



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina

Direttore: Roberto Vettor

UOC di Andrologia e Medicina della riproduzione

Direttore: prof. Alberto Ferlin

TESI DI LAUREA

**L'impatto dell'età alla prima visita sul metabolismo glicolipidico,
sul metabolismo osseo e sul potenziale di fertilità nei pazienti con
sindrome di Klinefelter.**

Relatore: Prof. Andrea Garolla

Correlatore: Dott. Andrea Graziani

Laureanda: Noemi Sagone

2022/2023

INDICE

1. Riassunto	1
2. Abstract	3
3. Testo	
3.1. Introduzione	5
3.2. Eziologia e fattori di rischio	5
3.3. Presentazione clinica	6
3.4. Effetti dell'extra cromosoma X	10
3.5. Alterazioni testicolari	10
3.6. Assetto ormonale	12
3.7. Omeostasi del glucosio	13
3.8. Mineralizzazione ossea	15
3.9. Altre comorbidità	19
3.9.1. Cardiovascolari	
3.9.2. Neoplasie	
3.9.3. Patologie autoimmuni	
3.10. Diagnosi	22
3.11. Terapia	24
3.12. Potenziale di fertilità	26
3.12.1. Criopreservazione da liquido seminale	
3.12.2. TESE - Testicular Sperm Extraction	
3.12.3. Aspetti etici	
3.13. Qualità di vita	33
4. Scopo dello studio	34
5. Materiali e metodi	34

5.1. Antropometria	
5.2. Esami ematochimici ed ormonali	
5.3. Ecocolordoppler	
5.4. Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA)	
5.5. Testicular Sperm Extraction (TESE)	
5.6. Analisi statistica	
6. Risultati	38
7. Discussione	52
7.1. Antropometria e metabolismo glicolipidico	52
7.2. Mineralizzazione ossea	54
7.3. Potenziale di fertilità	55
8. Conclusioni	57
9. Bibliografia	58

1. RIASSUNTO

Introduzione

La sindrome di Klinefelter (SK) è una condizione causata da un'anomalia numerica dei cromosomi sessuali e si caratterizza per la presenza, nei soggetti di sesso maschile, di 2 o più cromosomi X.

A causa dell'aneuploidia cromosomica, la spermatogenesi è alterata o del tutto assente, motivo per cui questi soggetti sono spesso infertili. Tale sindrome si correla anche ad alterazioni dell'omeostasi del glucosio, alterazioni della mineralizzazione ossea, nonché comorbidità cardiovascolari, tromboembolismo venoso, neoplasie e patologie autoimmuni.

Pertanto, è importante che i pazienti vengano presi in carico precocemente e seguano un percorso di follow-up.

Scopo dello studio

La presente tesi di laurea si propone di indagare il metabolismo glicolipidico, le alterazioni del metabolismo osseo e il potenziale di fertilità dei soggetti con Sindrome di Klinefelter in base all'età alla prima visita.

Materiali e metodi

In questo studio retrospettivo sono stati inclusi 445 pazienti affetti da SK con genotipo classico 47 XXY ed età inferiore a 50 anni afferenti al Centro di Riferimento Regionale della UOC Andrologia e Medicina della Riproduzione dell'Azienda Ospedale - Università di Padova.

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: gruppo A (n=136) con età alla prima visita tra 14 e 24 anni; gruppo B (n=152) con età alla prima visita tra 25 e 34 anni; gruppo C (n=157) con età alla prima visita tra 35 e 49 anni. Nei pazienti sono state effettuate misurazioni antropometriche, esami ematochimici ed ormonali, ecocolordoppler scrotale e Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA).

Un sottogruppo di pazienti ha eseguito la biopsia testicolare.

Risultati

L'età media alla prima visita è stata di $30,1 \pm 0,4$ anni mentre l'età media alla diagnosi è stata di $24,5 \pm 0,5$ anni.

L'età alla prima visita correla significativamente con l'aumento del girovita, del BMI, della glicemia, dell'emoglobina glicata, del colesterolo totale, del colesterolo LDL e dei trigliceridi e con una riduzione significativa del testosterone totale, del testosterone libero calcolato, della calcemia, della fosforemia, della vitamina D e dello Z score lombare.

Dopo aver suddiviso i pazienti in 3 gruppi in base all'età alla prima visita, è emerso che dai 25 anni in poi è più frequente riscontrare un aumento della circonferenza addominale (> 94 cm), sovrappeso e obesità ($BMI \geq kg/m^2$) e ipercolesterolemia ($LDL > 116$ mg/dL).

Da questi dati emerge che le alterazioni del metabolismo glicolipidico e fosfocalcico sono significativamente più frequenti già a partire dai 25 anni e pertanto i pazienti andrebbero presi in carico prima di tale età.

Dei 445 pazienti, 199 hanno eseguito la biopsia testicolare (45%), con un tasso di recupero del 36,2%. I tassi di recupero sono stati, nei gruppi A, B e C, rispettivamente del 46%, 37% e 26%.

Conclusioni

Una diagnosi precoce della sindrome di Klinefelter e una precoce presa in carico sono di fondamentale importanza per prevenire o ridurre le comorbidità nella vita futura di questi pazienti. Il metabolismo glucidico, lipidico e fosfo-calcico, infatti, peggiorano in base all'età alla prima visita. Per modificare il corso della SK sarebbe importante diagnosticarla quanto prima possibile.

Una precoce presa in carico del paziente sembra associarsi ad una maggiore probabilità di recupero di spermatozoi tramite la biopsia testicolare: il tasso di recupero, infatti, è maggiore nei soggetti più giovani.

Al fine di ridurre la probabilità che la sindrome di Klinefelter resti misconosciuta o la diagnosi avvenga tardivamente, sono di grande importanza le campagne di prevenzione e l'aumento della consapevolezza della sindrome tra i professionisti del campo medico.

2. ABSTRACT

Introduction

Klinefelter syndrome (KS) is a condition caused by a numerical abnormality of sex chromosomes and is characterized by the presence, in male subjects, of 2 or more X chromosomes.

Due to chromosomal aneuploidy, spermatogenesis is altered or completely absent, which is why these subjects are often infertile. This syndrome is also related to alterations in glucose homeostasis, alterations in bone mineralization, as well as cardiovascular comorbidities, venous thromboembolism, malignant neoplasms and autoimmune diseases.

Therefore, it is important patients' follow-up.

Aim of the study

This dissertation aims to investigate the glycolipid metabolism, the alterations of bone metabolism and the fertility potential of subjects with Klinefelter's syndrome based on age at the first visit.

Materials and methods

This retrospective study included 445 patients affected by KS with the classic 47 XXY genotype and less than 50 years of age followed by the Regional Reference Center located within the Andrology and Reproductive Medicine Unit of the Hospital - University of Padua.

Patients were divided into three groups: group A (n=136) with age at first visit between 14 and 24 years; group B (n=152) with age at first visit between 25 and 34 years; group C (n=157) with age at first visit between 35 and 49 years. Anthropometric measurements, haematochemical and hormonal tests, scrotal eco-color Doppler and Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) were performed in the patients.

A subset of patients underwent testicular biopsy.

Results

The mean age at the first visit was 30.1 ± 0.4 years while the mean age at diagnosis was 24.5 ± 0.5 years.

Age at first visit correlates significantly with increases in waist size, BMI, blood glucose, glycated hemoglobin, total cholesterol, LDL cholesterol, and triglycerides, and with significant decreases in total testosterone, calculated free testosterone, blood calcium, phosphorus, vitamin D, and lumbar Z score.

After dividing the patients into 3 groups based on age at the first visit, it emerged that from 25 years onwards it is more frequent to find an increase in abdominal circumference (> 94 cm), overweight and obesity ($\text{BMI} \geq \text{kg/m}^2$) and hypercholesterolaemia ($\text{LDL} > 116$ mg/dL).

From these data it emerges that the alterations of glycolipidic and phosphocalcic metabolism are significantly more frequent starting from the age of 25 and therefore patients should be taken in charge before this age.

Of the 445 patients, 199 underwent testicular biopsy (45%), with a recovery rate of 36.2%. The recovery rates in groups A, B and C were 46%, 37% and 26%, respectively.

Conclusions

Early diagnosis of Klinefelter syndrome and early management are important for preventing or reducing comorbidities of those patients later in life. Glucidic, lipid and phospho-calcium metabolism, in fact, worsen based on age at the first visit. To modify the course of KS it would be important to diagnose it as early as possible.

Early management of the patient seems to be associated with a greater probability of recovery of sperm through testicular biopsy: the recovery rate, in fact, is higher in younger subjects.

In order to reduce the likelihood that Klinefelter syndrome remains undetected or diagnosed late, prevention campaigns and raising awareness of the syndrome among medical professionals is important.

3. TESTO

3.1. INTRODUZIONE

Descritta per la prima volta nel 1942 (1), la sindrome di Klinefelter (SK) è causata da un'anomalia numerica dei cromosomi sessuali in soggetti di sesso maschile per la presenza di 1 o più cromosomi X sovranumerari.

L'incidenza della sindrome di Klinefelter è pari a 1 maschio nato vivo su 500 (1:500) (2). Uno studio sulla prevalenza della SK in Giappone ha riscontrato una prevalenza di 60 su 100.000, indicando dunque la presenza di differenze di prevalenze in base all'etnia (3).

L'incidenza risulta di per sé elevata ma, nonostante ciò, è possibile che sia comunque sotto-stimata. Infatti, si ritiene che i 2/3 dei casi restino non diagnosticati. Il motivo sarebbe da ricercarsi soprattutto nella presentazione fenotipica, spesso molto sfumata (4).

