di fertilità, eventuali gravidanze precedenti ed è infine necessaria un'attenta anamnesi farmacologica. Tra i farmaci di interesse ricordiamo gli steroidi anabolizzanti, gli inibitori di pompa protonica, immunosoppressori, antidepressivi e antiepilettici che possono inficiare sulla spermatogenesi.

Dopo questa prima fase dovremmo indagare sullo stile di vita del paziente, sono noti infatti dei fattori prettamente ambientali che possono alterare le capacità riproduttive dell'uomo. Ad esempio, fattori dietetici come l'elevata assunzione di carne ricca di grassi saturi e un elevato introito di zuccheri semplici possono avere effetti negativi sulla qualità del liquido seminale. L'assunzione di pesce e di omega-3 porta beneficio ai parametri del liquido seminale, ma studi ci dicono anche che è importante notare che pesci e i molluschi contaminati rappresentano la principale fonte di esposizione al metilmercurio, il composto organico di mercurio più comune presente nell'ambiente (51). Sia studi condotti su animali che ricerche in vitro (52) hanno evidenziato un effetto dannoso del metilmercurio sulla salute riproduttiva maschile. Questi effetti includono la compromissione della spermatogenesi (53), la diminuzione del numero di spermatozoi e la riduzione del peso testicolare, nonché la diminuzione della motilità degli spermatozoi e l'aumento delle anomalie morfologiche.

L'attività fisica troppo elevata può determinare un quadro di ipogonadismo funzionale in grado di sopprimere l'attività testicolare con riduzione della produzione di androgeni e riduzione della spermatogenesi. Altri fattori con azione negativa sulla fertilità maschile sono alcol, il fumo di sigaretta (54) e la cannabis (55) contenente fitoestrogeni in grado di alterare il rapporto testicolare testosterone/estrogeno.

ESAME OBIETTIVO

L'esame obiettivo sarà volto a valutare il grado di virilizzazione, la distribuzione pilifera, la presenza di ginecomastia o comunque segni di ipogonadismo. Andiamo dunque a valutare le dimensioni del pene che quando flaccido ha valori normali sopra i 7cm con media in Italia di 9,5cm (56), presenza di fimosi e la localizzazione dell'apertura uretrale. Fondamentale poi è valutare le dimensioni (V.N. $18,6 \pm 4,8$ ml), la regolarità delle superfici testicolari, l'eventuale presenza di masse cistiche e non, nel testicolo e nell'epididimo. Va fatta esplorazione rettale per saggiare la prostata e vanno palpati inoltre i funicoli spermatici a riposo e durante Valsalva per valutare la presenza di eventuale varicocele.

Un aspetto che si pone a cavallo tra la fase anamnestica (indagando le abitudini alimentari) e l'esame obiettivo vero e proprio è quello legato all'obesità. L'elevata quantità di tessuto adiposo, infatti, porta ad una eccessiva aromatizzazione del testosterone in estrogeni che vanno ad alterare l'asse ipotalamo-ipofisi. Inoltre, quadri di obesità sono correlati ad un incremento di ROS nel liquido seminale e a frammentazione del DNA spermatico (57). L'obesità negli uomini può influenzare quindi la loro fertilità dando spermatogenesi alterata, riduzione dei livelli di testosterone, disfunzione erettile e

scarsa libido prendendo di mira gli assi ipotalamo-ipofisi-gonadi e ipotalamo-ipofisi-surrene. La leptina svolge ruoli chiave in molte funzioni metaboliche, compresa la riproduzione. Alte concentrazioni di leptina sono state trovate in uomini infertili con disturbi che colpiscono il parenchima testicolare, tra cui azoospermia non ostruttiva, oligozoospermia e oligo-asteno-teratozoospermia. Inoltre, i livelli sierici di leptina sono inversamente correlati a livelli sierici di testosterone e parametri spermatici (58).

DOSAGGI ORMONALI

Un aspetto da indagare è il quadro ormonale del paziente, nella fattispecie valuteremo LH, FSH, testosterone totale, SHBG, testosterone libero per valutare la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e distinguere un eventuale ipogonadismo ipogonadotropo da causa pre-testicolare da un ipogonadismo ipergonadotropo da causa testicolare. Può essere utile andare a valutare l'estradiolo e la prolattina, elevati livelli di quest'ultima, infatti, possono alterare la secrezione ritmica del GnRH che riflette di conseguenza sulle gonadotropine. Altri ormoni che vengono indagati in specifiche condizioni quali ginecomastia ed eiaculazione precoce sono TSH, FT3 ed FT4 (20).

SPERMIOGRAMMA

Lo spermioγραμμα è l'esame principe quando si parla di infertilità maschile e come ci ricorda il manuale dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) 2021 non serve per definire un uomo come fertile o infertile ma per decidere su considerazioni cliniche e statistiche i successivi passi diagnostici e terapeutici (59). L'OMS si raccomanda anche di effettuare il campionamento del liquido seminale direttamente in laboratorio tramite masturbazione, onde evitare possibili condizioni maggiormente associate a coito interrotto come contaminazioni o perdita della prima frazione di eiaculato. Il trasporto del campione deve avvenire poi senza sbalzi termici ai quali il liquido seminale è particolarmente suscettibile e ad una temperatura prossima a quella corporea (37°C), analizzato dopo almeno 30 minuti dalla raccolta ma comunque prima di un'ora. Considerando che il ciclo di rigenerazione degli spermatozoi è intorno ai 72 giorni lo spermioγραμμα, se necessario va rivalutato a distanza di circa 3 mesi, va eseguito con un'astinenza compresa tra i 3 e i 5 giorni, in caso contrario potremmo favorire il riscontro di bassi volumi e basse concentrazioni da un lato e alterazioni della motilità dall'altro. La standardizzazione dei valori di riferimento è cambiata negli anni secondariamente alle varie edizioni dei manuali dell'OMS, l'ultima a cui facciamo riferimento è quella del 2021 dove troviamo delle piccole divergenze rispetto a quella del 2010 (riportata in figura 12).

Parametri seminali	Valori normali (\geq 5° percentile)
Volume	$\geq 1,5$ ml
pH	$\geq 7,2$
Concentrazione spermatozoi	$\geq 15 \times 10^6$ /ml
Numero totale spermatozoi /eiaculato	$\geq 39 \times 10^6$
Motilità	
Progressiva (PR)	$\geq 32\%$
Totale (PR+NP)	$\geq 40\%$
Morfologia (forme tipiche)	$\geq 4\%$
Vitalità	$\geq 58\%$
Leucociti	$< 1 \times 10^6$ /ml
MAR-test (negativo)	$< 50\%$ spermatozoi con particelle adese
Definizioni	
Normozoospermia	Normalità di tutti i parametri seminali
Oligozoospermia	Concentrazione $< 15 \times 10^6$ /ml o numero totale $< 39 \times 10^6$
Astenozoospermia	PR $< 32\%$ o motilità totale $< 40\%$
Teratozoospermia	Morfologia normale $< 4\%$
Oligo-asteno-teratozoospermia	Aterazione di numero, motilità e morfologia
Criptozoospermia	Presenza di spermatozoi dopo centrifugazione
Necrozoospermia	Vitalità $< 58\%$
Azoospermia	Assenza di spermatozoi (anche dopo centrifugazione)
Ipoposia	Volume seminale $< 1,5$ ml
Aspermia	Assenza di eiaculato

Figura 12: parametri seminali al 5° percentile OMS 2010

È importante notare, come accennato prima, che questa nuova classificazione ha apportato leggere modifiche ai valori di riferimento nel 5° percentile (descritti nella tabella soprastante) per la concentrazione degli spermatozoi (16 milioni/ml rispetto a 15 milioni/ml), la motilità totale (42% rispetto a 40%), e la motilità progressiva (30% rispetto a 32%).

Una volta ottenuto il campione, si vanno a valutare diversi aspetti dello stesso in successione:

Volume: Il volume totale è dato da una componente prettamente liquida del seme frutto della secrezione di ghiandole quali vescichette seminali, prostata e ghiandole bulbouretrali. Possiamo misurarlo tramite provetta graduata o considerando come nota la densità del liquido (1g/ml) può essere dedotto pesando il campione. Il volume conoscendo la concentrazione degli spermatozoi ci permette di calcolare il numero totale degli stessi. Per valori inferiori ai 1.4 ml parliamo di ipoposia.

Aspetto: Normalmente si presenta con aspetto omogeneo con colore grigio-opalescente, in caso di emazie si presenta rossiccio, giallo in caso di ittero, mentre un aspetto acquoso può riscontrarsi in caso di ridotta concentrazione degli spermatozoi.

Liquefazione: Fisiologicamente gli enzimi prodotti dalle ghiandole accessorie del tratto genitale entro un'ora andranno a liquefare il coagulo di liquido seminale formatosi subito dopo l'eiaculazione, se questo non dovesse avvenire in maniera completa va messo a referto.

Viscosità: Viene valutata una volta terminato il processo di liquefazione, facendo gocciolare tramite una pipetta il liquido seminale. Sarà normale quando le gocce si dividono l'una dall'altra senza formare filamenti.

Odore: in questa edizione del manuale dell'OMS si suggerisce infatti l'annotazione di eventuali anomalie dell'odore del liquido seminale come, ad esempio, forte odore di urina o di putrefazione che potrebbe essere correlato a quadri clinici rilevanti.

pH: il pH viene misurato tramite cartine tornasole e viene considerato normale se >7.2 , alterazioni del pH si hanno ad esempio in caso di alterato rapporto tra secreto delle vescichette seminali (di natura alcalina) e secreto prostatico (di natura acida).

