



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Scuola di Medicina e Chirurgia
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina – DIMED

U.O.C. di Andrologia e Medicina della Riproduzione
Direttore: Ch.mo Prof. Alberto Ferlin

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

Ruolo del modello dietetico mediterraneo nella salute riproduttiva maschile: associazione tra stili di vita e abitudini alimentari con i parametri seminali, ormonali e nutrizionali.

Relatore:

Ch.mo Prof. Alberto Ferlin

Correlatori:

Dott. Luca De Toni

Dott. Andrea Graziani

Laureanda: Asia Mingardi

Anno Accademico 2023-2024

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	5
1. ANATOMIA E FISIOLOGIA DELL'APPARATO GENITALE MASCHILE.....	6
2. INFERTILITA'.....	10
2.1 Definizione.....	10
2.2 Iter diagnostico dell'infertilità maschile.....	11
2.2.1 Anamnesi e fattori di rischio.....	11
2.2.2 Esame obiettivo.....	13
2.2.3 Esame del liquido seminale.....	13
2.2.4 Esami microbiologici	13
2.2.5 Esami di imaging	14
2.2.6 Esami endocrinologici.....	15
2.2.7 Analisi genetiche.....	16
2.3 Categorie di infertilità e relativo trattamento.....	17
3. ANALISI DEL LIQUIDO SEMINALE.....	21
3.1 Generalità	21
3.2 Fase pre-analitica.....	22
3.3 Fase analitica.....	24
3.3.1 Valutazione macroscopica.....	24
3.3.2 Valutazione microscopica.....	26
3.4 Fase post-analitica.....	29
4. INFERTILITÀ, OBESITÀ E SINDROME METABOLICA.....	30

5. PARAMETRI SEMINALI, ORMONALI E STILI DI VITA.....	33
5.1 Fumo di tabacco.....	33
5.2 Alcolici	34
5.3 Caffaina	35
5.4 Altre sostanze d'abuso	36
5.5 Inquinanti ambientali	36
5.6 Alimentazione e attività fisica	37
STUDIO SPERIMENTALE.....	42
6. Scopo dello studio.....	42
7. Materiali e metodi.....	42
7.1 Campione	43
7.2 Misure.....	44
7.2.1 MEDAS.....	44
7.2.2 24-hours Food Recall Questionnaire.....	45
7.3 Informazioni al paziente e consenso.....	47
7.4 Raccolta dati e analisi statistica	48
8. Risultati.....	49
9. Discussione.....	53
10. Conclusioni	59
BIBLIOGRAFIA.....	60

RIASSUNTO

Premesse

L'infertilità colpisce fino al 25% delle coppie nei paesi più sviluppati ed è riconosciuta dalla World Health Organization (WHO) come un problema globale di salute pubblica. L'analisi del liquido seminale è la metodica maggiormente utilizzata nella valutazione dell'infertilità maschile, da questo è possibile ottenere informazioni circa lo stato funzionale delle gonadi, dei tubuli seminiferi, degli epididimi e delle ghiandole sessuali accessorie. La valutazione dell'infertilità maschile va, però, ben oltre questo semplice esame di laboratorio, in quanto deve avvalersi di un ampio inquadramento clinico che include un accurato esame obiettivo del paziente, una dettagliata anamnesi, test genetici, esami endocrinologici per la valutazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi in toto e per lo studio dell'assetto metabolico. Infatti è ampiamente noto che sovrappeso e obesità interferiscono negativamente con il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e come l'ipogonadismo che ne deriva eserciti un effetto negativo sull'asse stesso e sul metabolismo energetico, in un circolo vizioso che si autoalimenta. Da ciò si deduce come la fertilità maschile sia ampiamente influenzata dai fattori ambientali e dallo stile di vita, quali inquinamento, fumo di sigaretta, consumo di alcol, attività fisica e soprattutto regime alimentare.

Scopo dello Studio

Tale studio osservazionale prospettico si prefigge di analizzare i principali parametri seminali, l'assetto nutrizionale e ormonale dei pazienti per poi stabilire un'associazione tra questi, l'aderenza alla dieta mediterranea e il consumo di cibi ultra-processati. L'obiettivo è quello di delineare una correlazione tra lo stile di vita, in particolare le abitudini alimentari, il consumo di alcol, il fumo di sigaretta e la salute riproduttiva dell'individuo, specchio della salute globale.

Materiali e Metodi

Sono stati esaminati uomini di età compresa tra i 18 e i 60 anni che si sono rivolti spontaneamente, con la prescrizione per un esame del liquido seminale, presso l'UOC di Andrologia e Medicina della Riproduzione (Azienda Ospedaliera di Padova). Tutti i soggetti che hanno accettato volontariamente di partecipare allo studio sono stati sottoposti ad anamnesi generale (attraverso cui sono stati

esaminati i fattori di esclusione dallo studio), valutazione antropometrica (peso corporeo e altezza) e ad un'intervista comprendente due questionari dietetici validati e riconosciuti a livello internazionale, il "Mediterranean Diet Adherence Screener" (MEDAS) per valutare l'aderenza alla dieta mediterranea e il "24-hours Food Recall Questionnaire" per la valutazione del consumo di cibi ultra-processati.

Risultati

Dalle analisi ottenute è emerso come l'aderenza alla dieta mediterranea correli in modo statisticamente significativo con i parametri seminali e con l'asse endocrino, ovvero FSH e LH. Il consumo di alimenti ultra-processati correla con i parametri seminali, ma non ha alcuna influenza sull'asse endocrino e sulla produzione ormonale. Il valore di FSH presenta una correlazione significativa e inversa con i parametri seminali, con il MEDAS SCORE, con i volumi testicolari e con i valori di testosterone libero calcolato e biodisponibile. Normalizzando il parametro MEDAS SCORE per il valore di FSH e successivamente, per la % di calorie assunte da alimenti ultra-processati, si perdono le correlazioni sopracitate, a indicare che tali parametri non esercitano funzioni indipendenti sulle variabili considerate. Mediante analisi statistica di regressione lineare, abbiamo inoltre valutato la variabile maggiormente influente sulla conta spermatica tra il valore di FSH, la categoria di aderenza alla dieta mediterranea e la % di consumo di alimenti ultra-processati, restituendo tale ordine. Per quanto concerne il fumo di sigaretta, non sono state riscontrate correlazioni statisticamente significative con le variabili considerate.

Discussione e Conclusioni

La dieta mediterranea ha un impatto positivo sui parametri seminali e sull'asse endocrino-ormonale, agendo quindi sia in maniera diretta sia indiretta sulla produzione spermatica. Il consumo di cibi ultra-processati, invece, influisce esclusivamente in maniera diretta sulla stessa. Tali correlazioni mantengono importanza nei pazienti con elevati valori di FSH, infatti in presenza di disfunzione gonadica primitiva una maggior aderenza alla dieta mediterranea e un basso consumo di alimenti ultra-processati agiscono positivamente sui parametri seminali funzionali, delineando un'azione diretta dell'alimentazione sulla fertilità.

ABSTRACT

Background

Infertility affects up to 25% of couples in more developed countries and it is recognized by the World Health Organization as a global public health problem. The analysis of the seminal fluid is the most widely used method in the evaluation of male infertility, from which is possible to obtain information about the functional state of the gonads, seminiferous tubules, epididymis, and accessory sex glands. The evaluation of male infertility needs, however, a wide clinical framework that includes an accurate objective examination of the patient, a detailed medical history, genetic tests, endocrinological tests for the evaluation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and for the study of metabolic parameters. In fact, it is widely known that overweight and obesity adversely interfere with the functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and that the resulting hypogonadism exerts a negative effect on the axis itself and on the energy metabolism, in a vicious circle that feeds itself. From this it can be deduced that male fertility is largely influenced by environmental factors and lifestyle, such as pollution, cigarette smoking, alcohol consumption, physical activity and especially diet.

Aim of the Study

This prospective observational study aims to analyse the main seminal parameters, the nutritional and hormonal structure of patients and then establish an association between them, the adherence to the Mediterranean diet and the consumption of ultra-processed foods. The goal is to draw a correlation between lifestyle, especially eating habits, alcohol consumption and cigarette smoking and the reproductive and metabolic health of the patient, mirror of the overall health.

Materials and Methods

We have examined men between the ages of 18 and 60 years who have spontaneously referred, with a prescription for a seminal fluid examination, to the UOC of Andrology and Reproductive Medicine (Hospital of Padua). All subjects, who voluntarily agreed to participate to the study, were subjected to a general medical history (through which were examined exclusion factors from the study) an anthropometric assessment (body weight and height) and an interview

including two dietary questionnaires, validated and recognized internationally: the "Mediterranean Diet Adherence Screener" (MEDAS) which evaluates the adherence to the Mediterranean diet and the "24-hours Food Recall Questionnaire" for the evaluation of the consumption of ultra-processed foods.

Results

According to our results we found that the adherence to the Mediterranean diet correlates in a statistically significant way with seminal parameters and with the endocrine axis, i.e. FSH and LH. The consumption of ultra-processed foods correlates with seminal parameters, but has no influence on the endocrine axis and hormonal production. The FSH value has a significant and inverse correlation with the seminal parameters, with the MEDAS SCORE, with the testicular volumes and with the values of calculated and bioavailable free testosterone. By normalizing the MEDAS SCORE parameter for the FSH value and subsequently, for the % of calories consumed from ultra-processed foods, the above-mentioned correlations are lost, indicating that these parameters do not exert independent functions on the variables considered. Using linear regression statistical analysis, we also evaluated the most influential variable on sperm count between the FSH value, the category of adherence to the Mediterranean diet and the % consumption of ultra-processed foods, returning this order. As regards cigarette smoking, no statistically significant correlations were found with the variables considered.

Discussion and Conclusion

The Mediterranean diet has a positive impact on seminal parameters and on the endocrine-hormonal axis, therefore acting both directly and indirectly on sperm production. The consumption of ultra-processed foods, on the other hand, only directly affects it. These correlations remain important in patients with high FSH values; in fact, in the presence of primary gonadal dysfunction, greater adherence to the Mediterranean diet and low consumption of ultra-processed foods act positively on functional seminal parameters, outlining a direct action of nutrition on fertility.

INTRODUZIONE

L'analisi del liquido seminale, o spermioγραμμα, è ampiamente riconosciuta come il principale descrittore clinico del potenziale di fertilità maschile. Infatti, da tale valutazione, è possibile ottenere informazioni circa lo stato funzionale delle gonadi, dei tubuli seminiferi, degli epididimi e delle ghiandole sessuali accessorie [1], rappresentando quindi il primo elemento diagnostico nell'identificazione del fattore maschile nella coppia infertile [2]. Inoltre, lo spermioγραμμα consente di prevedere o avviare un programma di crioconservazione del seme in presenza di patologie che richiedono terapie potenzialmente in grado di compromettere la fertilità. È assolutamente necessario sottolineare come, pur riconoscendo nello spermioγραμμα un'importante indagine preliminare, la valutazione dell'infertilità maschile vada ben oltre questo semplice esame di laboratorio, dovendo necessariamente avvalersi di un ampio inquadramento clinico che includa un accurato esame obiettivo del paziente, una dettagliata anamnesi, test genetici, esami endocrinologici per la valutazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi in toto e per lo studio dell'assetto metabolico. Infatti è ampiamente noto che sovrappeso e obesità interferiscono negativamente con il funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e come l'ipogonadismo che ne deriva eserciti un effetto negativo sull'asse stesso e sul metabolismo energetico, in un circolo vizioso che si autoalimenta [3,4]. Oltre a tali casi, nei quali è clinicamente palese l'interferenza negativa tra le alterazioni endocrine e i disordini metabolici, esiste una numerosa percentuale di pazienti in cui tale associazione appare meno chiara, caratterizzati da un fenotipo normopeso ma metabolicamente non sani. Tale condizione è presente circa nel 30% dei soggetti con indice di massa corporea (IMC o BMI) nel range di normalità, in cui il riscontro di una condizione di oligozoospermia (condizione in cui il numero totale di spermatozoi è inferiore a 39×10^6) è molto comune [5,6]. In tale contesto, la possibile influenza di fattori ambientali, quali gli stili di vita, la sedentarietà, le abitudini alimentari e l'esposizione ad inquinanti ambientali, è un tema di crescente interesse medico [4,7].

1. ANATOMIA E FISILOGIA DELL'APPARATO GENITALE MASCHILE

L'apparato genitale maschile è il complesso di organi e strutture anatomiche dell'uomo preposto alla riproduzione sessuale umana. Esso comprende: gonadi, epididimi, dotti deferenti, vescicole seminali, prostata, pene, scroto e ghiandole bulbo-uretrali [8].

La gonade maschile prende il nome di testicolo o didimo, un organo pari racchiuso all'interno dello scroto, una sacca cutanea esterna situata inferiormente al pene, nella quale viene mantenuta una temperatura inferiore di 1-1,5°C rispetto a quella corporea, condizione necessaria perché avvenga la spermatogenesi. All'interno di questo, i didimi si posizionano uno a destra e uno a sinistra, il secondo inferiormente rispetto al primo.

Nel maschio adulto, i testicoli misurano mediamente 3,5-4 centimetri in lunghezza e 2,5 centimetri in larghezza e pesano attorno ai 20 grammi, con notevoli variazioni interindividuali. Sono ricoperti da una tonaca connettivale che prende il nome di tonaca albuginea e sono caratterizzati da tre tipi di cellule: le cellule del Sertoli, le cellule germinali e le cellule interstiziali di Leydig. Le prime due, unite assieme, formano i tubuli seminiferi, nei quali avviene la spermatogenesi [8].

I testicoli, infatti, hanno due funzioni: la produzione di spermatozoi e degli ormoni sessuali maschili, tra i quali il testosterone. La produzione ormonale aumenta enormemente alla pubertà e si mantiene elevata per tutta l'età adulta, riducendosi in età avanzata.

La spermatogenesi inizia, invece, in epoca puberale e anche questa si riduce con l'avanzare dell'età [9]. Gli spermatozoi vengono prodotti in ogni didimo nei tubuli seminiferi, in particolare dalle cellule del Sertoli. Sulla parte superiore di ciascun testicolo trova posto una formazione di piccoli canali che prende il nome di rete testis, la quale, sfruttando il passaggio attraverso i cosiddetti dotti efferenti, unisce i tubuli seminiferi del testicolo all'epididimo omolaterale, permettendo il passaggio degli spermatozoi [8].

Vicino ai tubuli seminiferi, sono collocate le cellule interstiziali o cellule di Leydig, responsabili della produzione di testosterone, secreto direttamente nei vasi sanguigni circostanti.

La spermatogenesi è un processo complesso che prevede vari passaggi, i principali dei quali sono la spermatocitogenesi, la meiosi e la spermiogenesi [9]. Il

processo inizia dagli spermatogoni, cellule germinali diploidi (ovvero contenenti 46 cromosomi, non 23 come gli spermatozoi) che, attraverso la spermatocitogenesi, si dividono per mitosi originando due cellule identiche. Una parte di esse rimane tale, in modo da conservare una riserva di cellule germinali, mentre dall'altra parte originano gli spermatociti primari. Questi si dividono per meiosi generando cellule aploidi (ovvero contenenti 23 cromosomi) chiamate spermatociti secondari. Il passaggio dallo spermatocita primario allo spermatocita secondario costituisce la prima fase della divisione meiotica. Nella seconda fase della divisione meiotica, gli spermatociti secondari si trasformano a loro volta in spermatidi. Questi, per diventare spermatozoi, devono subire un processo chiamato spermiogenesi, che comprende diverse fasi: spostamento del nucleo verso la periferia della cellula, allungamento dello spermatide e formazione della parte centrale dello spermatozoo, condensazione del nucleo e formazione della coda dello spermatozoo. L'intero processo che porta dallo spermatogonio allo spermatozoo maturo richiede circa 70 giorni e avviene continuamente all'interno dei testicoli [9].

Dopo essere stati prodotti all'interno dei testicoli, gli spermatozoi passano nell'epididimo, dove acquistano la motilità. L'epididimo è un dotto di piccolo diametro strettamente avvolto che collega i dotti efferenti dal polo posteriore di ogni testicolo al rispettivo dotto deferente. Questo, inoltre, funge da area di raccolta per gli spermatozoi maturi: al momento dell'eiaculazione si contrae e spinge gli spermatozoi lungo il dotto deferente che li porta in alto, verso la prostata [8]. Il dotto deferente si unisce ai dotti provenienti dalle vescicole seminali, che secernono un liquido viscoso e alcalino contenente fruttosio, prostaglandine e altre sostanze, il quale costituisce il 70% del liquido seminale e svolge principalmente una funzione di nutrimento per gli spermatozoi [10]. Le due vescicole seminali sono strutture tubulari ripiegate di circa 15 cm di lunghezza, si collocano tra la parete posteriore del collo vescicale e la ghiandola prostatica e si uniscono alla rispettiva ampolla del dotto deferente immediatamente al di sopra della prostata. Gli spermatozoi e il liquido seminale, quindi, confluiscono insieme in un unico canale, chiamato dotto eiaculatore, che a sua volta confluisce nell'uretra [10]. All'interno di questa affluisce anche il liquido proveniente dalla prostata, il quale costituisce il 30% della parte fluida del liquido seminale. Questa ghiandola produce un fluido alcalino che contiene acido citrico,

zinco, fosfolipidi, enzimi proteolitici e altre sostanze, la cui funzione principale è neutralizzare l'ambiente acido della vagina femminile al fine di proteggere gli spermatozoi [10]. Infine il canale uretrale (nel quale fluisce anche l'urina), che scorre all'interno del pene, porta all'esterno il liquido seminale. Le ghiandole bulbo-uretrali di Cowper, piccole ghiandole endocrine situate alla radice del pene [8], sono deputate alla produzione di un liquido che serve a lubrificare l'ultimo segmento dell'uretra maschile e a detergerlo dai residui di urina, capaci di inficiare la qualità del liquido seminale. Il liquido secreto dalle ghiandole bulbo-uretrali non fa parte dello sperma [10].

Poiché la spermatogenesi avvenga, è necessario il corretto funzionamento del sistema endocrino, ovvero un'adeguata produzione ormonale [9]. Si ricorda che l'ipotalamo produce il fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH), il quale agisce sull'ipofisi anteriore stimolando la produzione dell'ormone follicolo-stimolante (FSH) e dell'ormone luteinizzante (LH) [11]. Questi agiscono a livello testicolare: in particolare l'FSH sulle cellule di Sertoli a supporto della spermatogenesi, mentre l'LH sulle cellule di Leydig stimolando la produzione di testosterone. In presenza di testosterone, l'FSH stimola le cellule di Sertoli e induce la spermatogenesi. Il testosterone agisce anche mediante feedback inibitorio sull'ipofisi anteriore e sull'ipotalamo. Inoltre l'FSH comporta la produzione Sertoliana dell'ormone inibina B, il quale agisce mediante feedback inibitorio sull'ipofisi anteriore, inibendo la sintesi di gonadotropine [11]. Il testosterone è un ormone che agisce su numerosi tessuti bersaglio. A titolo di esempio, infatti, esso non solo supporta la spermatogenesi ma stimola l'anabolismo proteico aumentando la densità ossea e la massa muscolare, stimola la produzione renale di eritropoietina aumentando il livello dei globuli rossi, stimola la crescita delle cellule staminali del midollo osseo garantendo una buona funzionalità del sistema immunitario e possiede, infine, effetti cutanei quali produzione di sebo e crescita dei capelli ed effetti neurali stimolando la sfera cognitiva e aumentando la libido. In età prenatale, il testosterone stimola lo sviluppo degli organi genitali esterni mentre in epoca puberale supporta la maturazione dei genitali esterni, determina i caratteri sessuali secondari e consente il picco di crescita puberale assieme all'ormone somatotropo e al fattore di crescita insulino simile [11].

La quota attiva di testosterone è la frazione sierica non legata a proteine plasmatiche. In particolare, solo l'1-2% si trova nel plasma come forma libera, mentre la restante parte è legata all'albumina e a SHBG. Il legame con l'albumina è debole e reversibile, mentre il legame con l'SHBG è molto forte e quasi irreversibile, per tale motivo la quota definita biodisponibile è quella non legata ad esso [11]. Per quanto riguarda il dosaggio del testosterone si parla di quota totale dell'ormone, in quanto le metodiche di laboratorio utilizzate non sono in grado di misurare in maniera affidabile la quota libera rispetto alla quota legata. Per ricavare la percentuale di quota libera di testosterone si sfrutta un metodo indiretto, è necessario infatti applicare la formula di Vermeulen, conoscendo la quota totale di testosterone e le concentrazioni di albumina e di SHBG [11].

2. INFERTILITÀ

2.1 Definizione

Secondo la WHO (World Health Organization) l'infertilità rappresenta l'incapacità di una coppia di giungere ad una gravidanza clinica spontanea nonostante abbia svolto rapporti sessuali non protetti e regolari per 12 mesi. Con quest'ultimo termine si intende una media di 2-3 rapporti a settimana, indipendentemente dal fatto che la donna sia nel proprio periodo ovulatorio, in quanto il concepimento rimane possibile anche in altre fasi del ciclo mestruale. Inoltre, i gameti maschili sopravvivono fino a 2 giorni all'interno delle vie genitali femminili, escludendo la necessità di rapporti giornalieri [12].

La diagnosi di infertilità è quindi retrospettiva e richiede un anno per affermare di essere di fronte ad una coppia infertile. Essa, inoltre, non deve essere confusa con i concetti di sterilità e subfertilità. La sterilità è una sottoclasse di infertilità che prevede l'impossibilità di concepire naturalmente data da fattori non modificabili quali gonadectomia, assenza totale di produzione di spermatozoi, chiusura delle tube etc. La subfertilità indica, invece, una ridotta probabilità di gravidanza spontanea nella coppia.

Si distinguono inoltre l'infertilità primaria, la quale rappresenta la mancanza di una prima gravidanza nella coppia, e un'infertilità secondaria, ovvero l'incapacità di ottenere una seconda gravidanza dopo una prima avvenuta regolarmente. Quest'ultimo concetto sta assumendo sempre più importanza relativamente alla maggior instabilità delle coppie, perciò non è infrequente che l'uomo o la donna della coppia infertile abbiano già avuto figli da una relazione precedente. L'infertilità colpisce fino al 25% delle coppie nei paesi più sviluppati ed è riconosciuta dal WHO come un problema globale di salute pubblica [12].

Diverse sono le cause che compromettono la fertilità in entrambi i sessi, in particolare, circa il 40-50% dei casi riconosce un fattore maschile [13]. È dunque importante conoscere il potenziale di fertilità di entrambi i partner, per cui è necessario un lavoro specialistico integrato tra ginecologo e andrologo.

2.2 Iter diagnostico dell'infertilità maschile.

Fanno parte dell'iter diagnostico [12] dell'infertilità maschile:

1. Anamnesi e valutazione dei fattori di rischio;
2. Esame obiettivo;
3. Esame del liquido seminale;
4. Esami microbiologici;
5. Esami di imaging;
6. Analisi endocrinologica dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi;
7. Analisi genetiche.

2.2.1 Anamnesi e valutazione dei fattori di rischio

È importante ricordare che il fattore di rischio è differente dalla causa della patologia, si tratta infatti di un elemento che aumenta la probabilità di insorgenza di una determinata condizione. Nell'ambito dei fattori di rischio, è possibile distinguere fattori di rischio maggiori e minori, modificabili e non.

Fattori di rischio minori [12]:

- Fumo di sigaretta;
- Obesità e stile di vita sedentario;
- Fumo di marijuana e utilizzo di altre sostanze ricreative;
- L'età avanzata risulta essere il fattore più importante della controparte femminile, mentre lo è meno per quanto riguarda la parte maschile. Infatti, la riduzione della fertilità maschile con l'avanzare degli anni è un fenomeno molto lento e non particolarmente determinante.