La diagnosi precoce della sindrome di Klinefelter è di fondamentale importanza per prevenire o ridurre le comorbidità nella vita futura dei pazienti. Una diagnosi precoce permette una tempestiva terapia androgenica sostitutiva (*TRT - Testosterone Replacement Therapy*) che ha un effetto positivo sul metabolismo, sulla composizione corporea e sulla salute dell'osso; inoltre, una diagnosi precoce sembrerebbe avere un impatto positivo sulla funzionalità quotidiana e sulla qualità di vita (5).

Al contrario, il ritardo della diagnosi o la mancata diagnosi rappresenterebbero problemi da non sottostimare; il ritardo diagnostico potrebbe avere un forte impatto sull'*outcome* della terapia androgenica sostitutiva e sull'*outcome* delle tecniche di riproduzione assistita (6).

3.2. EZIOLOGIA E FATTORI DI RISCHIO

Il nome della sindrome deriva dal suo scopritore, Klinefelter, che nel 1942 pubblicò un report su 9 uomini con ginecomastia, riduzione dei peli facciali e corporei, testicoli atrofici e inability di produrre spermatozoi (1). Successivamente, nel 1959, si scoprì che tutti questi uomini erano accomunati dal fatto di avere un cromosoma X in più rispetto al classico genotipo maschile 46 XY (7).

La *forma classica* (non-mosaico) della sindrome di Klinefelter (47, XXY), che si presenta nel 90% dei casi, è causata dalla mancata disgiunzione dei cromosomi sessuali durante la meiosi della gametogenesi (oogenesi o spermatogenesi) (2). Gli errori della gametogenesi materna o paterna sono, con la stessa probabilità, responsabili del cariotipo 47, XXY e questo contrasta con la maggior parte delle aneuploidie autosomiche (es. trisomia 21, sindrome di Down), nelle quali gli errori sono imputabili, principalmente, alla meiosi I materna (8).

L'origine del cromosoma X in eccesso sembrerebbe essere associato a differenze fenotipiche, anche se l'evidenza non è conclusiva. In particolare, uno studio di *Wikstrom et al*, riporta che quando l'origine del cromosoma X in eccesso è paterna l'esordio della sindrome è più tardivo e la progressione è più lenta (9). Tuttavia, secondo *Jacobs et al*, l'origine del cromosoma X in eccesso non avrebbe particolari influenze sul fenotipo dei pazienti (8).

Oltre alla forma classica, esiste anche la *forma mosaico*, ovvero con genotipo 46 XY/47 XXY. In questo caso, l'errore genetico alla base della sindrome è rappresentato dalla mancata disgiunzione dei cromosomi sessuali durante la mitosi nello zigote. La forma mosaico si presenta nel 10% degli individui con questa condizione.

Sono state riportate anche altre varianti genotipiche come ad esempio 48 XXYY o 48 XXXY ma si tratta di condizioni molto rare.

La severità del quadro fenotipico sembra essere correlata al numero di cromosomi X in eccesso. Di conseguenza, i soggetti con genotipo mosaico mostrano tendenzialmente un quadro fenotipico più sfumato mentre nei soggetti con genotipo 48 XXXY il quadro clinico è più marcato.

L'età materna avanzata ha un impatto significativo sulla prevalenza della sindrome di Klinefelter. E' stato osservato un rischio aumentato di 4 volte nelle madri con età > 40 anni, rispetto a madri di età < 24 anni (10).

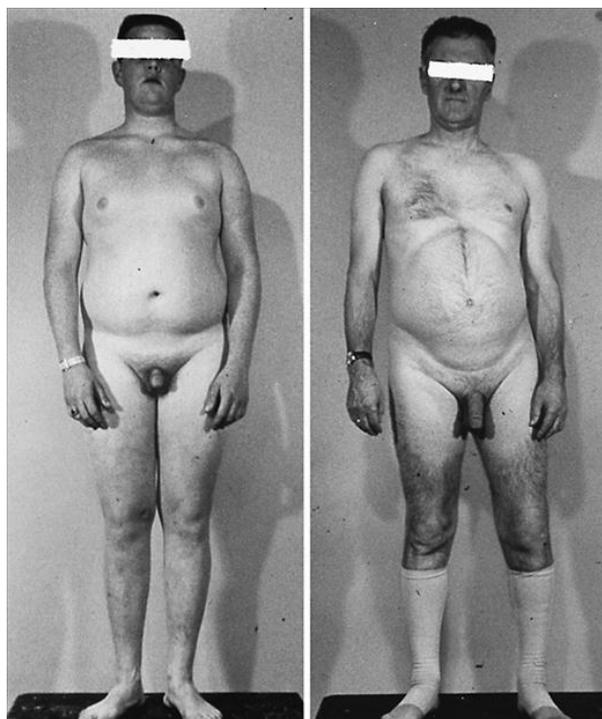
3.3. PRESENTAZIONE CLINICA

Alcuni soggetti affetti dalla sindrome di Klinefelter presentano un aspetto fisico caratteristico, con elevata statura (generalmente al di sopra dei 184 cm), arti lunghi, fianchi larghi (aspetto ginoide)(**figura 1**). L'aumentata lunghezza degli arti inferiori è il principale fattore determinante l'elevata statura mentre l'aumentata lunghezza degli arti superiori determinata un'apertura delle braccia superiore alla norma (11).

Tuttavia, le caratteristiche appena elencate non sono sempre presenti e questo contribuisce alla mancata diagnosi o al ritardo diagnostico che spesso si verificano (4).

La maggior parte dei soggetti con sindrome di Klinefelter presenta un quoziente intellettivo (QI) normale o leggermente più basso rispetto alla norma. E' stato osservato un ampio range di quoziente intellettivo ma nella maggior parte dei casi si colloca tra 85 e 90. Molti soggetti affetti, soprattutto adolescenti, presentano difficoltà legate alla conversazione, alla lettura e al linguaggio. Possono essere osservate anche difficoltà comportamentali, tra cui immaturità, insicurezza, timidezza e scarso giudizio (2).

Figura 1 (12) : soggetti di sesso maschile affetti dalla sindrome di Klinefelter con il cariotipo classico 47, XXY (a sinistra) e con mosaicismo (a destra). A sinistra: proporzioni eunucoide, distribuzione femminile del grasso corporeo, ginecomastia, assenza di peli corporei e facciali, pene di dimensioni ridotte e testicoli ipotrofici. A destra: caratteristiche più maschiline, con maggiore distribuzione di peli corporei, pene e testicoli di dimensioni maggiori.



In letteratura è riportato inoltre un aumento della prevalenza dei disturbi dello spettro autistico, deficit di attenzione, iperattività e schizofrenia; tuttavia, i risultati riportati sono incompleti, in quanto i relativi studi non avevano preso in considerazione un'eventuale storia familiare di malattie psichiatriche o disturbi dell'apprendimento. (13).

Le disfunzioni sessuali, come la disfunzione erettile, non sono ancora state studiate a sufficienza. Infatti, attualmente in letteratura esistono solo pochi studi che indagano il rapporto tra la funzionalità sessuale e l'assetto ormonale o tra la funzionalità sessuale e la condizione neuropsicologica dei pazienti. La correlazione tra la disfunzione erettile e la sindrome di Klinefelter è stata indagata da uno studio di *De Rocco et al* (14), che ha concluso come un disturbo della sfera sessuale possa essere una delle possibili presentazioni della sindrome. Infatti, circa il 70% dei pazienti con SK lamenta una riduzione della libido e la presenza di disfunzione erettile dopo i 25 anni (15).

E' noto come il testosterone giochi un ruolo in molti aspetti della funzione sessuale, quali desiderio, orgasmo ed eiaculazione. Dunque, è possibile che la disfunzione erettile sia secondaria all'ipogonadismo normalmente presente in questi pazienti. Dall'altro lato, però, la disfunzione erettile potrebbe anche essere correlata ai disturbi psicologici, anch'essi comuni in questo gruppo di pazienti.

Le caratteristiche cliniche dipendono sia dal cromosoma X sovrannumerario che dagli effetti dell'ipogonadismo (**tabella I**). Effettuare una distinzione tra i segni/sintomi dovuti al difetto genetico e segni/sintomi dovuti all'ipogonadismo è di fondamentale importanza per migliorare l'esito della terapia androgenica sostitutiva, stabilire come effettuare il follow-up e informare il paziente sui risultati attesi (4).

La presentazione clinica tipica è stata definita solo in seguito alla descrizione degli uomini che avevano già ricevuto la diagnosi di sindrome di Klinefelter. Per questo motivo, il fenotipo dei pazienti con sindrome di Klinefelter resta ancora ampiamente sconosciuto (**figura 2**).

Tabella I (4): caratteristiche fenotipiche della SK raggruppate in base al meccanismo patogenetico.

	Segni e sintomi dovuti all'extra cromosoma X	Segni e sintomi dovuti alla carenza di testosterone	Segni e sintomi dovuti sia all'extra cromosoma X che alla carenza di testosterone
Segni	Malformazioni congenite (rare) Arti inferiori più lunghi Testicoli piccoli	Riduzione dei peli corporei e facciali Riduzione della massa muscolare Ginecomastia bilaterale Scheletro eunucoide Alterazione del rapporto estradiolo/testosterone	Fianchi ginoidi Elevata statura Anomalie genitali alla nascita (rare) Gonadotropine elevate Aumento del BMI Anomalie metaboliche Riduzione della BMD
Sintomi	Difficoltà del linguaggio Azoospermia	Riduzione del desiderio sessuale Disfunzione erettile Debolezza	Alterazioni dell'umore
Esordio	Prima della pubertà	Pubertà o età adulta	Prima della pubertà con progressivo peggioramento dopo la pubertà

Figura 2 (4): segni e sintomi della SK in base alla severità del fenotipo clinico.