Osservazione: L'osservazione viene effettuata a fresco ed è caratterizzata da due fasi, nella prima delle quali si utilizza un ingrandimento a 100X che ci permette di valutare la presenza di muco, aggregati di spermatozoi, presenza di cellule germinali immature, leucociti e cellule epiteliali. Nella seconda fase invece si fa un ingrandimento maggiore e si va a valutare la motilità.

Concentrazione spermatica: Si utilizza tendenzialmente la conta di Makler che utilizza una griglia 10 X 10 che serve da riferimento per la conta degli spermatozoi. Qualora il liquido seminale non presenti spermatidi va effettuata una valutazione dell'eiaculato dopo centrifugazione, solo in assenza completa di spermatozoi possiamo parlare di azoospermia altrimenti è più corretto parlare di criptoospermia.

Motilità degli spermatozoi: la motilità dovrebbe essere valutata subito dopo la liquefazione, viene condotta dall'operatore ma possono essere utilizzate anche tecniche computerizzate (CASA). Viene fatta su almeno 200 spermatozoi e viene distinta in motilità progressiva quando gli spermatozoi si muovono attivamente con progressione, non progressiva se gli spermatozoi si muovono ma non progrediscono ed immobilità quando abbiamo un'assenza totale di movimento. Inoltre, nella nuova edizione del Manuale, la refertazione della motilità nemaspermica prevede una diversa

categorizzazione, con un'ulteriore suddivisione della motilità progressiva in “rapidamente progressiva” ($\geq 25 \mu\text{m/s}$) o “lentamente progressiva” ($< 25 \mu\text{m/s}$).

Morfologia degli spermatozoi: Viene valutata dopo aver strisciato il liquido seminale con colorazione di Papanicolau. Lo spermatozoo tipico deve rispettare le seguenti caratteristiche: la testa deve essere liscia, ovale e a contorni regolari; l'acrosoma deve contenere non più di due vacuoli piccoli e mai vacuoli grandi; il collo deve essere dritto, regolare e lungo quanto la testa, privo di eccessivi residui citoplasmatici e con l'asse maggiore allineato con quello della testa; la coda deve essere di calibro uniforme, più sottile del collo e lunga circa 10 volte la testa. Si parla di teratozoospermia quando abbiamo meno del 4% di forme tipiche.

Test di vitalità: Per questo test si utilizza l'eosina al 5% che attraversa passivamente le membrane danneggiate e di conseguenza colora gli spermatozoi morti, se la percentuale di questi ultimi è superiore al 58% si parla di necrozoospermia.

MAR-test: Il MAR-test viene effettuato in presenza di spermioagglutinazioni particolarmente numerose e va a valutare la presenza di anticorpi adesi alla superficie degli spermatozoi. Viene fatto incubando il liquido seminale con microsfere di lattice ricoperte da igA o igG, di conseguenza aggiungendo anti-igA o anti-igG andiamo a valutare la formazione di agglutinazioni miste che indicano la presenza di immunoglobuline anti-spermatozoo (20).

FRAMMENTAZIONE DEL DNA SPERMATICO

Durante la spermatogenesi il DNA degli spermatozoi subisce normali processi di frammentazione e riorganizzazione attraverso meccanismi enzimatici intracellulari. Tuttavia, fattori endogeni ed esogeni, in particolare lo stress ossidativo, possono causare rotture non fisiologiche nel DNA degli spermatozoi. Queste rotture non fisiologiche possono alterare la capacità fecondante degli spermatozoi e sono un fattore predittivo nelle metodiche di riproduzione assistita. Può essere indagato tramite 4 tecniche diverse: Comet assay, SCD, TUNEL, SCSA (20).

SPERMIOCOLTURA

La spermiocoltura è un esame importante quando presenti segni e/o sintomi che ci fanno sospettare un'infezione urogenitale o se lo spermioγραμμα effettuato in precedenza ci mostra alterazioni quali colore giallognolo, ridotto volume, PH alcalino, elevati livelli di leucociti, astenozoospermia, spermioagglutinazioni. In caso di positività alla spermiocoltura va eseguita terapia antibiotica e si ripete l'esame a distanza di due settimane. Se non fosse possibile procedere con la spermiocoltura può essere effettuata l'urinocoltura per confermare la presenza di un eventuale infezione urogenitale.

ESAMI GENETICI

Quando un paziente presenta allo spermioγραμμα una condizione di azoospermia o comunque presenta una concentrazione di spermatozoi minore di 5 milioni/ml dobbiamo

sospettare anomalie genetiche che possiamo studiare tramite analisi del cariotipo e analisi delle microdelezioni del cromosoma Y.

Per quanto riguarda l'analisi del cariotipo andiamo a valutare aneuploidie che coinvolgono i cromosomi sessuali come nei casi di Klinefelter e gli autosomi che se presentano traslocazioni Robertsoniane, traslocazioni reciproche o inversioni paracentriche si associano ad importanti alterazioni cromosomiche nella prole.

Da indagare, inoltre, ci sono quelle alterazioni microscopiche del cromosoma Y che prendono il nome di microdelezioni e che non sono osservabili all'esame del cariotipo e che sono responsabili di isolata alterazione della spermatogenesi.

Un'altra patologia associata ad infertilità maschile ed indagabile da un punto di vista genetico è la fibrosi cistica (CFTR mutato).

ESAMI STRUMENTALI

Un esame di imaging particolarmente importante e comunemente utilizzato è l'ecocolordoppler scrotale, fondamentale nella diagnostica e nella stadiazione secondo Sarteschi del varicocele. Viene utilizzato inoltre per valutare il parenchima testicolare in termini volumetrici ma anche per osservare eventuali masse o microlitiasi.

Sempre rimanendo nell'imaging quando c'è sospetto di alterazioni delle vie deferenti come agenesia od ostruzione può essere importante ricorrere alla deferentografia che si effettua incanalando (passando per l'uretra) il dotto deferente e iniettando il mezzo di contrasto.

Quando c'è oligozoospermia o azoospermia con liquido seminale normale e dotti pervi può essere indicata la biopsia testicolare al fine di valutare possibilità terapeutiche come l'inseminazione artificiale.

Con l'ecografia prostatica transrettale, che viene effettuata quando abbiamo sospetti all'esplorazione digitorettale, possiamo valutare la presenza di alterazioni ostruttive congenite come le agenesie dei dotti deferenti o acquisite come quelle post-infiammatorie.

4.4) TRATTAMENTO DELL'INFERTILITA'

Il trattamento dell'infertilità può essere di tipo eziologico o di tipo empirico, nel primo caso andremo a risolvere la causa sottostante l'infertilità come può essere un varicocele o un'infezione delle vie urogenitali, la terapia empirica invece è volta al miglioramento dei parametri seminali quando è sconosciuta la causa a monte dell'infertilità. In base alla causa sottostante il trattamento può basarsi su approcci farmacologici o chirurgici (60) cercando sempre di favorire un concepimento per via naturale prima di ricorrere ad eventuale PMA (61).

TERAPIA MEDICA

La terapia medica, nei casi di ipogonadismo ipogonadotropo può essere rappresentata da FSH umano e ricombinante (62) o da GnRH che ne è un'alternativa razionale ma limitata da costi elevati e difficoltà di utilizzo. Per quanto riguarda l'FSH invece come accennato è la terapia di prima scelta nei casi di ipogonadismo ipogonadotropo, ovvero se il paziente

presenta livelli di FSH <8 IU/L, come viene descritto nella nota n. 74 dell'AIFA (Agenzia Italiana del Farmaco). In realtà in assenza di un rialzo di FSH che correla con un danno gonadico (20) ed escluse patologie ostruttive delle vie seminali può essere impiegato anche nel trattamento di pazienti eugonadici affetti da oligoastenoteratozoospermia. Il trattamento con FSH deve essere effettuato per almeno 3-4 mesi fino ad ottenere una soddisfacente spermatogenesi, in caso contrario va rivalutato il dosaggio terapeutico. L'uso di questo farmaco è associato a un costo relativamente elevato, e potrebbe essere ottimizzato attraverso lo studio dei polimorfismi genetici del gene FSHB, che codifica per la subunità β del recettore FSH (FSHR). Tuttavia, va notato che attualmente esistono risultati contrastanti e variabili tra gli studi condotti su questo argomento (48).

Noto che la presenza di elevata attività enzimatica e l'eccessiva produzione di ROS possono essere correlate alla presenza di spermatozoi atipici (63) e che l'eccesso di ROS è anche implicato in un processo perossidativo, con danno al DNA nucleare e mitocondriale che può esitare in una perdita della funzione nemaspermica (64) può risultare indicato un trattamento con antiossidanti (65), quali ad esempio vitamina E, coenzima Q10, pentossifillina, glutatione, vitamina C e selenio (66). E' opportuno ricordare però che l'utilizzo di queste terapie si basa su studi con evidenze limitate.

Chiaramente altre terapie mediche da citare sono quelle atte a debellare infezioni delle vie genitourinarie che possono essere la causa di infertilità maschile, e in questo caso ricordiamo Azitromicina e Ciprofloxacina per i patogeni più frequentemente coinvolti come Chlamydia e Mycoplasma, ricordiamo infatti che le infezioni a livello prostatico necessitano di antibiotici che siano efficienti in ambiente acido (46).

Sono stati considerati come terapia farmacologica anche i SERM (modulatori selettivi del recettore degli estrogeni, ad esempio tamoxifene o clomifene citrato (67) anche se ad oggi non si sono dimostrati particolarmente efficaci.