Fattori di rischio maggiori [12]:

- Ipofonia testicolare, il quale correla principalmente con alterazioni quantitative della spermatogenesi;
- Varicocele, ovvero un'abnorme dilatazione delle vene del testicolo conseguente ad un'anomala inversione del flusso sanguigno nelle vene spermatiche, solitamente interne;
- Criptorchidismo, ovvero la mancata discesa nello scroto di uno o di entrambi i testicoli al momento della nascita;
- Esposizione ambientale a sostanze inquinanti, in particolare ai cosiddetti "interferenti endocrini";

- Esposizione lavorativa a fonti di calore. Il motivo per cui i testicoli sono situati esternamente all'addome risiede proprio nella minor temperatura (inferiore di 1-1,5°C) nella borsa scrotale rispetto alla temperatura corporea, requisito fondamentale per la spermatogenesi;
- Torsione del testicolo;
- Traumi testicolari, se importanti o ripetuti nel tempo possono determinare orchialgia ed infiammazione, a cui conseguono volumi testicolari ridotti;
- Orchiti;
- Malattie sessualmente trasmissibili;
- Infertilità iatrogena, in seguito ad interventi chirurgici o, soprattutto, a chemioterapia e radioterapia in quanto queste possono incidere in modo negativo e permanente sulla spermatogenesi e sulla funzione testicolare in toto. Questo problema non riguarda solo il trattamento della neoplasia del testicolo, ma anche quello di altre neoplasie riscontrabili nei giovani quali leucemie, linfomi e melanomi. A fronte di tale problematica, sono stati istituiti dei centri di oncofertilità, volti a crioconservare gli spermatozoi dei pazienti oncologici prima che questi inizino i trattamenti chemioterapici o terapie di altra natura che possano danneggiare in modo definitivo la funzione testicolare;
- Alcuni farmaci;
- Neoplasia testicolare;
- Storia familiare di infertilità. Come per il tumore testicolare o altre patologie del sistema riproduttivo, anche per l'infertilità maschile la componente familiare è molto rilevante: circa il 10-15% dei casi sono di origine genetica. Questo è peculiare in quanto l'infertilità è una patologia multifattoriale e tendenzialmente la componente familiare di questa categoria possiede un rilievo molto modesto. In questo caso, vista la sua importanza, sono disponibili esami genetici specifici;
- Abuso di steroidi anabolizzanti, si tratta di una problematica molto diffusa nei giovani, infatti in alcuni ambienti sportivi, soprattutto nelle palestre, i ragazzi vengono incitati ad assumere sostanze (di cui non si conosce l'esatta composizione) che spesso agiscono come steroidi anabolizzanti. A ciò si aggiunge il doping sportivo intenzionale;
- Alcool, fattore molto più rilevante del fumo.

A fronte di questi fattori di rischio, da un lato si evidenzia l'importanza dell'anamnesi, dall'altro si deduce come l'infertilità possa essere indice di salute generale dell'individuo.

2.2.2 Esame obiettivo

L'esame obiettivo consta di tre parti:

1. Esame obiettivo generale, in particolar modo si valutano massa grassa, altezza, peso, circonferenza vita e parametri vitali;
2. Esame obiettivo genitale, per lo studio delle caratteristiche strutturali e morfologiche di testicoli, epididimi, pene, dotti deferenti, strutture funicolari e prostata (mediante l'esplorazione rettale);
3. Valutazione dei caratteri sessuali secondari quali ginecomastia, distribuzione pilifera (soprattutto dei peli pubici), androgenizzazione, trofismo muscolare e caratteristiche della voce.

2.2.3 Esame del liquido seminale

Come verrà approfondito nel *Capitolo 3*, si tratta di un esame fondamentale per valutare lo stato di salute generale dell'apparato riproduttivo. Un esame del liquido seminale normale non correla necessariamente con un quadro di fertilità, così come un esame anormale non è indice assoluto di infertilità. Si tratta di un esame di laboratorio che fornisce informazioni di massima sul potenziale di fertilità, in quanto il concetto assoluto di fertilità è un concetto di coppia. Infatti, a parità di parametri seminali, un soggetto maschile può essere fertile con una partner e infertile con un'altra.

Importante sottolineare come l'esame del liquido seminale non sia solo indice di salute dell'apparato riproduttivo, ma indicativo di salute generale [13].

2.2.4 Esami microbiologici

Nell'ambito dell'inquadramento diagnostico-terapeutico dell'infertilità maschile è necessario prendere in considerazione le infezioni del tratto uro-genitale. Queste ultime sono sempre più frequenti e sottovalutate, in quanto spesso paucisintomatiche. Tuttavia, esse rientrano tra le possibili condizioni responsabili del mancato raggiungimento di una gravidanza. La presenza di un'infezione microbica viene diagnosticata in presenza di uno sviluppo, in una coltura di

liquido seminale, di $10^3 >$ colonie di batteri patogeni per ml di eiaculato o 10^4 colonie di batteri normalmente non patogeni per ml di eiaculato [14]. L'identificazione dell'agente eziologico mediante gli opportuni esami microbiologici, ovvero urinocoltura, spermocoltura, tampone uretrale e il relativo antibiogramma, consentono di scegliere in maniera mirata la terapia da somministrare. Per quanto riguarda le infezioni di origine batterica, esse sono spesso causate da germi Gram negativi quali *Escherichia Coli*, *Proteus*, *Serratia*, *Pseudomonas species* e *Klebsiella species* [14], ovvero patogeni certi a livello prostatico, ma possono anche essere determinate da patogeni a prevalente trasmissione sessuale come *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum* e *Neisseria gonorrhoeae* [14]. Occasionalmente è possibile il riscontro di forme flogistiche sostenute da batteri considerati come non patogeni o patogeni occasionali del tratto uro-genitale maschile, quali anaerobi obbligati o Gram positivi come *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus hominis* [14]. Infine, vanno considerate le infezioni protozoarie, la più frequente da *Trichomonas vaginalis* e le micosi, in particolare quelle causate da *Candida albicans*. Le classi di antibiotici che possono essere impiegate nel trattamento delle infezioni uro-genitali sono molteplici, in particolare si utilizzano i fluorochinoloni, i macrolidi e le tetracicline. La terapia delle forme protozoarie e di quelle micotiche è affidata, rispettivamente, ai nitroimidazoli e alla famiglia degli azoli [14].

Inoltre, la letteratura internazionale suggerisce di ricercare il DNA del Papillomavirus umano (HPV) nelle coppie infertili con infertilità idiopatica e particolarmente in quelle con storia di pregressa infezione o con specifici fattori di rischio. Infatti, secondo recenti evidenze, la presenza di HPV adesivo agli spermatozoi rappresenta un importante fattore predittivo negativo per la fertilità, sia naturale sia assistita [15]. Questa condizione sembrerebbe, infine, essere associata ad un significativo aumento nel numero degli aborti spontanei [16].

2.2.5 Esami di imaging

Gli esami di imaging utilizzati nella valutazione della fertilità maschile comprendono ecografia scrotale ed ecografia prostatico-vescicolare transrettale. Attraverso la prima possono essere valutate alterazioni morfo-funzionali del testicolo, epididimo e dotti deferenti, mentre mediante la seconda possono essere

valutate prostata, vescichette seminali e la porzione terminale dei dotti deferenti ed eiaculatori, per identificare le patologie del tratto riproduttivo in toto.

2.2.6 Esami endocrinologici

Per poter inquadrare la natura della problematica, allo studio dei fattori di rischio, all'esame obiettivo e allo studio del volume testicolare, viene associato lo studio endocrinologico dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Si ricorda che l'ipotalamo produce il fattore di rilascio delle gonadotropine GnRH, il quale agisce sull'ipofisi anteriore stimolando la produzione di FSH e LH. Questi agiscono a livello testicolare, in particolare l'FSH sulle cellule di Sertoli, a supporto della spermatogenesi (produzione di spermatozoi e liquido seminale), mentre l'LH agisce sulle cellule di Leydig stimolando la produzione di testosterone, il quale stimola la spermatogenesi agendo sull'FSH. Inoltre il testosterone agisce mediante feedback inibitorio sull'ipofisi anteriore e sull'ipotalamo, mentre l'FSH comporta la produzione Sertoliana dell'ormone inibina B, il quale agisce mediante feedback inibitorio sull'ipofisi anteriore, inibendo la sintesi di gonadotropine. Di conseguenza, per indagare l'origine di un problema di funzionamento della gonade maschile, oltre ad eseguire un esame del liquido seminale, è necessario fare un dosaggio di FSH, LH e testosterone (la metodica di dosaggio dell'inibina B non è affidabile, per cui non risulta utile alla diagnosi).

Tra i dosaggi ormonali quello dell'FSH è il più importante perché, unitamente ai valori di testosterone, permette di classificare subito l'ipogonadismo come primario, secondario o terziario [11]. Un valore elevato di FSH insieme ad una bassa concentrazione plasmatica di testosterone (ipogonadismo ipergonadotropo o ipogonadismo primario) indicano sempre un danno primario, ovvero a livello testicolare. Un valore di FSH inferiore al range di normalità insieme ad una bassa concentrazione plasmatica di testosterone spesso sono indicativi di una problematica a livello ipotalamico-ipofisario (ipogonadismo ipogonadotropo o ipogonadismo centrale), per la cui conferma è necessario il dosaggio di LH. Una condizione di ipogonadismo associata ad un valore di FSH normale può indicare la presenza di una forma ostruttiva, ma non esclude la possibilità di un'iniziale testicolopatia primaria e quindi di un ipogonadismo ipergonadotropo subclinico. Un valore di FSH alto associato a parametri di LH e testosterone normali indicano una testicolopatia primaria con funzione delle cellule di Leydig conservata: è

presente quindi un'alterazione della spermatogenesi, ma non della funzione endocrina del testicolo. Infatti quando il testicolo subisce un'alterazione, le prime componenti che ne risentono sono la spermatogenesi e le cellule del Sertoli, se il danno tuttavia perdura viene alterata anche la funzione endocrina delle cellule di Leydig [11].

Concentrazioni di FSH e LH basse associate ad un valore di testosterone alto concettualmente potrebbero indicare un tumore secernente testosterone che sopprime le gonadotropine (condizione molto rara), oppure potrebbe trattarsi di un caso di doping, ad oggi problema ampiamente diffuso. Valori di FSH, LH e testosterone alti potrebbero indicare una massa tumorale secernente a livello ipofisario che non risponde al feedback negativo mediato dal testosterone, oppure una mutazione inattivante del gene per il recettore degli androgeni, che anche in questo caso, non permette il corretto funzionamento del meccanismo di feedback negativo a livello ipofisario.

Un valore di FSH basso associato a LH e testosterone normali è indicativo, invece, di una mutazione inattivante esclusivamente del gene dell'FSH a livello ipofisario, che quindi non viene secreto a livelli adeguati.

2.2.7 Analisi genetiche

All'iter diagnostico dell'infertilità maschile appartengono anche analisi genetiche [17], in particolare le più utilizzate sono:

- **Analisi del cariotipo:** serve a valutare il numero dei cromosomi ed eventuali traslocazioni bilanciate o sbilanciate. È noto infatti che l'incidenza di alterazioni cromosomiche nei soggetti infertili è compresa tra il 2 e l'8%. Questa percentuale aumenta fino al 15% nei soggetti azoospermici;
- **Microdelezioni del cromosoma Y:** ovvero alcune regioni nel cromosoma Y possono risultare assenti. La prevalenza di questa alterazione nei soggetti infertili è stimata attorno al 10%;
- **Fibrosi cistica:** mutazioni nel gene della fibrosi cistica CFTR possono compromettere la funzionalità riproduttiva. Il 70-80% dei casi di azoospermia ostruttiva causata da agenesia congenita bilaterale dei vasi deferenti (CBAVD) riconosce una mutazione di tale gene. Inoltre anche i casi di agenesia monolaterale possono essere effetto della stessa. L'analisi molecolare del gene CFTR consiste

in un pannello di ricerca di un numero variabile di mutazioni note e in un pannello di mutazioni rare;

- Recettore degli androgeni: mutazioni nel gene del recettore degli androgeni sono riscontrate nel 2-3% dei soggetti azoospermici o oligozoospermici.

2.3 Categorie di infertilità e relativo trattamento

Dipendentemente dai parametri esaminati, i pazienti vengono distinti in tre diversi fattori di infertilità maschile. Si parla di:

- Fattori pre-testicolari: ovvero che agiscono sull'asse ipotalamo-ipofisi. In questa categoria rientrano le problematiche di natura ipofisaria nella produzione di gonadotropine, si tratta quindi di ipogonadismo ipogonadotropo [18]. I valori sierici di LH, FSH e testosterone risultano bassi e all'esame del liquido seminale si rileva oligozoospermia o azoospermia. Anche il volume testicolare risulta ridotto in quanto mancano le gonadotropine, infatti il volume finale dei testicoli è frutto dello sviluppo puberale, nel quale aumenta la spermatogenesi, di conseguenza sono prevalentemente le gonadotropine, in particolar modo l'FSH, che guidano questo processo. Se queste vengono meno, allora il volume è inferiore a quello fisiologico, soprattutto se la problematica pre-testicolare si sviluppa in epoca prepuberale.

Nelle alterazioni spermatiche pre-testicolari, la terapia medica è finalizzata a ripristinare i delicati equilibri dell'asse riproduttivo ormonale maschile, con l'utilizzo delle gonadotropine (FSH e LH/hCG) o del GnRH nel caso in cui la problematica sia di natura ipotalamica. La stimolazione con gonadotropine deve essere effettuata per almeno 3-4 mesi, fino a ripristinare la spermatogenesi [18]. Una volta normalizzata la funzione testicolare, si cerca di ottenere la gravidanza per via naturale o, se indicato, mediante tecniche di procreazione medicalmente assistita (PMA). Può essere inoltre opportuno, a scopo cautelativo per futuri programmi riproduttivi, ricorrere alla crio-conservazione del seme. Un'alternativa razionale all'utilizzo delle gonadotropine è rappresentata, nelle forme terziarie (ipotalamiche), dalla somministrazione di GnRH, anche se l'elevato costo e la difficoltà di utilizzo ne limitano l'attuazione;

- Fattori testicolari: ossia cause primarie di testicolopatia, quali orchiti e traumi. In tal caso è sempre presente un'alterazione del liquido seminale e un volume testicolare ridotto, ma i valori di FSH e LH nel sangue sono generalmente elevati.

I livelli di testosterone, invece, dipendono dal fatto che l'alterazione abbia compromesso o meno anche la steroidogenesi [18].

Le gonadotropine possono essere utilizzate anche nelle alterazioni spermatiche testicolari da ipogonadismo funzionale [19], con normali livelli di FSH (< 8 mU/mL). Questo quadro può essere determinato, ad esempio, da una ridotta attività funzionale dell'FSH (isoforme a ridotta attività e mutazione geniche della subunità β) o da alterazioni del recettore per l'FSH (polimorfismi FSH-R). La posologia per 3-6 mesi è sovrapponibile a quella utilizzata per l'ipogonadismo ipogonadotropo, ma l'efficacia è minore.

Possono essere utilizzati anche dei trattamenti ormonali off label, ovvero gli anti-estrogeni, mentre la terapia rebound con testosterone non viene più utilizzata [20]. La prima può essere definita anche terapia gonadotropinica indiretta e si serve dei modulatori selettivi del recettore degli estrogeni (SERM) e degli anti-estrogeni. Per quanto riguarda i SERM, quali clomifene [21] e tamoxifene, il razionale si basa sulla possibilità di interferire sul feedback negativo esercitato dagli estrogeni a livello ipotalamo-ipofisario, inducendo quindi un aumento di GnRH e conseguentemente di gonadotropine. Si sono inoltre dimostrati utili nel trattamento dell'ipogonadismo indotto da utilizzo di steroidi anabolizzanti.

Gli anti-estrogeni, come testolattone e anastrozolo, invece, riducono l'aromatizzazione del testosterone ad estradiolo provocando una riduzione dei livelli di estrogeni, pertanto il razionale del loro utilizzo è analogo a quello dei SERM [21].

Il trattamento delle alterazioni spermatiche causate dalle infezioni didimo/epididimarie e delle ghiandole accessorie (prostata e vescicole seminali) prevede l'utilizzo di antibiotici e anti-flogistici [22]. In particolare, per la scelta dell'antibiotico ci si avvale, ove possibile, dell'antibiogramma. Per quanto riguarda le flogosi, sia in presenza che in assenza di infezioni, si può ricorrere all'utilizzo di farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) e, se necessario, di cortisonici. Un'alternativa, soprattutto nelle flogosi croniche clinicamente silenti, è rappresentata dall'utilizzo di fitoterapici ad azione anti-flogistica (curcuma e quercetina) e anti-edemigena (bromelina) [23].

Nel caso in cui si sospetti la presenza di infertilità immunologica, ovvero determinata dalla presenza di autoanticorpi diretti verso gli spermatozoi come conseguenza di un trauma o di un processo infettivo, si può ricorrere all'utilizzo di

cortisonici, in modo continuativo o in una fase del ciclo della partner. Un altro approccio consiste nell'indurre un'azoospermia transitoria (mediante la somministrazione di testosterone enantato) con l'obiettivo di eliminare o ridurre la stimolazione antigenica alla ripresa della spermatogenesi [25].

Frequentemente nell'infertilità testicolare idiopatica viene utilizzato un approccio nutraceutico come terapia empirica [25]. Il termine "nutraceutica" deriva dall'unione di "nutrizione" e "farmaceutica" ed indica componenti alimentari che possiedono un'attività biologica tale da posizionarsi tra alimento e farmaco, ma la loro efficacia è ancora ampiamente dibattuta e i risultati derivanti dai diversi studi condotti sono contrastanti [26]. La terapia nutraceutica comprende amminoacidi (in particolare arginina ed acido aspartico), antiossidanti (tra cui pentossifillina, coenzima Q10, vitamina E, glutazione, vitamina C, selenio, zinco, licopene, acido alfa-lipoico e superossido dismutasi) ed energizzanti (in particolare carnitina ed ubidecarenone).

Infine, diversi studi, tra cui quello di Blomberg et al. [27] hanno dimostrato un'importante correlazione tra ipovitaminosi ($25\text{ (OH)D} < 25\text{ nmol/L}$) e alterazioni del liquido seminale, in particolare nella riduzione della motilità progressiva e nella morfologia tipica, rispetto a coloro che presentavano livelli di $25\text{ (OH)D} > 75\text{ nmol/L}$. Sulla base di ciò sono state proposte terapie integrative con supplementazioni di vitamina D per gli uomini infertili, tuttavia, ad oggi, mancano studi di intervento che abbiano dimostrato un reale effetto positivo delle stesse;

- Fattori post-testicolari o forme ostruttive: i quali interessano le vie seminali, come l'assenza congenita dei dotti deferenti, la cui causa più frequente è la mutazione del gene della fibrosi cistica. A questa patologia si aggiungono tutte le forme infiammatorie ed infettive delle vie seminali quali prostatiti, prostatovescoliti ed epididimiti che protraendosi nel tempo esitano in una fibrosi che comporta la chiusura dei dotti deferenti [28]. Negli ultimi decenni le forme ostruttive si presentano frequentemente anche su base iatrogena e l'intervento chirurgico a più elevato rischio in tal senso è l'ernioplastica inguinale [29].

Nelle forme ostruttive FSH, LH, testosterone e volume testicolare rientrano nel range di normalità.

Per le azoospermie ostruttive non è possibile effettuare terapia medica, pertanto il trattamento si basa sul recupero di spermatozoi dal testicolo o dall'epididimo e il ricorso a tecniche di PMA (procreazione medicalmente assistita). L'approccio microchirurgico per il ripristino della pervietà delle vie seminali è attualmente in disuso [30].

3. ANALISI DEL LIQUIDO SEMINALE

3.1 Generalità

Il liquido seminale è un liquido biologico composto da una frazione cellulata, costituita essenzialmente da spermatozoi, e da una componente liquida nota come plasma seminale. Quest'ultima svolge le funzioni di trasporto, nutrimento e immunomodulazione (soppressione della risposta immunitaria femminile contro gli spermatozoi del partner) ed è rappresentata dalla secrezione degli organi sessuali accessori, ovvero prostata, vescicole seminali, e, in misura minore, epididimi e ghiandole bulbo-uretrali di Cowper [10]. Dall'analisi del liquido seminale emergono due principali parametri quantificabili, ovvero il numero di spermatozoi ed il volume totale di eiaculato. Il primo riflette la produzione testicolare di cellule germinali matura; il secondo la capacità di trasporto del sistema duttale e, in particolare, l'efficacia di contrazione delle cellule muscolari lisce degli epididimi, la pervietà dei dotti deferenti che ne permettono il trasporto all'uretra uniti all'efficienza erettile ed eiaculatoria che ne consentono l'espulsione. In particolare, queste ultime dipendono dal desiderio sessuale, quindi dall'elaborazione nervosa che afferisce alle cellule muscolari lisce e al controllo delle stesse sull'afflusso e sull'efflusso di sangue dai tessuti erettili penieni, dallo striato bulbocavernoso e dai muscoli perineali. Il volume totale di eiaculato riflette, inoltre, la funzionalità delle cellule muscolari lisce delle ghiandole sessuali accessorie, la cui attività dipende dalla produzione ormonale endocrina e dal sistema nervoso autonomo come risposta all'eccitazione sessuale [10]. Le metodologie ed i valori di riferimento adottati nell'analisi del liquido seminale si rifanno a linee guida internazionali, emanate da Enti Regolatori sovranazionali, per migliorare la qualità dei risultati e la comparabilità degli stessi tra i diversi laboratori. Fra queste, il "WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen", emanato dalla World Health Organization (WHO) rappresenta le linee guida più unanimemente riconosciute ed adottate a livello internazionale. Particolarità della sesta ed ultima edizione del manuale WHO è quella di indicare come limite inferiore di riferimento dei vari parametri seminali il 5° percentile con l'intervallo di confidenza al 95%, raccomandando di utilizzare tali valori di riferimento insieme alla valutazione clinica, tra cui il fattore femminile, per stabilire le prospettive di fertilità della coppia [2]. Il 5° percentile è il valore (di un determinato parametro) al quale solamente il 5% della popolazione

considerata ha (per quel parametro) valori inferiori. Includere l'intervallo di confidenza al 95%, indicatore dell'entità dell'imprecisione del risultato, si rivela clinicamente utile per determinare in quale percentile rientra il campione seminale del paziente rispetto agli standard di riferimento, piuttosto che classificarlo in modo dicotomico come "normale" o "alterato". Rispetto alle precedenti edizioni, tale approccio si pone in modo clinicamente più realistico, consentendo una miglior interpretazione del profilo seminale di un paziente rispetto ad un gruppo di riferimento [1].

3.2 Fase pre-analitica:

Al fine di standardizzare e rendere omogenea e confrontabile la valutazione analitica dello spermogramma, viene prevista e codificata anche una fase pre-analitica di raccolta del liquido seminale in un contenitore sterile e mantenimento dello stesso tra i e 20 e i 37°C per almeno 30 minuti, consentendo la sua completa fluidificazione. Numerosi fattori, tuttavia, possono influenzare l'efficienza della fase pre-analitica con conseguenze sulla fase analitica [10]. A tale proposito, si distinguono fattori paziente-indipendenti, quali:

1. La qualità della raccolta: questa deve essere completa, infatti le prime frazioni dell'eiaculato contengono liquidi prostatici maggiormente ricchi di spermatozoi, mentre le successive sono composte per lo più da liquido vescicolare seminale. Pertanto, la perdita della prima frazione ha sicuramente un maggior impatto sull'analisi rispetto alla perdita della seconda;
2. L'attività delle ghiandole sessuali accessorie: i fluidi da queste prodotte diluiscono la concentrazione spermatica. Essa, pertanto, non riflette la misura diretta della produzione di sperma testicolare che viene stimata prendendo in considerazione il numero totale di spermatozoi eiaculati, ovvero la concentrazione degli spermatozoi moltiplicata per il volume totale di eiaculato;
3. Il tempo di astinenza eiaculatoria: gli spermatozoi si accumulano negli epididimi, e, quando questi sono pieni, passano nei dotti deferenti, eiaculatori, traboccano nell'uretra e si trovano escreti nelle urine. Gli epididimi non vengono mai completamente svuotati, per tale motivo, permangono sempre spermatozoi dall'eiaculazione precedente. Studi approfonditi [10], hanno dimostrato come siano necessari 2-3 giorni di eiaculazioni quotidiane per esaurire le riserve dell'epididimo di spermatozoi. Pertanto la raccomandazione, basata

sull'esperienza clinica [10], è quella di chiedere ai probandi di osservare un periodo di astinenza di 2-7 giorni per ridurre la variabilità cellulare;

4. Il metodo di raccolta: il campione da esaminare dovrebbe essere ottenuto mediante masturbazione, in un ambiente appositamente dedicato, prossimo al laboratorio, in modo da limitare l'esposizione del liquido seminale a variazioni di temperatura e verificare l'intervallo di tempo tra la raccolta del campione e l'esecuzione del suo esame. Tuttavia, esistono diverse evidenze [10] che sottolineano come il volume totale ed il contenuto di spermatozoi dell'eiaculato dipendano molto dalle circostanze nelle quali questo è prodotto. In particolare, l'eiaculato prodotto dalla masturbazione e raccolto in un contenitore in una stanza adiacente al laboratorio, presenta una resa minore rispetto a quello raccolto a casa in seguito ad un rapporto sessuale mediante l'utilizzo di preservativi non spermicidi. Questa differenza dipende non solo da un diverso livello e da una diversa durata dell'eccitazione sessuale, ma anche dal minor tempo impiegato per la raccolta del campione tramite masturbazione [10];
5. Il contenitore per la raccolta: questo deve essere sterile se viene effettuata l'analisi microbiologica o se utilizzato per la riproduzione assistita, altrimenti è sufficiente un contenitore pulito di plastica o vetro [10] prelevato da un lotto di cui sia certificata la non tossicità per gli spermatozoi;
6. La temperatura: questa deve essere mantenuta tra i 20° e i 37° gradi [10].