E' probabile che il fenotipo dipenda dalla severità dell'espressione del difetto genetico, dalla deficienza androgenica e dalla sensibilità del recettore androgenico, definito dal polimorfismo delle ripetizioni CAG. Infatti, i pazienti con mosaicismi hanno un quadro clinico molto sfumato, con testicoli tendenzialmente più grandi dei soggetti con il genotipo classico, mentre i soggetti con una polisomia più grave (ad esempio pazienti con genotipo 48 XXXY) hanno un fenotipo più marcato (4).

Per quanto riguarda il linguaggio e l'eloquio, all'aumentare del numero di cromosomi X, peggiorerebbe la disabilità; per ogni cromosoma X in eccesso, sembrerebbe esserci una riduzione di circa 15 punti di quoziente intellettivo (16).

3.4. EFFETTI DELL'EXTRA CROMOSOMA X

I meccanismi molecolari sottostanti l'insufficienza testicolare e l'eterogeneità delle caratteristiche fisiche e neuro-cognitive di questi pazienti non sono del tutto noti. Sebbene il cromosoma X in eccesso vada incontro ad un processo di inattivazione (come quello che avviene nelle donne con genotipo 46 XX), ci sono dei geni che sfuggono a tale fenomeno. Questi geni, dunque, sono direttamente o indirettamente responsabili del fenotipo della SK (17). Più del 10% dei geni localizzati sul cromosoma X vengono espressi a livello testicolare e dunque giocano un ruolo nella patogenesi della sindrome di Klinefelter (18).

Il cromosoma X in eccesso è responsabile di un processo di ialinizzazione e fibrosi testicolare, che causa insufficienza gonadica primaria che spesso evolve durante l'adolescenza e l'età adulta.

L'espressione del *gene SHOX* (Short-stature Homeobox-containing gene On Chromosome X) presente nel cromosoma X conduce ad elevata statura, arti lunghi e ridotto rapporto tra segmento superiore/segmento inferiore. Dunque, bisogna sottolineare il fatto che l'elevata statura che caratterizza i soggetti SK è attribuibile alla presenza del cromosoma X in eccesso e non alla carenza di testosterone in epoca prepuberale (che potrebbe spiegare una chiusura tardiva delle cartilagini di accrescimento)(11).

La patogenesi degli aspetti neuro-cognitivi resta ancora oscura.

3.5. ALTERAZIONI TESTICOLARI

A causa dell'aneuploidia cromosomica, i soggetti affetti dalla SK vanno incontro ad una progressiva alterazione testicolare correlata ad un'alterata o del tutto assente spermatogenesi. I soggetti affetti, dunque, sono spesso infertili. L'infertilità caratterizza il 90% dei pazienti con forma classica 47 XXY e il 74.7% dei pazienti con mosaicismo (19).

In soggetti prepuberali è stato riscontrato una riduzione del numero o una completa assenza degli spermatogoni, a causa di un progressivo fenomeno di apoptosi (mentre le cellule di Sertoli e le cellule di Leydig appaiono normali), conducendo ad un quadro di *azoospermia*. Studi immunohistochimici hanno dimostrato che, nella fase di adolescenza precoce, nella maggior parte dei ragazzi con SK si può dimostrare la presenza di cellule germinali a livello testicolare, sebbene il numero di spermatogoni sia marcatamente ridotto rispetto alla norma. Nonostante ciò, la pubertà è associata ad una progressiva e accelerata perdita di queste cellule germinali, che potrebbe precedere l'aumento delle gonadotropine (20).

Secondo alcuni studi questo processo di perdita delle cellule germinali inizierebbe già in utero, per poi procedere lentamente durante l'infanzia e accelerare durante la pubertà e l'adolescenza (20).

Oltre alla perdita delle cellule germinali, a livello testicolare si osserva un progressivo processo di fibrosi e ialinizzazione dei tubuli seminiferi; tale processo inizia in genere in seguito alla pubertà.

Wikstrom et al., studiando soggetti SK, hanno dimostrato che le cellule germinali possono essere trovate nei testicoli del 50% dei ragazzi in età prepuberale, sottolineando il fatto che il potenziale di fertilità possa essere compromesso già in questo stadio della vita. Lo stesso studio ha dimostrato, inoltre, che la differenziazione delle cellule germinali si arresta allo stadio di spermatogonio: le cellule, bloccate in questo stadio, vanno incontro ad apoptosi piuttosto che iniziare la meiosi (21).

Secondo altri autori, come *Skakkebaek et al* (22), sarebbe comunque possibile osservare, in alcuni soggetti SK, una spermatogenesi completa e normale. Questa osservazione potrebbe essere spiegata tramite due meccanismi:

1. basso grado di mosaicismo per cui gli spermatogoni con genotipo 46 XY sarebbero in grado di differenziare normalmente diventando spermatozoi normali e maturi;
2. spermatogenesi che si completerebbe normalmente nonostante la presenza di spermatogoni con genotipo 47 XXY.

Sciurano et al. (23), hanno inoltre ipotizzato che gli spermatogoni che vanno incontro al processo di mitosi possano perdere uno dei cromosomi X in eccesso, generando delle cellule con genotipo normale 46 XY. Queste ultime non andrebbero incontro al processo di apoptosi ma prolifererebbero all'interno dei tubuli seminiferi, proseguendo le divisioni mitotiche e meiotiche, portando dunque alla generazione di spermatozoi aploidi. Questo spiegherebbe la possibilità di trovare foci di tubuli seminiferi normali tra molti altri tubuli seminiferi che invece sono sclerotici e fibrotici.

Altri autori, come *Yamamoto et al* (24), suggeriscono invece la possibilità di un processo di riparazione attiva, che permetterebbe il silenziamento o la perdita del cromosoma X in eccesso.

3.6. ASSETTO ORMONALE

Durante l'infanzia, nei soggetti affetti dalla sindrome di Klinefelter, si osservano concentrazioni normali di testosterone, FSH (ormone follicolo-stimolante), LH (ormone luteinizzante), AMH (ormone anti-mülleriano), inibina B e INSL-3 (Insulin-Like Factor 3) (25). Inoltre, all'inizio della pubertà, si ha un iniziale normale aumento di testosterone, INSL-3 e inibina B.

Tuttavia, subito dopo, intorno ai 12-14 anni, ha inizio la degenerazione testicolare, evidenziata da una riduzione del volume testicolare e da un declino della funzione testicolare, che esita in una riduzione della produzione di testosterone e dunque una riduzione della concentrazione sierica dello stesso. Inoltre, le concentrazioni delle gonadotropine plasmatiche FSH e LH aumentano. Questi parametri sono indicativi di una insufficienza gonadica primaria e di un *ipogonadismo ipergonadotropo* (26).

La SK rappresenta la causa genetica più frequente di ipogonadismo ipergonadotropo (27).

Le concentrazioni sieriche di testosterone possono anche essere nel range di norma. Infatti, il KING (*Klinefelter ItaliaN Group*), ha osservato che nella propria coorte di pazienti il rapporto LH/T rimane alto nonostante i valori normali di testosterone (28). Dunque, si evince come l'aumento delle gonadotropine sieriche sia un elemento cardine della sindrome di Klinefelter, nonostante la possibilità di riscontrare valori di testosterone che rientrano ancora nel range di norma. La letteratura, infatti, riporta che ridotte concentrazioni di testosterone (<12 nmol/L) non sono riscontrabili in tutti i pazienti, ma in una percentuale variabile, pari al 65–85% (29).

Particolare attenzione necessita la misurazione del testosterone. Infatti, i livelli sierici di testosterone totale possono essere falsamente elevati, a causa di elevati livelli di SHBG (*Serum Hormone-Binding Globuline*), motivo per cui è necessario, nei pazienti SK, calcolare il testosterone libero, mediante la *formula di Vermeullen*, attraverso la misura di testosterone totale, SHBG e albumina sierici (30).

I livelli di estradiolo sono in genere aumentati, conseguenza della stimolazione cronica delle cellule di Leydig da parte dell'LH e conseguenza della conversione dell'androstenedione a livello del tessuto adiposo. L'iperestrogenismo potrebbe essere correlato alla patogenesi della ginecomastia e della disfunzione erettile.

3.7. OMEOSTASI DEL GLUCOSIO

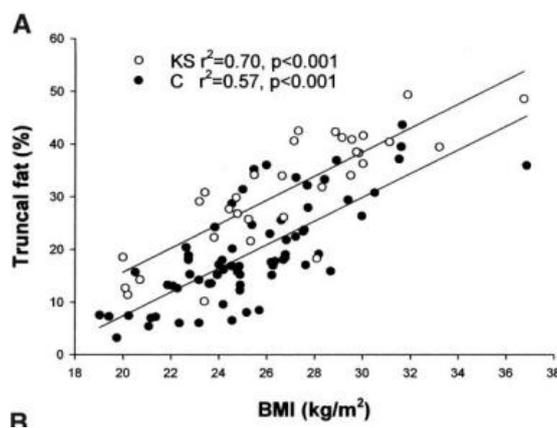
Già nel 1969, *Nielsen et al* descrissero un aumento della prevalenza (39%) di intolleranza glucidica nei pazienti affetti da SK, mentre altri studi descrissero una riduzione della sensibilità insulinica e iperinsulinemia durante il digiuno (31). Inoltre, nei pazienti con SK si osserva un aumento dell'incidenza di insulino-resistenza rispetto a gruppi controllo di pari età (32). Questo è un dato preoccupante in virtù del fatto che l'insulino-resistenza è un potente fattore di rischio per lo sviluppo di diabete e delle sue complicanze micro e macrovascolari.

In letteratura si riporta l'esistenza di una relazione inversa tra i livelli plasmatici di testosterone e l'insulino-resistenza, anche in soggetti maschi non affetti dalla sindrome (33). In pazienti con ipogonadismo ipogonadotropo, la cessazione del trattamento sostitutivo con testosterone provoca un deterioramento della sensibilità insulinica in soli 14 giorni (34).