TERAPIA CHIRURGICA

La terapia chirurgica può essere risolutiva in alcuni casi specifici di criptorchidismo e nella correzione del varicocele. Il varicocele può essere trattato per via endovascolare o chirurgica e va trattato solo quando palpabile e fastidioso, se c'è una situazione di infertilità o quando ci sono alterazioni dei parametri seminali (20). Sebbene le metanalisi abbiano mostrato un miglioramento dei parametri dello sperma per tutte le tecniche di trattamento del varicocele, l'approccio subinguinale microchirurgico è la tecnica ottimale per il trattamento del varicocele, perché si riscontra costantemente che ha i tassi più bassi di complicanze postoperatorie (68).

Le tecniche di recupero intratesticolare di spermatozoi vengono utilizzate ai fini di una fecondazione medicalmente assistita nei quadri di azoospermia. Le principali metodiche sono la Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration (MESA), Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration (PESA), la Testicular Sperm Aspiration (TESA), la Testicular Sperm Extraction (TESE), la MicroTESE. Nella prima (MESA) si prelevano gli spermatozoi dall'epididimo tramite tecnica microchirurgica, nella PESA si agisce sempre a livello dell'epididimo ma con agoaspirato, nella TESA si effettua un agoaspirato a livello testicolare e nella TESE si fa una vera e propria biopsia sempre a livello testicolare.

Queste tecniche sono importanti nei processi di procreazione medicalmente assistita che viene definita come un insieme di procedimenti riguardanti ovociti, spermatozoi o

embrioni, al fine di realizzare una gravidanza (69). Possiamo riconoscere oltre all'inseminazione intrauterina fondamentalmente altre due tecniche, FIVET e ICSI. Nella prima si stimola l'ovulazione con gonadotropine e si prelevano gli ovuli che vengono inseminati in vitro e si aspettano 3 giorni, il prodotto del concepimento allo stadio di 8-16 cellule viene reimpiantato con una speranza di successo di circa il 75% per ovulo. Nel caso della ICSI invece gli spermatozoi sono inadatti a fertilizzare l'ovulo e vengono quindi inseriti all'interno dello stesso tramite un ago.

CAPITOLO 5

PROTOCOLLO DI STUDIO

5.1) INTRODUZIONE

Numerosi studi animali evidenziano come i glucocorticoidi possano influenzare la funzione riproduttiva maschile. Nella fattispecie, uno studio su roditori ha mostrato che l'incremento dei livelli di corticosterone stress-correlato si associa a estesi fenomeni apoptotici a carico delle cellule di Leydig, degli spermatogoni e degli spermatoцитi di 1° ordine, determinando inoltre una riduzione dei livelli circolanti di testosterone (71). Analogamente, uno studio sui cinghiali suggerisce che l'elevata concentrazione intratesticolare di cortisolo sia correlata ad una diminuzione del numero delle cellule di Sertoli (72). Sembra quindi che elevati livelli di glucocorticoidi possano influenzare negativamente la funzione testicolare, a alcune evidenze suggeriscono anche il contrario; si è visto infatti come nei ratti la mancanza completa dei glucocorticoidi porti ad un danno dei tubuli seminiferi e ad una inefficace spermatogenesi (73). Nell'uomo, ad oggi, le evidenze sono meno definite; tuttavia, è stata rilevato che diversi recettori dei glucocorticoidi a livello gonadico possono influenzare i parametri seminali, più nel dettaglio è stato dimostrato che un polimorfismo (bc11) del recettore NR3C1 è correlato ad astenospermia (74). Recentemente, inoltre, è stato portato alla luce che l'idrocortisone è in grado di agire su CatSper, recettore attivato fisiologicamente dal progesterone fondamentale nel processo di capacitazione e mantenimento della motilità degli spermatozoi (75).

È noto come l'utilizzo del cortisolo salivare sia sempre più frequentemente favorito nella pratica clinica rispetto a quello plasmatico per questioni relative alla sua praticità ed efficienza (70). Il cortisolo spermatico, invece, non è mai stato studiato su larga scala, anche se indagini condotte dal nostro gruppo ne suggeriscono una notevole variabilità interindividuale. Con questi presupposti, ci siamo prefissati l'obiettivo di saggiare le possibili correlazioni tra i valori di cortisolo nelle tre diverse matrici di nostro interesse (sangue, saliva, sperma), oltre che di valutare come il cortisolo spermatico possa porsi in relazione con la spermiogenesi e con i relativi parametri visualizzabili allo spermogramma.

5.2) PAZIENTI

I soggetti esaminati nello studio sono 50 volontari maschi di età mediana pari a 25 anni (IQR = 24-26) senza patologie andrologiche note in anamnesi. Questi pazienti sono stati arruolati tra gli studenti e i medici in formazione specialistica dell'Università Politecnica delle Marche tra marzo e giugno 2021. I campioni di materiale biologico sono stati esaminati presso il laboratorio di Endocrinologia dell'Università Politecnica delle Marche e il laboratorio analisi dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche di Ancona.

5.3) SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio può essere distinto in due misure di outcome differenti:

Outcome primario: valutare eventuali correlazioni tra valori di cortisolo nel sangue, nella saliva e nello sperma.

Outcome secondario: descrivere il rapporto tra parametri seminali classici e livelli di cortisolo misurato nelle 3 distinte matrici biologiche.

5.4) MATERIALI E METODI

Lo studio qui presentato si è basato su campioni ematici raccolti nel reparto di Endocrinologia e malattie del metabolismo dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria delle Marche di Ancona. I campioni di liquido seminale e di saliva utilizzati nello studio sono stati raccolti direttamente in laboratorio o a domicilio (quando era possibile garantire un tempo inferiore ad un'ora tra prelievo del campione ed analisi dello stesso). Lo spermogramma è stato refertato secondo il manuale WHO 2021 dell'organizzazione mondiale della sanità sull'analisi del seme presso il laboratorio di Endocrinologia dell'Università Politecnica delle Marche.

INDAGINI BIOCHIMICHE

Cortisolo salivare e plasmatico sono stati misurati immediatamente dopo la raccolta tramite elettrochemiluminescenza (ECLIA, Elecsys Cortisol II test - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) utilizzando un analizzatore immunodiagnostico automatico (Cobas E 601). L'intervallo di misurazione del kit è 0.054-63.4 µg/dL, mentre i limiti di normalità sono 10-110 µg/dl per il cortisolo plasmatico e 0,15-0,35 µg/dl per il

cortisolo salivare. Per quanto riguarda invece il cortisolo spermatico, dopo l'analisi dello sperma, i liquidi seminali sono stati conservati a -20°C fino all'uso. La concentrazione di cortisolo nel plasma seminale è stata misurata mediante elettrochemiluminescenza (ECLIA, test Elecsys Cortisol II - Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germania - progettato per la misurazione del cortisolo nel siero, nel plasma e nella saliva umani e adattato per il plasma seminale) utilizzando un analizzatore immunodiagnostico automatico (Cobas E 601).

5.5) ANALISI STATISTICA DEI DATI

L'analisi statistica è stata effettuata con il software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 26.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Le variabili continue sono state sottoposte, qualora non risultasse evidente dalla rappresentazione grafica mediante istogramma e/o grafico di normalità, a test di normalità di Shapiro-Wilk. In caso di normalità, le distribuzioni sono state descritte in termini di media e di deviazione standard; altrimenti, sono state utilizzate la mediana e lo scarto interquartile. Le variabili distribuite in modo non-normale sono inoltre state normalizzate usando una trasformazione logaritmica prima di essere analizzate. Le correlazioni bivariate sono state indagate mediante test di Pearson o test di Spearman (scelti sulla base della normalità o meno della distribuzione). Le correlazioni più significative sono inoltre state ulteriormente studiate utilizzando dei modelli di regressione lineare e non lineare. Valori di $p < 0,05$ sono considerati statisticamente significativi.

CAPITOLO 6

RISULTATI

I risultati che seguono sono stati elaborati su un numero di 49 pazienti, in quanto dei 50 soggetti arruolati uno è stato escluso per azoospermia.

6.1) STATISTICHE DESCRITTIVE

Sono stati esaminati 49 adulti di sesso maschile (tabella n° 1) in assenza di patologie metaboliche e di carattere endocrinologico note in anamnesi.

N° pazienti = 49	Media \pm DS, mediana (IQR)
Età (anni)	25 (24-26)
Peso (kg)	74,22 \pm 8,01
Altezza (cm)	178,31 \pm 5,89
BMI (kg/m ²)	23,29 (21,68-24,6)

Tabella n° 1 : Caratteristiche biometriche dei soggetti presi in esame.

Vengono riportati di seguito i parametri seminali ottenuti dai soggetti esaminati (tabella n°2).

N° pazienti = 49	Media ± DS, mediana (IQR)	Valori normali
Volume (ml)	2,5 (2,25-3,1)	≥ 1,5
Astinenza (giorni)	3,5 (3-4)	2-7
Concentrazione (milioni/ml)	44 (23-78)	≥ 16
Motilità progressiva (%)	13 (7-22)	≥ 30
Motilità totale (%)	35,47 ± 16,61	≥ 42
TMSC (milioni)	31,2 (17,47-73,95)	≥ 20
Atipici (%)	92 (90-93,75)	≥ 4

Tabella n° 2 : Dati seminali dei soggetti presi in esame.

Nella tabella n° 3 osserviamo il valore di cortisolo misurato sulle tre matrici biologiche prese in esame, che ricordiamo essere : plasma , sperma e saliva.