Dall'altro lato, tra i fattori paziente-dipendente [10], vi sono:

1. Il volume testicolare, il quale riflette la capacità di spermatogenesi degli stessi;
2. L'assetto metabolico-endocrinologico del paziente;
3. L'utilizzo di farmaci. Per esempio, il trasporto degli spermatozoi fino all'uretra dipende dall'attivazione dei recettori alfa-1 nelle cellule muscolari lisce dei vasi deferenti, pertanto trattamenti farmacologici con alfa-bloccanti o inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina possono inibire l'attività di tali cellule [10];
4. L'utilizzo di integratori o di steroidi anabolizzanti.

3.3 Fase analitica

La fase analitica consta di due momenti distinti: la valutazione macroscopica, nella quale vengono esaminate le caratteristiche chimico-fisiche del liquido seminale, e quella microscopica che ha l'obiettivo di analizzare la componente cellulare nemaspermica, o germinale, e la componente cellulare non nemaspermica.

3.3.1 Valutazione macroscopica

La valutazione macroscopica restituisce una serie di informazioni che non possono essere tradotte in un esatto valore numerico e quindi controllate da metodi quantitativi tradizionali, ma rivestono ugualmente una grande importanza clinica.

Macroscopicamente un eiaculato nella norma presenta un aspetto omogeneo di consistenza cremosa e color grigio-opalescente [10]. Questi elementi variano a seconda delle condizioni, in particolare potrebbe apparire meno opaco se la concentrazione di spermatozoi è particolarmente bassa, leggermente giallastro nel caso di un'astinenza prolungata, rosso-marrone se presenta globuli rossi (ematospermia) o francamente giallo nel caso in cui il paziente sia itterico. Particolare attenzione va posta se l'eiaculato si presenta viscoso, totalmente chiaro e incolore, infatti in tal caso si parla di pre-eiaculato, prodotto dalle ghiandole di Cowper in quantità variabile durante l'eccitazione, solitamente seguito dalla fase eiaculatoria vera e propria [10].

Nel periodo di tempo immediatamente post-eiaculatorio, il seme si presenta come una massa gelatinosa semi-solida, la quale inizia a liquefare in pochi minuti a temperatura ambiente per apparire, infine, come una miscela eterogenea. Man mano che la liquefazione procede, l'eiaculato diventa più omogeneo e trasparente, ma con una viscosità maggiore dell'acqua. Tale fase si completa generalmente in 30 minuti, trascorsi i quali possono comunque permanere alcuni granuli gelatinosi, privi di significato clinico. La presenza di filamenti di muco può, tuttavia, interferire con l'esame dell'eiaculato e dovrebbe, pertanto, essere segnalata nel referto finale. Dopo la completa liquefazione, la viscosità dell'eiaculato può essere stimata aspirando lo stesso in una pipetta di plastica (sterile e non spermicida) per poi osservare che, in condizioni normali, questo

fuoriesce per gravità in piccole gocce. In caso di viscosità anomala si noteranno dei filamenti molto lunghi [10].

L'esatta determinazione del volume dell'eiaculato è essenziale per qualsiasi valutazione del liquido seminale, in quanto permette di calcolare il numero totale di spermatozoi e di cellule non nemaspermiche. Il limite inferiore di riferimento per il volume del liquido seminale è 1.4 ml (5° percentile, IC al 95% 1.3-1.5) [10]. Un volume seminale inferiore è caratteristico di ostruzione dei dotti eiaculatori o di assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti, una rara anomalia ostruttiva in cui anche le vescicole seminali sono scarsamente sviluppate. Tra le altre cause di un volume seminale ridotto troviamo, inoltre, la raccolta non completa del campione seminale (perdita di una frazione dell'eiaculato), l'eiaculazione retrograda parziale o un deficit androgenico. Dall'altro lato, un volume seminale elevato potrebbe dipendere dall'essudazione che si verifica in presenza di infiammazione acuta delle ghiandole sessuali accessorie [10].

Anche l'odore dell'eiaculato deve essere preso in considerazione. Infatti, nonostante la diversa percezione personale degli odori, un franco odore di urina o di putrefazione sono certamente indice di condizioni non fisiologiche.

Ulteriore parametro da valutare è il pH dell'eiaculato, il quale dipende dal contenuto della secrezione prostatica acida e da quella alcalina delle vescicole seminali. Non esiste un controllo efficace del pH del seme, inoltre in vitro si verifica una progressiva carbonatazione che esita in un abbassamento di tale parametro. Per tale motivo andrebbe valutato "alla tocca" entro 30 minuti dall'avvenuta eiaculazione, utilizzando strisce reattive che presentano un valore compreso tra i 6 e i 10. Un pH inferiore al valore 7.2 potrebbe essere dovuto ad una carenza di liquido vescicolare seminale alcalino o ad una contaminazione urinaria. Inoltre, il riscontro di un pH minore di 7.0 in campioni seminali di scarso volume e contenenti un basso numero di spermatozoi, può essere indicativo di ostruzione dei dotti eiaculatori o assenza bilaterale congenita dei vasi deferenti. Dall'altro lato, un valore di pH del liquido seminale elevato (≥ 8.0) è indicativo di flogosi genitale [10].

3.3.2 Valutazione microscopica

L'esame microscopico del liquido seminale ha come obiettivo lo studio della componente nemaspermica e della componente non nemaspermica. Per quanto riguarda gli spermatozoi, vengono valutati rispettivamente: il numero totale, il numero per ml (concentrazione), la motilità, la vitalità e la morfologia. Le cellule non nemaspermiche riscontrabili all'esame microscopico del liquido seminale includono: cellule epiteliali del tratto genito-urinario, cellule germinali immature, leucociti ed eritrociti.

Il numero totale di spermatozoi per eiaculato si ottiene moltiplicando il volume totale dell'eiaculato per la concentrazione degli stessi (numero/ml). Il valore di riferimento inferiore per tale parametro è 39×10^6 spermatozoi (5° percentile, IC al 95% $33-46 \times 10^6$). Sulla base di tale valore [10] si definisce:

1. normozoospermia: il numero di spermatozoi rientra nel range di riferimento;
2. oligozoospermia: il liquido seminale presenta un numero ridotto di spermatozoi totali, inferiore a 39×10^6 ;
3. criptozoospermia: liquido seminale presenta un numero molto esiguo di spermatozoi (la concentrazione è inferiore a 100.000 spermatozoi/ml), questi non risultano visibili al microscopio, ma solo dopo centrifugazione del campione;
4. azoospermia: totale assenza di spermatozoi nel liquido seminale, anche dopo centrifugazione. L'azoospermia è una condizione molto importante da diagnosticare, in quanto la presenza di un numero estremamente esiguo di spermatozoi cambia radicalmente la prognosi del paziente rendendo possibile la fecondazione assistita, per tale motivo non ci si affida mai ad un solo esame del liquido seminale, ma va sempre ripetuto a circa 2-3 mesi di distanza (tempo necessario affinché si realizzi la spermatogenesi). Ciò perché esistono molti fattori, anche transitori, che influiscono sulla stessa, basti pensare ad un semplice episodio febbrile, il quale causa un'alterazione del liquido seminale rilevabile a circa due mesi di distanza [10].

La concentrazione di spermatozoi fa riferimento al numero di spermatozoi per unità di volume del liquido seminale, quindi dipende dal numero di spermatozoi emessi e dal volume di fluido in cui sono diluiti, risultando quindi influenzata dal volume delle secrezioni prodotte dalle vescicole seminali e dalla prostata, pertanto, non rappresenta un indice specifico della funzione testicolare. Il limite

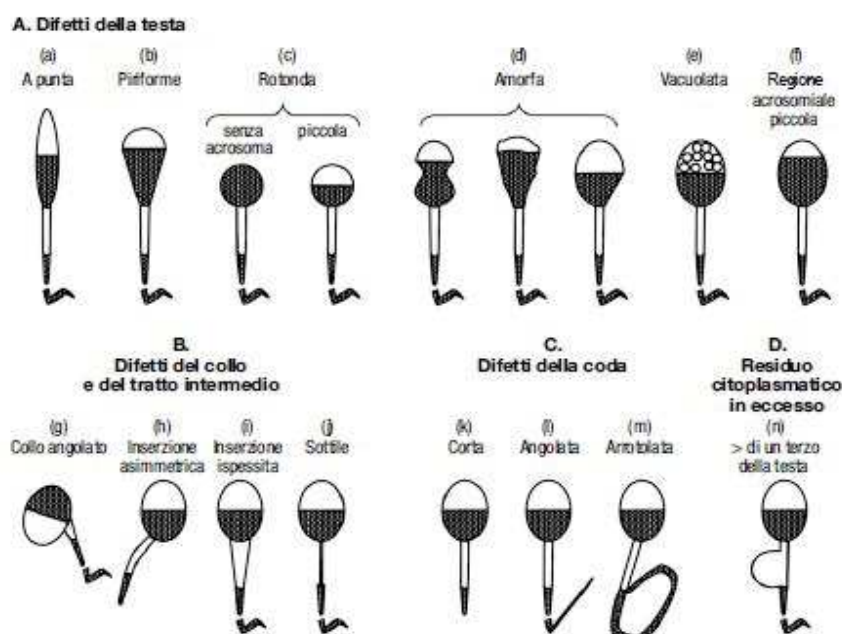
inferiore di riferimento per tale valore è 16×10^6 spermatozoi per ml (5°percentile, IC al 95% $15-18 \times 10^6$) [10].

La motilità degli spermatozoi viene distinta in classi, rispettivamente progressiva, non progressiva ed immobilità, a seconda delle caratteristiche di progressione cellulare; si distingue poi la percentuale di spermatozoi che ricade in ogni singola classe. La prima descrive uno spermatozoo che si muove attivamente, in modo lineare o lungo un'ampia circonferenza, indipendentemente dalla velocità. Tale parametro è sensibilmente correlato alle percentuali di successo di una gravidanza [10]. La seconda indica qualsiasi altro tipo di motilità in cui si riscontri l'assenza di progressione nello spazio, ad esempio, movimenti che descrivono piccole circonferenze, deboli spostamenti della testa indotti dal movimento flagellare o il solo movimento della coda. Per immobilità si intende, invece, assoluta assenza di movimento. La motilità totale, il cui limite inferiore corrisponde al 42% (5° percentile, IC al 95% 40-43), è pari alla somma della motilità progressiva (il cui limite inferiore di riferimento è 30%, ovvero il 5° percentile, IC al 95% 29-31) e di quella non progressiva. Per valori inferiori al range di riferimento si parla di astenozoospermia [10].

La vitalità degli spermatozoi è una caratteristica cellulare dall'ampio significato che, ai fini laboratoristici, viene ricondotta all'integrità della membrana plasmatica. L'integrità della membrana cellulare viene studiata mediante il test di esclusione del colorante o il test di rigonfiamento iposmotico. Il primo si basa sul principio che le membrane cellulari danneggiate permettono la penetrazione di coloranti e può essere effettuato utilizzando solo eosina o eosina-nigrosina, quest'ultima conferendo una colorazione scura allo sfondo, aumenta il contrasto tra quest'ultimo e le teste degli spermatozoi lievemente colorate, rendendole in tal modo più evidenti. Il test del rigonfiamento iposmotico, invece, si basa sul presupposto teorico che solo le cellule con membrana integra (cellule vitali) si rigonfiano all'interno di soluzioni ipotoniche. Gli spermatozoi rigonfi vengono identificati in base alle modificazioni morfologiche della cellula, in particolare quelli vitali si distinguono dalla presenza di code rigonfie. Viene quindi riportata la percentuale di cellule non-alterate, il cui valore inferiore di riferimento è pari al 54% (5° percentile, IC al 95% 50-56). Per valori inferiori al range di riferimento si parla di necrozoospermia [10].

Anche la valutazione della morfologia nemaspermica si avvale dell'attribuzione in classi definite come tipica e atipica. Per considerare uno spermatozoo come avente morfologia tipica, le sue parti costitutive principali, visibili al microscopio ottico, ovvero testa e coda (tratto intermedio e tratto principale), devono risultare normoconformate ovvero: la testa deve presentarsi liscia, di forma ovale e delimitata da contorni regolari, con una regione acrosomiale ben definita; il tratto intermedio, la cui lunghezza deve essere uguale a quella della testa, si deve presentare uniforme e affusolato; il tratto principale deve avere un calibro uniforme lungo l'intera lunghezza, più sottile di quello intermedio. Tutte le forme non strettamente classificabili come tipiche dovrebbero essere considerate atipiche e possono essere ulteriormente caratterizzate a seconda dell'anomalia morfologica dominante (Figura I) [10]. Il limite di riferimento inferiore per le forme tipiche è del 4% (5° percentile, IC al 95% 3.9-4). Per valori inferiori al range di riferimento si parla di teratozoospermia [10]. I campioni di liquido seminale umano contengono spermatozoi con differenti tipi di difetti morfologici, solitamente misti, i quali sono spesso determinati da alterazioni della spermatogenesi. Tali alterazioni morfologiche sono state associate ad un'aumentata frammentazione del DNA, alla presenza di cromatina immatura e ad una più elevata incidenza di alterazioni strutturali cromosomali [10]. Di seguito si raffigurano le principali alterazioni morfologiche:

Figura 1 [10]



3.4 Fase post-analitica

La fase post-analitica dello spermioγραμμα prevede la refertazione, la quale fa riferimento alle indicazioni riportate nel manuale WHO. Storicamente, nelle precedenti edizioni del manuale WHO venivano utilizzati come valori di riferimento dei parametri nemaspermici la media e la deviazione standard della popolazione di riferimento esaminata. Dall'edizione del 2010, tali valori sono stati sostituiti con i percentili, in quanto i parametri seminali non seguono una distribuzione normale. Questi valori (Tabella I) derivano dai risultati di numerosi studi prospettici trasversali sulla qualità del seme e sono stati ottenuti da una selezione diretta e retrospettiva di uomini fertili, definiti come soggetti le cui partner avevano concepito entro 12 mesi di rapporti sessuali regolari non protetti. Il 5° percentile è stato individuato come limite inferiore di riferimento, in base al quale un uomo può essere ancora potenzialmente fertile, anche se con possibilità ridotte, infatti, i valori corrispondenti devono essere considerati come valori minimi di potenzialità fecondante per vie naturali, non tanto di normalità. Tuttavia è importante ricordare che gli uomini inclusi negli studi di qualità e fertilità del seme costituiscono un gruppo selezionato di individui ed i loro parametri seminali potrebbero essere diversi da quelli della popolazione generale di soggetti sani. Inoltre, i parametri seminali che si trovano all'interno dell'intervallo di confidenza al 95% non rappresentano una garanzia di fertilità. D'altro canto, gli uomini le cui caratteristiche seminali si collocano al di sotto dei limiti inferiori riportati nella tabella non sono necessariamente infertili. Le caratteristiche seminali, che mostrano una notevole variabilità intra- ed interindividuale, non sono gli unici fattori a determinare la fertilità di una coppia. Pertanto, gli intervalli di riferimento forniscono solo elementi orientativi circa la condizione di fertilità di un uomo e la successiva individuazione della causa di un'eventuale anomalia dovrà avvalersi di un inquadramento clinico più ampio, che include la valutazione dello stato generale di salute del soggetto mediante accurata anamnesi ed esame obiettivo, l'esecuzione di indagini diagnostiche specifiche, tra cui quelle genetiche e la ricerca di cause ostruttive suscettibili di trattamento [10].

Tabella I [10]

Table 8.3 Distribution of semen examination results from men in couples starting a pregnancy within one year of unprotected sexual intercourse leading to a natural conception. From Campbell et al. (5); fifth percentile given with variability (95% confidence interval)

	N	Centiles									
		2.5th	5th	(95% CI)	10th	25th	50th	75th	90th	95th	97.5th
Semen volume (ml)	3586	1.0	1.4	(1.3-1.5)	1.8	2.3	3.0	4.2	5.5	6.2	6.9
Sperm concentration (10 ⁶ per ml)	3587	11	16	(15-18)	22	36	66	110	166	208	254
Total sperm number (10 ⁶ per ejaculate)	3584	29	39	(35-40)	58	108	210	363	561	701	865
Total motility (PR + NP, %)	3488	35	42	(40-43)	47	55	64	73	83	90	92
Progressive motility (PR, %)	3389	24	30	(29-31)	36	45	55	63	71	77	81
Non-progressive motility (NP, %)	3387	1	1	(1-1)	2	4	8	15	26	32	38
Immotile spermatozoa (IM, %)	2800	15	20	(19-20)	23	30	37	45	53	58	65
Vitality (%)	1337	45	54	(50-56)	60	69	78	88	95	97	98
Normal forms (%)	3335	3	4	(3.9-4.0)	5	8	14	23	32	39	45

4. INFERTILITÀ, OBESITÀ E SINDROME METABOLICA

Numerosi studi epidemiologici indicano come le abitudini alimentari errate e uno stile di vita sedentario, aumentati notevolmente negli ultimi cinquant'anni, siano fortemente associati al rischio di aumento del peso corporeo con conseguente sovrappeso/obesità. La prevalenza dell'obesità tra gli uomini in età riproduttiva appare, infatti, sostanzialmente triplicata negli ultimi decenni [31]. L'obesità è una patologia multifattoriale, definita tale quando il BMI è uguale o superiore a 30 kg/m^2 [31]. Strettamente correlata ad essa vi è la sindrome metabolica [32], definita dall'International Diabetes Federation (IDF) come la presenza di obesità associata ad almeno due tra: pressione arteriosa superiore o uguale a 135/85 mmHg (o trattamento antipertensivo già in atto), alterata glicemia a digiuno (superiore a 100 mg/dl), valore di trigliceridi superiore a 150 mg/dl, valore del colesterolo HDL inferiore a 40 mg/dl nell'uomo e 50 mg/dl nella donna.

Citando alcuni studi, è stato evidenziato come i soggetti con bassa conta spermatica presentino frequentemente una condizione di sindrome metabolica caratterizzata da insulino-resistenza, bassi livelli di HDL, alti livelli di LDL e ipertensione [33]. Dal punto di vista fisiopatologico, l'aumento del tessuto adiposo si associa ad una aumentata rappresentazione dell'aromatasi adipocitaria con conseguente aumento dei livelli di 17-beta-estradiolo (E2), il quale agisce con un meccanismo di feedback negativo sull'asse ipotalamo ipofisario con inibizione del rilascio di GnRH e delle gonadotropine ipofisarie [34]. In particolare, recenti studi hanno dimostrato una riduzione del volume seminale, della concentrazione degli spermatozoi e della motilità progressiva degli stessi all'aumentare dell'indice di massa corporea, già a partire dall'età adolescenziale [35]. Va sottolineata, quindi, l'importanza di prevenire la condizione di sovrappeso anche in età prepubere, per ridurre il rischio a carico della funzionalità gonadica secondario ad una pubertà precoce.

In generale, il diabete ha effetti sulla fertilità maschile agendo a diversi livelli: pre-testicolare, testicolare e post-testicolare. Sono state inoltre evidenziate conseguenze cliniche differenti a seconda della presenza di diabete di tipo 1 o 2 [36]. Di maggior importanza ai fini della salute riproduttiva è il tipo 1, in quanto circa il 90% dei soggetti affetti ha un'età inferiore ai 30 anni. Uno studio di La Vignera et al. ha dimostrato che i soggetti con diabete mellito di tipo 1

presentavano una percentuale inferiore di spermatozoi con motilità progressiva, una compromissione della funzionalità mitocondriale e una disfunzione post-eiaculatoria epididimaria [37]. Questi effetti sono espressione dei livelli glicemici elevati, ma potrebbero essere correlati anche all'utilizzo di farmaci ipoglicemizzanti. Tuttavia, gli studi condotti hanno preso in considerazione solo Metformina e Liraglutide, agonista del glucagon-like peptide 1 e hanno prodotto risultati incompleti e contrastanti [38,39].

Considerando la tipologia di danno gonadico, possono essere intrapresi diversi percorsi terapeutici.

In particolare, il danno indotto dal diabete è più frequentemente di tipo testicolare e sembrerebbe essere determinato dall'elevata concentrazione di specie reattive dell'ossigeno, per cui un trattamento specifico in tal senso potrebbe giovare sia ai parametri seminali sia a quelli metabolici. La terapia di elezione in questo caso potrebbe essere quella a base di antiossidanti e rientrerebbe nel capitolo della nutraceutica. Tale argomento è oggetto di numerosi dibattiti a fronte di studi dai risultati fortemente contrastanti. Tra questi l'antiossidante maggiormente utilizzato è l'inositolo, o mioinositolo nella sua forma biologicamente attiva [40], un componente del complesso vitaminico B coinvolto nella regolazione dell'osmolarità del plasma seminale, nell'espressione di proteine essenziali per lo sviluppo embriogenetico e nella motilità degli spermatozoi.

Inoltre, nei soggetti infertili diabetici, si riscontra frequentemente un danno post-testicolare, in particolare a carico delle vescicole seminali, probabilmente determinato da complicanze su base neuropatica, le quali a propria volta favorirebbero le cosiddette male accessory gland infections (MAGI). Queste ultime trovano particolare giovamento dal trattamento a base di antiinfiammatori ed antibiotici [41]. Da ciò si evince l'importanza di valutare la fertilità in questi soggetti con patologie metaboliche incentivando il maggior controllo possibile del compenso gluco-metabolico.

La condizione di dislipidemia, ovvero di alterazione nella quantità di trigliceridi e colesterolo, determina un importante stress ossidativo, noto fattore di importanza tossicologica per la qualità dei gameti maschili [42]. Non esistono, però, studi significativi circa l'influenza dei farmaci ipolipemizzanti sulla fertilità maschile. Un recente studio pilota [43] ha dimostrato come l'Atorvastatina incida in

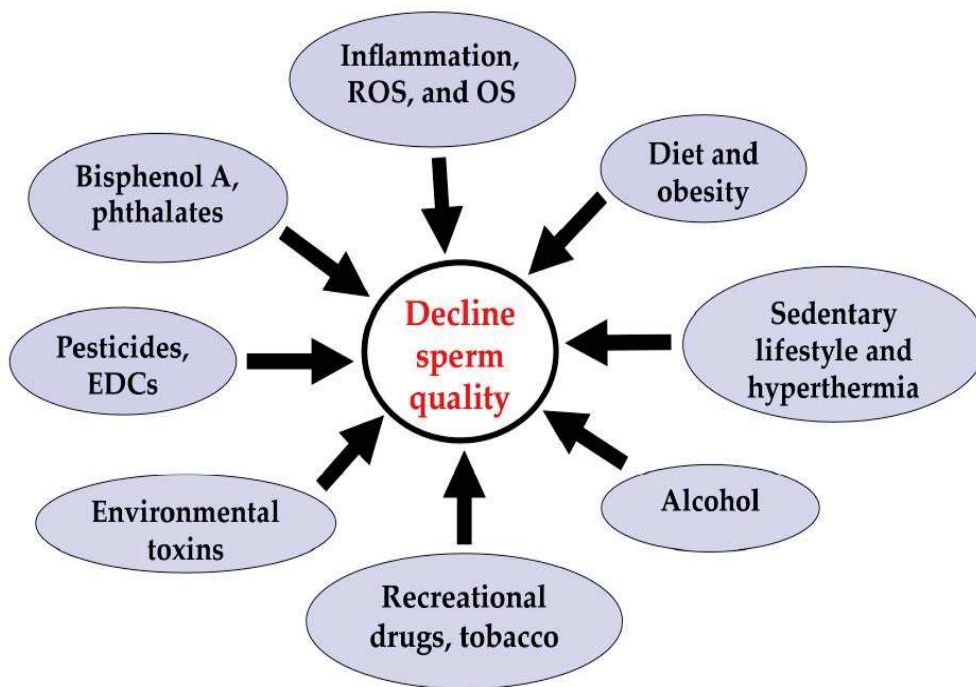
maniera negativa sui parametri seminali, portando ad una diminuzione del numero e della vitalità degli spermatozoi, con un lieve aumento, però, della motilità totale.

Lo stesso concetto è applicabile ai farmaci antipertensivi per cui esistono studi contrastanti, condotti solo su modelli murini, in cui i calcio antagonisti quali Verapamil e Nimodipina sembrano peggiorare i parametri seminali, dove invece gli ACE inibitori hanno dimostrato effetti positivi sugli stessi [44].

5. PARAMETRI SEMINALI, ORMONALI E STILI DI VITA

È noto che le abitudini alimentari e lo stile di vita influenzano la qualità del seme rappresentando importanti fattori modificabili nella salute riproduttiva maschile (figura 2).

Figura 2



5.1 Fumo di sigaretta

Il fumo rappresenta uno dei principali problemi di sanità pubblica, con una prevalenza stimata di fumatori nel mondo pari a circa un miliardo [45]. Il fumo prodotto dalla combustione della sigaretta è un aerosol complesso costituito da una fase vapore e da una fase particolata i cui costituenti principali sono: nicotina, idrocarburi policiclici aromatici e nitrosammine tabacco specifiche. Il fumo di sigaretta contiene due differenti gruppi di radicali liberi: a lunga emivita nella fase particolata, in particolare il complesso chinone-idrochinone, e ad emivita breve nella fase vapore, ovvero piccoli radicali alchilici e alcossilici dotati di maggiore reattività. Il primo è in grado di ridurre l'ossigeno molecolare a radicale superossido, quindi a perossido di idrogeno e infine a radicale idrossilico.