Secondo *Bojesen et al*, il principale fattore predittivo lo sviluppo di sindrome metabolica è l'adiposità viscerale e in particolare il *truncal fat (BFtr)*; per ogni valore di BMI, i pazienti con SK hanno una percentuale maggiore di BFtr rispetto ai soggetti controllo, anche per valori di BMI che rientrano nel range di norma (**figura 3**). In altre parole, effettuando una correzione per il BFtr, scompare l'impatto dell'ipogonadismo sulla presenza o meno di sindrome metabolica o sulla sensibilità insulinica, supportando l'ipotesi che l'insulino-resistenza, l'output epatico di glucosio e la secrezione insulinica siano indipendenti dal controllo ormonale.

Questi autori suggerivano la presenza di un circolo vizioso per cui l'ipogonadismo, con influenza sulla composizione corporea, portasse ad un aumento del grasso corporeo, soprattutto intra-addominale, causando, di conseguenza, un deterioramento del metabolismo glucidico. Quest'ultimo, a sua volta, causerebbe l'insulino-resistenza che andrebbe ulteriormente a peggiorare l'ipogonadismo, avendo un effetto diretto sulle cellule di Leydig, responsabili della produzione del testosterone.

Figura 3 (32): correlazione tra BFtr e BMI. I pazienti con SK hanno una quantità più elevata (dell'8% in più) di BFtr per ogni valore di BMI rispetto ai soggetti di controllo.



Alla luce dei risultati dello studio *Bojesen et al*, la sindrome metabolica sarebbe associata alla sindrome di Klinefelter indipendentemente dallo stato di ipogonadismo. È noto che la sindrome metabolica sia strettamente correlata ad uno stato di infiammazione cronica caratterizzata da un'alterata produzione di citochine che attivano tutta una serie di vie del segnale il cui effetto finale è un'iperproduzione

di *CCL2* (piccola citochina appartenente alla famiglia delle chemochine), associata ad insulino-resistenza. Nei pazienti con sindrome di Klinefelter, infatti, sono stati riscontrati aumentati livelli di *CCL2* (35).

L'effetto della terapia androgenica sostitutiva sul metabolismo glucidico resta ancora controverso. In alcuni studi è stato osservato un miglioramento dei livelli di emoglobina glicata (HbA1c)(36) o dell'HOMA dopo la terapia (37). Altri studi, invece, non hanno riportato nessun miglioramento (38).

E' stato osservato un miglioramento della sensibilità insulinica in seguito alla terapia androgenica sostitutiva solo in pazienti ipogonadici obesi, ma non in pazienti ipogonadici non obesi (18).

In virtù del fatto che la condizione di ipogonadismo incrementa il grasso corporeo, portando ad una condizione di insulino-resistenza, è probabile che l'effetto della terapia androgenica sostitutiva sul metabolismo glucidico e lipidico non sia diretto, ma sia invece *indiretto*, mediato dal miglioramento del rapporto tra grasso e muscolo (perdita di massa grassa e incremento della massa muscolare).

3.8. MINERALIZZAZIONE OSSEA

La cellula di Leydig produce testosterone ed esprime l'enzima *CYP2R1* che contribuisce all'idrossilazione del colecalciferolo in 25-idrossi-vitamina D. Il testosterone, direttamente o dopo conversione in diidrotestosterone ed estradiolo, agisce sugli osteoblasti e sugli osteoclasti attraverso il recettore degli androgeni e quello degli estrogeni. Gli effetti sono: riduzione dell'apoptosi degli osteoblasti, induzione della proliferazione e del differenziamento degli osteoblasti, riduzione dell'attività degli osteoclasti, induzione dell'apoptosi degli osteoclasti (39).

La sindrome di Klinefelter e l'ipogonadismo che ne consegue sono associati ad una riduzione della massa ossea e dunque allo sviluppo di osteoporosi secondaria, con un aumento del rischio di fratture da fragilità. In epoca prepuberale il picco di massa ossea viene compromesso e questo determina un aumento del rischio di frattura nell'età adulta. In epoca post puberale si ha una perdita di BMD, maggiore a livello trabecolare, con assottigliamento delle trabecole ossee.

Secondo lo studio *Bojesen et al.* (40), che ha coinvolto 70 soggetti adulti con SK e un gruppo controllo di 71 soggetti sani della stessa età, il BMD era ridotto in tutte le regioni studiate (a livello della colonna vertebrale, a livello pelvico e a livello dell'avambraccio) rispetto al BMD dei controlli. I markers di rimodellamento osseo (fosfatasi alcalina osseo-specifica e osteocalcina) non erano alterati, ma i livelli di 25-OH-vitamina D erano più bassi rispetto ai soggetti sani ($p < 0.0001$).

La riduzione del BMD è clinicamente rilevante: secondo studi epidemiologici sulla mortalità e sulla mortalità nei pazienti SK, la riduzione della BMD si associa ad un aumento del rischio di ospedalizzazione e di morte a causa di fratture osteoporotiche (41).

Effettuando un confronto tra il gruppo dei trattati (in terapia androgenica sostitutiva) e quello dei non trattati, non sono state riscontrate differenze statisticamente rilevanti. Questo dato è stato interpretato come conseguenza della terapia inefficace a causa di:

1. dosi troppo basse;
2. bassa compliance da parte dei pazienti;
3. ridotta durata del trattamento;
4. combinazione dei fattori sopraelencati.

Infatti, non sono state riscontrate differenze di testosterone totale e libero tra il gruppo dei trattati e quello dei non trattati, riflessione del fatto che le dosi di testosterone fossero, probabilmente, inefficaci.

Anche altri studi sulla BMD e il trattamento con testosterone nei pazienti SK non hanno osservato effetti benefici derivanti dalla terapia androgenica. Tuttavia, prendendo in considerazione studi su pazienti ipogonadici non affetti da SK, nei pazienti in terapia androgenica sostitutiva si evidenzia un significativo miglioramento della BMD, sia a livello pelvico che a livello spinale (42).

La riduzione del BMD non è in realtà confermata da tutti gli studi. *Luisetto et al.*(43), hanno infatti messo in luce l'assenza di una riduzione significativa della BMD confrontando soggetti affetti da SK e soggetti sani.

Le conclusioni contrastanti di studi diversi potrebbero essere dovute a: differenze nella misurazione della BMD, che infatti può avvenire in siti diversi (osso trabecolare piuttosto che corticale) o elevati livelli di estrogeni.

In merito alla terapia androgenica sostitutiva e ai possibili effetti di questa sulla mineralizzazione ossea, *Wong et al.* (44) non hanno riscontrato differenze statisticamente rilevanti tra il gruppo dei trattati e quello dei non trattati, neanche considerando tipologie diverse di testosterone o considerando terapie di durate differenti, quindi più o meno estese. In conclusione, la perdita di massa ossea che si verifica a causa dell'ipogonadismo nei pazienti con sindrome di Klinefelter non può essere annullata tramite la terapia androgenica sostitutiva. Similmente, anche *Tahani et al.*, concludevano che la perdita di massa ossea nei pazienti SK potrebbe essere, almeno in parte, indipendente dallo stato di ipogonadismo (45). Dunque, altri fattori potrebbero giocare un ruolo nello sviluppo del danno osseo. Tra quelli ipotizzati si ricordano:

1. i polimorfismi del recettore AR (46);
2. i ridotti livelli di vitamina D (40);
3. bassi livelli di insuline-like factor 3 (INSL-3) (47).

Inoltre, è stato inoltre ipotizzato da *Akslaede et al* (48), che anche un rapporto sfavorevole tra la quantità di grasso e la quantità di muscolo (*fat/muscle ratio*) possa, almeno in parte, spiegare le alterazioni della salute dell'osso nei pazienti SK.

Schulz et al., riportano effetti diversi della terapia sostitutiva in base all'età del paziente al momento dell'avvio della terapia: nel caso di pazienti giovani, in cui la terapia sostitutiva viene avviata prima dei 20 anni, si registra un miglioramento della massa ossea, con valori che tornano normali; nel caso di pazienti che iniziano invece una terapia più tardivamente, non si ha un miglioramento della massa ossea, ma è probabile che grazie all'avvio della terapia, si interrompa il processo di perdita di massa ossea e si riduca comunque il rischio di fratture. Questi dati, dunque, suggeriscono che bassi livelli di testosterone prima o durante la pubertà causino un inadeguato sviluppo osseo; solo una sostituzione androgenica precoce potrebbe prevenire il deficit di mineralizzazione ossea (49).

La prevalenza delle fratture vertebrali in una coorte di pazienti affetti dalla sindrome di Klinefelter è stata studiata, per la prima volta, da *Vena et al.* (50). Lo studio ha valutato 87 pazienti con SK, sottoponendoli ad una RX della colonna; le fratture vertebrali sono state riscontrate in 13 pazienti (14.9%). La prevalenza

misurata risultava inferiore rispetto a quella riscontrata in altre forme di ipogonadismo, quali carenza di GH (51), acromegalia (52) o prolattinoma (53).

La prevalenza di fratture vertebrali non era significativamente diversa tra i pazienti con BMD nella norma e pazienti con una BMD ridotta (15.9% vs 13.6%; $p = 0.800$). Similmente, non sono state riscontrate differenze statisticamente rilevanti stratificando i pazienti in base all'età, maggiore o minore di 50 anni (**figura 4**). Stratificando, invece, i pazienti in base all'età al momento della diagnosi, la prevalenza di fratture vertebrali è stata maggiore nel gruppo con diagnosi > 21 anni, rispetto al gruppo con diagnosi più precoce (**figura 5**). Questi risultati sottolineano, ancora una volta, l'importanza di una diagnosi precoce della sindrome.