N° pazienti = 49	Media \pm DS, mediana (IQR)
Cortisolo plasmatico ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	19,79 \pm 5,79
Cortisolo spermatico ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	3,65 (2,95-5,37)
Cortisolo salivare ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	0,75 (0,47-1,02)

Tabella n° 3 : Livelli cortisolo su 3 matrici

Nella tabella soprastante notiamo come la variabile relativa al cortisolo plasmatico venga riportata come media e deviazione standard, questo è giustificato dal fatto che tale variabile assume una distribuzione normale.

Situazione diversa invece, ritroviamo nelle altre due variabili prese in esame, riportate infatti come mediana e scarto interquartile dovuto alla distribuzione non normale che assumono i valori di cortisolo spermatico e cortisolo salivare.

Andando ad analizzare i dati ottenuti, possiamo notare come la mediana dei valori di cortisolo spermatico si attesta tra quella del cortisolo salivare e la media dei valori del cortisolo plasmatico. Nella fattispecie la mediana dei valori del cortisolo spermatico è circa 5,4 volte minore rispetto alla media del cortisolo plasmatico ed è 4,9 volte superiore alla mediana del cortisolo salivare (grafico n°1).

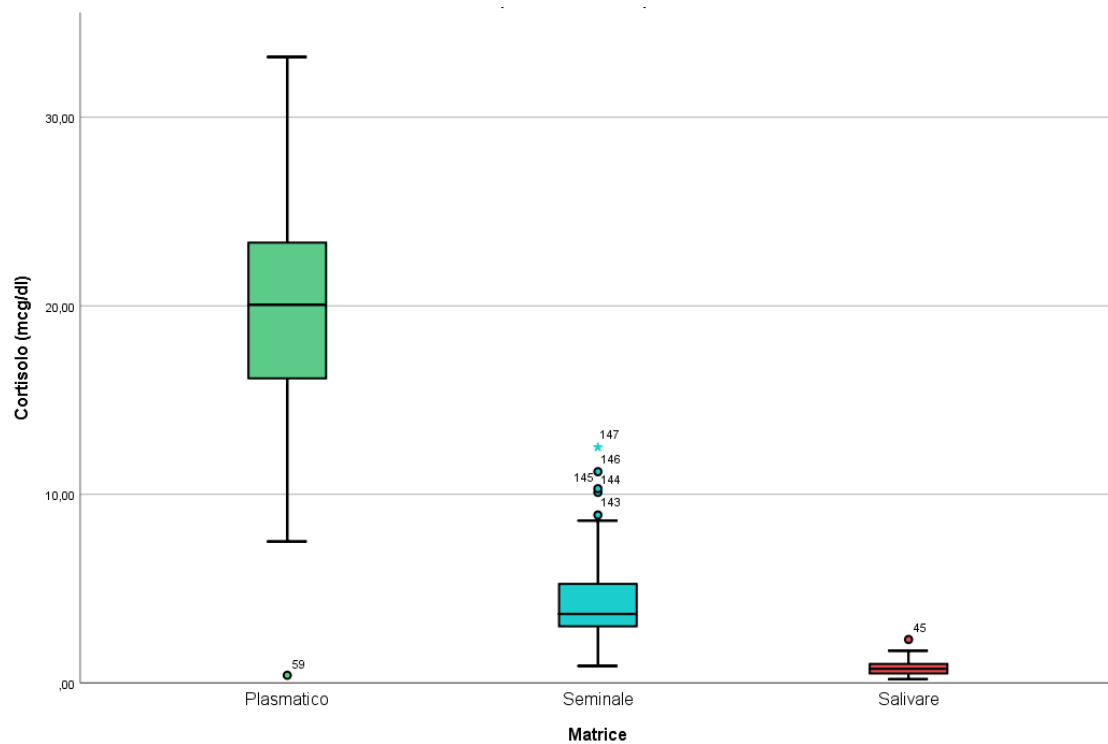


Grafico n° 1: Forest plot cortisolo sulle tre matrici.

6.2) CORRELAZIONE TRA LIVELLI DI CORTISOLO NELLE TRE MATRICI

Tramite analisi bivariata dei valori di cortisolo ottenuti nei tre liquidi biologici posti in esame abbiamo ottenuto due importanti relazioni.

La prima che andiamo ad esaminare è quella vigente tra cortisolo spermatico e cortisolo salivare, possiamo notare infatti dal grafico che segue (grafico n° 2) come ci sia un rapporto lineare tra i suddetti valori con un coefficiente di correlazione pari a 0,354 ($p=0,017$).

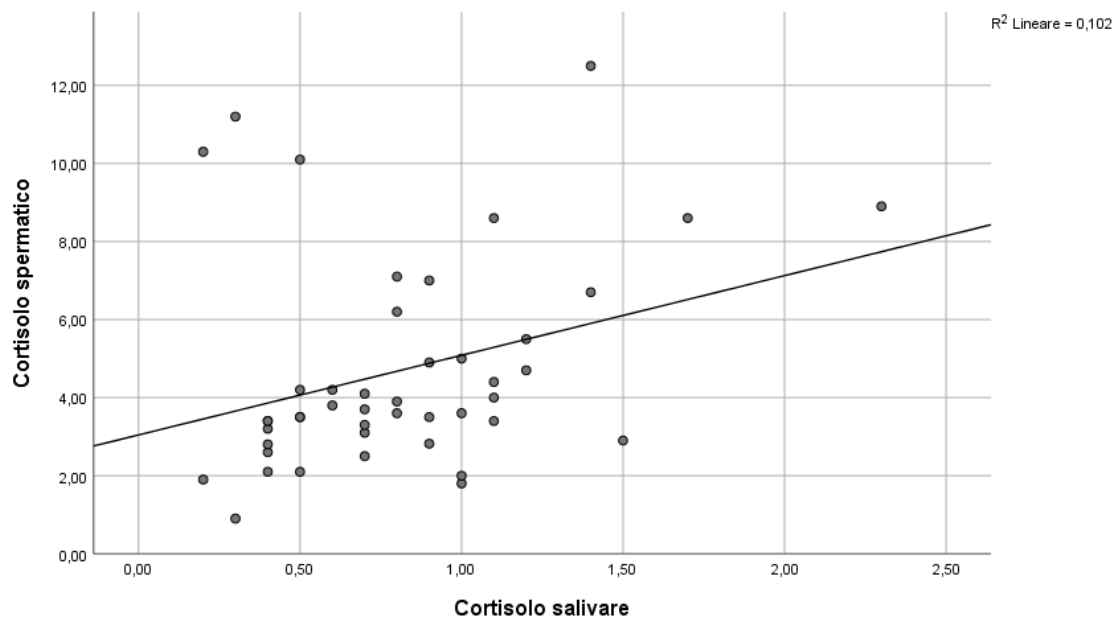


Grafico n° 2: Correlazione cortisolo spermatico – cortisolo salivare

La seconda relazione meritevole di discussione è quella tra il già citato cortisolo salivare e il cortisolo plasmatico, dal grafico (grafico n° 3) si evidenzia un rapporto lineare tra i due parametri presi in esame legati da un coefficiente di correlazione pari a 0,326 (p=0,029).

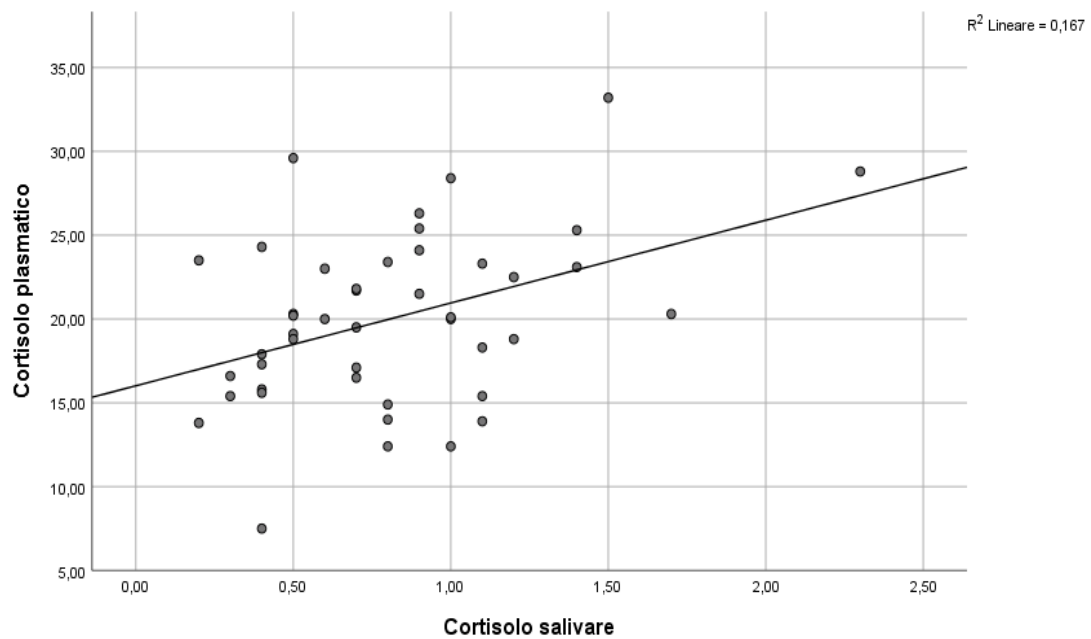


Grafico n° 3: Correlazione cortisolo plasmatico – cortisolo salivare

Non abbiamo invece osservato una relazione statisticamente significativa tra cortisolo spermatico e cortisolo plasmatico ($\rho = 0,135$, $p=0,364$) (grafico n°4).