Il plasma seminale protegge gli spermatozoi dai livelli patologici di ROS attraverso enzimi quali superossido dismutasi e glutathione perossidasi e sostanze

antiossidanti quali alfa-tocoferolo e acido ascorbico [46]. Quando questi non bilanciano la produzione di ROS, gli spermatozoi divengono oggetto di alterazioni alla membrana plasmatica come conseguenza della perossidazione lipidica, ossidazione delle proteine, alterazioni della funzione mitocondriale e frammentazione del DNA spermatico, con conseguenti alterazioni quantitative e qualitative a carico degli stessi [47]. Inoltre l'insufficiente apporto di ossigeno causato dal fumo danneggia la funzione testicolare determinando una minor funzionalità delle cellule di Sertoli da un lato, influenzando negativamente la spermatogenesi e, a livello microangiopatico dall'altro, concorrendo alla patogenesi della disfunzione erettile [48]. Oltre a ciò, il fumo di sigaretta si è dimostrato in grado di determinare cambiamenti epigenetici, ovvero alterazioni dell'espressione genica senza modificazioni nella sequenza di DNA, quali metilazioni e rimodellamento della cromatina. Il parametro seminale che maggiormente risulta compromesso sembra essere la motilità, in particolare la motilità totale correla negativamente con la concentrazione seminale di (trans-3'-idrossicotinina (3HC), metabolita della cotinina, a propria volta metabolita della nicotina [46]). L'alterazione della motilità è correlata a diversi meccanismi fisiopatologici. In particolare, si hanno alterazioni nel numero e nel posizionamento dei microtubuli che compongono l'assonema, ovvero l'organo strutturale di base delle ciglia e dei flagelli, e alterazioni a carico dell'enzima creatinchinasi, che interviene nel catalizzare la reazione che porta alla produzione di fosfocreatina, consentendo la liberazione dell'energia necessaria al movimento. Nonostante ciò, in letteratura esistono vari dati contrastanti relativi all'effetto del fumo di sigaretta sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e quindi sulla compromissione della fertilità maschile [47,48]. Tale discordanza sembra essere dovuta alla presenza di vari fattori confondenti. Infatti è molto probabile che i forti fumatori presentino in associazione uno stile di vita più lesivo per la salute andrologica.

5.2 Alcolici

L'abuso di alcol negli uomini è causa di atrofia testicolare, a cui consegue una riduzione della produzione di testosterone associata ad impotenza, infertilità e compromissione dei caratteri sessuali secondari maschili [49]. In particolare, l'alcol sembra in grado di interferire con i meccanismi di feedback dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi con compromissione della produzione e della secrezione

di FSH ed LH, causando una conseguente alterazione funzionale delle cellule di Leydig e del Sertoli, anche mediante meccanismi di danno proteico diretto [50]. Pertanto la riduzione dei livelli di testosterone, FSH ed LH associati al consumo di alcol porta ad una alterata produzione di spermatozoi e ne ostacola anche il normale sviluppo morfologico e maturativo. Di conseguenza, il consumo di alcol altera fortemente i parametri seminali, in particolare si nota un incremento della percentuale di spermatozoi morfologicamente atipici, una riduzione del volume del liquido seminale e un aumento del numero di leucociti, dato ricondotto alla maggior frequenza di uretriti e prostatiti negli alcolisti [51]. Nonostante ciò, non sono ancora ben stabiliti effetti dose-dipendenti dell'alcol sulla spermatogenesi umana, in quanto questi dipendono anche da eventuali carenze nutrizionali associate all'etilismo e dal background genetico del paziente. Nell'uomo si tende ad accettare un consumo giornaliero di 2-3 unità alcoliche (un'unità alcolica corrisponde a 12 grammi di etanolo puro, ovvero un bicchiere di vino da 125 ml).

5.3 Caffaina

La caffeina presenta un ruolo controverso nella fertilità maschile. Da un lato il suo consumo sembra correlare con una diminuzione del numero totale di spermatozoi e con un aumentato numero di atipie [52], dall'altro, invece, sembra favorire il metabolismo energetico delle cellule del Sertoli [53]. Numerose evidenze infatti, dimostrano come la caffeina contribuisca a migliorare la motilità degli spermatozoi. In particolare nello studio di Jurewicz et al. la motilità totale risulta del 4.41% superiore in coloro che assumono caffè quotidianamente rispetto a chi non ne consuma affatto, a fronte, però, di un aumentato rischio di aneuploidie nelle cellule germinali [54]. Nello studio di Parazzini et al. il rischio di alterazioni spermatiche risulta direttamente proporzionale al numero di tazze di caffè consumate quotidianamente [55]. Infine, lo studio di Jansen et al. [52], non ha evidenziato alcuna differenza circa il volume dell'eiaculato e la motilità degli spermatozoi, ma ha messo in evidenza una riduzione del numero totale degli stessi nei consumatori abituali di caffè. In conclusione il rapporto tra caffeina e spermatogenesi rimane poco chiaro e necessita di ulteriori studi.

5.4 Altre sostanze d'abuso

Importante è anche considerare l'effetto della cannabis e della cocaina sul sistema riproduttivo maschile, in quanto sostanze largamente utilizzate. In particolare, vari studi hanno riportato come la cannabis rivesta un ruolo determinante nell'interrompere l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, nell'alterare la spermatogenesi e le capacità funzionali degli spermatozoi stessi, come la motilità e la reazione acrosomiale. I recettori dei cannabinoidi sono strettamente correlati all'attività dei neuroni secernenti GnRH nell'ipotalamo e il rilascio di quest'ultimo è inibito dall'opioide endogeno anandamide (AEA), ma anche dal tetraidrocannabinolo (THC) attraverso l'interazione con GABA e altri sistemi [56]. Si ritiene quindi che un'esposizione regolare alla cannabis determini una riduzione dei livelli di FSH, LH e del numero di spermatozoi prodotti [56]. Le evidenze cliniche, tuttavia, sono molto più limitate per quanto riguarda le anomalie morfologiche degli stessi.

La cocaina, è un alcaloide il cui effetto principale è quello di aumentare la disponibilità sinaptica di dopamina e serotonina, agendo a livello delle terminazioni corticomesolimbiche e nigro-striatali, bloccando la loro ricaptazione. A livello periferico, gli effetti farmacologici sono quelli tipici dell'attivazione simpatica, di conseguenza l'assunzione di cocaina determina un incremento della libido come effetto a breve termine, ma, nel consumatore cronico, si assiste ad un calo della stessa, disfunzione erettile e iperprolattinemia, la quale determina una riduzione dei livelli di testosterone [57].

5.5 Inquinanti ambientali

Anche l'inquinamento chimico-fisico possiede effetti negativi sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e sulla spermatogenesi. Tra le sostanze più studiate figura il dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (), uno dei più noti insetticidi, il quale agisce mimando l'azione degli estrogeni e inducendo una femminilizzazione nello sviluppo del feto di sesso maschile [58]. Inoltre, il DDE, principale prodotto di degradazione del DDT, inibisce l'azione degli androgeni legandosi ai loro recettori a livello delle cellule bersaglio [58]. L'impiego degli insetticidi organoclorurati è stato vietato in Europa e negli USA da più di vent'anni, rimangono tuttavia inquinanti di notevole rilevanza in quanto persistenti per decenni nell'ambiente e nella catena alimentare. Altre sostanze tossiche largamente studiate sono i policlorobifenili (PCB), una classe di composti organici classificati

anch'essi come inquinanti persistenti. Il loro ampio uso commerciale per la produzione di vernici, pesticidi, sigillanti, condensatori etc., deriva proprio dalla elevata stabilità chimica, la quale è responsabile della loro persistenza nell'ambiente. In particolare è stato ipotizzato che basse dosi di PCB determinino un'alterazione della spermatogenesi attraverso una maggior espressione del gene p53 che porta all'arresto del ciclo cellulare, mentre l'esposizione ad alte dosi degli stessi induce l'attivazione della cascata delle caspasi, determinando l'apoptosi delle cellule germinali [59].

Anche la temperatura è considerata un potenziale tossico ambientale in grado di indurre patologie di vari organi e apparati. Attraverso uno studio epidemiologico condotto [60] su una popolazione di operai dell'industria della ceramica, professionalmente esposti a sorgenti di calore alla temperatura media di 400°C, con punte di 800°C, ha evidenziato una correlazione tra l'esposizione ad alte temperature e la velocità di progressione spermatica. Ulteriore fattore di rischio sono le radiazioni ionizzanti, le quali hanno effetti tossici dose-dipendenti (non vi sono dati sicuri su quale sia la soglia) che alterano la forma e il numero dei cromosomi delle cellule germinali determinando infertilità, aumento dell'abortività e malformazioni fetali [61]. Infine sono sempre più oggetto di studio gli effetti tossici derivanti dai campi elettromagnetici a seguito della diffusione sempre più ampia dei dispositivi elettronici. Ad oggi sembra che l'effetto negativo degli stessi sulla fertilità maschile sia maggiormente imputabile a fattori di stress associati al loro impiego [62].

5.6 Alimentazione e attività fisica

Negli ultimi anni è stato dimostrato come un corretto apporto calorico, la riduzione del consumo di carni rosse e di alimenti ultra-processati e l'aumento del consumo di frutta, verdura, legumi, cereali e la sostituzione dei grassi saturi con grassi polinsaturi, contribuiscano a garantire la salute sessuale, riproduttiva e globale dell'organismo [63]. In particolare è stato dimostrato come lo status nutrizionale paterno al momento del concepimento sia importante per garantire un corretto sviluppo fetale e sono stati condotti diversi studi trasversali di associazione tra i fattori determinanti la fertilità maschile e i diversi gruppi alimentari [63, 64]. Questi hanno dimostrato come i grassi saturi, riscontrabili nella maggior parte dei cibi di origine animale e gli oli vegetali idrogenati,

abbiano un ruolo determinante nell'incidenza di patologie coronariche, neoplasie, obesità, diabete e infertilità. In particolare è stata riportata una correlazione negativa con la concentrazione spermatica, il volume di eiaculato totale, la motilità e la morfologia degli spermatozoi [64]. Tale risultato è stato attribuito alla capacità di tali molecole di indurre uno stato infiammatorio e aumentare la concentrazione di colesterolo nelle membrane degli spermatozoi, danneggiando la loro struttura e compromettendo, quindi, la qualità del gamete. Inoltre, i mitocondri vedrebbero ridotta la capacità di ossidare tutti i lipidi che vi si accumulano, portando ad un eccesso di produzione di radicali liberi con conseguente impattano sull'integrità del DNA [63]. Dall'altro lato, gli acidi grassi polinsaturi, in particolare gli omega 3, sembrerebbero avere un effetto positivo sui parametri seminali. Diversi studi hanno dimostrato come il consumo di datteri, castagne e frutta secca quale noci e nocciole abbiano un forte impatto positivo sulla fertilità maschile [63,64]. Infatti, l'omega-3 acido alfa-linoleico (ALA) presente in essi sembrerebbe cruciale per alcune funzioni cellulari come la fagocitosi dei residui cellulari e la composizione delle membrane cellulari spermatiche [64].

Per quanto riguarda il consumo di carne, la maggior parte della produzione nei paesi occidentali deriva dagli allevamenti intensivi e come tale presenterebbe elevate concentrazioni non solo di antibiotici, ma anche di xenoestrogeni e steroidi che, comportandosi come estrogeni, impatterebbero sulla fertilità maschile alterando la produzione ormonale e la qualità del liquido seminale [64]. Ulteriori studi hanno valutato anche la correlazione tra i prodotti lattiero-caseari e la fertilità maschile, osservando come il consumo di latticini sia inversamente associato alla motilità progressiva e alla normale morfologia spermatica [63,64]. Tale risultato trova una spiegazione non solo nel contenuto di xenoestrogeni, come per la carne, ma anche nella grande quantità di inquinanti ambientali che impattano negativamente la qualità del liquido seminale. Il consumo di pesce, invece, è stato associato sia ad una maggior concentrazione seminale di spermatozoi sia ad un maggior numero di spermatozoi morfologicamente normali [65]. Tale beneficio deriverebbe dal contenuto dello stesso di acidi grassi polinsaturi quali acido docosaesaenoico (DHA) ed acido eicosapentaenoico (EPA) che contribuirebbero alla composizione delle membrane cellulari spermatiche [65]. Nonostante ciò, occorre sottolineare come i prodotti ittici possano avere un

impatto negativo sulla fertilità maschile a causa delle tossine contenute in essi. In particolare, uno studio svedese ha dimostrato come le organoclorine, pesticidi largamente presenti in pesci e molluschi, e i metalli pesanti abbiano un impatto negativo sulla spermatogenesi, sulla motilità spermatica totale e sull'integrità cromatinica [65]. Di conseguenza, la relazione tra fertilità maschile e il consumo di pesce non è stata univocamente definita dai precedenti studi.

Il metabolismo glucidico è fondamentale per la spermatogenesi, in particolare il glucosio penetra negli spermatozoi mediante diffusione facilitata attraverso l'espressione dei trasportatori GLUT espressi sulle membrane cellulari. Si ritiene che un eccessivo introito di glucosio a causa di un'alimentazione ricca di zuccheri semplici e cibi ad alto indice glicemico impatti sulla qualità seminale influenzando la motilità e la maturazione spermatica [63,64]. Inoltre, il consumo di questa categoria di alimenti è fortemente associato ad una maggior incidenza di obesità, diabete di tipo 2 e sindrome metabolica, condizioni caratterizzate da insulino resistenza, la quale determina un aumento dello stress ossidativo che influenza la funzionalità gonadica [63,64].

Frutta e verdura rappresentano la principale fonte naturale di antiossidanti, infatti in una dieta sana e bilanciata ne è raccomandato il consumo di cinque porzioni al giorno. Si tratta di cibi a basso contenuto calorico, ricchi di acqua, vitamine, minerali, fibre e sostanze fitochimiche quali polifenoli, oligosaccaridi e acidi organici. Questi ultimi sono composti di origine esclusivamente vegetale dotati di attività antiossidante e formati da acidi grassi polinsaturi che contribuiscono all'equilibrio della flora batterica intestinale. In particolare, il loro consumo sembrerebbe influenzare positivamente la fertilità maschile ripristinando i livelli sierici di testosterone, riducendo il danno ossidativo testicolare e dei tubuli seminiferi e migliorando la qualità del liquido seminale agendo sulla concentrazione spermatica, sulla motilità e sulla morfologia [63,64]. Oltre a ciò, le vitamine e i folati, principalmente presenti nelle crucifere, hanno un effetto protettivo sul DNA riducendo la concentrazione di omocisteina, la quale agirebbe come forte fattore ossidativo, mediante la sua metilazione a metionina [63]. I folati, infatti, hanno un ruolo centrale nella spermatogenesi, garantendo un'adeguata quota di spermatozoi normali e limitando la percentuale di forme anomale [63,64]. Inoltre, frutta, verdura, legumi e cereali integrali rappresentano la principale fonte di fibre, le quali agirebbero riducendo i livelli di estrogeni

plasmatici e garantendo quindi un corretto funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi [63,64]. Tra i legumi, la soia possiede sicuramente un ruolo molto controverso. Negli ultimi decenni gli alimenti a base di soia sono diventati sempre più popolari grazie ai loro benefici nutrizionali, all'elevato contenuto proteico e al crescente interesse verso un'alimentazione a base vegetale. La soia contiene isoflavoni, molecole con composizione chimica molto simile agli estrogeni che consente loro di legarsi ad entrambi i recettori estrogenici, ER- α ed ER- β , per tale motivo vengono chiamati anche fitoestrogeni. Questi differiscono dagli estrogeni in quanto legano preferenzialmente il recettore ER- β [66]. Tale differenza è molto importante perché i recettori hanno una diversa distribuzione tissutale e, quando attivati, possono esercitare effetti molto diversi tra loro, talvolta opposti. Per tale motivo questi composti sono stati definiti come modulatori selettivi dei recettori degli estrogeni. Negli ultimi 30 anni l'effetto del consumo di soia e, in particolare, di isoflavoni sulla fertilità maschile è stato ampiamente studiato in relazione all'effetto femminilizzante degli estrogeni, quindi sui livelli di testosterone totale e SHBG. In risposta ai diversi lavori dai risultati discordanti è stata eseguita una metanalisi [66] comprendente 41 studi pubblicati dal 2010 al 2020, la quale non ha tuttavia rilevato alcuna correlazione statisticamente significativa tra il consumo di proteine della soia e la concentrazione plasmatica di testosterone, SHBG, estrogeni o altri parametri correlati ad una maggior femminilizzazione.

Tra i gruppi alimentari sta acquisendo sempre più importanza quello dei cibi ultra processati (UPF), il cui consumo è aumentato esponenzialmente nell'ultimo decennio. Diversi studi hanno evidenziato una correlazione tra il consumo di questi e diverse patologie croniche quali obesità, diabete, ipertensione e malattie cardiovascolari, mentre ancora poco studiato è l'effetto sulla fertilità maschile. Un recente studio del 2024 ha dimostrato come l'elevato consumo di UPF sia correlato ad un minor numero di spermatozoi e ad una percentuale di motilità totale inferiore, valori che rientravano nel range di normalità sostituendo il 10% dell'energia derivante dai cibi ultra-processati con cibi non trasformati [67].

In relazione a quanto appena esposto, si ritiene che la dieta mediterranea sia associata positivamente allo stato di fertilità maschile, grazie al suo basso contenuto di cibi ultra-processati e di acidi grassi saturi, ai livelli adeguati di acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi come omega-3 e omega-6 e al suo eccellente contenuto di antiossidanti, minerali e vitamine [68]. Infatti, il modello alimentare

mediterraneo, basato su varietà e stagionalità, favorisce il consumo prevalente di alimenti di origine vegetale ed è caratterizzato da un elevato consumo di frutta e verdura, cereali, specialmente integrali, legumi, olio d'oliva e frutta secca; da un moderato consumo di pesce, carne bianca, uova, latte e derivati e, infine, da un consumo limitato di carne rossa, carne processata e dolci. In particolare, i carboidrati costituiscono il 55% dell'introito calorico, di cui solo una minima parte è rappresentata dagli zuccheri semplici, i quali derivano principalmente dalla frutta. I grassi sono moderatamente presenti, rappresentando il 30% delle calorie totali, ed hanno un'abbondante componente monoinsatura, essendo apportati principalmente dall'olio di oliva. Infine le proteine sono quelle meno presenti, la loro quota arriva al 15% delle calorie totali e sono soprattutto di origine vegetale. Le abitudini alimentari [69] hanno quindi un ruolo sempre più determinante per la salute sessuale e riproduttiva e rappresentano un fattore modificabile attraverso specifici interventi educativi.

Per quanto riguarda l'attività fisica è stato ampiamente dimostrato come la qualità seminale e i parametri ormonali migliorino in coloro che praticano attività fisica per 60 minuti per almeno tre giorni a settimana [70]. In particolare, si sono evidenziate una maggior reattività ipofisaria, una miglior funzione delle cellule di Leydig, una maggior produzione di testosterone e un miglior flusso sanguigno testicolare. È importante sottolineare che non solo la sedentarietà rappresenta un fattore di rischio per la salute riproduttiva, ma anche l'eccesso di attività fisica, infatti nella stessa analisi condotta da Jozkow [70], è stata rilevata una diminuzione di FSH, LH e testosterone totale nei soggetti che praticavano quotidianamente attività fisica particolarmente intensa. Infatti, questa agisce non solo sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi, ma anche sull'aumento della temperatura scrotale, danneggiando il DNA e favorendo il processo di glicosilazione ossidativa [70]. Di conseguenza si sottolinea l'importanza di valutare la tipologia, la durata e l'intensità dell'attività fisica praticata.

STUDIO SPERIMENTALE

6. Scopo dello studio

Tale studio osservazionale prospettico si prefigge di stabilire una possibile associazione tra l'aderenza alla dieta mediterranea e consumo di cibi ultra-processati con i principali parametri seminali, i parametri antropometrici e l'assetto metabolico e ormonale. In particolare, tra i parametri seminali, sono stati valutati il volume totale dell'eiaculato in ml, il pH, la concentrazione di spermatozoi (numero/ml), il numero totale di spermatozoi (concentrazione di spermatozoi moltiplicata per il volume totale dell'eiaculato), la motilità progressiva (in %), l'immobilità (in %), la vitalità (in %) e la morfologia (% forme tipiche e atipiche). Relativamente l'assetto metabolico sono stati valutati glicemia, colesterolo totale, trigliceridi e colesterolo HDL. Tra i parametri ormonali sono stati studiati: testosterone totale, testosterone libero calcolato, testosterone biodisponibile, FSH, LH e SHBG. L'obiettivo è quello di delineare una correlazione tra lo stile di vita, in particolare le abitudini alimentari, il consumo di alcol e il fumo di sigaretta e la salute riproduttiva e metabolica dell'individuo, specchio della salute globale.

7. Materiali e metodi

7.1 Campione

Sono stati reclutati prospetticamente soggetti di sesso maschile di età compresa tra i 18 e i 60 anni afferenti all'UOC di Andrologia e Medicina della Riproduzione, Azienda Ospedale-Università di Padova per la valutazione del liquido seminale nel periodo compreso tra settembre 2022 e aprile 2024, previa sottoscrizione del consenso informato (Studio AOP3205). I criteri di esclusione prevedevano:

- terapia con farmaci che potessero influenzare la funzione sessuale e/o riproduttiva;
- aderenza ad un intervento nutrizionale in corso o effettuato nei precedenti 6 mesi;
- diagnosi di insufficienza epatica;
- diagnosi di malattie infiammatorie croniche intestinali;
- diagnosi di diabete mellito di tipo 1 (T1DM) e/o di tipo 2 (T2DM);
- diagnosi di e/o concomitante trattamento per endocrinopatie;
- diagnosi di e/o trattamento per neuropatie;
- diagnosi di insufficienza renale cronica con tasso di filtrazione glomerulare stimata < 60 ml/min;
- presenza di angina instabile o aritmie cardiache e/o in trattamento per tali patologie;
- storia recente di eventi cardiovascolari maggiori,
- diagnosi di disturbi del comportamento alimentare o altri disturbi psichiatrici conclamati;
- presenza di infiammazioni/infezioni a livello del tratto genito-urinario e/o in trattamento per tali patologie;
- storia di interventi chirurgici a livello del tratto genito-urinario;
- storia di episodi febbrili con temperatura $\geq 38^{\circ}\text{C}$ per almeno due giorni nei precedenti 3 mesi;
- pregresse neoplasie;
- accertate cause genetiche di infertilità;
- inosservanza del periodo di astinenza sessuale richiesto per l'analisi seminale.

7.2 Misure

Tutti i soggetti arruolati nello studio sono stati sottoposti a ad anamnesi generale, valutazione antropometrica (peso corporeo e altezza) e ad un'intervista comprendente due questionari dietetici. Eventuali ulteriori esami necessari all'inquadramento diagnostico quali ecografia testicolare, spermocoltura ed esami ormonali gonadici, sono stati richiesti come da normale pratica clinica indipendentemente dallo studio. I parametri ormonali e metabolici sono stati ottenuti dai pazienti a digiuno mediante prelievi ematici mattutini e analizzati presso il laboratorio dell'Azienda Ospedale- Università di Padova. L'indice di massa corporea (IMC) è stato calcolato come rapporto tra il peso corporeo in kg e il quadrato dell'altezza in metri. L'analisi del liquido seminale come da linee guida del WHO [10] è stato eseguito su campioni ottenuti mediante masturbazione in contenitori sterili, dopo 2-7 giorni di astinenza sessuale, previa liquefazione a 37°C per 30 minuti.

7.2.1 MEDAS

L'aderenza al modello mediterraneo è stata valutata attraverso il Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS) [71], validato rispetto ai 136 item del questionario sulla frequenza di consumo degli alimenti (FFQ) [72]. Il MEDAS consta di 14 domande riguardanti i principali gruppi di alimenti consumati come parte della dieta mediterranea e il punteggio finale restituisce il valore di aderenza al modello mediterraneo, distinti in: ≤ 5 bassa aderenza, 6–9 aderenza media, ≥ 10 aderenza elevata. Dei 14 quesiti, 12 sono relativi alla frequenza di consumo di alimenti e 2 riguardano le abitudini alimentari quali l'utilizzo dell'olio d'oliva come principale fonte di grasso in cucina e il maggior consumo di carne bianca rispetto a quella rossa. In particolare, viene valutato il consumo giornaliero di frutta e verdura, carne rossa, hamburger o insaccati, burro, margarina o panna e il consumo settimanale di vino, legumi, pesce/frutti di mare e prodotti industriali dolci. La tabella II di seguito illustra il metodo utilizzato per l'attribuzione dei punteggi.