Figura 4 (50): prevalenza di fratture vertebrali (FV) in pazienti con sindrome di Klinefelter (SK) stratificata in base alla mediana dell'età al momento dello studio.

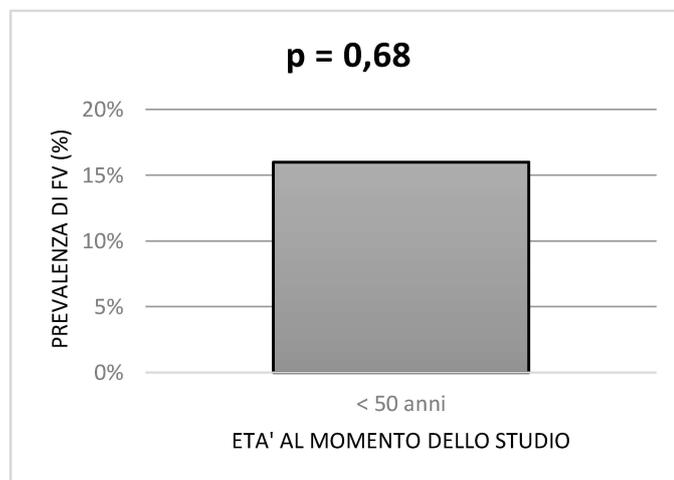
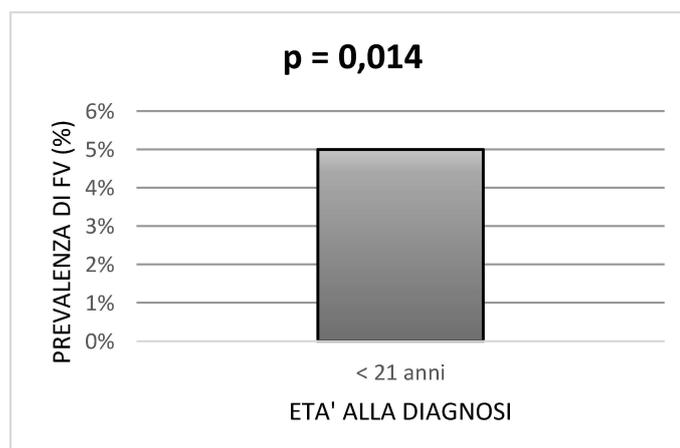


Figura 5 (50): prevalenza di fratture vertebrali (VFs) in pazienti con sindrome di Klinefelter (SK) stratificata in base alla mediana dell'età al momento della diagnosi della malattia.



Le fratture vertebrali sono state riscontrate anche nei pazienti con valori di testosterone nel range di norma e nei pazienti in terapia androgenica sostitutiva. Dunque, è probabile che, oltre al testosterone, altri fattori giochino un ruolo nella fragilità scheletrica e nel rischio di frattura di questi pazienti, come per esempio la carenza di INSL3 (54) e le alterazioni della composizione corporea (40). In questo studio, inoltre, le fratture vertebrali sono state osservate anche nei pazienti con una BMD normale, dato che riflette l'incapacità della DEXA di evidenziare le alterazioni della qualità ossea indotte dalla sindrome di Klinefelter (55).

Considerando che le fratture vertebrali sono spesso asintomatiche e solo 1\3 di esse viene riconosciuta clinicamente, si sottolinea l'importanza, nella gestione del paziente con sindrome di Klinefelter, di effettuare degli studi radiologici della colonna vertebrale, al fine di valutare la prevalenza e l'incidenza di tali fratture che hanno un forte impatto sulla qualità di vita (56) e sull'aspettativa di vita (57).

3.9. ALTRE COMORBIDITA'

Nei pazienti affetti dalla sindrome di Klinefelter, oltre ad un aumento della prevalenza di sindrome metabolica e di riduzione della BMD, è stato descritto un aumento di altre comorbidità, tra cui comorbidità cardiovascolari, neoplasie e malattie autoimmuni. Attualmente, non è ancora chiaro se queste comorbidità siano parte integrante della sindrome o siano la conseguenza dei bassi livelli di testosterone.

Gli uomini con la sindrome di Klinefelter richiedono ospedalizzazioni più frequenti e l'aspettativa di vita appare ridotta di circa 2.1 anni rispetto a quella della popolazione generale (58). Le principali comorbidità correlate ad un aumento della mortalità sono il diabete mellito di tipo 2 e i fenomeni tromboembolici; entrambi sono fattori di rischio per gli eventi cardiovascolari (59).

3.9.1. COMORBIDITA' CARDIOVASCOLARI

Le anomalie cardiache strutturali che sono state descritte nei pazienti SK sono disfunzione ventricolare sinistra diastolica e prolasso della valvola mitrale; inoltre, è stato documentato un aumento dello spessore della tunica delle carotidi (60). Dunque, è ragionevole che il curante proponga al paziente un ecocardiogramma. In epoca pre-puberale, questo esame ha principalmente lo scopo di andare alla ri-

cerca di malattie cardiovascolari congenite; in età adulta, l'ecocardiogramma ha come fine principale la ricerca di disfunzione sistolica o diastolica (61).

Zoller et al., hanno riscontrato un'incidenza cumulativa di tromboembolismo venoso, in adulti SK, dell'8.6% all'età di 50 anni e del 20.8% all'età di 70 anni (62). Per spiegare questo fenomeno sono stati eseguiti vari studi. *Glueck et al.*, concludevano che questo fenomeno fosse l'effetto dell'azione combinata di uno stato di trombofilia ereditaria non diagnosticata associata alla terapia androgenica sostitutiva, con effetto pro-trombotico (63). Alla luce di ciò, sottolineavano l'importanza di eseguire una screening trombofilico prima di avviare la TRT.

Nonostante i fenomeni tromboembolici abbiano una forte influenza sulla morbilità dei pazienti SK, attualmente gli studi a riguardo sono ancora carenti; in particolare, il meccanismo fisiopatologico resta ancora oscuro. Attualmente, esistono solo delle ipotesi:

1. anomalie vascolari (64);
2. anomalie nel processo di fibrinolisi che aumentano l'attività dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1)(65);
3. aumento dell'attività del fattore VIII (66);
4. iperaggregabilità piastrinica (67);
5. deficit delle proteine C ed S (68);
6. elevati livelli di omocisteina associati ad alterazioni dell'antitrombina (69);
7. mutazione del fattore V Leyden (70).

Sebbene siano ormai ben noti gli effetti diretti e indiretti che il testosterone esercita sul sistema della coagulazione, non è ancora chiaro il contributo della terapia androgenica sostitutiva nell'aumento del rischio tromboembolico nei pazienti SK. Infatti, in alcuni studi è stato riportato un effetto negativo della terapia androgenica sostitutiva sulla bilancia emostatica (71), mentre secondo *Chang et al.*, la terapia con testosterone non sarebbe in grado di modificare il tasso di trombosi arteriosa o venosa (72).

3.9.2. NEOPLASIE

Sebbene l'incidenza globale di neoplasie non sia più alta nella popolazione SK, vi è un aumento di alcuni tipi di neoplasie, tra cui i *tumori extragonadici a cellule*

germinali (GCTs) e il *tumore alla mammella*. Tuttavia, proprio perché l'incidenza globale resta comunque bassa, non sono giustificate le procedure di screening alla ricerca di tali neoplasie nei maschi non sintomatici.

Secondo *Williams et al.*, il 3% di tutti i GCTs diagnosticati nei maschi al di sotto dei 19 anni si riscontra nei pazienti con genotipo 47 XXY (73). Similmente, il Rischio Relativo (RR) dei pazienti con sindrome di Klinefelter di sviluppare un GCT, rispetto ad un gruppo controllo, è di 18,8. La localizzazione più frequente è quella mediastinica; la tipologia più frequente è quella non-seminomatosa.

I maschi con SK hanno un rischio di sviluppare un carcinoma mammario di 20-30 volte maggiore rispetto alla popolazione maschile generale, con una mortalità aumentata di 60 volte. Questi dati indicano, dunque, che la sindrome di Klinefelter sia un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di carcinoma mammario negli uomini (74). Tuttavia, considerando che l'incidenza assoluta continua a restare bassa, una mammografia di screening non è ancora parte delle raccomandazioni formali (75).

In contrapposizione all'aumentata prevalenza di questa tipologia di tumori, si cita invece una riduzione della prevalenza di carcinoma prostatico e della mortalità associata, che dunque risulta più bassa nei pazienti SK rispetto che negli uomini senza la sindrome (76). Il motivo di questa riduzione potrebbe essere l'assenza di stimolazione delle cellule neoplastiche prostatiche data la condizione di ipogonadismo, anche se alcuni studi recenti hanno messo in dubbio la correlazione tra i livelli intraprostatici di testosterone e la carcinogenesi (77). È interessante notare come i livelli dell'antigene prostatico specifico (PSA), marker del carcinoma prostatico, restino al di sotto del range di normalità, indipendentemente dalla presenza di terapia androgenica sostitutiva (78).

3.9.3. PATOLOGIE AUTOIMMUNI

Uno studio retrospettivo ha dimostrato che, rispetto a uomini sani, i soggetti con SK hanno un aumentato rischio di sviluppare sindrome di Sjogren (RR 19.3), Lupus Eritematoso Sistemico (RR 18.1), Malattia di Addison (RR 11.7), diabete

mellito di tipo 1 (RR 6.1), sclerosi multipla (RR 4.3), Artrite Reumatoide (RR 3.3) e ipotiroidismo acquisito (RR 2.7).

Questo potrebbe essere dovuto ai bassi livelli di testosterone e agli alti livelli di estrogeni, visto che gli androgeni proteggono dalle malattie autoimmuni, mentre gli estrogeni le favoriscono (79).