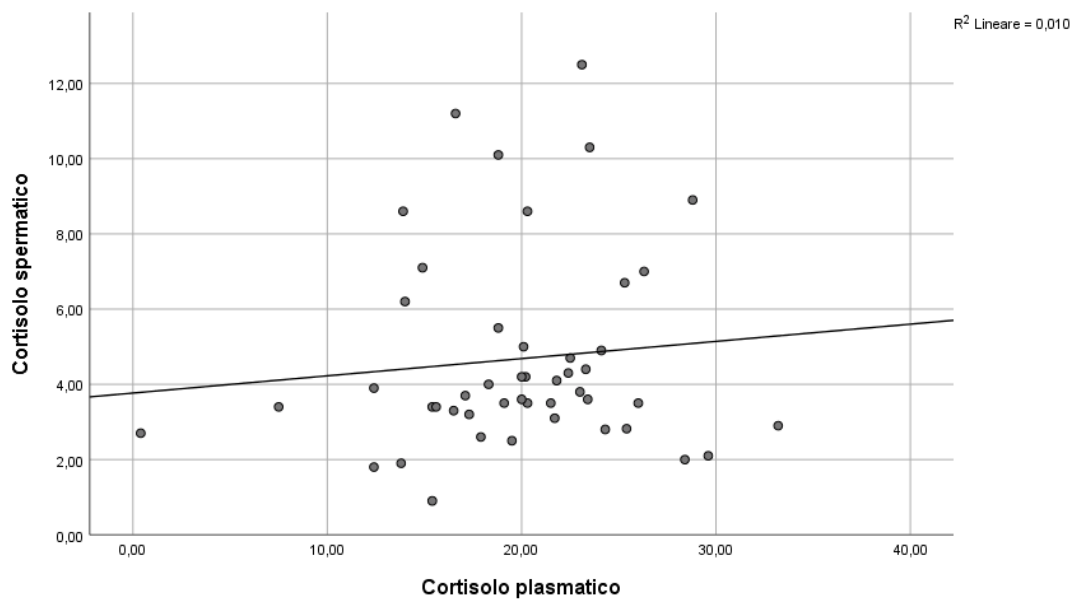


Grafico n° 4: Correlazione cortisolo spermatico – cortisolo plasmatico

6.3) CORRELAZIONE TRA LIVELLI DI CORTISOLO SPERMATICO E PARAMETRI SEMINALI

Andando ad esaminare i parametri seminali ottenuti e ponendo i suddetti in rapporto ai livelli di cortisolo spermatico, possiamo evidenziare alcune particolari relazioni. I dati sicuramente più sensibili riguardano il rapporto cortisolo spermatico – volume del liquido seminale e quello tra cortisolo spermatico – concentrazione spermatica.

Correlazione tra livelli di cortisolo e parametri seminali

	Plasmatico	Spermatico	salivare
Volume	$\rho = -0.168$ $p = 0.254$	$\rho = -0.216$ $p = 0.141$	$\rho = -0.068$ $p = 0.653$
Astinenza	$\rho = 0.216$ $p = 0.144$	$\rho = -0.028$ $p = 0.853$	$\rho = 0.055$ $p = 0.722$
Concentrazione	$\rho = 0.093$ $p = 0.528$	$\rho = 0.215$ $p = 0.143$	$\rho = -0.002$ $p = 0.988$
Motilità progressiva	$\rho = 0.022$ $p = 0.881$	$\rho = 0.039$ $p = 0.792$	$\rho = -0.084$ $p = 0.578$
Motilità totale	$\rho = 0.082$ $p = 0.579$	$\rho = 0.059$ $p = 0.690$	$\rho = -0.037$ $p = 0.805$
TMSC	$\rho = 0.011$ $p = 0.942$	$\rho = 0.147$ $p = 0.319$	$\rho = -0.019$ $p = 0.898$
Atipici	$\rho = -0.081$ $p = 0.589$	$\rho = -0.054$ $p = 0.717$	$\rho = 0.032$ $p = 0.836$
Leucociti	$\rho = 0.065$ $p = 0.661$	$\rho = 0.071$ $p = 0.632$	$\rho = 0.126$ $p = 0.404$
Vitalità	$\rho = -0.009$ $p = 0.951$	$\rho = -0.083$ $p = 0.583$	$\rho = -0.203$ $p = 0.187$

Partendo dalla correlazione tra cortisolo spermatico e volume del liquido seminale ($\rho = 0,216$, $p = 0,131$), come mostra la tabella sottostante, la relazione tra i due parametri è stata indagata utilizzando con diversi modelli matematici di regressione non lineare, tra i quali quello logaritmico è risultato essere il più adatto.

Riepilogo del modello e stime dei parametri

Equazione	R²	F	p-value
Lineare	0,068	3,360	0,073
Logaritmica	0,102	5,226	0,027
Quadratica	0,092	2,284	0,114
Composta	0,067	3,324	0,075
Esponenziale	0,067	3,324	0,075

Tale relazione viene evidenziata su scala logaritmica come regressione non lineare (grafico n° 5).

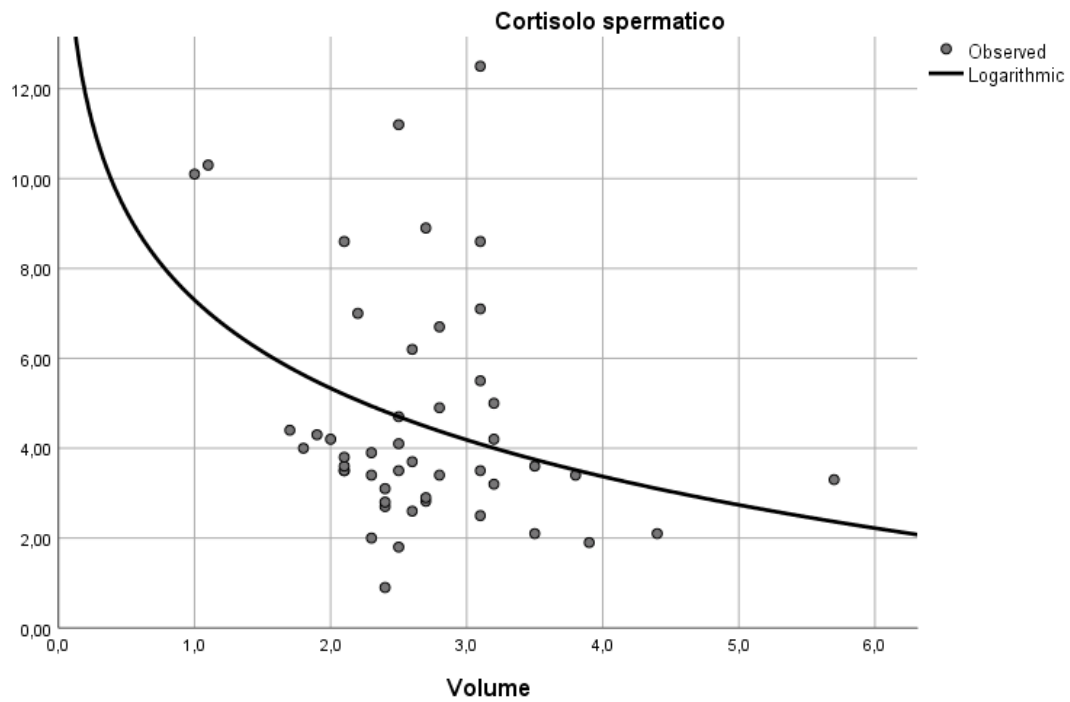


Grafico n° 5: Regressione non lineare cortisolo spermatico – volume del liquido seminale

Per quanto riguarda invece cortisolo spermatico e concentrazione spermatica, i due parametri sono legati da un coefficiente di correlazione pari a 0,215 (non significativa). Analogamente a quanto fatto prima con il rapporto cortisolo spermatico – volume liquido seminale andiamo adesso a riportare nella tabella sottostante i vari modelli matematici utilizzati anche per quanto concerne la correlazione cortisolo spermatico – concentrazione spermatica, evidenziando come in questo caso l’equazione maggiormente espressiva sia quella quadratica.

Riepilogo del modello e stime dei parametri

Equazione	R²	F	p-value
Lineare	0,003	0,154	0,697
Logaritmica	0,038	1,810	0,185
Quadratica	0,137	3,567	0,036

Possiamo notare il suddetto rapporto nel grafico n° 6 dove, su scala quadratica, si evidenzia come valori di cortisolo spermatico estremi siano in rapporto con valori anomali di concentrazione spermatica.