Tabella II [68]

Utilizza olio extravergine di oliva come principale condimento in cucina?	SI = 1	NO = 1	
Quanto olio utilizza (compreso l'olio usato per friggere, insalate, etc.)	0-1 = 0	2-3 = 0,5	$\geq 4 = 1$
Quante porzioni di verdura consuma al giorno? (1 porzione: 200 g)	0 = 0	1 = 0,5	$\geq 2 = 1$
Quanti frutti (compresi i succhi di frutta naturali) consuma al giorno?	0-1 = 0	2 = 0,5	$\geq 3 = 1$
Quante porzioni di carne rossa, hamburger, o di prodotti a base di carne (prosciutto, salsicce, etc.), consuma al giorno? (1 porzione: 100-150 g)	0 = 1	$< 1 = 1$	$\geq 1 = 0$
Quante porzioni di burro, margarina o grassi animali consuma al giorno? (1 porzione: 12 g)	0 = 1	$< 1 = 1$	$\geq 1 = 0$
Quante bevande zuccherate o gassate bevi al giorno?	0 = 1	$< 1 = 1$	$\geq 1 = 0$
Quanto vino bevi alla settimana?	0-3 = 0	4-6 = 0,5	$\geq 7 = 1$
Quante porzioni di legumi consuma a settimana? (1 porzione: 150 g)	0-1 = 0	2 = 0,5	$\geq 3 = 1$
Quante porzioni di pesce o frutti di mare consuma a settimana? (1 porzione 100-150 g di pesce o 4-5 unità o 200 g di frutti di mare)	0-1 = 0	2 = 0,5	$\geq 3 = 1$
Quante volte alla settimana consuma dolci o pasticcini commerciali (non fatti in casa), come torte, biscotti, biscotti, o crema pasticcera?	0-1 = 1	2 = 0,5	$\geq 3 = 0$
Quante porzioni di frutta secca (noci, arachidi), consuma a settimana? (1 porzione 30 g)	0-1 = 0	2 = 0,5	$\geq 3 = 1$
Preferenzialmente consuma carni bianche quali pollo, tacchino o coniglio al posto delle carni rosse quali vitello, maiale, hamburger o salsicce?	SI = 1	NO = 0	
Quante volte alla settimana consuma verdure, pasta, riso o altri piatti conditi con soffritto (salsa fatta con pomodoro e cipolla, porro, o aglio e cotto con olio d'oliva)?	0 = 0	1 = 0,5	$\geq 2 = 1$

7.2.2 24-hours Food Recall Questionnaire

Per valutare l'introito di cibi ultra-processati abbiamo utilizzato un questionario denominato "24 hours Food Recall Questionnaire" [73], ovvero una metodica di valutazione dell'utilizzo e degli introiti giornalieri di alimenti ultra-processati secondo la classificazione NOVA [74]. Questa prevede la suddivisione degli alimenti in quattro principali gruppi:

- Non processati o minimamente processati: si tratta di cibi naturali che comprendono le porzioni commestibili delle piante (come frutta, foglie, steli, semi e radici) o derivate da animali (come muscoli, frattaglie, uova, latte), ma anche funghi, alghe e acqua. Gli alimenti minimamente trasformati sono alimenti naturali alterati mediante metodi che includono la rimozione di parti non commestibili o indesiderate e sottoposti a processi quali essiccazione, frantumazione, macinazione, polverizzazione, frazionamento, filtraggio, tostatura, bollitura, fermentazione analcolica, pastorizzazione, refrigerazione, congelamento, invasatura e confezionamento sottovuoto. Le differenze tra gli alimenti non trasformati e minimamente processati non sono particolarmente significative;
- Ingredienti culinari processati: si tratta di ingredienti utilizzati per elaborare cibi del primo gruppo. Questi includono oli, burro, strutto, zucchero, sale, ma anche additivi come antiossidanti, umettanti, addensanti, antibatterici e stabilizzanti. Si tratta di sostanze naturali ottenute mediante processi come pressatura, raffinazione, macinazione ed essiccazione. Sono utilizzati in combinazione ad altri alimenti per rendere i pasti più appetibili e piacevoli, di conseguenza sarebbe fuorviante valutare il loro significato nutrizionale singolarmente;
- Cibi processati: si tratta di alimenti relativamente semplici ottenuti aggiungendo ingredienti del secondo gruppo ad alimenti del primo. La maggior parte di questi cibi ha due o tre ingredienti e le lavorazioni includono cottura, conservazione e fermentazione non alcolica. Tra questi figurano le verdure in scatola e i legumi conservati in salamoia, la frutta sciroppata, alcuni tipi di alimenti animali trasformati come il prosciutto, la pancetta, il pesce affumicato e conservato sott'olio, la maggior parte del pane appena sfornato e i formaggi semplici a cui viene aggiunto il sale. In questo gruppo rientrano anche le bevande alcoliche come vino e birra.
- Cibi ultra-processati: si tratta di alimenti composti solitamente da cinque o più ingredienti ottenuti mediante una serie di tecniche e processi industriali. Alcune sostanze si trovano solo in questa categoria, ovvero quelle direttamente estratte da altri alimenti, come caseina, lattosio, siero di latte, glutine e quelle derivate dall'ulteriore trasformazione di costituenti alimentari, come oli idrogenati o esterificati, proteine idrolizzate, proteine isolate dalla soia, maltodestrina, zucchero invertito e sciroppo di mais ad alto contenuto di fruttosio. Le classi di

additivi che si trovano solo nei prodotti ultra-processati includono coloranti, stabilizzanti del colore, aromi, esaltatori di sapidità, edulcoranti e coadiuvanti tecnologici quali processi di carbonatazione, sostanze anti-agglomeranti, gelificanti ed emulsionanti. Tra questi prodotti di uso comune troviamo piatti precotti o pronti da scaldare, come tortellini e lasagne, bevande analcoliche gassate, snack confezionati, caramelle, cioccolata, gelato, pane e focacce confezionati prodotti in serie, biscotti e pasticcini, torte e preparati per dolci, margarina, creme spalmabili, yogurt ai cereali e alla frutta, cereali per la prima colazione, hamburger, la maggior parte dei formaggi, “bastoncini” di pollame e di pesce, prodotti a base di carne ricostituiti, zuppe pronte, alimenti per neonati, etc. In questo gruppo rientrano anche i superalcolici.

La valutazione dell’apporto di cibi ultra-processati mediante software ‘Metadieta’ prevedeva il calcolo delle calorie giornaliere assunte da ciascun paziente, ulteriormente suddivise tra le varie classi di alimenti secondo la classificazione NOVA. È stata infine ottenuta la percentuale di calorie derivanti da alimenti non processati o minimamente processati, mediamente processati e ultra-processati assunti rispetto all’introito calorico giornaliero complessivo.

7.3 Informazioni al paziente e consenso

I pazienti, dopo adeguata informazione, hanno espresso il loro consenso alla partecipazione, al momento dell’arruolamento nello studio. I dati sono stati trattati in ottemperanza al D. Lgs 196/2003 e successive autorizzazioni e al Regolamento Europeo 679/2016. I dati sono stati raccolti su supporto informatico Excel con valida licenza e coperto da autorizzazione, in forma pseudoanonimizzata ed i nominativi dei pazienti sono stati registrati solo per lettere iniziali. A tali dati informatizzati hanno avuto accesso solo gli investigatori dello studio ed è stata garantita la riservatezza di qualsiasi informazione riguardante l’oggetto della sperimentazione, per garantire la privacy di tutti i pazienti inclusi nello studio.

7.4 Raccolta dati e analisi statistica

La durata dello studio è stata di 24 mesi, di cui 21 di raccolta dati e 3 di elaborazione degli stessi. Tutte le analisi statistiche sono state condotte con software SPSS versione 25.0 (SPSS Inc, Chicaco, USA). I dati sono stati raccolti su supporto informatico in forma pseudoanonimizzata e le variabili analizzate sono state computate come variabili categoriche o continue. Le differenze tra variabili continue sono state analizzate con ANOVA. Le differenze tra le variabili discrete sono state analizzate con il test Chi-quadrato o il test di Fisher (se il conteggio atteso era <5). Per descrivere le correlazioni tra le variabili sono stati utilizzati l'indice di correlazione di Pearson o l'indice di correlazione di Spearman per variabili non distribuite normalmente. Sulla base delle analisi di correlazione, sono state eseguite analisi multivariate per confrontare i parametri seminali maggiormente associati al valore MEDAS e alimenti ultra-processati dopo aggiustamento per i fattori confondenti.

8. Risultati

	N	Media ± SD
BMI (kg/m ²)	358	24.4± 4,2
ETA' (anni)	358	34.6± 9.3
MEDSCORE	358	7.5± 2.8
CalTOT	357	1923.8± 344.9
%KalUP (%)	357	29.1± 21.9
%ProtUP (%)	357	3.8± 2.7
%LipUP (%)	357	8.1± 6.5
%CHOUP (%)	357	17.4± 13.0
Volume (mL)	358	3.0± 1.5
pH	358	7.6± 0.2
Concentrazione (10 ⁶ cellule/mL)	358	43.5± 42.3
Conta totale (10 ⁶ cellule/eiaculato)	358	116.4± 114.9
Motilità progressiva (%)	358	45.5± 20.1
Immobili (%)	358	44.2± 20.7
Vitalità (%)	358	75.8± 17.5
Morfologia (%)	358	5.2± 2.7
Volume dx (mL)	117	14.6± 5.1
Volume sx (mL)	117	13.7± 4.7
Glicemia (mg/dL)	14	95.9± 6.5
Trigliceridi (mg/dL)	15	91.2± 65.5
Colesterolo totale (mg/dL)	15	208.2± 28.8
HDL (mg/dL)	16	67.0± 46.1
FSH (U/mL)	80	10.2± 9.9
LH (U/mL)	76	6.8± 4.4
SHBG (nmol/L)	41	36.2± 14.9
TT (nmol/L)	78	15.5± 5.5
BAT (nmol/L)	41	7.1± 3.1
fT (nmol/L)	41	0.3± 0.1

Tabella III

Dati clinici e demografici di 358 pazienti afferenti alla UOC di Andrologia e Medicina della riproduzione per analisi del liquido seminale.

Abbreviazioni: BMI: body mass index; CalTOT: calorie totali assunte; %KalUP: % calorie assunte derivate da alimenti ultra-processati; %ProtUP: % calorie assunte derivate da proteine ultra-processati; %LipUP: % calorie assunte derivate da lipidi ultra-processati; %CHOUP: % calorie assunte derivate da carboidrati ultra-processati; FSH: ormone follicolo-stimolante; LH: ormone luteinizzante; SHBG: sex hormone binding globuline; BAT: testosterone biodisponibile; fT: testosterone libero calcolato.

Caratteristiche del gruppo di studio

Nel periodo settembre 2022-aprile 2024 sono stati reclutati prospetticamente 358 soggetti afferenti alla UOC Andrologia e Medicina della Riproduzione – Azienda Ospedale Università di Padova per l'esecuzione di un esame del liquido seminale di primo livello. I dati demografici, nutrizionali, metabolici e ormonali sono riportati in Tabella III. I parametri metabolici quali glicemia, trigliceridi, colesterolo totale e HDL erano disponibili per una minoranza dei pazienti (< 4.5%), per tale motivo non sono stati ulteriormente considerati per le analisi statistiche.

La tabella IV riassume l'analisi di correlazione bivariata tra i diversi parametri demografici, seminali e ormonali con i valori di MEDSCORE e percentuali di calorie derivanti da alimenti ultra-processati (%KalUP). Si noti la correlazione estremamente significativa tra %KalUP e le percentuali di calorie da ultra-processati associate alle singole categorie nutrizionali (glucidi, proteine e lipidi). Per questo motivo %KalUP è stato utilizzato come parametro rappresentativo per l'apporto di alimenti ultra-processati nelle successive analisi.

I risultati dimostrano come MEDSCORE correli negativamente con %KalUP e positivamente con tutti i parametri seminali ad eccezione del pH seminale e della percentuale di cellule immobili. Una correlazione negativamente significativa era, inoltre, riscontrabile con i livelli sierici di FSH ed LH. D'altro canto, %KalUP presentava una correlazione negativamente significativa con tutti i parametri seminali, sempre ad eccezione della percentuale di cellule immobili, ma nessuna correlazione con i parametri ormonali. È importante notare, inoltre, come non vi sia una correlazione significativa, sia per MEDSCORE che per %KalUP, con l'età dei pazienti o con il BMI.

I soggetti sono stati successivamente raggruppati secondo livelli di aderenza alla dieta mediterranea in base allo score raggiunto nel questionario MEDAS: bassa aderenza per score ≤ 5 , livello 1; aderenza media per score tra 6 e 9, livello 2; aderenza elevata per score ≥ 10 ; livello 3. L'analisi multivariata mostrava una differenza significativa nei parametri seminali nei tre gruppi (Figura 3). Ad eccezione del volume seminale, venivano riscontrate differenze altamente significative tra tutti i livelli MEDAS, con valori medi progressivamente crescenti, relativamente a: concentrazione spermatica, conta spermatica totale,

motilità cellulare progressiva, vitalità cellulare e percentuale di cellule con morfologia tipica (tutti i valori di $P < 0.001$, Figura 3 A). L'effetto del raggruppamento in livelli di aderenza alla dieta mediterranea sui parametri ormonali viene riportato in Figura 3B. Veniva riscontrata una significativa riduzione di LH tra il livello 1 e 2 di MEDAS ed una significativa riduzione di FSH nei livelli 2 e 3 rispetto al livello 1 (tutti i valori di $P < 0.05$). Nessuna differenza significativa veniva riscontrata relativamente agli altri parametri ormonali.

Analogo raggruppamento è stato eseguito relativamente all'assunzione di cibi ultra-processati, stratificando i parametri seminali e ormonali per quartili crescenti di %KalUP (Figura 4A e B. Rispettivamente: 0.5%-10.8% Q1, 10.8%-24.1% Q2, 24.1%-42.6% Q3, 42.6%-96.6% Q4). Relativamente ai parametri seminali, ad eccezione del volume seminale, una progressiva riduzione dei valori medi di concentrazione seminale, conta spermatica totale, motilità progressiva cellulare e percentuale di cellule con morfologia cellulare tipica era riscontrabile dal Q1 al Q4 di %KalUP (tutti i valori di $P < 0.01$, Figura 4A). È interessante notare come la vitalità cellulare media nel Q1 di %KalUP fosse significativamente inferiore rispetto ai valori medi degli altri quartili. Nessuna variazione significativa era evidenziabile in termini di parametri ormonali (Figura 4B). Un'ulteriore analisi evidenziava come i pazienti stratificati per l'appartenenza al livello 1 di aderenza alla dieta mediterranea e Q4 di %KalUP presentassero valori medi dei parametri seminali significativamente peggiori rispetto ai pazienti appartenenti al livello 3 di aderenza alla dieta mediterranea e Q1 di %KalUP (Figura 5).

***Analisi multivariata dell'outcome seminale dell'interazione tra regime
nutrizionale e parametri ormonali***

Al fine di chiarire l'interazione tra parametri ormonali e aderenza alla dieta mediterranea nel determinare il pattern dei parametri seminali, è stata eseguita un'analisi multivariata stratificando i pazienti per livelli sierici di FSH (rispettivamente < 8 IU/mL e ≥ 8 IU/mL) e ulteriormente per quartili di consumo di alimenti ultra-processati (Figura 6). Nei soggetti con FSH < 8 IU/mL, i valori medi di concentrazione spermatica, conta totale, percentuale di motilità cellulare progressiva e percentuale di cellule immobili erano significativamente progressivamente peggiorati dall'appartenenza ai quartili crescenti di %KaUP rispetto al quartile 1. Nei soggetti con FSH ≥ 8 IU/mL, tale effetto dell'apporto di alimenti ultra-processati non era evidenziabile. Tuttavia, relativamente al parametro di vitalità spermatica, una riduzione significativa era riscontrabile sia nei soggetti con FSH < 8 IU/mL, tra i quartili Q1 e Q4, sia nei soggetti con FSH ≥ 8 IU/mL tra i quartili Q2 e Q4. Anche per il parametro della morfologia tipica, una progressiva riduzione era riscontrabile sia tra i soggetti con FSH < 8 IU/mL che con FSH ≥ 8 IU/mL.

Analogo approccio è stato applicato anche all'interazione tra livelli sierici di FSH e aderenza alla dieta mediterranea valutata mediante i livelli di score MEDAS (Figura 7). Un significativo aumento dei livelli medi di concentrazione spermatica e conta spermatica totale era riscontrabile all'aumentare dei livelli di aderenza alla dieta mediterranea solo per i soggetti con FSH < 8 IU/mL. Diversamente, per i parametri di motilità progressiva, assenza di motilità, vitalità e morfologia tipica, un effetto di significativo miglioramento associato all'aumento dell'aderenza alla dieta mediterranea, era riscontrabile sia nei soggetti con FSH < 8 IU/mL, sia nei soggetti con FSH ≥ 8 IU/mL. Si noti che nei soggetti con bassa conta spermatica totale ($< 39 \times 10^6$ cellule/eiaculato), una significativa riduzione dei livelli di FSH era riscontrabile tra soggetti con livello di aderenza 1 e 2 alla dieta mediterranea ($P < 0.001$), a suggerire un parziale ruolo diretto di quest'ultima sulla funzione testicolare indipendente dall'asse endocrino centrale.

Infine, attraverso un'analisi di regressione logistica, è stato stimato il peso relativo dei livelli di FSH, $< 0 \geq 8$ IU/mL, dei livelli di aderenza alla dieta mediterranea e dei livelli di consumo di alimenti ultra-processati, nel determinare un valore di

conta seminale $< o \geq 39 \times 10^6$ cellule/eiaculato (Tabella V). L'analisi attribuiva ai livelli di FSH un ruolo indipendente ed altamente significativo nel determinare l'associazione alla conta spermatica ($P < 0.001$). In un modello di regressione a FSH costante, il livello MEDAS ($P = 0.003$) e il quartile di %KalUP di appartenenza ($P = 0.024$) erano i parametri categorici progressivamente meno associati all'outcome di conta. Infine, in un ultimo modello a FSH e livello di MEDAS costante, nessuna associazione significativa veniva riscontrata con i quartili di %KalUP ($P = 0.608$).

	MEDSCORE	%KalUP (%)	FSH (U/mL)	MEDSCORE (Norm FSH)	MEDSCORE (Norm %KalUP)
BMI	$r = -0.088$ P= 0.096	$r = 0.018$ P= 0.736	$r = 0.191$ P= 0.090	$r = 0.091$ P= 0.863	$r = -0.498$ P= 0.315
ETA'	$r = -0.009$ P= 0.864	$r = -0.075$ P= 0.158	$r = \mathbf{0.262}$ P= 0.019	$r = -0.138$ P= 0.795	$r = -0.454$ P= 0.366
MEDSCORE		$r = \mathbf{-0.813}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.301}$ P= 0.007		$r = -0.483$ P= 0.331
Calorie TOT	$r = \mathbf{-0.146}$ P= 0.006	$r = 0.026$ P= 0.622	$r = 0.155$ P= 0.169	$r = -0.170$ P= 0.747	
%KalUP	$r = \mathbf{-0.813}$ P= 0.000		$r = 0.217$ P= 0.053	$r = -0.270$ P= 0.605	
%ProtUP	$r = \mathbf{-0.803}$ P= 0.000	$r = \mathbf{0.960}$ P= 0.000	$r = \mathbf{0.253}$ P= 0.023	$r = -0.218$ P= 0.677	$r = 0.207$ P= 0.694
%LiPUP	$r = \mathbf{-0.800}$ P= 0.000	$r = \mathbf{0.998}$ P= 0.000	$r = 0.212$ P= 0.059	$r = -0.256$ P= 0.625	$r = 0.215$ P= 0.682
%CHOUP	$r = \mathbf{-0.814}$ P= 0.000	$r = \mathbf{0.999}$ P= 0.000	$r = 0.211$ P= 0.060	$r = -0.291$ P= 0.576	$r = 0.242$ P= 0.644
Volume	$r = \mathbf{0.141}$ P= 0.008	$r = \mathbf{-0.158}$ P= 0.003	$r = 0.000$ P= 1.000	$r = 0.776$ P= 0.070	$r = 0.493$ P= 0.320
PH	$r = \mathbf{-0.059}$ P= 0.008	$r = 0.084$ P= 0.113	$r = -0.003$ P= 0.982	$r = 0.594$ P= 0.214	$r = -0.069$ P= 0.897
Concentrazione	$r = \mathbf{0.416}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.302}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.360}$ P= 0.001	$r = -0.772$ P= 0.072	$r = 0.090$ P= 0.865
Conta totale	$r = \mathbf{0.456}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.361}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.394}$ P= 0.000	$r = -0.325$ P= 0.530	$r = 0.460$ P= 0.359
Motilità Progressiva	$r = \mathbf{0.431}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.365}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.308}$ P= 0.005	$r = -0.085$ P= 0.873	$r = 0.432$ P= 0.392
Immobili	$r = \mathbf{-0.390}$ P= 0.000	$r = \mathbf{0.322}$ P= 0.000	$r = \mathbf{0.276}$ P= 0.013	$r = -0.024$ P= 0.965	$r = -0.506$ P= 0.306
Vitalità	$r = \mathbf{0.349}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.248}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.430}$ P= 0.000	$r = 0.150$ P= 0.777	$r = 0.753$ P= 0.084
Morfologia	$r = \mathbf{0.468}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.346}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.260}$ P= 0.020	$r = -0.308$ P= 0.552	$r = 0.284$ P= 0.585
Volume dx	$r = 0.033$ P= 0.724	$r = -0.044$ P= 0.641	$r = \mathbf{-0.598}$ P= 0.000	$r = -0.795$ P= 0.059	$r = 0.285$ P= 0.584
Volume sx	$r = 0.093$ P= 0.318	$r = -0.076$ P= 0.412	$r = \mathbf{-0.603}$ P= 0.000	$r = \mathbf{-0.892}$ P= 0.017	$r = 0.369$ P= 0.472
FSH	$r = \mathbf{-0.301}$ P= 0.007	$r = 0.217$ P= 0.053			$r = -0.811$ P= 0.050
LH	$r = -0.275$ P= 0.16	$r = 0.164$ P= 0.158	$r = \mathbf{0.838}$ P= 0.000	$r = -0.008$ P= 0.988	$r = -0.660$ P= 0.153
SHBG	$r = -0,116$ P= 0.472	$r = 0.166$ P= 0.299	$r = 0.241$ P= 0.134	$r = 0.163$ P= 0.758	$r = 0.380$ P= 0.457
TT	$r = -0,171$ P= 0.135	$r = 0.158$ P= 0.166	$r = -0,071$ P= 0.543	$r = -0,352$ P= 0.493	$r = 0.384$ P= 0.452
BAT	$r = 0.062$ P= 0.702	$r = -0.141$ P= 0.379	$r = \mathbf{-0.316}$ P= 0.047	$r = -0.037$ P= 0.822	$r = -0.069$ P= 0.670
ft	$r = 0.062$ P= 0.699	$r = -0,141$ P= 0.378	$r = \mathbf{-0.316}$ P= 0.047	$r = -0.036$ P= 0.826	$r = -0.069$ P= 0.674

Tabella IV

Correlazioni tra i parametri clinici e demografici e i parametri nutrizionali in 358 pazienti afferenti allo studio.

Abbreviazioni: BMI: body mass index; CalTOT: calorie totali assunte; %KalUP: % calorie assunte derivate da alimenti ultra-processati; %ProtUP: % calorie assunte derivate da proteine ultra-processati; %LipUP: % calorie assunte derivate da lipidi ultra-processati; %CHOUP: % calorie assunte derivate da carboidrati ultra-processati; FSH: ormone follicolo-stimolante; LH: ormone luteinizzante; SHBG: sex hormone binding globuline; BAT: testosterone biodisponibile; fT: testosterone libero calcolato; *r*: correlazione di Pearson; P= significatività.