3.10. DIAGNOSI

La sindrome di Klinefelter può essere confermata tramite un esame del sangue e successiva analisi dei cromosomi (*cariotipo*). L'analisi del cariotipo richiede il blocco delle cellule durante la metafase mitotica e la colorazione dei cromosomi condensati. I cromosomi delle singole cellule vengono fotografati e le loro immagini organizzate a formare un cariotipo. L'osservazione di 2 o più cromosomi X pone la diagnosi di SK.

La diagnosi può avvenire in epoca prenatale, di norma in maniera accidentale, in seguito all'esecuzione di test pre-natali non invasivi (NIPT - Non Invasive Prenatal Testing), come amniocentesi o villocentesi. I test pre-natali non invasivi, infatti, sono in grado di individuare le più comuni aneuploidie cromosomiche, compresa la sindrome di Klinefelter (80).

La diagnosi può avvenire anche in epoca prepuberale e in questo caso ciò che porta il paziente all'attenzione del medico è la presenza di genitali ipotrofici, di criptorchidismo o di scarso rendimento scolastico. Dopo la pubertà, invece, le cause più comuni sono un'alterata androgenizzazione e la presenza di ginecomastia.

In età adulta, ciò che porta alla diagnosi è soprattutto l'infertilità di coppia, legata in particolare alla condizione di azoospermia. Nel 3% di tutti gli uomini che vengono valutati per infertilità si giunge alla diagnosi di sindrome di Klinefelter (2).

Secondo il *KING (Klinefelter ItaliaN Group)*, l'età media dei pazienti SK al momento della diagnosi è di 37.4 ± 13.4 anni (28), in accordo con quanto riportato da Bojesen (32) e Ishikawa (81). Dunque, la maggior parte delle diagnosi avviene in età adulta, tipicamente durante gli approfondimenti diagnostici eseguiti per motivi di infertilità di coppia; solo una minoranza di pazienti riceve la diagnosi nel periodo prepuberale o dopo i 50 anni.

Va comunque detto che circa 2/3 dei casi restano non diagnosticati. La bassa percentuale di diagnosi è legata all'aspetto fenotipico, che spesso è molto sfumato. È stato stimato infatti che circa un quarto degli individui con sindrome di Klinefelter non presenti segni tipici né all'anamnesi né all'esame obiettivo. Il ritardo della diagnosi o la mancata diagnosi della sindrome sono dei problemi da non sottovalutare. Entrambi sono correlati a:

5. esitazione, presente nella popolazione maschile, di sottoporsi ad una visita di prevenzione andrologica;
6. bassa consapevolezza della sindrome tra i professionisti del campo medico;
7. mancata esecuzione, da parte del personale medico, di una corretta valutazione dei genitali esterni.

Il ritardo diagnostico ha un forte impatto sull'outcome della terapia androgenica sostitutiva e delle tecniche di riproduzione assistita (6).

Herlihy et al. (82), hanno proposto di effettuare uno screening della popolazione generale per una diagnosi precoce della sindrome. Gli autori sottolineano l'importanza di questo screening, basandosi su alcuni elementi cardine:

8. l'elevata prevalenza della sindrome;
9. l'impatto psicosociale che i disturbi dello sviluppo e del linguaggio, che caratterizzano la sindrome, hanno sulla vita del paziente;
10. la disponibilità di tecnologie appropriate per lo svolgimento dello screening, senza la necessità dello sviluppo e della messa a punto di nuove tecnologie.

Il ruolo dello screening e la sua effettiva utilità sono attualmente dibattuti. Infatti, in contrasto rispetto a quanto riportato da *Herlihy, Nieschlag et al.* (83), sostengono l'assenza di prove sul beneficio della diagnosi precoce, ovvero in età neonatale, della sindrome. In altre parole, secondo questi autori, la diagnosi in età neonatale non avrebbe un beneficio in termini di riduzione della mortalità e della morbilità dei pazienti.

In ogni caso, anche senza l'avvio di uno screening, grazie all'aumentata diffusione dei test prenatali non invasivi (NIPT) e grazie alla riduzione dei costi, si attende un aumento della frequenza delle diagnosi prenatali che permetteranno un management precoce del paziente (2).

La comunicazione della diagnosi è un momento critico, soprattutto nei pazienti giovani. L'impreparazione degli operatori della sanità può condurre a depressione, ansia e alterazioni dell'autostima. Attualmente non esistono raccomandazioni ufficiali o linee guida in merito a questo argomento.

3.11. TERAPIA

I ragazzi con SK sono seguiti con visite annuali o biennali durante l'infanzia. L'esame clinico è individualizzato ma generalmente include misurazioni antropometriche, la valutazione del volume testicolare e la valutazione neurologica. Al momento della prevista pubertà, la frequenza delle visite aumenta su base individualizzata e a questo punto l'esame clinico comprende la valutazione dello sviluppo puberale, le misure antropometriche, la determinazione degli ormoni sessuali e la ricerca dei sintomi dovuti alla carenza di testosterone (ginecomastia, affaticamento, basso tono muscolare, obesità) (84).

La forma di testosterone più comunemente utilizzata, soprattutto per motivi di compliance, è il gel (85). Il testosterone in forma di gel, infatti, viene somministrato una volta al giorno, in maniera molto semplice, e permette anche il raggiungimento di valori di testosterone sierico piuttosto stabili nel tempo; tuttavia, questa modalità di somministrazione è associata al rischio di irritazioni cutanee (86). Altre possibili vie di somministrazione sono quella intramuscolare e quella orale, quest'ultima scelta molto raramente. La via di somministrazione intramuscolare permette di ridurre la frequenza delle somministrazioni ma si associa al rischio di anafilassi e *discomfort* nel sito di iniezione.

Attualmente, la scelta della via di somministrazione del testosterone resta una decisione del paziente nella maggior parte dei casi. Infatti, *Kabilan et al.* (87), hanno dimostrato che, confrontando le due principali vie di somministrazione, quindi quella transdermica e quella intramuscolare, non esistono differenze rilevanti in termini di modifiche dell'ematocrito, dell'emoglobina, del PSA o del BMD; nessuna delle due vie di somministrazione, inoltre, sembra ridurre significativamente il rischio di malattie metaboliche, sottolineando il fatto che entrambe apportano modifiche simili del profilo metabolico.

La quantità totale di grasso nei pazienti SK è maggiore rispetto ai soggetti di pari età, soprattutto a causa di un accumulo di grasso addominale. La terapia con testosterone sembrerebbe migliorare la composizione corporea, sebbene gli studi a riguardo siano ancora poco numerosi (72).

Gli effetti della terapia con testosterone sul metabolismo glucidico non sono chiari, in quanto diversi studi hanno portato a conclusioni diverse. Per esempio, *Zitzmann et al.* (38), confrontando un gruppo di pazienti SK in terapia sostitutiva e un gruppo di pazienti SK senza terapia, non hanno riscontrato differenze nell'HOMA, parametro che esprime la sensibilità insulinica. Di contro, *Selice et al.* (37), hanno messo in luce delle differenze statisticamente significative di HOMA tra un gruppo di SK trattati per 18 mesi con testosterone gel e uno di non trattati.

Dunque, data la presenza di risultati conflittuali, non è ancora chiaro se la terapia con testosterone, nei pazienti SK, possa influenzare direttamente la sensibilità insulinica. E' probabile che l'effetto del testosterone sulla sensibilità insulinica non sia un diretto, ma piuttosto sia secondario alla perdita di massa grassa e all'incremento di massa muscolare. Visto il riscontro di conclusioni discordanti, è sicuramente necessario che vengano svolti altri studi in merito, che coinvolgano un maggiore numero di uomini con sindrome di Klinefelter, che dovranno essere sottoposti alla terapia con testosterone per un periodo di tempo più lungo.

In merito al quadro neuropsichiatrico dei pazienti SK, *Ross et al.*, hanno dimostrato che una terapia a base di testosterone, della durata di 2 anni, non ha effetti significativi sugli aspetti cognitivi, quali le abilità verbali o la memoria. Tuttavia, nonostante sia ancora dibattuta l'effettiva efficacia della terapia sostitutiva, un intervento precoce con supporto educativo è sicuramente necessario (88).

Non esiste un'età standard raggiunta la quale è indicato iniziare la terapia sostitutiva con testosterone. La terapia va individualizzata: in alcuni casi potrebbe essere necessario somministrare il testosterone all'inizio dello sviluppo puberale mentre in altri casi l'inizio del trattamento potrebbe essere ritardato fino alla chiara evidenza di ipogonadismo, che potrebbe significare iniziare la terapia in età adulta.

Le attuali linee guida dell'*Endocrine Society* per la terapia con testosterone citano semplicemente la sindrome di Klinefelter come possibile causa di ipogonadismo

ma non forniscono specifiche indicazioni su quando iniziare la terapia, su quale via di somministrazione scegliere, su quale dose somministrare o su quanto frequentemente monitorare gli effetti della terapia (89).

Nei soggetti con SK l'osteopenia e l'osteoporosi sembrano essere correlate non solo all'ipogonadismo, ma anche alla carenza di 25-idrossi-vitamina D (40). La supplementazione con vitamina D sembra essere più efficace rispetto alla terapia androgenica sostitutiva nell'aumentare la BMD (90).

La fertilità, nei pazienti con oligozoospermia o azoospermia, può essere raggiunta tramite tecniche di fecondazione in vitro in seguito alla raccolta di spermatozoi con tecniche specifiche.

3.12. POTENZIALE DI FERTILITA'

La sindrome di Klinefelter viene diagnosticata nel 10% dei maschi azoospermici e nel 2% della popolazione maschile infertile (91).