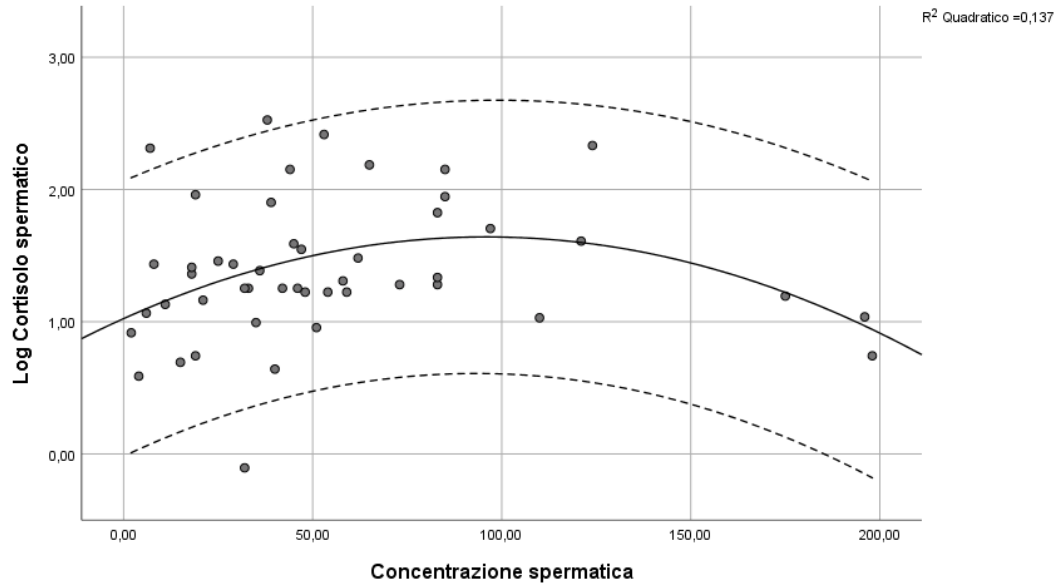


Grafico n° 6: Correlazione cortisolo spermatico – concentrazione spermatica

6.4) DISCUSSIONE

Cortisolo nelle tre matrici

Il nostro studio si è preposto, in primis, di valutare i valori di cortisolo in una popolazione maschile sana nello sperma, nel plasma e nella saliva considerando che proprio il cortisolo salivare nelle ultime tre decadi sta riscontrando sempre più successo nella pratica clinica (76). Questo è dovuto fondamentalmente a vari aspetti legati alla sua praticità, tra tutti la semplicità nella raccolta, il fatto che il campionamento sia facilmente ripetibile e non risulti invasivo. Altri vantaggi del cortisolo salivare sono ascrivibili al fatto che con tale misurazione si vanno a saggiare solo i valori di cortisolo libero, che sono tendenzialmente quelli di maggiore interesse clinico e diagnostico, e che il campionamento può essere eseguito in diverse ore della giornata rendendo sicuramente più agevole la valutazione circadiana dei valori di cortisolo. Tornando alle tre matrici, abbiamo visto come ci sia una correlazione tra cortisolo spermatico e cortisolo salivare e una correlazione tra cortisolo salivare e cortisolo plasmatico, mentre non abbiamo evidenziato una correlazione significativa tra cortisolo plasmatico e cortisolo spermatico. Pur non avendo a disposizione studi di riferimento che descrivano su larga scala la variabilità del cortisolo spermatico, ci sono indagini condotte dal nostro gruppo che suggeriscono una forte eterogeneità di questi valori nella popolazione, caratteristica che ritroviamo anche nel nostro studio. Di conseguenza, ipotizziamo che sia difficile correlare la concentrazione di cortisolo spermatico con i livelli di cortisolo nelle altre matrici, con particolare riferimento a quella plasmatica. A contribuire inoltre a questa mancata correlazione tra cortisolo nel liquido seminale e cortisolo plasmatico ci fa ipotizzare che quello spermatico non derivi esclusivamente da un processo di emofiltrazione passiva, ma che ci sia anche una componente di cortisolo prodotta

localmente, come suggerito da un nostro precedente studio. Nonostante questa sua intrinseca variabilità, tuttavia, possiamo ipotizzare che la correlazione con il cortisolo salivare sia data dal fatto che in entrambe le matrici il cortisolo si trovi nella sua forma libera, scevro da legami che coinvolgono proteine come la CBG (proteina plasmatica legante ormoni steroidei), responsabile da sola del legame dell'80-90% del cortisolo sierico (77), e l'albumina.

Cortisolo spermatico e volume del liquido seminale

Una correlazione importante portata alla luce dal nostro studio è quella relativa all'interdipendenza tra i valori di cortisolo spermatico e quelli di volume del liquido seminale. Nella fattispecie, vediamo come all'aumentare del volume del liquido seminale diminuisca la concentrazione del cortisolo spermatico, come se a governare questa equazione ci sia un fenomeno di diluizione. A questo proposito, il volume del liquido seminale è dato fondamentalmente dalle vescichette seminali, che ne costituiscono circa il 60%, dalla prostata, responsabile mediamente di un 30% e dalle ghiandole bulbo-uretrali (ghiandole di Cowper); queste ultime svolgono una funzione esocrina che analogamente a quella delle ghiandole salivari ha un ruolo di lubrificazione (in questo caso dell'uretra maschile durante il rapporto sessuale). Mentre il secreto prostatico e delle vescichette seminali presenta tendenzialmente un volume più o meno costante, la componente relativa alle ghiandole bulbo-uretrali è caratterizzata da una importante variabilità dipendente dallo stato di eccitazione del soggetto. Riteniamo, pertanto, che la relazione inversa tra volume seminale e concentrazione di cortisolo spermatico possa suggerire una produzione di cortisolo a livello delle vie seminali più profondo (prostata, vescichette seminali e testicolo), con un contributo da parte delle ghiandole bulbo-uretrali pressoché trascurabile.

Cortisolo spermatico e concentrazione spermatica

Andiamo adesso a trattare un argomento particolarmente rilevante del nostro studio, ovvero come la concentrazione di cortisolo nel liquido seminale vada ad influenzare la concentrazione spermatica, parametro che sappiamo essere di fondamentale importanza in materia di fertilità maschile. Quello che il nostro studio ha sottolineato è come valori di cortisolo particolarmente bassi o particolarmente alti di cortisolo nel liquido seminale siano in relazione con valori anormali di concentrazione spermatica. Questo confermerebbe quanto descritto in diversi studi su modelli animali, nei quali si è visto che all'aumentare dei livelli di glucocorticoidi endogeni si osserva un depauperamento delle varie componenti cellulari intratesticolari (72). A suffragio di tale ipotesi, inoltre, studi in via di pubblicazione indicano come pazienti affetti da varicocele, notoriamente più inclini a manifestare anomalie spermatiche siano caratterizzati da valori di cortisolo spermatico sensibilmente più elevati. È lecito immaginare, quindi, che il cortisolo seminale possa rappresentare, in futuro, un esame complementare utile a valutare lo stato della spermatogenesi in modo non invasivo, ma sono necessari ulteriori studi per stabilire in modo definitivo il suo possibile ruolo nel percorso diagnostico del maschio infertile.

Il nostro studio presenta i seguenti punti di forza:

- *Popolazione di soggetti sani ben selezionata, senza patologie andrologiche note.*
- *Metodica mai utilizzata in modo sistematico, ma già perfezionata in precedenti studi del nostro gruppo.*
- *Forti evidenze precliniche a sostegno dei nostri risultati.*

Gli attuali limiti sono rappresentati, invece, da:

- *Numerosità del campione*
- *Possibile presenza di condizioni patologiche non valutate (es. varicocele sub-clinico, infezioni asintomatiche...).*

6.5) CONCLUSIONI

Dal nostro studio è emerso come il cortisolo spermatico presenti una significativa correlazione con il cortisolo salivare, che a sua volta rispecchia la concentrazione plasmatica di cortisolo. Tuttavia, la mancanza di una correlazione significativa tra cortisolo seminale e cortisolo plasmatico e la relazione inversa tra volume seminale e concentrazione di cortisolo, suggeriscono che il cortisolo misurabile a livello seminale non rappresenti il risultato di una semplice filtrazione passiva dal circolo sistemico, ma che possa derivare, almeno in parte, da una produzione locale a livello delle vie seminali. Sembra inoltre che il cortisolo spermatico abbia un definito range di valori entro il quale possa svolgersi regolarmente la spermatogenesi. Riteniamo necessari studi su più ampia scala per definire i limiti di tale fenomeno prima di introdurli nella pratica clinica.

BIBLIOGRAFIA

- 1) **Anastasi, G. et al.** *Trattato di Anatomia Umana*. Milano : Edi.Ermes, 2006. Vol. 2.
- 2) **Filippi S**, Morelli A, Vignozzi L, Vannelli GB, Marini M, Ferruzzi P, Mancina R, Crescioli C, Mondaini N, Forti G, Ledda F, Maggi M. Oxytocin mediates the estrogen-dependent contractile activity of endothelin-1 in human and rabbit epididymis. *Endocrinology*. 2005 Aug;146(8):3506-17. doi: 10.1210/en.2004-1628. Epub 2005 Apr 28. PMID: 15860558.
- 3) **G. Faglia, P. beck-Peccoz, A. Spada, A.Lania.** Core curriculum. *Endocrinologia e metabolismo*. S.I MC Graw Hill Education, 2014.
- 4) **Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M.** Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016 Nov;59:10-26. doi: 10.1016/j.semdb.2016.04.009. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27143445.
- 5) **Cariboni A, Balasubramanian R.** Kallmann syndrome and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: The role of semaphorin signaling on GnRH neurons. *Handb Clin Neurol*. 2021;182:307-315. doi: 10.1016/B978-0-12-819973-2.00022-8. PMID: 34266601; PMCID: PMC9039773.
- 6) **Conti F.** *fisiologia medica*. 2020 Edi. Ermes.
- 7) **Newton CL, Riekert C, Millar RP.** Gonadotropin-releasing hormone analog therapeutics. *Minerva Ginecol*. 2018 Oct;70(5):497-515. doi: 10.23736/S0026-4784.18.04316-2. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30264955.
- 8) **Maggi R, Pimpinelli F, Martini L, Piva F.** Inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion by delta-opioid agonists in GT1-1 neuronal cells.