Significatività: i valori P di significatività sono riportati in grassetto

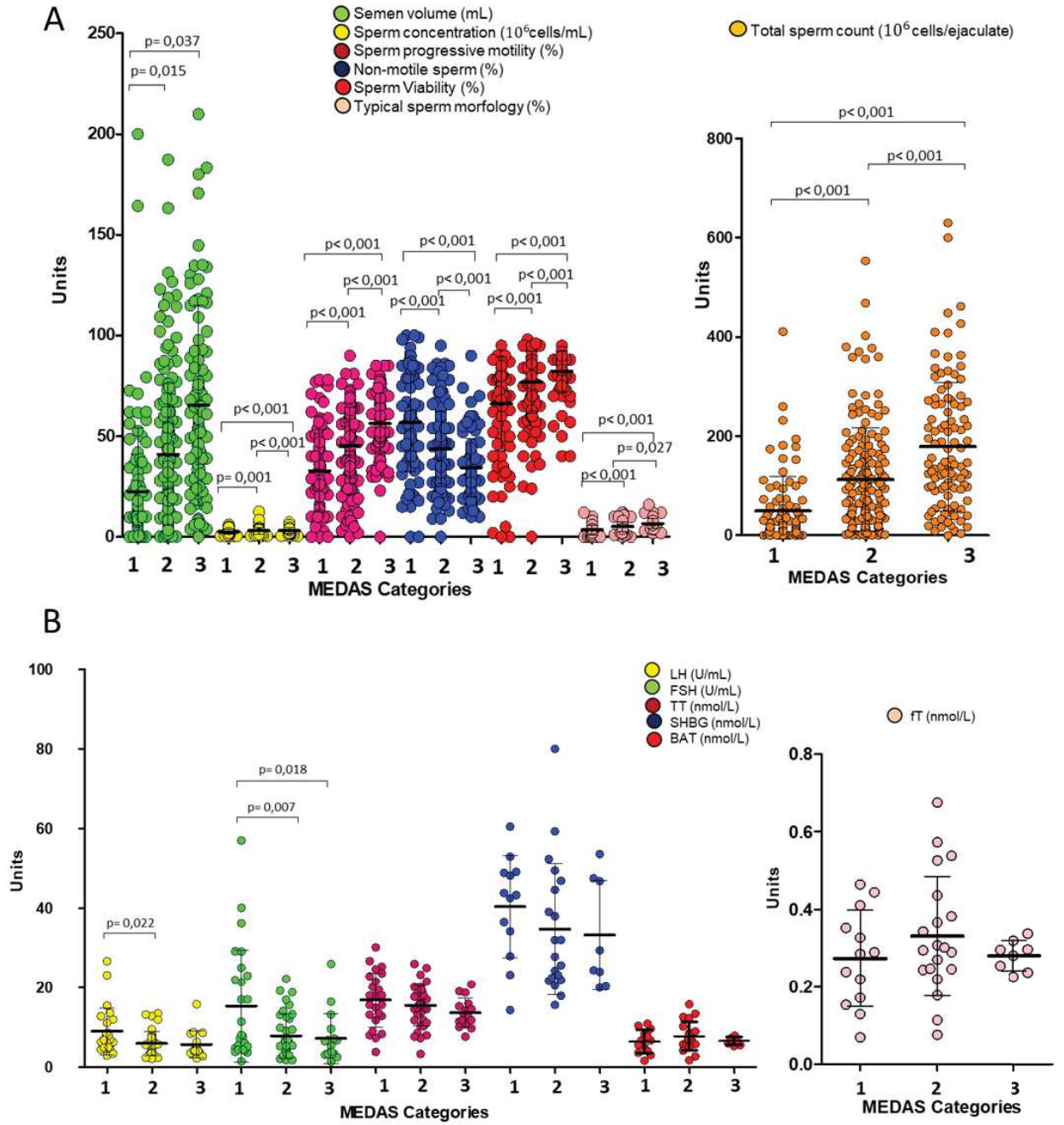


Figura 3

Effetto dell'aderenza alla dieta mediterranea, valutato mediante questionario "MEDAS" e suddiviso in bassa aderenza (1), media aderenza (2), alta aderenza (3), sui parametri seminali (A) e ormonali (B).

Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo-stimolante; LH: ormone luteinizzante; TT: testosterone totale; SHBG: sex hormone binding globuline; BAT: testosterone biodisponibile; FT: testosterone libero calcolato.

Significatività: i valori di P associati al confronto tra coppie di gruppi sono esplicitati nell'immagine.

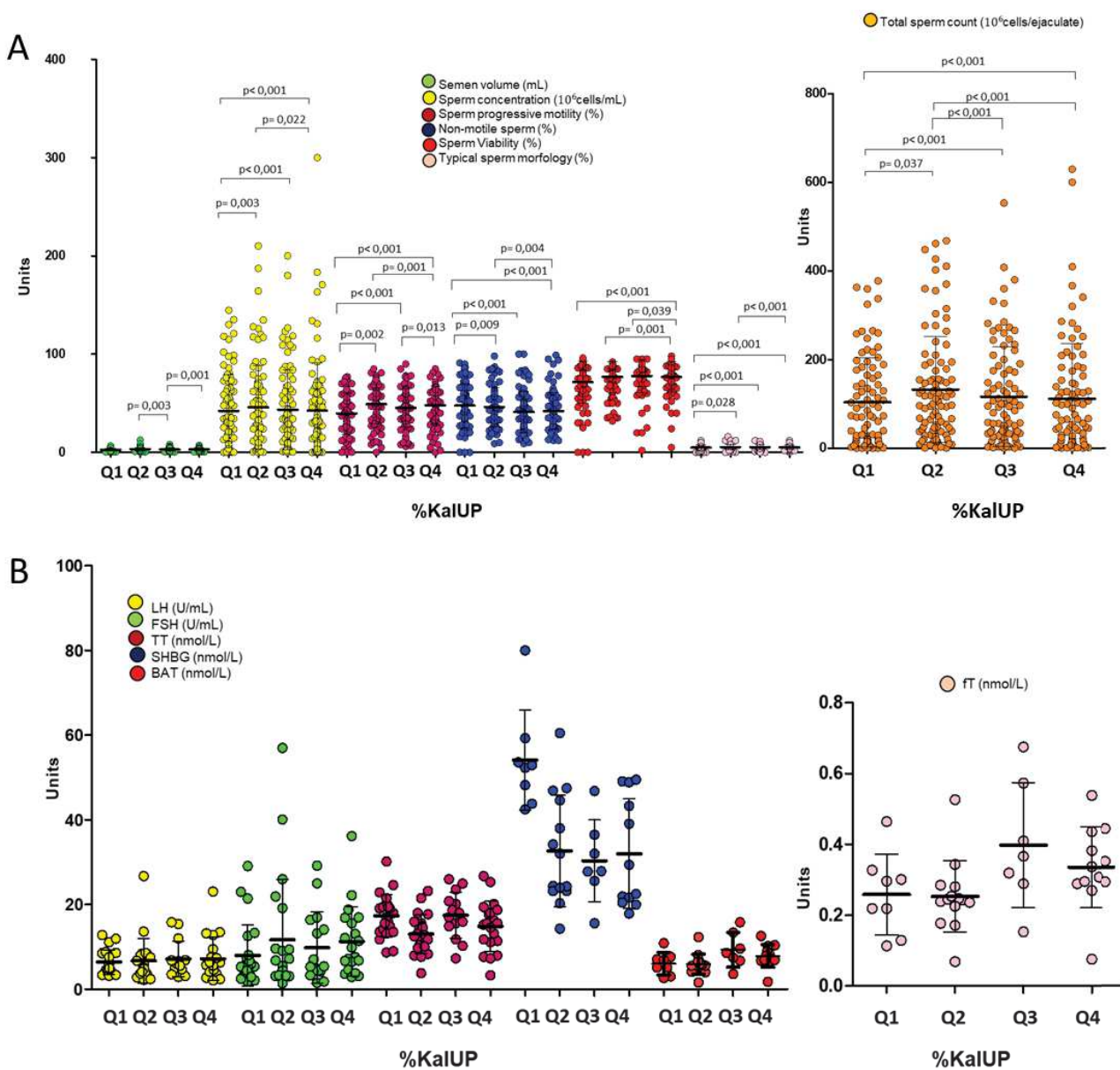


Figura 4

Effetto del consumo di alimenti ultra-processati, valutato mediante questionario "24 hours Food Recall Questionnaire" e suddiviso in basso consumo (Q1), medio-basso consumo (Q2), medio-alto consumo (Q3), alto consumo (Q4), sui parametri seminali (A) e ormonali (B).

Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo-stimolante; LH: ormone luteinizzante; TT: testosterone totale; SHBG: sex hormone binding globuline; BAT: testosterone biodisponibile; FT: testosterone libero calcolato; %KalUP: % calorie assunte da alimenti ultra-processati.

Significatività: i valori di P associati al confronto tra coppie di gruppi sono esplicitati nell'immagine.

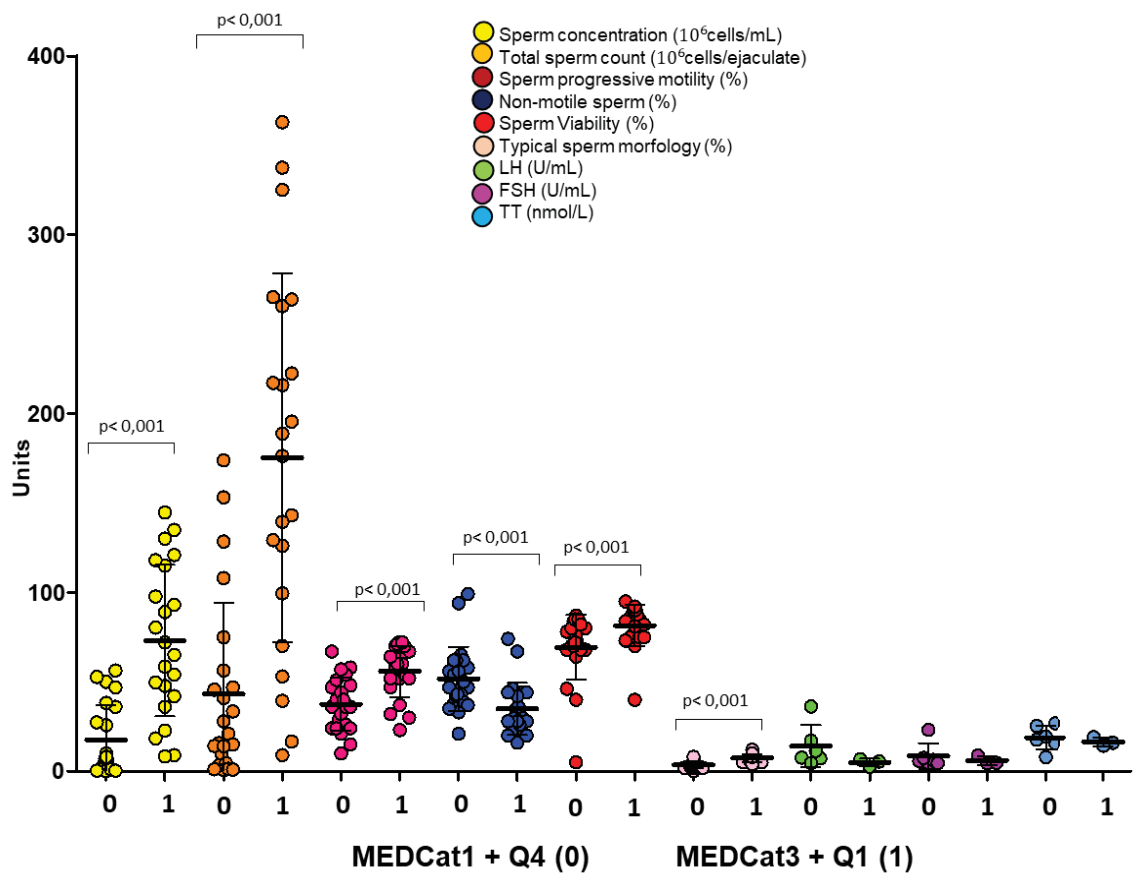


Figura 5

Confronto di parametri seminali e ormonali tra soggetti con bassa aderenza alla dieta mediterranea ed elevato consumo di alimenti ultra-processati (0) e soggetti con elevata aderenza alla dieta mediterranea e basso consumo di alimenti ultra-processati (1). Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo-stimolante; LH: ormone luteinizzante; TT: testosterone totale.

Significatività: i valori di P associati al confronto tra coppie di gruppi sono esplicitati nell'immagine.

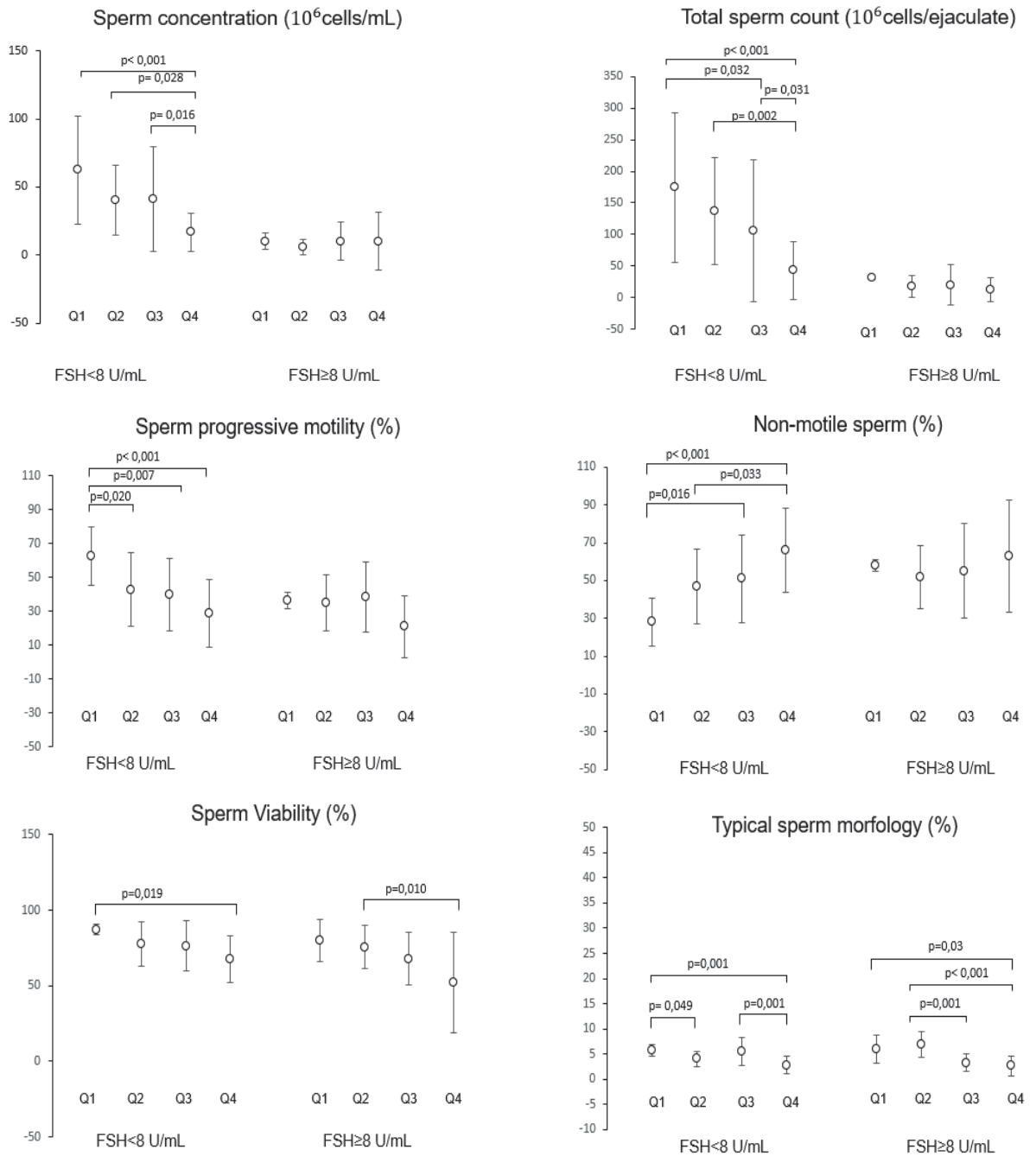


Figura 6

Valutazione dell'interazione tra i livelli di gonadotropine, espressi come variabile dicotomica (FSH < 8 U/mL e FSH ≥ 8 U/mL) e il consumo di alimenti ultra-processati, valutato mediante questionario "24 hours Food Recall Questionnaire" e suddiviso in basso consumo (Q1), medio-basso consumo (Q2), medio-alto consumo (Q3) ed alto consumo (Q4) sui parametri seminali.

Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo-stimolante.

Significatività: i valori di P associati al confronto tra coppie di gruppi sono esplicitati nell'immagine.

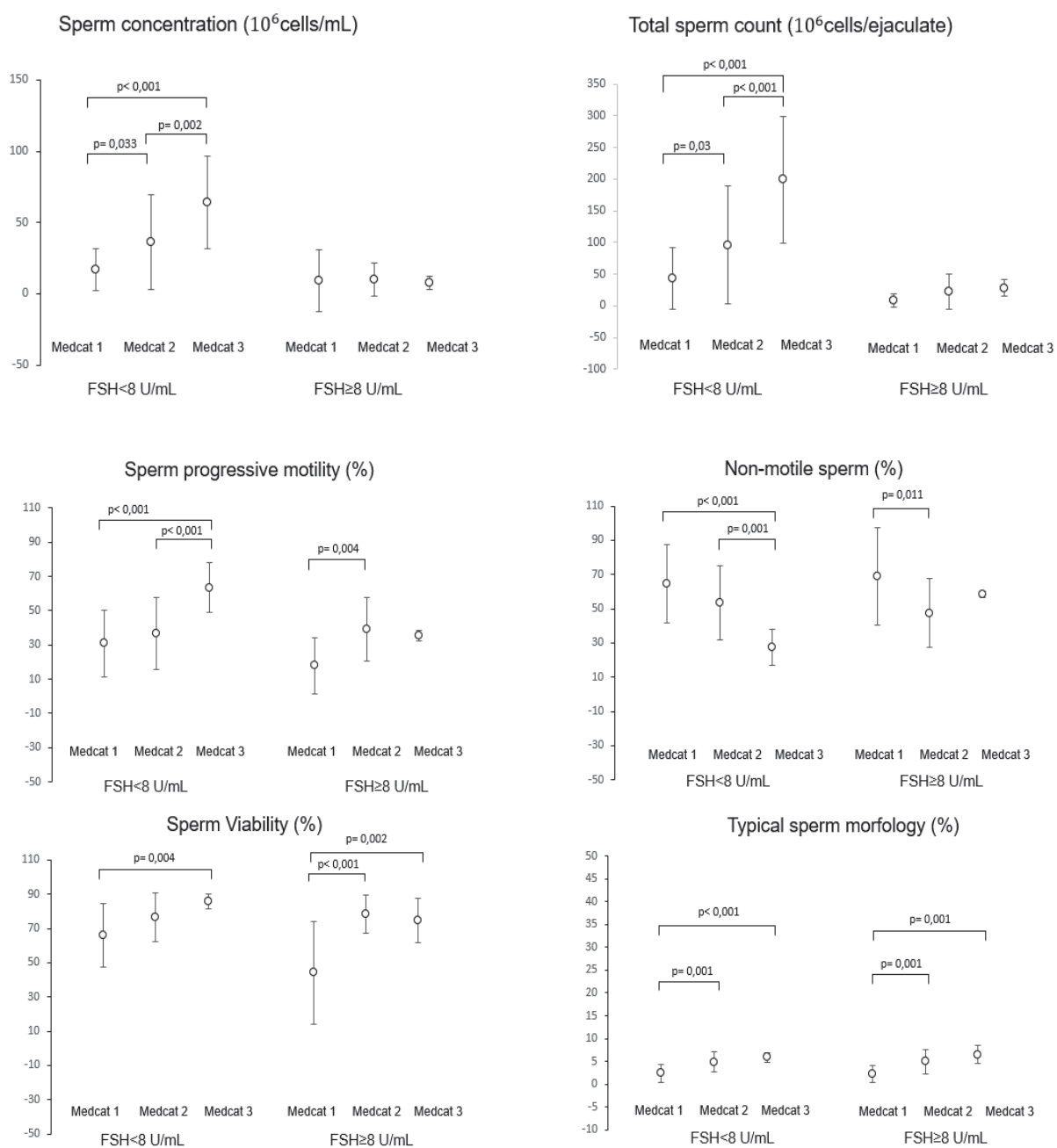


Figura 7

Valutazione dell'interazione tra i livelli di gonadotropine, espressi come variabile dicotomica (FSH < 8 U/mL e FSH ≥ 8 U/mL) e l'aderenza alla dieta mediterranea, valutata mediante questionario "MEDAS" e suddivisa in bassa aderenza (Medcat1), media aderenza (Medcat2) ed alta aderenza (Medcat3) sui parametri seminali.

Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo-stimolante.

Significatività: i valori di P associati al confronto tra coppie di gruppi sono esplicitati nell'immagine.

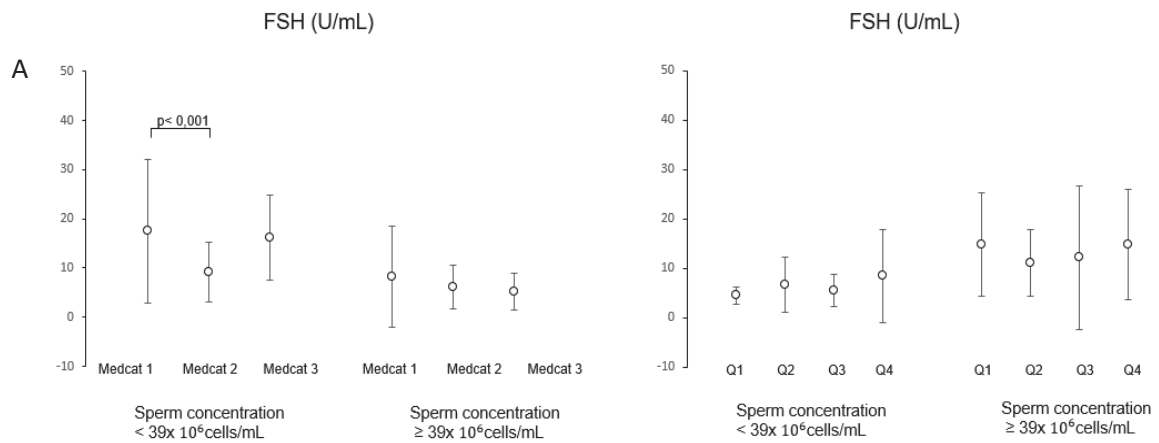


Figura 8

A) Valutazione dell'interazione tra la concentrazione spermatica, espressa come variabile dicotomica (< e ≥ 39 milioni/mL) e l'aderenza alla dieta mediterranea, valutata mediante questionario "MEDAS" e suddivisa in bassa aderenza (Medcat1), media aderenza (Medcat2) ed alta aderenza (Medcat3) sui valori di FSH.

B) Valutazione dell'interazione tra la concentrazione spermatica, espressa come variabile dicotomica (< e ≥ 39 milioni/mL) e il consumo di alimenti ultra-processati, valutato mediante questionario "24 hours Food Recall Questionnaire" e suddiviso in basso consumo (Q1), medio-basso consumo (Q2), medio-alto consumo (Q3) ed alto consumo (Q4) sui valori di FSH.

Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo-stimolante.

Significatività: i valori di P associati al confronto tra coppie di gruppi sono esplicitati nell'immagine.

Variabile		Logaritmo della verosimiglianza modello	gl	P value
Fase 1	IperFSH	-55.051	1	0.000
Fase 2	MEDCat	-46.720	2	0.002
	IperFSH	-47.275	1	0.000
Variabili non nell'equazione				
			gl	P value
Fase 1 - Costanti: FSH	Variabili	MEDCat	2	0.003
		MEDCat (1)	1	0.020
		MEDCat (2)	1	0.599
		%KalUP	3	0.024
		%KalUP (1)	1	0.092
		%KalUP (2)	1	0.046
		%KalUP (3)	1	0.296
Fase 2 - Costanti: FSH, MEDCat	Variabili	%KalUP	3	0.608
		%KalUP (1)	1	0.311
		%KalUP (2)	1	0.210
		%KalUP (3)	1	0.542

Tabella V

Analisi di regressione logistica per la stima del fattore più importante nella determinazione della conta spermatica, espressa come variabile dicotomica (< e ≥ 39 milioni/mL) tra FSH, aderenza alla dieta mediterranea, valutata mediante questionario "MEDAS" e suddivisa in bassa aderenza (Medcat1), media aderenza (Medcat2) ed alta aderenza (Medcat3) e il consumo di alimenti ultra-processati, valutato mediante questionario "24 hours Food Recall Questionnaire" e suddiviso in basso consumo (Q1), medio-basso consumo (Q2), medio-alto consumo (Q3) ed alto consumo (Q4). Abbreviazioni: FSH: ormone follicolo stimolante; %KalUP: quantità di calorie assunte da alimenti ultra-processati; gl: grado di libertà; P value: significatività. Significatività: i valori P di significatività sono riportati in grassetto.

9. Discussione

In questo studio, forniamo l'evidenza che il grado di aderenza alla dieta mediterranea, valutato attraverso il questionario "MEDAS" e il consumo di alimenti ultra-processati, valutato attraverso il questionario "24 hours Food Recall Questionnaire" correlino significativamente con i parametri spermatici, predicendo il verificarsi di una loro alterazione indipendentemente dall'età, dal BMI, dal fumo e dall'attività fisica. Questa evidenza suggerisce il ruolo del regime nutrizionale come possibile marcatore di anomalie spermatiche in quei pazienti senza ulteriori fattori di infertilità.