Per molto tempo, la sindrome di Klinefelter è stata considerata una condizione di assoluta infertilità. Tuttavia, nel 1996, *Tournaye et al.* (92), riportarono per la prima volta una *Testicular Sperm Extraction* (TESE) con esito positivo; un anno dopo, *Palermo et al.* (93), riportarono la prima gravidanza e la prima nascita di un bambino in seguito a TESE/ICSI (*Testicular Sperm Extraction* seguita da *IntraCyttoplasmatic Sperm Injection*), con un padre affetto da sindrome di Klinefelter.

3.12.1. CRIOPRESERVAZIONE DA LIQUIDO SEMINALE

I pazienti SK sono tendenzialmente azoospermici. Nei rari casi in cui si trovino spermatozoi vitali e mobili nel liquido seminale, si dovrebbe procedere al recupero e alla criopreservazione degli stessi. La probabilità di riscontrare spermatozoi nel liquido seminale sarebbe maggiore nei soggetti SK prima della pubertà, ovvero prima che il processo di distruzione dei tubuli seminiferi sia completo, e nei soggetti con genotipo mosaico 46 XY/47 XXY (26).

(94) Studi diversi hanno portato a risultati contrastanti in merito al recupero di spermatozoi dal liquido seminale di soggetti SK: nello studio *Aksglaede et al.*, in nessuno dei 12 pazienti studiati, è stato possibile procedere al recupero (26), risul-

tato in contrasto con lo studio Lanfranco et al nel quale è stato attestato un tasso di successo del 8.4% (11 su 131 su pazienti).

3.12.2. TESE

Tecnologie avanzate come la *Testicular Sperm Extraction (TESE)* si sono dimostrate efficaci, permettendo a circa la metà dei pazienti affetti da sindrome di Klinefelter di avere figli biologici. A livello testicolare, infatti, possono essere individuate delle piccole aree di tessuto ancora in grado di produrre spermatozoi; una volta estratti, questi potranno essere utilizzati ed iniettati all'interno del citoplasma di un oocita (*Intra Cytoplasmic Sperm Injection - ICSI*).

Esistono due modalità di esecuzione della TESE:

1. Conventional TESE (cTESE)
2. Microsurgical TESE (mTESE).

La cTESE prevede la rimozione di un frammento di tessuto testicolare attraverso una incisione trasversale dell'albuginea, a livello equatoriale o a livello craniale del testicolo. In questo caso la biopsia viene effettuata alla cieca. La mTESE prevede una incisione trasversale del testicolo, che interessi i 3/4 della sua circonferenza, preservando il più possibile i vasi sotto-albuginei. Il testicolo viene dunque aperto come un libro (**figura 6**) e il tessuto testicolare viene osservato sotto il microscopio, con una magnificazione di x10-24, per andare alla ricerca di aree con tubuli dilatati, dalle quali avviene l'estrazione selettiva degli spermatozoi. Nel caso in cui non vengano osservate aree con tubuli dilatati, si procede rimuovendo piccole porzioni di tessuto testicolare dalle due superfici, a profondità diverse. Il tessuto testicolare prelevato viene inviato ad un biologo per l'esaminazione microscopica; se vengono riscontrati spermatozoi, questi vengono criopreservati (**figura 7**).

Figura 6 (96): mTESE con ampia incisione della tunica albuginea per una completa visualizzazione di tubuli testicolari.

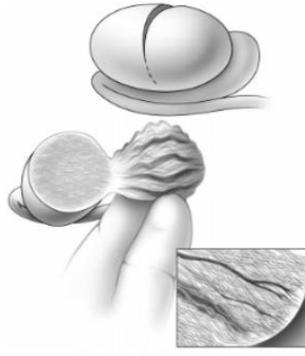
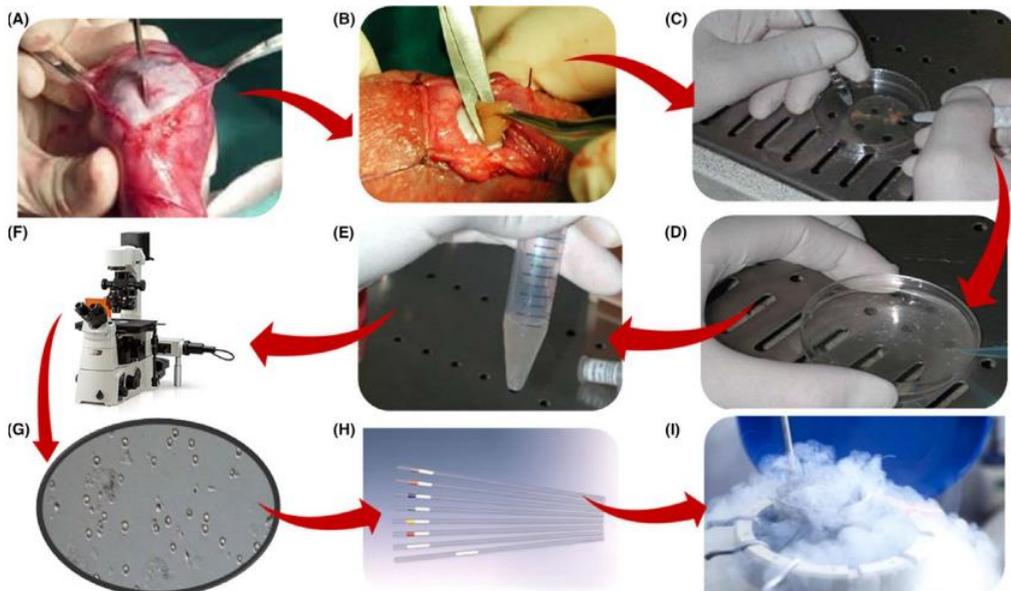


Figura 7 (20): TESE e criopreservazione. A. incisione trasversale della tunica albuginea sulla superficie anteriore del testicolo. B. escissione di un piccolo frammento di tessuto delle dimensioni di circa 5 mm. C. Frammentazione del tessuto su una piastra Petri. D. Trasferimento del materiale su un 15 ml Falcon. E. Dopo centrifugazione, scarto del supernatante e risospensione del pellet. F. Controllo della sospensione sotto microscopio con magnificazione x400 alla ricerca di spermatozoi maturi. G. Spermatozoi maturi insieme ad alcuni eritrociti. H. Trasferimento del materiale e criopreservazione. I. Conservazione del materiale in nitrogeno liquido a -196° .



Il tasso di recupero di spermatozoi tramite cTESE o mTESE, secondo la *review* di Askglæde et al (26), si attesta intorno al 50%.

Lo studio Colpi et al (94) ha dimostrato che la mTESE è significativamente più efficace della cTESE nel recupero degli spermatozoi nei pazienti con azoospermia non ostruttiva (*Non-obstructive azoospermia -NOA*), gruppo al quale appartengono i pazienti con sindrome di Klinefelter. Quindi, nel momento in cui si ha un paziente con NOA, il metodo di scelta sarebbe sempre la mTESE, soprattutto in quei pazienti con un alto valore di FSH.

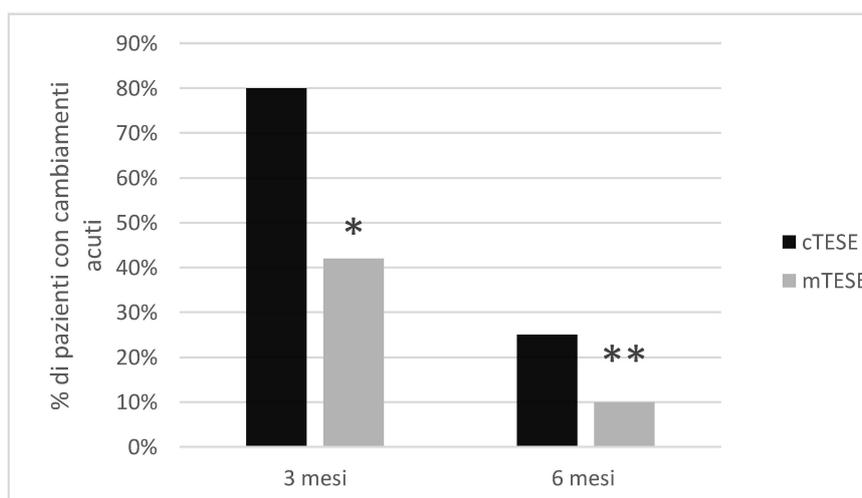
Possibili complicanze della biopsia testicolare sono:

11. cicatrizzazione e fibrosi post-operatoria;
12. alterazioni del flusso sanguigno;
13. devascularizzazione.

Queste complicanze possono determinare una riduzione della funzione testicolare endocrina (95).

Ramasamy et al. (96), hanno dimostrato che la mTESE causa meno complicanze acute e croniche rispetto alla cTESE (**figura 8**). Lo studio ha valutato un totale di 435 pazienti, 83 dei quali avevano subito un intervento di cTESE e 460 uno di mTESE. In entrambi i gruppi è stato registrato un calo medio del testosterone del 20%; 12 mesi dopo la procedura, i livelli di testosterone registrati, anche in questo caso in entrambi i gruppi, sono stati pari all'85% rispetto ai livelli precedenti alla procedura, senza differenze statisticamente rilevanti tra i due gruppi.

Figura 8 (96): confronto delle percentuali di cambiamenti acuti riscontrati tramite ultrasonografia dopo TESE convenzionale e microchirurgica. $*p = 0.001$. $**p = 0.04$.



Diversi studi si sono proposti di individuare i fattori predittivi il successo della TESE. Secondo lo studio di *Rohayem et al.* (97), i fattori predittivi sono l'età, l'LH e il testosterone sierico totale. Il tasso di successo maggiore si ha negli adolescenti fra 15 e 19 anni, con LH < 17.5 UI/L e testosterone > 7.5 nmol/L (**figura 9**).