Endocrinology. 1995 Nov;136(11):5177-81. doi: 10.1210/endo.136.11.7588256. PMID: 7588256.

9) **Henderson HL, Townsend J, Tortonese DJ.** Direct effects of prolactin and dopamine on the gonadotroph response to GnRH. *J Endocrinol.* 2008 May;197(2):343-50. doi: 10.1677/JOE-07-0536. PMID: 18434364.

10) **Cicognani A, Cacciari E, Pasini A, Burnelli R, De Iasio R, Pirazzoli P, Paolucci G.** Low serum inhibin B levels as a marker of testicular damage after treatment for a childhood malignancy. *Eur J Pediatr.* 2000 Jan-Feb;159(1-2):103-7. doi: 10.1007/s004310050021. PMID: 10653341.

11) **Aldo E, Calogero.** Società Italiana di andrologia e medicina della sessualità. <https://www.siams.info/ipogonadismo-clinica-complicanze-e-diagnostica/>

12) **Guzelce EC, Galbiati F, Goldman AL, Gattu AK, Basaria S, Bhasin S.** Accurate measurement of total and free testosterone levels for the diagnosis of androgen disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2022 Jul;36(4):101683. doi: 10.1016/j.beem.2022.101683. Epub 2022 Jul 16. PMID: 35927159.

13) **Foresta C, Calogero AE, Lombardo F, Lenzi A, Ferlin A.** Late-onset hypogonadism: beyond testosterone. *Asian J Androl.* 2015 Mar-Apr;17(2):236-8. doi: 10.4103/1008-682X.135985. PMID: 25248651; PMCID: PMC4650463.

14) **Tsametis CP, Isidori AM.** Testosterone replacement therapy: For whom, when and how? *Metabolism.* 2018 Sep;86:69-78. doi: 10.1016/j.metabol.2018.03.007. Epub 2018 Mar 9. PMID: 29530796.

- 15) **Wang C, Swerdloff RS.** Testosterone Replacement Therapy in Hypogonadal Men. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2022 Mar;51(1):77-98. doi: 10.1016/j.ecl.2021.11.005. Epub 2022 Feb 8. PMID: 35216722; PMCID: PMC8994707.
- 16) **Fraietta R, Zylberstejn DS, Esteves SC.** Ipogonadismo ipogonadotropo rivisitato. *Cliniche (San Paolo).* 2013;68 Suppl 1(Suppl 1):81-8. DOI: 10.6061/clinics/2013(sup01)09. PMID: 23503957; PMCID: PMC3583156.
- 17) **Zitzmann M, Faber S, Nieschlag E.** Associazione di sintomi specifici e rischi metabolici con testosterone sierico negli uomini più anziani. *J Clin Endocrinol Metab.* novembre 2006; 91(11):4335-43. DOI: 10.1210/jc.2006-0401. EPUB 2006 Agosto 22. PMID: 16926258.
- 18) **Nieschlag E.** Late-onset hypogonadism: a concept comes of age. *Andrology.* 2020 Nov;8(6):1506-1511. doi: 10.1111/andr.12719. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31639279.
- 19) **Vander Borgh M, Wyns C.** Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018 Dec;62:2-10. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012. Epub 2018 Mar 16. PMID: 29555319.
- 20) **Giuliano, D.** . Endocrinologia e malattie del metabolismo. s.l. : Idelson-Gnocchi, 2020.
- 21) **Monaco F.** Endocrinologia Clinica. S.l.: Società Editrice Universo, 2011.
- 22) **Ma J, Zhang Y, Bao B, Chen W, Li H, Wang B.** Prevalenza e fattori associati di disfunzione erettile, disturbi psicologici e prestazioni sessuali negli uomini di infertilità primaria vs secondaria. *Reprod Biol Endocrinol.* 2021 Marzo 9;19(1):43. DOI: 10.1186/s12958-021-00720-5. PMID: 33750412; PMCID: PMC7942006.

- 23) **Istituto Superiore di Sanità.** Infertilità maschile e femminile.
- 24) **Abrao MS, Muzii L, Marana R.** Anatomical causes of female infertility and their management. *Int J Gynaecol Obstet.* 2013 Dec;123 Suppl 2:S18-24. doi: 10.1016/j.ijgo.2013.09.008. Epub 2013 Sep 11. PMID: 24119894.
- 25) **Crawford NM, Steiner AZ.** Age-related infertility. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2015 Mar;42(1):15-25. doi: 10.1016/j.ogc.2014.09.005. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25681837.
- 26) **Smith N, Quinton R. Kallmann syndrome.** *BMJ.* 2012 Dec 3;345:e6971. doi: 10.1136/bmj.e6971. PMID: 23207501.
- 27) **Milenković L, D'Angelo G, Kelly PA, Weiner RI.** Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 15;91(4):1244-7. doi: 10.1073/pnas.91.4.1244. PMID: 8108395; PMCID: PMC43133.
- 28) **Dittrich R, Beckmann MW, Oppelt PG, Hoffmann I, Lotz L, Kuwert T, Mueller A.** Thyroid hormone receptors and reproduction. *J Reprod Immunol.* 2011 Jun;90(1):58-66. doi: 10.1016/j.jri.2011.02.009. Epub 2011 Jun 8. PMID: 21641659.
- 29) **Ministero della Salute.** Varicocele (online) 17 Settembre 2020 <http://www.salute.gov.it/portale/fertility/dettaglioContenutiFertility.jsp?lingua=italiano&id=4559&area=fertilita&menu=malattie>.
- 30) **Associazione italiana per la ricerca,** Cancro. (online) www.airc.it/tumori/tumori-ai-testicoli.asp.

- 31) **Sklar C.** Reproductive physiology and treatment-related loss of sex hormone production. *Med Pediatr Oncol.* 1999 Jul;33(1):2-8. doi: 10.1002/(sici)1096-911x(199907)33:1<2::aid-mpo2>3.0.co;2-7. PMID: 10401490.
- 32) **Hsiao W, Stahl PJ, Osterberg EC, Nejat E, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN.** Successful treatment of postchemotherapy azoospermia with microsurgical testicular sperm extraction: the Weill Cornell experience. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 20;29(12):1607-11. doi: 10.1200/JCO.2010.33.7808. Epub 2011 Mar 14. PMID: 21402606.
- 33) **Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Meinhardt A, Bergmann M, Haidl G, Weidner W.** Orchitis und Infertilität [Orchitis and male infertility]. *Urologe A.* 2010 May;49(5):629-35. German. doi: 10.1007/s00120-010-2256-1. PMID: 20449780.
- 34) **Semet M, Paci M, Saias-Magnan J, Metzler-Guillemain C, Boissier R, Lejeune H, Perrin J.** The impact of drugs on male fertility: a review. *Andrology.* 2017 Jul;5(4):640-663. doi: 10.1111/andr.12366. Epub 2017 Jun 16. PMID: 28622464.
- 35) **Leathersich S, Hart RJ.** Immune infertility in men. *Fertil Steril.* 2022 Jun;117(6):1121-1131. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.02.010. Epub 2022 Mar 30. PMID: 35367058.
- 36) **Finelli R, Leisegang K, Finocchi F, De Masi S, Agarwal A, Damiani G.** The impact of autoimmune systemic inflammation and associated medications on male reproductive health in patients with chronic rheumatological, dermatological, and gastroenterological diseases: A systematic review. *Am J Reprod Immunol.* 2021 May;85(5):e13389. doi: 10.1111/aji.13389. Epub 2021 Jan 27. PMID: 33420722.
- 37) **Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J.** Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *J Biomed*

Biotechnol. 2010;2010:936569. doi: 10.1155/2010/936569. Epub 2010 Jun 30. PMID: 20671934; PMCID: PMC2910558.

38) **Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, Balercia G, Jannini EA, Ferlin A;** Klinefelter ItaliaN Group (KING). Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest.* 2017 Feb;40(2):123-134. doi: 10.1007/s40618-016-0541-6. Epub 2016 Sep 19. PMID: 27644703; PMCID: PMC5269463.

39) **Mohammed SK, Jan A.** Young Syndrome. 2023 Feb 20. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 30969689.

40) **Ahmad A, Ahmed A, Patrizio P.** Cystic fibrosis and fertility. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2013 Jun;25(3):167-72. doi: 10.1097/GCO.0b013e32835f1745. PMID: 23429570.

41) **Shoemark A, Harman K.** Primary Ciliary Dyskinesia. *Semin Respir Crit Care Med.* 2021 Aug;42(4):537-548. doi: 10.1055/s-0041-1730919. Epub 2021 Jul 14. PMID: 34261178.

42) **Pilatz A, Boecker M, Schuppe HC, Diemer T, Wagenlehner F.** Infektionen und Infertilität [Infection and infertility]. *Urologe A.* 2016 Jul;55(7):883-9. German. doi: 10.1007/s00120-016-0151-0. PMID: 27335094.

43) **Leos-Alvarado C, Llaca-Díaz J, Flores-Aréchiga A, Pérez-Chávez F, Casillas-Vega N.** Male urethritis. A review of the ideal diagnostic method. *Actas Urol Esp (Engl Ed).* 2020 Oct;44(8):523-528. English, Spanish. doi: 10.1016/j.acuro.2019.11.008. Epub 2020 Jul 16. PMID: 32684296.