È noto che la fertilità, in particolare quella maschile, è influenzata da numerosi fattori ambientali e abitudini di vita, tra cui il fumo di sigaretta, l'inquinamento, il consumo di alcol, la scarsa attività fisica e, soprattutto, il regime alimentare [3,7]. Si ritiene che il modello alimentare mediterraneo sia associato positivamente allo stato di fertilità maschile [68], grazie al consumo limitato di alimenti ultra-processati e acidi grassi saturi, livelli adeguati di acidi grassi monoinsaturi e frazione ottimale di acidi grassi polinsaturi (PUFA), come omega-3 e omega-6 [75]. Inoltre, questo modello nutrizionale fornisce eccellenti livelli di molecole antiossidanti, minerali e vitamine. Fornendo con la dieta quantità e qualità adeguate di acidi grassi, soprattutto in relazione al rapporto omega-3/omega-6, gli spermatozoi possono raggiungere una maturazione ottimale. Infatti, gli acidi grassi alimentari sono costituenti della membrana degli stessi [76]. Una dieta povera di acidi grassi saturi e colesterolo, con un basso rapporto di acidi grassi polinsaturi (PUFA), sembra migliorare la qualità spermatica [77,78] attraverso il mantenimento della fluidità della membrana cellulare [79], la riduzione dello stress ossidativo, dell'infiammazione e migliorando la funzione mitocondriale [80]. La dieta mediterranea, infatti, favorisce il consumo prevalente di alimenti di origine vegetale ed è caratterizzata da un elevato consumo di frutta e verdura, cereali, specialmente integrali, legumi, olio d'oliva e frutta secca; da un moderato consumo di pesce, carne bianca, uova, latte e derivati e, infine, da un consumo limitato di carne rossa, carne processata e dolci [68,71]. In particolare, i carboidrati costituiscono il 55% dell'introito calorico, di cui solo una minima parte è rappresentata dagli zuccheri semplici, i quali derivano principalmente dalla frutta. I grassi sono moderatamente presenti, rappresentando il 30% delle calorie totali ed hanno un'abbondante componente monoinsatura, essendo apportati

principalmente dall'olio di oliva. Infine le proteine sono quelle meno presenti, la cui quota arriva al 15% delle calorie totali e sono soprattutto di origine vegetale [71]. In questo contesto, risulta importante ricordare che l'infiammazione e lo stress ossidativo possono influenzare il potenziale riproduttivo maschile anche attraverso cambiamenti anatomici o funzionali delle ghiandole accessorie [81]. Si ritiene infatti che le abitudini alimentari possano influenzare favorevolmente la salute della prostata, riducendo i processi infiammatori e, di conseguenza, migliorando i parametri spermatici.

I nostri risultati evidenziano come una maggior aderenza alla dieta mediterranea correla positivamente, in modo statisticamente significativo, con tutti i parametri seminali, agendo sia in maniera diretta sugli stessi, sia indirettamente mediante l'asse ipotalamo-ipofisario, ovvero influenzando i valori di FSH e LH. È interessante notare come tali correlazioni si mantengano anche nei pazienti con valore di FSH ≥ 8 U/mL, valore soglia per definire una disfunzione gonadica primitiva. Infatti in questi pazienti, una maggior aderenza alla dieta mediterranea migliora sensibilmente i parametri spermatici funzionali, ovvero motilità progressiva, immobilità, vitalità e morfologia tipica. Ciò dimostra come l'alimentazione possa giovare alla fertilità anche in pazienti con gonadi primariamente disfunzionali. Nonostante l'aderenza al modello mediterraneo influenzi i valori di LH e FSH, tale correlazione non si riscontra circa i valori di testosterone libero calcolato e biodisponibile.

I nostri dati sono coerenti con un numero crescente di studi su questo argomento. Karayiannis et al. hanno valutato 225 uomini provenienti da coppie afferenti ad una clinica per la fertilità [82]. Gli uomini appartenenti alla categoria di minor punteggio di aderenza alla dieta mediterranea presentavano valori di conta spermatica, motilità totale e concentrazione spermatica peggiori, mentre un punteggio di aderenza elevato era significativamente associato ad una maggior qualità spermatica. Ricci et al. hanno valutato l'aderenza alla dieta mediterranea in 309 partner maschi di coppie sub-fertili sottoposte a tecniche di riproduzione assistita [83]. In questo studio, il regime alimentare in questione era positivamente associato alla concentrazione e alla conta degli spermatozoi, ma non al volume seminale. È importante sottolineare che i due studi precedenti non distinguevano i partecipanti in base alle problematiche di fertilità congenita, introducendo così un notevole bias nella valutazione del ruolo della dieta. Salas-Huetos et al. hanno,

invece, valutato 106 giovani partecipanti senza apparenti patologie, concludendo che l'aderenza alla dieta mediterranea era positivamente associata solo alla motilità degli spermatozoi [84]. Infine, Cutillas-Tolin et al., in uno studio su 215 studenti universitari maschi sani, hanno evidenziato come una maggiore aderenza all'alimentazione mediterranea fosse positivamente associata solo alla conta spermatica totale [85]. Una revisione sistematica e una meta-analisi di studi osservazionali, valutando l'associazione tra alcuni modelli alimentari e la qualità del liquido seminale, hanno concluso che un modello alimentare sano potrebbe avere un impatto positivo solo sulla concentrazione spermatica, ma non su altri parametri [86]. È importante sottolineare che il campione analizzato era piccolo e gli studi inclusi erano molto eterogenei. Invece, Salas-Huetos et al., in un'ampia revisione sistematica di studi osservazionali, hanno evidenziato come le diete ricche di classi di alimenti quali pesce, legumi, cereali, verdura e frutta e povere di acidi grassi saturi e cibi ultra-processati, fossero positivamente associate a miglioramenti in diversi parametri spermatici [87].

L'introito di cibi ultra-processati è correlato a quelle che vengono denominate 'non-communicable diseases (NCDs)', ovvero malattie croniche non trasmissibili. In termini epidemiologici, si stima siano responsabili della morte di 41 milioni di persone l'anno, pari al 74% di tutti i decessi [88]. Esse vengono suddivise in quattro principali gruppi: malattie cardiovascolari, tumori, malattie respiratorie croniche e diabete. Si tratta di patologie multifattoriali determinate da fattori genetici, fisiologici, ambientali e occupazionali [88]. Da ciò ne consegue come l'inquinamento ambientale, l'inattività fisica, l'elevato consumo di alcol, il fumo di sigaretta e un'alimentazione insalubre costituiscano importanti fattori di rischio. Diversi studi di associazione hanno evidenziato una correlazione positiva tra il consumo di alimenti ultra-processati e l'incidenza di malattie metaboliche e cardiovascolari [89,90,91], con particolare attenzione all'obesità [92,93]. Associazioni positive sono state riscontrate anche per le patologie tumorali [94]. Come precedentemente sottolineato, si tratta di alimenti che contengono un elevato contenuto di zuccheri, acidi grassi saturi, sodio e un'elevata densità energetica, a discapito di un basso contenuto di fibre, proteine e potassio. Dai nostri risultati emerge come un minor consumo di alimenti ultra-processati si associ significativamente a tutti i parametri seminali, agendo in maniera probabilmente diretta sugli stessi. Tuttavia, contrariamente all'aderenza alla dieta

mediterranea, il consumo di alimenti ultra-processati non sembra influire sull'asse ipotalamo-ipofisario, ovvero sui valori di FSH e LH. È interessante notare come tali correlazioni si mantengano anche nei pazienti con valore di FSH ≥ 8 U/mL, valore soglia per definire una disfunzione gonadica primitiva. Infatti in questi pazienti, un minor consumo di alimenti ultra-processati migliora sensibilmente alcuni parametri spermatici funzionali quali vitalità e morfologia tipica.

L'obesità, definita sulla base di un indice di massa corporea superiore o uguale a 30 kg/m^2 , rappresenta una delle principali malattie cronico-degenerative [88]. Si tratta di una patologia ad eziopatogenesi multifattoriale, la cui causa non dipende quindi unicamente dalle abitudini alimentari, ma anche da fattori ambientali, genetici, sociali ed economici [88]. Ad oggi la ricerca non è concentrata sui singoli gruppi alimentari, ma sugli effetti della combinazione degli stessi all'interno di un modello alimentare più ampio. In tal senso il modello alimentare mediterraneo si è dimostrato il più efficace nel controllo del peso corporeo [95], dei valori glicemici [96], della pressione arteriosa [97,98], dei trigliceridi e del colesterolo [99]. L'efficacia nel controllo dei parametri metabolici conferisce al modello alimentare mediterraneo un ruolo protettivo, di prevenzione e trattamento nei confronti delle principali patologie cronico-degenerative [99]. L'efficacia del modello alimentare mediterraneo nel controllo dell'assetto metabolico è associata anche all'inclusione di abitudini non dietetiche, quali l'attività fisica e la condivisione dei pasti, promuovendo 'l'atto del mangiare' ad attività sociale [95]. Secondo diversi studi, l'obesità maschile impatta negativamente sulla fertilità attraverso cambiamenti diretti sui parametri seminali, sulla composizione molecolare spermatica e indirettamente influenzando l'assetto ormonale [100]. In particolare l'eccesso di tessuto adiposo causa una maggior conversione di testosterone in estradiolo, il quale determina ipogonadismo secondario sopprimendo l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi attraverso un meccanismo di feedback negativo. Inoltre, l'eccessiva produzione di leptina, caratteristica dei pazienti obesi, determina una minor produzione di testosterone, agendo sulle cellule di Leydig [101]. Del resto, l'obesità agisce modulando negativamente la funzione delle cellule di Sertoli, necessarie perché avvenga la spermatogenesi [102]. La presenza di grasso viscerale e sovrappubico è stata associata ad ipertermia scrotale, causa di stress ossidativo, il quale determina una minor qualità spermatica interferendo sulla funzione mitocondriale [103]. Una meta-analisi

condotta da MacDonald et al. non ha evidenziato una correlazione significativa tra i parametri seminali e l'elevato indice di massa corporea, ma ha dimostrato una forte relazione negativa tra quest'ultimo e l'assetto ormonale, in particolare nella minor concentrazione di testosterone totale, testosterone libero e SHBG, delineando una correlazione indiretta tra obesità e parametri seminali [104]. Un ulteriore studio ha evidenziato come la relazione tra obesità e assetto ormonale non sia determinata dai valori di gonadotropine, ma solo da quelli di testosterone, totale e libero [105]. Ciò evidenzia come negli uomini obesi venga mantenuta la funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisario, da sola non sufficiente per garantire un'adeguata spermatogenesi. Ciò concorda con i risultati emersi dal nostro studio, per cui non vi è una correlazione statisticamente significativa tra l'indice di massa corporea e i valori di FSH. Inoltre, secondo uno studio di Campell et al. l'obesità maschile non è correlata ai parametri seminali standard, ma determina una maggior frammentazione del DNA spermatico e una maggior disfunzione mitocondriale [106]. Molti studi concordano, tuttavia, nell'asserire la relazione tra obesità e parametri seminali. Risultati non coerenti potrebbero essere determinati da fattori confondenti quali età e stile di vita, in particolare attività fisica e stato di salute degli uomini intervistati. Secondo i risultati da noi ottenuti non vi è una correlazione significativa tra il BMI, l'aderenza alla dieta mediterranea e il consumo di alimenti ultra-processati. Occorre sottolineare come l'indice di massa corporea, utilizzato come surrogato di obesità, non sia un descrittore esaustivo in quanto incapace di distinguere la diversa composizione corporea e la distribuzione del grasso corporeo. Nonostante ciò viene ad oggi utilizzato in quanto buon indicatore di adiposità, specialmente negli studi su ampie popolazioni [107]. Futuri studi potrebbero beneficiare di indici di adiposità più accurati, come la misura diretta del grasso corporeo mediante bioimpedenziometria [108].

Per quanto concerne il fumo di sigaretta, non abbiamo riscontrato correlazioni significative con le variabili considerate. Secondo diversi studi, tuttavia, il fumo di sigaretta influisce fortemente sulla motilità e sulla morfologia spermatica, determinando significative alterazioni quantitative e qualitative a carico degli stessi [47,48]. Tale discordanza con studi precedentemente svolti potrebbe essere attribuita al fatto che la variabile è stata considerata in modo dicotomico, senza quindi valutare la quantità effettiva di sigarette consumate. Inoltre tra i fumatori sono stati considerati anche coloro che utilizzano la sigaretta 'elettronica', i cui

componenti chimici non sono sovrapponibili alle sigarette industriali tradizionali, pur riconoscendo alle stesse un ruolo nocivo alla salute riproduttiva [109].

Rispetto agli studi precedenti, i nostri dati sono particolarmente rafforzati dalla notevole dimensione del campione, dalla valutazione omogenea del regime alimentare e dall'esclusione di cause note di infertilità, a sostegno di un ruolo autonomo del regime alimentare. Tuttavia, riconosciamo un limite importante del presente studio, ovvero la sua natura osservativa e trasversale. Infatti, un disegno trasversale non può determinare se l'aderenza alla dieta mediterranea, l'introito di alimenti ultra-processati e i parametri seminali siano causalmente correlati. Pertanto, sebbene siano stati esclusi diversi potenziali fattori confondenti, questi risultati dovrebbero essere considerati con cautela a causa dei numerosi fattori che possono influenzare la qualità del liquido seminale. Inoltre, non ci è stato possibile raccogliere un numero adeguato di parametri metabolici, in quanto non presenti nell'iter diagnostico-terapeutico dei pazienti. Occorre poi sottolineare che i parametri seminali non possono essere direttamente tradotti in termini di fertilità. Si raccomandano, pertanto, ulteriori studi osservazionali prospettici e studi clinici ben progettati sull'argomento attuale.

10. Conclusioni

In conclusione, i nostri risultati confermano una migliore qualità del liquido seminale negli uomini con maggiore aderenza alla dieta mediterranea e minor consumo di alimenti ultra-processati. In particolare, suddividendo i pazienti in base alla categoria MEDAS e in base alla % di calorie assunte derivanti dagli alimenti ultra-processati, abbiamo osservato che una maggior aderenza all'alimentazione mediterranea e un minor consumo di alimenti ultra-processati, erano correlati positivamente con i diversi parametri spermatici quali concentrazione, conta totale, volume seminale, motilità progressiva, vitalità e morfologia tipica, indipendentemente dall'età, dall'indice di massa corporea e dall'abitudine al fumo. Inoltre i pazienti con maggior punteggio MEDAS presentavano anche valori inferiori di FSH, indice di un miglior funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisario e, di conseguenza, di un'influenza indiretta sui parametri seminali.

Il modello alimentare dietetico da noi studiato, è ricco di nutrienti che hanno un effetto benefico sulla composizione e sulla funzione del liquido seminale, suggerendo un ruolo fisiologicamente favorevole nella fertilità maschile. Al contrario, una dieta caratterizzata da alimenti ultra-processati, ricca di zuccheri e di grassi saturi, anche quando non accompagnata ad una condizione di sovrappeso, è più frequentemente associata ad alterazioni dei parametri spermatici e ad infertilità maschile. Pertanto, la consulenza nutrizionale sembra essere una pratica clinica facilmente implementabile e non invasiva, consigliabile a tutti gli uomini con segni di alterazione della qualità spermatica.

BIBLIOGRAFIA

1. Esteves SC. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *Int Braz J Urol.* 2014 Jul-Aug;40(4):443-53. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.04.02. PMID: 25254609.
2. Wang C, Swerdloff RS. Limitations of semen analysis as a test of male fertility and anticipated needs from newer tests. *Fertil Steril* 2014 Dec;102(6):1502-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.021. PMID: 25458617; PMCID: PMC4254491.
3. Ferlin A, Calogero AE, Krausz C, Lombardo F, Paoli D, Rago R, Scarica C, Simoni M, Foresta C, Rochira V, Sbardella E, Francavilla S, Corona G. Management of male factor infertility: position statement from the Italian Society of Andrology and Sexual Medicine (SIAMS): Endorsing Organization: Italian Society of Embryology, Reproduction, and Research (SIERR). *J Endocrinol Invest.* 2022 May;45(5):1085-1113. doi: 10.1007/s40618-022-01741-6. Epub 2022 Jan 24. PMID: 35075609.
4. De Toni L, Petre GC, Garolla A, De Santis I, Valente U, Foresta C, De Rocco Ponce M. Prognostic Value of Ultrasound Stratigraphy in Long-Term Weight Loss: Results from a Nutritional Counselling Program. *Obes Facts.* 2019;12(6):606-617. doi: 10.1159/000502119. Epub 2019 Nov 8. PMID: 31707390; PMCID: PMC6940438.
5. Cazzaniga W, Candela L, Boeri L, Capogrosso P, Pozzi E, Belladelli F, Baudo A, Ventimiglia E, Alfano M, Abbate C, Montorsi F, Salonia A. The impact of metabolically healthy obesity in primary infertile men: Results from a cross-sectional study. *Andrology.* 2020 Nov;8(6):1762-1769. doi: 10.1111/andr.12861. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32644296.
6. Cazzaniga W, Candela L, Boeri L, Capogrosso P, Pozzi E, Belladelli F, Baudo A, Ventimiglia E, Alfano M, Abbate C, Montorsi F, Salonia A. The impact of metabolically healthy obesity in primary infertile men: Results from a cross-sectional study. *Andrology.* 2020 Nov;8(6):1762-1769. doi: 10.1111/andr.12861. Epub 2020 Jul 21. PMID: 32644296.
7. Łakoma K, Kukharuk O, Śliż D. The Influence of Metabolic Factors and Diet on Fertility. *Nutrients.* 2023 Feb 27;15(5):1180. doi: 10.3390/nu15051180. PMID: 36904180; PMCID: PMC10005661.
8. Clement P, Giuliano F. Anatomy, and physiology of genital organs - men. *Handb Clin Neurol.* 2015; 130:19-37. doi: 10.1016/B978-0-444-63247-0.00003-1. PMID: 26003237.
9. Neto FT, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminal Cell Dev Biology,* 2016 November; 59:10-26. doi: 10.1016/j.semcdb.2016.04.009. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27143445.
10. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, Sixth Edition 2021.

11. Attanasio R, Borretta G, Papini E, et al. *Manuale di Endocrinologia Clinica*. Associazione Medici Endocrinologi (AME), 2010.
12. Eisenberg ML, Esteves SC, Lamb DJ, Hotaling JM, Giwercman A, Hwang K, Cheng YS. Male infertility. *Nat Rev Dis Primers*. 2023 Sep 14;9(1):49. doi: 10.1038/s41572-023-00459-w. PMID: 37709866.
13. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*. 2018 Oct;110(5):810-814. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.08.015. PMID: 30316415.
14. Calogero AE, Condorelli RA, Russo GI, La Vignera S. Conservative Nonhormonal Options for the Treatment of Male Infertility: Antibiotics, Anti-Inflammatory Drugs, and Antioxidants. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:4650182. doi: 10.1155/2017/4650182. Epub 2017 Jan 9. PMID: 28164122; PMCID: PMC5253172.
15. Garolla A, Engl B, Pizzol D, Ghezzi M, Bertoldo A, Bottacin A, Noventa M, Foresta C. Spontaneous fertility, and in vitro fertilization outcome: new evidence of human papillomavirus sperm infection. *Fertil Steril*. 2016 Jan;105(1):65-72. e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.09.018. Epub 2015 Oct 9. PMID: 26453270.
16. Perino A, Giovannelli L, Schillaci R, Ruvolo G, Fiorentino FP, Alimondi P, Cefalù E, Ammatuna P. Human papillomavirus infection in couples undergoing in vitro fertilization procedures: impact on reproductive outcomes. *Fertil Steril*. 2011 Apr;95(5):1845-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.11.047. Epub 2010 Dec 17. PMID: 21167483.
17. Gunes S, Esteves SC. Role of genetics and epigenetics in male infertility. *Andrologia*. 2021 Feb;53(1): e13586. doi: 10.1111/and.13586. Epub 2020 Apr 21. PMID: 32314821.
18. Foresta C (coordinatore), et al. *Infertilità maschile. Fisiopatologia, clinica, diagnostica e terapia*. Coop. Libreria Editrice, Università di Padova, 2009.
19. Foresta C, Selice R, Ferlin A, Garolla A. Recombinant FSH in the treatment of oligozoospermia. *Expert Opin Biol Ther*. 2009 May;9(5):659-66. doi: 10.1517/14712590902932673. PMID: 19379121.
20. Chehab M, Madala A, Trussell JC. On-label and off-label drugs used in the treatment of male infertility. *Fertil Steril*. 2015 ;103(3):595-604. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.12.122. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25660648.
21. 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.
22. 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.

23. Workowski KA, Bolan GA; Centers for Disease Control and Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. *MMWR Recomm Rep.* 2015 Jun 5;64(RR-03):1-137. Erratum in: *MMWR Recomm Rep.* 2015 Aug 28;64(33):924. PMID: 26042815; PMCID: PMC5885289.
24. Lombardo F, Gandini L, Dondero F, Lenzi A. Antisperm immunity in natural and assisted reproduction. *Hum Reprod Update.* 2001 ;7(5):450-6. doi: 10.1093/humupd/7.5.450. PMID: 11556491.
25. 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.
26. Showell MG, Mackenzie-Proctor R, Brown J, Yazdani A, Stankiewicz MT, Hart RJ. Antioxidants for male subfertility. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(12):CD007411. doi: 10.1002/14651858.CD007411.pub3. Epub 2014 Dec 15. Update in: *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 14;3:CD007411. PMID: 25504418.
27. Blomberg Jensen M, Bjerrum PJ, Jessen TE, Nielsen JE, Joensen UN, Olesen IA, Petersen JH, Juul A, Dissing S, Jørgensen N. Vitamin D is positively associated with sperm motility and increases intracellular calcium in human spermatozoa. *Hum Reprod.* 2011 Jun;26(6):1307-17. doi: 10.1093/humrep/der059. Epub 2011 Mar 22. PMID: 21427118.
28. Özgök Y, Tan MO, Kilciler M, Tahmaz L, Kibar Y. Diagnosis, and treatment of ejaculatory duct obstruction in male infertility. *Eur Urol.* 2001 Jan;39(1):24-9. doi: 10.1159/000052408. PMID: 11173935.
29. Sheynkin YR, Hendin BN, Schlegel PN, Goldstein M. Microsurgical repair of iatrogenic injury to the vas deferens. *J Urol.* 1998 Jan;159(1):139-41. doi: 10.1016/s0022-5347(01)64036-9. PMID: 9400456.
30. Franco G, Misuraca L, Ciletti M, Leonardo C, De Nunzio C, Palminteri E, De Dominicis C. Chirurgia dell'infertilità maschile: update [Surgery of male infertility: an update]. *Urologia.* 2014 Jul-Sep;81(3):154-64. Italian. doi: 10.5301/uro.5000088. Epub 2014 Sep 12. PMID: 25214369.
31. Palmer NO, Bakos HW, Fullston T, Lane M. Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis.* 2012 Oct 1;2(4):253-263. doi: 10.4161/spmg.21362. PMID: 23248766; PMCID: PMC3521747.
32. The International Diabetes Federation (IDF) consensus worldwide definition of the metabolic syndrome, 2023.

33. Ferlin A, Garolla A, Ghezzi M, Selice R, Palego P, Caretta N, Di Mambro A, Valente U, De Rocco Ponce M, Dipresa S, Sartori L, Plebani M, Foresta C. Sperm Count and Hypogonadism as Markers of General Male Health. *Eur Urol Focus*. 2021 Jan;7(1):205-213. doi: 10.1016/j.euf.2019.08.001. Epub 2019 Aug 17. PMID: 31427194.
34. Stokes VJ, Anderson RA, George JT. How does obesity affect fertility in men - and what are the treatment options? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015 May;82(5):633-8. doi: 10.1111/cen.12591. Epub 2014 Sep 16. PMID: 25138694.
35. Jokela M, Kivimäki M, Elovainio M, Viikari J, Raitakari OT, Keltikangas-Järvinen L. Body mass index in adolescence and number of children in adulthood. *Epidemiology*. 2007 Sep;18(5):599-606. doi: 10.1097/EDE.0b013e3181257158. PMID: 17700249.
36. Shi GJ, Li ZM, Zheng J, Chen J, Han XX, Wu J, Li GY, Chang Q, Li YX, Yu JQ. Diabetes associated with male reproductive system damages: Onset of presentation, pathophysiological mechanisms, and drug intervention. *Biomed Pharmacother*. 2017 Jun; 90:562-574. doi: 10.1016/j.biopha.2017.03.074. Epub 2017 Apr 10. PMID: 28407577.
37. La Vignera S, Condorelli RA, Di Mauro M, Lo Presti D, Mongioì LM, Russo G, Calogero AE. Reproductive function in male patients with type 1 diabetes mellitus. *Andrology*. 2015 Nov;3(6):1082-7. doi: 10.1111/andr.12097. Epub 2015 Oct 7. PMID: 26446574.
38. Morgante G, Tosti C, Orvieto R, Musacchio MC, Piomboni P, De Leo V. Metformin improves semen characteristics of oligo-terato-asthenozoospermic men with metabolic syndrome. *Fertil Steril*. 2011 May;95(6):2150-2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.12.009. Epub 2010 Dec 30. PMID: 21194687.
39. Fontoura P, Cardoso MC, Erthal-Martins MC, Werneck C, Sartorio C, Ramos CF. The effects of liraglutide on male fertility: a case report. *Reprod Biomed Online*. 2014 Nov;29(5):644-6. doi: 10.1016/j.rbmo.2014.07.009. Epub 2014 Jul 29. PMID: 25246122.
40. Condorelli RA, La Vignera S, Bellanca S, Vicari E, Calogero AE. Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? *Urology*. 2012 Jun;79(6):1290-5. doi: 10.1016/j.urology.2012.03.005. PMID: 22656408.
41. La Vignera S, Condorelli RA, Di Mauro M, D'Agata R, Vicari E, Calogero AE. Seminal vesicles and diabetic neuropathy: ultrasound evaluation. *J Androl*. 2011 Sep-Oct;32(5):478-83. doi: 10.2164/jandrol.110.011676. Epub 2010 Dec 16. PMID: 21164143.
42. Whitfield M, Pollet-Villard X, Levy R, Drevet JR, Saez F. Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. *Asian J Androl*. 2015 Sep-Oct;17(5):742-8. doi: 10.4103/1008-682X.155536. PMID: 26067871; PMCID: PMC4577583.