- 44) **Farsimadan M, Motamedifar M.** The effects of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, herpes simplex virus-1 and -2, human herpesvirus-6 and -8, cytomegalovirus, and hepatitis B and C virus on female fertility and pregnancy. *Br J Biomed Sci.* 2021 Jan;78(1):1-11. doi: 10.1080/09674845.2020.1803540. Epub 2020 Sep 7. PMID: 32726192.
- 45) **Wu H, Wang F, Tang D, Han D.** Mumps Orchitis: Clinical Aspects and Mechanisms. *Front Immunol.* 2021 Mar 18;12:582946. doi: 10.3389/PMID: 33815357; PMCID: PMC8013702.
- 46) **Everaert K, Mahmoud A, Depuydt C, Maeyaert M, Comhaire F.** Chronic prostatitis and male accessory gland infection--is there an impact on male infertility (diagnosis and therapy)? *Andrologia.* 2003 Oct;35(5):325-30. PMID: 14535865.
- 47) **Jhuang, Y.H. et al.** . Association of Obstructive Sleep Apnea With the Risk of Male Infertility in Taiwan. *JAMA Network Open* . 2021, Vol. 4, 1.
- 48) **Krausz , C. e Escamilla, A.R.** Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology* . 2018, Vol. 15, 6.
- 49) **Schill , W.B. , Comhaire , F.H. e Hargreave, T.B.** *Andrologia clinica* . Milano : Springer-Verlag , 2010.
- 50) **Zhao , W. et al.** . Circulating sex hormone levels in relation to male sperm quality. *BMC Urology.* 2017, Vol. 20, 1.
- 51) **U.S. Food and Drug Administration;** U.S. Environmental Protection Agency
EPA-FDA advice about eating fish and shellfish.

<https://www.epa.gov/fish-tech/2017-epa-fda-advice-about-eating-fish-and-shellfish>

- 52) **Arabi M, Heydarnejad MS.** In vitro mercury exposure on spermatozoa from normospermic individuals. *Pak J Biol Sci.* 2007 Aug 1;10(15):2448-53. doi: 10.3923/pjbs.2007.2448.2453. PMID: 19070112.
- 53) **Homma-Takeda S, Kugenuma Y, Iwamuro T, Kumagai Y, Shimojo N.** Compromissione della spermatogenesi nei ratti da metilmercurio: coinvolgimento dell'apoptosi delle cellule germinali specifiche dello stadio e della cellula. *Tossicologia.* 2001 dicembre 1; 169(1):25-35. DOI: 10.1016/s0300-483x(01)00487-5. PMID: 11696407.
- 54) **Sansone A, Di Dato C, de Angelis C, Menafrà D, Pozza C, Pivonello R, Isidori A, Gianfrilli D.** Smoke, alcohol and drug addiction and male fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2018 Jan 15;16(1):3. doi: 10.1186/s12958-018-0320-7. PMID: 29334961; PMCID: PMC5769315.
- 55) **Srinivasan M, Hamouda RK, Ambedkar B, Arzoun HI, Sahib I, Fondeur J, Escudero Mendez L, Mohammed L.** The Effect of Marijuana on the Incidence and Evolution of Male Infertility: A Systematic Review. *Cureus.* 2021 Dec 2;13(12):e20119. doi: 10.7759/cureus.20119. PMID: 34984155; PMCID: PMC8720305.
- 56) **Di Mauro M, Tonioni C, Cocci A, Kluth LA, Russo GI, Gomez Rivas J, Cacciamani G, Cito G, Morelli G, Polloni G, di Maida F, Giunti D;** Trauma, Reconstructive Urology, Men's Health Working Parties of the European Association of Urology (EAU) Young Academic Urologists (YAU). Penile length and circumference dimensions: A large study in young Italian men. *Andrologia.* 2021 Jul;53(6):e14053. doi: 10.1111/and.14053. Epub 2021 Mar 21. PMID: 33748967; PMCID: PMC8243978.

- 57) **Sharma A, Minhas S, Dhillon WS, Jayasena CN.** Male infertility due to testicular disorders. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021 Jan 23;106(2):e442-e459. doi: 10.1210/clinem/dgaa781. PMID: 33295608; PMCID: PMC7823320.
- 58) **Khodamoradi K, Parmar M, Khosravizadeh Z, Kuchakulla M, Manoharan M, Arora H.** The role of leptin and obesity on male infertility. *Curr Opin Urol.* 2020 May;30(3):334-339. doi: 10.1097/MOU.0000000000000762. PMID: 32205811.
- 59) **Manuale OMS 2021** <https://www.riproduzionefertilita.it/2021/11/18/manuale-who-2021-dellorganizzazione-mondiale-della-sanita-oms-sullanalisi-del-seme/>
- 60) **Ministero della Salute** Terapia dell'infertilità maschile .
[http://www.salute.gov.it/portale/fertility/dettaglioContenutiFertility.jsp?lingua=italiano&id=4567&area=fertilita&menu=medicina.](http://www.salute.gov.it/portale/fertility/dettaglioContenutiFertility.jsp?lingua=italiano&id=4567&area=fertilita&menu=medicina)
- 61) **Foresta C et al.** Consensus: iter terapeutico della coppia infertile. Coop. Libreria Editrice. 2005.
- 62) **Attia AM, Abou-Setta AM, Al-Inany HG.** Gonadotrophins for idiopathic male factor subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 Aug 23;(8):CD005071. doi: 10.1002/14651858.CD005071.pub4. PMID: 23970458.
- 63) **Alahmar AT.** Role of Oxidative Stress in Male Infertility: An Updated Review. *J Hum Reprod Sci.* 2019 Jan-Mar;12(1):4-18. doi: 10.4103/jhrs.JHRS_150_18. PMID: 31007461; PMCID: PMC6472207.
- 64) **Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ.** Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res.* 2003 Aug 28;529(1-2):21-34. doi: 10.1016/s0027-5107(03)00101-5. PMID: 12943917.

- 65) **Lombardo F, Sansone A, Romanelli F, Paoli D, Gandini L, Lenzi A.** The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility: an overview. *Asian J Androl.* 2011 Sep;13(5):690-7. doi: 10.1038/aja.2010.183. Epub 2011 Jun 20. PMID: 21685925; PMCID: PMC3739574.
- 66) **Mirone M, Giannetta E, Isidori AM.** Selenium and reproductive function. A systematic review. *J Endocrinol Invest.* 2013 Nov;36(10 Suppl):28-36. PMID: 24419057.
- 67) **Roth LW, Ryan AR, Meacham RB.** Clomiphene citrate in the management of male infertility. *Semin Reprod Med.* 2013 Jul;31(4):245-50. doi: 10.1055/s-0033-1345271. Epub 2013 Jun 17. PMID: 23775379.
- 68) **Johnson D, Sandlow J.** Treatment of varicoceles: techniques and outcomes. *Fertil Steril.* 2017 Sep;108(3):378-384. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.07.020. PMID: 28865535.
- 69) **Ministero della Salute.** Procreazione medicalmente assistita. .
<http://www.salute.gov.it/portale/fertility/dettaglioContenutiFertility.jsp?lingua=italiano&id=4570&area=fertilita&menu=medicina>.
- 70) **Clements AD.** Salivary cortisol measurement in developmental research: where do we go from here? *Dev Psychobiol.* 2013 Apr;55(3):205-20. doi: 10.1002/dev.21025. Epub 2012 Apr 4. PMID: 22488016.
- 71) **Starovlah IM, Radovic Pletikosic SM, Kostic TS, Andric SA.** Reduced spermatozoa functionality during stress is the consequence of adrenergic-mediated disturbance of mitochondrial dynamics markers. *Sci Rep.* 2020 Oct 8;10(1):16813. doi: 10.1038/s41598-020-73630-y. PMID: 33033347; PMCID: PMC7544694.

- 72) **Berger T, Sidhu P, Tang S, Kucera H.** Are testicular cortisol and WISP2 involved in estrogen regulated Sertoli cell proliferation? *Anim Reprod Sci.* 2019 Aug;207:44-51. doi: 10.1016/j.anireprosci.2019.05.014. Epub 2019 May 29. PMID: 31208847.
- 73) **Silva EJ, Vendramini V, Restelli A, Bertolla RP, Kempinas WG, Avellar MC.** Impact of adrenalectomy and dexamethasone treatment on testicular morphology and sperm parameters in rats: insights into the adrenal control of male reproduction. *Andrology.* 2014 Nov;2(6):835-46. doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00228.x. Epub 2014 Jun 13. PMID: 24925687.
- 74) **Nordkap L, Almstrup K, Nielsen JE, Bang AK, Priskorn L, Krause M, Holmboe SA, Winge SB, Egeberg Palme DL, Mørup N, Petersen JH, Juul A, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N.** Possible involvement of the glucocorticoid receptor (NR3C1) and selected NR3C1 gene variants in regulation of human testicular function. *Andrology.* 2017 Nov;5(6):1105-1114. doi: 10.1111/andr.12418. Epub 2017 Oct 9. PMID: 28992366.
- 75) **Rehfeld A.** Revisiting the action of steroids and triterpenoids on the human sperm Ca²⁺ channel CatSper. *Mol Hum Reprod.* 2020 Nov 1;26(11):816-824. doi: 10.1093/molehr/gaaa062. PMID: 32926144.
- 76) **Pierre Bastin, Dominique Maiter, Damien Gruson.** La determinazione del cortisolo salivare: aspetti pre-analitici e analitici. *Annali di biologia clinica.* 2018; 76(4):393-405. DOI:10.1684/abc.2018.1355
- 77) **Bae YJ, Kratzsch J.** Corticosteroid-binding globulin: modulating mechanisms of bioavailability of cortisol and its clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015 Oct;29(5):761-72. doi: 10.1016/j.beem.2015.09.001. Epub 2015 Sep 11. PMID: 26522460.