43. Pons-Rejraji H, Brugnion F, Sion B, Maqdasy S, Gouby G, Pereira B, Marceau G, Gremeau AS, Drevet J, Grizard G, Janny L, Tauveron I. Evaluation of atorvastatin efficacy and toxicity on spermatozoa, accessory glands, and gonadal hormones of healthy men: a pilot prospective clinical trial. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 Jul 12; 12:65. doi: 10.1186/1477-7827-12-65. PMID: 25016482; PMCID: PMC4114109.
44. Laganà AS, Vitale SG, Iaconianni P, Gatti S, Padula F. Male Infertility during Antihypertensive Therapy: Are We Addressing Correctly the Problem? *Int J Fertil Steril*. 2016 Oct-Dec;10(3):267-269. doi: 10.22074/ijfs.2016.4633. Epub 2016 Sep 5. PMID: 27695607; PMCID: PMC5023036.
45. Ministero della Salute. Quaderni della Salute.
46. Pacifici R, Altieri I, Gandini L, Lenzi A, Pichini S, Rosa M, Zuccaro P, Dondero F. Nicotine, cotinine, and trans-3-hydroxycotinine levels in seminal plasma of smokers: effects on sperm parameters. *Ther Drug Monit*. 1993 Oct;15(5):358-63. doi: 10.1097/00007691-199310000-00002. PMID: 8249041.
47. Ochedalski T, Lachowicz-Ochedalska A, Dec W, Czechowski B. Badania nad wpływem palenia tytoniu na stezenie wybranych hormonów w surowicy krwi u młodych mężczyzn [Examining the effects of tobacco smoking on levels of certain hormones in serum of young men]. *Ginekol Pol*. 1994 Feb;65(2):87-93. Polish. PMID: 8070716.
48. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int*. 2006 Feb;97(2):324-6. doi: 10.1111/j.1464-410X.2005.05906.x. PMID: 16430638.
49. Emanuele MA, Emanuele NV. Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health Res World*. 1998;22(3):195-201. PMID: 15706796; PMCID: PMC6761906.
50. Darby E, Anawalt BD. Male hypogonadism: an update on diagnosis and treatment. *Treat Endocrinol*;4(5): 293-309. doi:10.2165/00024677-200504050-00003. PMID: 16185098.
51. Gaur DS, Talekar MS, Pathak VP. Alcohol intake and cigarette smoking: impact of two major lifestyle factors on male fertility. *Indian J Pathol Microbiol*. 2010 Jan-Mar;53(1):35-40. doi: 10.4103/0377-4929.59180. PMID: 20090219.
52. Jensen TK, Swan SH, Skakkebaek NE, Rasmussen S, Jørgensen N. Caffeine intake and semen quality in a population of 2,554 young Danish men. *Am J Epidemiol*. 2010 Apr 15;171(8):883-91. doi: 10.1093/aje/kwq007. Epub 2010 Mar 25. PMID: 20338976.

53. Dias TR, Alves MG, Bernardino RL, Martins AD, Moreira AC, Silva J, Barros A, Sousa M, Silva BM, Oliveira PF. Dose-dependent effects of caffeine in human Sertoli cells metabolism and oxidative profile: relevance for male fertility. *Toxicology*. 2015 Feb 3; 328:12-20. doi: 10.1016/j.tox.2014.12.003. Epub 2014 Dec 5. PMID: 25486098.
54. Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. Lifestyle, and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med*. 2014 Feb;60(1): 43-51. doi: 10.3109/19396368.2013.840687. Epub 2013 Sep 30. PMID: 24074254.
55. Parazzini F, Marchini M, Tozzi L, Mezzopane R, Fedele L. Risk factors for unexplained dyspermia in infertile men: a case-control study. *Arch Androl*. 1993 Sep-Oct;31(2):105-13. doi: 10.3109/01485019308988387. PMID: 8215689.
56. Farkas I, Kalló I, Deli L, Vida B, Hrabovszky E, Fekete C, Moenter SM, Watanabe M, Liposits Z. Retrograde endocannabinoid signaling reduces GABAergic synaptic transmission to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2010 Dec;151(12):5818-29. doi: 10.1210/en.2010-0638. Epub 2010 Oct 6. PMID: 20926585; PMCID: PMC3858799.
57. Vallejo-Medina P, Sierra JC. Effect of drug use and influence of abstinence on sexual functioning in a Spanish male drug-dependent sample: a multisite study. *J Sex Med*. 2013 Feb;10(2):333-41. doi: 10.1111/j.1743-6109.2012.02977.x. Epub 2012 Oct 23. PMID: 23095213.
58. Alhama J, Fuentes-Almagro CA, Abril N, Michán C. Alterations in oxidative responses and post-translational modification caused by DDE in *Mus spretus* testes reveal Cys oxidation status in proteins related to cell-redox homeostasis and male fertility. *Sci Total Environ*. 2018 Sep 15; 636:656-669. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.04.305. Epub 2018 May 1. PMID: 29723838.
59. Meeker JD, Hauser R. Exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and male reproduction. 2010Apr;56(2): 122-31. doi:10.3109/19396360903443658. PMID: 20377311.
60. Figà-Talamanca I, Dell'Orco V, Pupi A, Dondero F, Gandini L, Lenzi A, Lombardo F, Scavalli P, Mancini G. Fertility, and semen quality of workers exposed to high temperatures in the ceramics industry. *Reprod Toxicol*. 1992;6(6):517-23. doi: 10.1016/0890-6238(92)90036-s. PMID: 1288761.
61. Krenn CG, Herczeg K, Albrecht A, Koppensteiner E, Mikoleit B, Rahmani A, Stranzinger J, Weixelberger A, Wieser S, Unfried E, et al. Radioaktives Cäsium 137 und Cäsium 134 in der Follikel- und Samenflüssigkeit [Radioactive cesium 137 and cesium 134 in follicle and seminal fluid]. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1990 May;50(5):394-6. German. doi: 10.1055/s-2008-1026268. PMID: 2373336.

62. Qi G, Zuo X, Zhou L, Aoki E, Okamura A, Watanebe M, Wang H, Wu Q, Lu H, Tuncel H, Watanabe H, Zeng S, Shimamoto F. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) exposure on B6C3F1 mice. *Environ Health Prev Med.* 2015 Jul;20(4):287-93. doi: 10.1007/s12199-015-0463-5. Epub 2015 May 5. PMID: 25939981; PMCID: PMC4491062.
63. Salas-Huetos A, James ER, Aston KI, Jenkins TG, Carrell DT. Diet, and sperm quality: Nutrients, foods, and dietary patterns. *Reprod Biol.* 2019 Sep;19(3):219-224. doi: 10.1016/j.repbio.2019.07.005. Epub 2019 Jul 30. PMID: 31375368.
64. Pecora G, Sciarra F, Gangitano E, Venneri MA. How Food Choices Impact on Male Fertility. *Curr Nutr Rep.* 2023 Dec;12(4):864-876. doi: 10.1007/s13668-023-00503-x. Epub 2023 Oct 20. PMID: 37861951; PMCID: PMC10766669.
65. Axmon A, Rylander L, Rignell-Hydbom A. Reproductive toxicity of seafood contaminants: prospective comparisons of Swedish east and west coast fishermen's families. *Environ Health.* 2008 May 28; 7:20. doi: 10.1186/1476-069X-7-20. PMID: 18507855; PMCID: PMC2438351.
66. Reed KE, Camargo J, Hamilton-Reeves J, Kurzer M, Messina M. Neither soy nor isoflavone intake affects male reproductive hormones: An expanded and updated meta-analysis of clinical studies. *Reprod Toxicol.* 2021 Mar; 100:60-67. doi: 10.1016/j.reprotox.2020.12.019. Epub 2020 Dec 28. PMID: 33383165.
67. Valle-Hita C, Salas-Huetos A, Fernández de la Puente M, Martínez MÁ, Canudas S, Palau-Galindo A, Mestres C, Manzanares JM, Murphy MM, Marquès M, Salas-Salvadó J, Babio N. Ultra-processed food consumption and semen quality parameters in the Led-Fertyl study. *Hum Reprod Open.* 2024 Jan 17;2024(1):hoae001. doi: 10.1093/hropen/hoae001. PMID: 38283622; PMCID: PMC10813743.
68. Petre GC, Francini-Pesenti F, Di Nisio A, De Toni L, Grande G, Mingardi A, Cusmano A, Spinella P, Ferlin A, Garolla A. Observational Cross-Sectional Study on Mediterranean Diet and Sperm Parameters. *Nutrients.* 2023 Dec 1;15(23):4989. doi: 10.3390/nu15234989. PMID: 38068847; PMCID: PMC10707842.
69. Benatta M, Kettache R, Buchholz N, Trinchieri A. The impact of nutrition and lifestyle on male fertility. *Arch Ital Urol Androl.* 2020 Jun 24;92(2). doi: 10.4081/aiua.2020.2.121. PMID: 32597116.
70. Józków P, Mędraś M, Lwow F, Zagrodna A, Słowińska-Lisowska M. Associations between physical activity and semen quality in young healthy men. *Fertil Steril.* 2017 Feb;107(2):373-378.e2. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.11.004. Epub 2016 Dec 2. PMID: 27919439.

71. García-Conesa MT, Philippou E, Pafilas C, Massaro M, Quarta S, Andrade V, Jorge R, Chervenkov M, Ivanova T, Dimitrova D, Maksimova V, Smilkov K, Ackova DG, Miloseva L, Ruskovska T, Deligiannidou GE, Kontogiorgis CA, Pinto P. Exploring the Validity of the 14-Item Mediterranean Diet Adherence Screener (MEDAS): A Cross-National Study in Seven European Countries around the Mediterranean Region. *Nutrients*. 2020 Sep 27;12(10):2960. doi: 10.3390/nu12102960.
72. Cade J, Thompson R, Burley V, Warm D. Development, validation, and utilisation of food-frequency questionnaires - a review. *Public Health Nutr*. 2002 Aug;5(4):567-87. doi: 10.1079/PHN2001318. PMID: 12186666.
73. Freedman LS, Midthune D, Arab L, Prentice RL, Subar AF, Willett W, Neuhouser ML, Tinker LF, Kipnis V. Combining a Food Frequency Questionnaire With 24-Hour Recalls to Increase the Precision of Estimation of Usual Dietary Intakes-Evidence from the Validation Studies Pooling Project. *Am J Epidemiol*. 2018 Oct 1;187(10):2227-2232. doi: 10.1093/aje/kwy126.
74. Monteiro CA, Cannon G, Lawrence M, Laura Da Costa Louzada M, Machado PP. Ultra-processed foods, diet quality, and health using the NOVA classification system.
75. Salas-Huetos A, Moraleda R, Giardina S, Anton E, Blanco J, Salas-Salvadó J, Bulló M. Effect of nut consumption on semen quality and functionality in healthy men consuming a Western-style diet: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*. 2018 Nov 1;108(5):953-962. doi: 10.1093/ajcn/nqy181. PMID: 30475967.
76. Safarinejad MR, Safarinejad S. The roles of omega-3 and omega-6 fatty acids in idiopathic male infertility. *Asian J Androl*. 2012 Jul;14(4):514-5. doi: 10.1038/aja.2012.46. Epub 2012 Jun 4. PMID: 22659579; PMCID: PMC3720081.
77. Funes AK, Simón L, Colombo R, Avena MV, Monclús M, Crescitelli J, Cabrillana ME, Conte MI, Cayado N, Boarelli P, Fornés MW, Saez Lancellotti TE. Impact of high fat diet on the sterol regulatory element-binding protein 2 cholesterol pathway in the testicle. *Mol Hum Reprod*. 2021 May 8;27(5): gaab023. doi: 10.1093/molehr/gaab023. PMID: 33787903.
78. Abdollahzadeh S, Riasi A, Tavalae M, Jafarpour F, Nasr-Esfahani MH. Omega 6/Omega 3 Ratio Is High in Individuals with Increased Sperm DNA fragmentation. *Reprod Sci*. 2023 Dec;30(12):3469-3479. doi: 10.1007/s43032-023-01313-w. Epub 2023 Aug 10. PMID: 37563480.
79. Tavilani H, Doosti M, Abdi K, Vaisiraygani A, Joshaghani HR. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. *Andrologia*. 2006 Oct;38(5):173-8. doi: 10.1111/j.1439-0272.2006.00735.x. PMID: 16961570.
80. Ferramosca A, Moscatelli N, Di Giacomo M, Zara V. Dietary fatty acids influence sperm quality and function. *Andrology*. 2017 May;5(3):423-430. doi: 10.1111/andr.12348. Epub 2017 Mar 23. PMID: 28334508.

81. La Vignera S, Condorelli RA, Vicari E, Tumino D, Morgia G, Favilla V, Cimino S, Calogero AE. Markers of semen inflammation: supplementary semen analysis? *J Reprod Immunol*. 2013 Nov;100(1):2-10. doi: 10.1016/j.jri.2013.05.001. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23850173.
82. Karayiannis D, Kontogianni MD, Mendorou C, Douka L, Mastrominas M, Yiannakouris N. Association between adherence to the Mediterranean diet and semen quality parameters in male partners of couples attempting fertility. *Hum Reprod*. 2017 Jan;32(1):215-222. doi: 10.1093/humrep/dew288. Epub 2016 Nov 14. PMID: 27994040.
83. Ricci E, Bravi F, Noli S, Ferrari S, De Cosmi V, La Vecchia I, Cavadini M, La Vecchia C, Parazzini F. Mediterranean diet and the risk of poor semen quality: cross-sectional analysis of men referring to an Italian Fertility Clinic. *Andrology*. 2019 Mar;7(2):156-162. doi: 10.1111/andr.12587. Epub 2019 Jan 20. PMID: 30663272.
84. Salas-Huetos A, Babio N, Carrell DT, Bulló M, Salas-Salvadó J. Adherence to the Mediterranean diet is positively associated with sperm motility: A cross-sectional analysis. *Sci Rep*. 2019 Mar 4;9(1):3389. doi: 10.1038/s41598-019-39826-7. PMID: 30833599; PMCID: PMC6399329.
85. Cutillas-Tolín A, Mínguez-Alarcón L, Mendiola J, López-Espín JJ, Jørgensen N, Navarrete-Muñoz EM, Torres-Cantero AM, Chavarro JE. Mediterranean and western dietary patterns are related to markers of testicular function among healthy men. *Hum Reprod*. 2015 Dec;30(12):2945-55. doi: 10.1093/humrep/dev236. Epub 2015 Sep 25. PMID: 26409012; PMCID: PMC4643528.
86. Arab A, Rafie N, Mansourian M, Miraghajani M, Hajianfar H. Dietary patterns, and semen quality: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Andrology*. 2018 Jan;6(1):20-28. doi: 10.1111/andr.12430. Epub 2017 Oct 12. PMID: 29024507.
87. Salas-Huetos A, Bulló M, Salas-Salvadó J. Dietary patterns, foods, and nutrients in male fertility parameters and fecundability: a systematic review of observational studies. *Hum Reprod Update*. 2017 Jul 1;23(4):371-389. doi: 10.1093/humupd/dmx006. PMID: 28333357.
88. World Health Organization.
89. Jardim MZ, Costa BVL, Pessoa MC, Duarte CK. Ultra-processed foods increase noncommunicable chronic disease risk. *Nutr Res*. 2021 Nov; 95:19-34. doi: 10.1016/j.nutres.2021.08.006. Epub 2021 Sep 11. PMID: 34798466.
90. Du S, Kim H, Crews DC, White K, Rebholz CM. Association Between Ultraprocessed Food Consumption and Risk of Incident CKD: A Prospective Cohort Study. *Am J Kidney Dis*. 2022 Nov;80(5):589-598.e1. doi: 10.1053/j.ajkd.2022.03.016. Epub 2022 Jun 6. PMID: 35679994; PMCID: PMC9613500.

91. Srouf B, Fezeu LK, Kesse-Guyot E, Allès B, Debras C, Druésne-Pecollo N, Chazelas E, Deschasaux M, Hercberg S, Galan P, Monteiro CA, Julia C, Touvier M. Ultra-processed Food Consumption and Risk of Type 2 Diabetes Among Participants of the NutriNet-Santé Prospective Cohort. *JAMA Intern Med.* 2020 Feb 1;180(2):283-291. doi: 10.1001/jamainternmed.2019.5942. PMID: 31841598; PMCID: PMC6990737.
92. Nardocci M, Leclerc BS, Louzada ML, Monteiro CA, Batal M, Moubarac JC. Consumption of ultra-processed foods and obesity in Canada. *Can J Public Health.* 2019 Feb;110(1):4-14. doi: 10.17269/s41997-018-0130-x. Epub 2018 Sep 20. Erratum in: *Can J Public Health.* 2018 Oct 23; PMID: 30238324; PMCID: PMC6964616.
93. Juul F, Parekh N, Martinez-Steele E, Monteiro CA, Chang VW. Ultra-processed food consumption among US adults from 2001 to 2018. *Am J Clin Nutr.* 2022 Jan 11;115(1):211-221. doi: 10.1093/ajcn/nqab305. PMID: 34647997.
94. Fiolet T, Srouf B, Sellem L, Kesse-Guyot E, Allès B, Méjean C, Deschasaux M, Fassier P, Latino-Martel P, Beslay M, Hercberg S, Lavalette C, Monteiro CA, Julia C, Touvier M. Consumption of ultra-processed foods and cancer risk: results from NutriNet-Santé prospective cohort. *BMJ.* 2018 Feb 14;360: k322. doi: 10.1136/bmj.k322. PMID: 29444771; PMCID: PMC5811844.
95. Dominguez LJ, Veronese N, Di Bella G, Cusumano C, Parisi A, Tagliaferri F, Ciriminna S, Barbagallo M. Mediterranean diet in the management and prevention of obesity. *Exp Gerontol.* 2023 Apr; 174:112121. doi: 10.1016/j.exger.2023.112121. Epub 2023 Feb 17. PMID: 36792040.
96. Esposito K, Maiorino MI, Bellastella G, Chiodini P, Panagiotakos D, Giugliano D. A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: a systematic review with meta-analyses. *BMJ Open.* 2015 Aug 10;5(8): e 008222. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008222. PMID: 26260349; PMCID: PMC4538272.
97. Filippou C, Tatakis F, Polyzos D, Manta E, Thomopoulos C, Nihoyannopoulos P, Tousoulis D, Tsioufis K. Overview of salt restriction in the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) and the Mediterranean diet for blood pressure reduction. *Rev Cardiovasc Med.* 2022 Jan 19;23(1):36. doi: 10.31083/j.rcm.2301036. PMID: 35092228.
98. Jennings A, Berendsen AM, de Groot LCPGM, Feskens EJM, Brzozowska A, Sicinska E, Pietruszka B, Meunier N, Caumon E, Malpuech-Brugère C, Santoro A, Ostan R, Franceschi C, Gillings R, O' Neill CM, Fairweather-Tait SJ, Minihane AM, Cassidy A. Mediterranean-Style Diet Improves Systolic Blood Pressure and Arterial Stiffness in Older Adults. *Hypertension.* 2019 Mar;73(3):578-586. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12259. PMID: 30636547; PMCID: PMC6380440.

99. Rees K, Takeda A, Martin N, Ellis L, Wijesekara D, Vepa A, Das A, Hartley L, Stranges S. Mediterranean-style diet for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 13;3(3):CD009825. doi: 10.1002/14651858.CD009825.pub3. PMID: 30864165; PMCID: PMC6414510.
100. Katib, A. (2015) Mechanisms linking obesity to male infertility. *Cent European J Urol.* 68, 79–85.
101. Suliga E, Głuszek S. The relationship between diet, energy balance and fertility in men. *Int J Vitam Nutr Res.* 2020 Oct;90(5-6):514-526. doi: 10.1024/0300-9831/a000577. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30967104.
102. Martins, A.D., Moreira, A.C., Sá, R., Monteiro, M.P., Sousa, M. Carvalho, R.A., Silva, B.M., Oliveira, P.F., & Alves, M.G. (2015) Leptin modulates human Sertoli cells acetate production and glycolytic profile: a novel mechanism of obesity-induced male infertility? *Biochemical Biopsy's Acta.* 1852, 1824–1832.
103. Palmer, N.O., Bakos, H.W., Fullston, T., & Lane, M. (2012) Impact of obesity on male fertility, sperm function and molecular composition. *Spermatogenesis.* 2, 253–263.
104. MacDonald, A.A., Herbison, G.P., Showell, M., & Farquhar, C.M. (2010) The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update.*16, 293–311.
105. MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010 May-Jun;16(3):293-311. doi: 10.1093/humupd/dmp047. Epub 2009 Nov 4. PMID: 19889752.
106. Campbell, J.M., Lane, M., Owens, J.A., & Bakos, H.W. (2015) Paternal obesity negatively affects male fertility and assisted reproduction outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Reprod Biomed Online.* 31, 593–604.
107. Gutin I. In *BMI We Trust: Reframing the Body Mass Index as a Measure of Health.* *Soc Theory Health.* 2018 Aug;16(3):256-271. doi: 10.1057/s41285-017-0055-0. Epub 2017 Oct 25. PMID: 31007613; PMCID: PMC6469873.
108. Jabłonowska-Lietz B, Wrzosek M, Włodarczyk M, Nowicka G. New indexes of body fat distribution, visceral adiposity index, body adiposity index, waist-to-height ratio, and metabolic disturbances in the obese. *Kardiol Pol.* 2017;75(11):1185-1191. doi: 10.5603/ KP. a2017.0149. Epub 2017 Jul 17. PMID: 28715064.

109. Cousin O, Vandecandelaere A, Bosquet D, Lefranc E, Scheffler F, Copin H, Mattoug S, Ben Khalifa M, Cabry R. Cigarette électronique et fertilité: vrais ou faux amis? [Electronic cigarettes and fertility: True or false friends?]. *Gynecol Obstet Fertil Senol.* 2023 Jul-Aug;51(7-8):378-383. French. doi: 10.1016/j.gofs.2023.03.003. Epub 2023 Mar 15. PMID: 3693159

Nella stesura di questa tesi, è stato per me fondamentale il supporto di tante persone: senza il loro aiuto il mio lavoro non sarebbe stato così completo e il mio percorso sarebbe stato sicuramente più difficile.

Un sentito ringraziamento va al mio relatore, il Professor Ferlin, che mi ha seguita, con disponibilità e gentilezza, in ogni step della realizzazione dell'elaborato, fin dalla scelta dell'argomento. Non meno importante è stato l'aiuto dei miei correlatori, il Dottor De Toni e il Dottor Graziani, per i loro consigli puntuali e le loro critiche costruttive.

Non posso esimermi dal ringraziare il personale del laboratorio di Seminologia dell'UOC di Andrologia e Medicina della Riproduzione presso il quale ho svolto la raccolta dei dati. Ritengo una grande fortuna aver avuto la possibilità di svolgere il mio lavoro di tesi in un ambiente lavorativo così accogliente, interessante e dinamico. Grazie all'Infermiere Stefano per la sua dolcezza e disponibilità.

Ringrazio infinitamente tutta la mia famiglia e la mia amica più cara, Mayla che mi hanno sempre motivata a dare il meglio e hanno condiviso con me gioie e dolori di questo percorso universitario. Grazie a Giorgia, Arianna, Alessandra, Stefano, alle Ciudetti per essere una meravigliosa costante della mia vita, nel bene e nel male. Grazie ai miei coinquilini e amici Roberta e Luca, per avermi fatta sentire a casa.

Una menzione speciale va ad Enea, creatura speciale, sostegno psicologico e compagno fidato nelle lunghe sessioni estive.