Secondo *Garolla et al.* (6), invece, non vi sono differenze statisticamente significative in base all'età dei pazienti ($p = 0.059$) (**Tabella II**). Dunque, il momento in cui effettuare la TESE resterebbe una decisione del paziente.

Figura 9 (97): tasso di successo della mTESE in pazienti con SK.

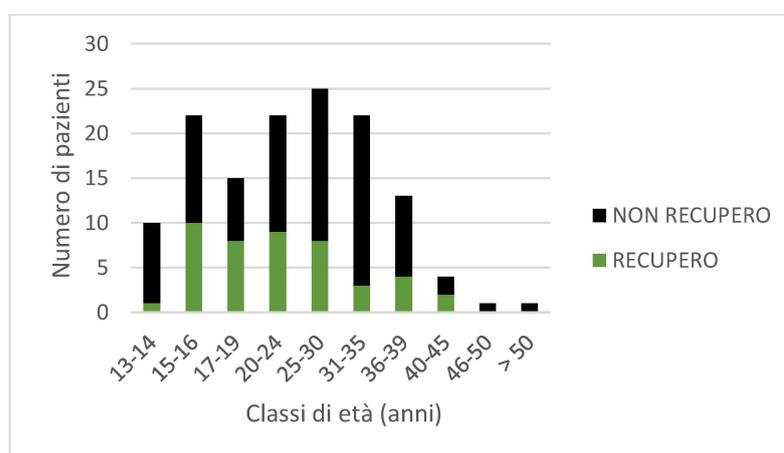


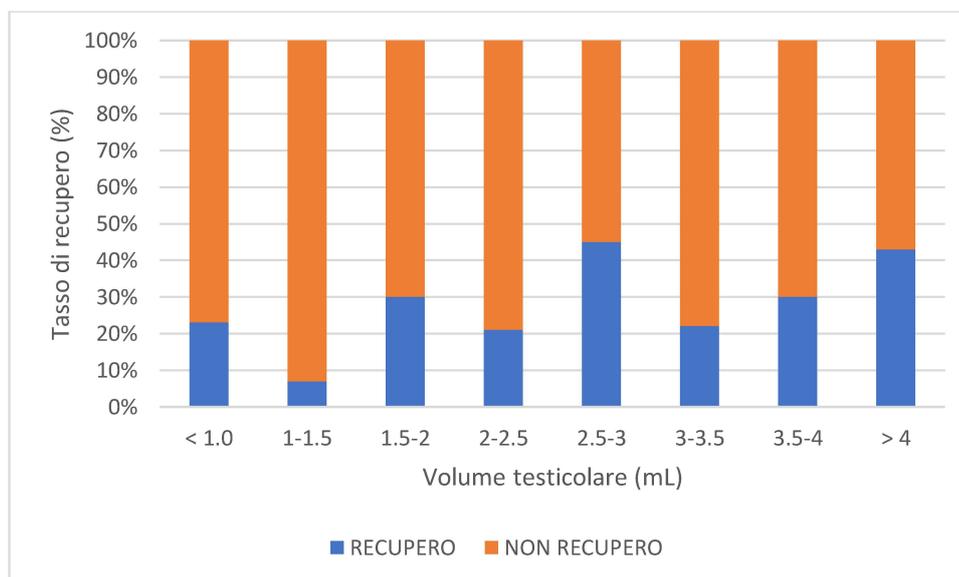
Tabella II (20): caratteristiche antropometriche, ormonali e seminali in relazione al recupero degli spermatozoi

Caratteristiche dei pazienti	No recupero spermatozoi (N = 73)	Recupero spermatozoi (N = 38)	P value
Età (anni)	30,80 ± 7,22	28,53 ± 6,91	0,059
Circonferenza addominale (cm)	91,84 ± 11,16	90,61 ± 15,19	0,627
Apertura braccia (cm)	180,53 ± 8,09	181,68 ± 6,58	0,452
BMI (kg/m ²)	24,80 ± 3,46	24,58 ± 4,70	0,781
LH (U/L)	18,40 ± 11,51	16,96 ± 8,03	0,492
FSH (U/L)	28,91 ± 19,09	30,74 ± 14,36	0,605
Testosterone totale (nmol/L)	12,90 ± 6,06	12,42 ± 4,76	0,673
Testosterone libero (ng/dL)	0,22 ± 0,11	0,23 ± 0,09	0,692
SHBG (nmol/L)	35,83 ± 18,61	34,03 ± 15,71	0,604
Albumina (g/dL)	47,99 ± 3,23	47,92 ± 2,34	0,912
Prolattina (ng/mL)	12,10 ± 9,17	11,20 ± 5,38	0,580
Estradiolo (pg/mL)	99,71 ± 36,52	98,39 ± 31,78	0,851
Volume testicolare destro (mL)	2,01 ± 0,75	2,24 ± 1,10	0,185
Volume testicolare sinistro (mL)	2,08 ± 0,84	2,31 ± 0,89	0,180

Un altro dato di rilievo di quest'ultimo studio è il tasso di successo della TESE rispetto al volume testicolare (**figura 10**): sebbene il recupero sia stato positivo soprattutto nei casi in cui il volume testicolare fosse maggiore di 1.5 mL, è stato osservato un recupero del 23% in testicoli con un volume estremamente basso, inferiore a 1 mL. Dunque, il riscontro di volumi testicolari estremamente bassi in seguito alla misurazione effettuata con l'ecografia scrotale, non dovrebbe precludere la possibilità di effettuare un tentativo di biopsia testicolare.

L'influenza di una precedente terapia androgenica sostitutiva è ancora dibattuta: alcuni studi hanno riportato che essa agisca influenzando in maniera negativa il recupero degli spermatozoi (98), mentre altri affermano il contrario (99).

Figura 10 (20): Recupero cumulativo di spermatozoi (barre azzurre) in rapporto al volume testicolare, espresso come percentuale, confrontato con recupero fallimentare (barre arancioni).



Una volta recuperati gli spermatozoi tramite TESE, questi possono essere utilizzati per la procedura di ICSI. Nella metanalisi di *Corona et al.*, sono stati valutati l'esito del recupero degli spermatozoi e la successiva ICSI (6). In tutti gli studi, ad eccezione di due, sono stati inclusi pazienti con sindrome di Klinefelter con genotipo classico, quindi non mosaico, per un totale di 1248 pazienti. Il tasso di successo cumulativo per ciclo di TESE è stato del 44%. L'analisi ha dimostrato che il tasso di successo era indipendente dall'età, dal volume testicolare e dai parametri ormonali al momento del reclutamento. 29 degli studi presi in considerazione for-

nivano anche informazioni sulla successiva procedura di ICSI. In questi studi, l'età media delle donne era di 29.5 ± 2.9 anni. Dopo l'esecuzione di 410 ICSI, il numero cumulativo di gravidanze osservato è stato di 218, con un tasso di gravidanza, *pregnancy rate (PR)*, del 43%. Così come osservato nel caso precedente, quindi per il tasso di successo del recupero degli spermatozoi, non è stata evidenziata nessuna correlazione con l'età, il volume testicolare, i livelli di LH o di TT del padre (soggetto SK). Tuttavia, è stato messo in evidenza un rapporto inversamente proporzionale tra i livelli di FSH e l'LBR (*Live Birth Rate*).

In conclusione, la metanalisi ha dimostrato che le possibilità di fertilità dei pazienti azoospermici affetti da sindrome di Klinefelter è sovrapponibile a quella di altri pazienti con azoospermia.

Un follow-up di bambini nati da padri affetti dalla sindrome di Klinefelter tramite la tecnica TESE-ICSI non ha mostrato un aumento dell'incidenza di anomalie fenotipiche o cromosomiche (98).

3.12.3. ASPETTI ETICI

Maiburg et al., (100) hanno studiato il punto di vista etico delle tecniche di preservazione della fertilità in pazienti adulti affetti dalla SK, delle loro compagne e dei loro genitori. Questo studio ha rilevato che nella maggior parte dei casi vi è un atteggiamento positivo nei confronti della TESE e della successiva ICSI. Anche nel caso in cui il soggetto palesi il proprio disinteresse nei confronti della procedura, afferma comunque che la tecnica possa essere utile per qualcun altro.

Le tesi a favore della TESE-ICSI sono: la possibilità di avere figli biologici e l'aumento dell'autostima del paziente affetto. Gli argomenti che invece vanno contro la tecnica TESE-ICSI sono: la possibilità di malformazioni congenite o di ritardi dello sviluppo del bambino e il limitato tasso di successo della tecnica.

Nonostante ciò, *Rives et al.* (101), hanno riportato che gli adolescenti SK non sono veramente interessati al loro futuro potenziale di fertilità e lo diventano solo dopo almeno 3 colloqui medici. Di contro, i loro genitori sono immediatamente d'accordo sulla necessità di iniziare un percorso di preservazione della fertilità.

Le considerazioni etiche sono sempre difficili da effettuare, soprattutto quando vengono applicate a soggetti che sono ancora bambini o adolescenti. L'insuccesso del recupero degli spermatozoi può avere un impatto emotivo molto importante,

motivo per cui è necessario un *counselling* psicologico prima e dopo la procedura. Gli adolescenti SK dovrebbero iniziare il percorso di preservazione della fertilità solo se completamente consci della possibilità di un esito negativo e se a conoscenza di opzioni alternative per soddisfare il loro desiderio di paternità (102).

Infine, considerando il fatto che circa il 30% dei soggetti affetti dalla sindrome soffre anche di un certo grado di disturbi comportamentali e intellettuali, non è sempre garantita la possibilità di offrire la preservazione della fertilità.

3.13. QUALITA' DI VITA

Sebbene le conseguenze mediche della sindrome di Klinefelter siano state ampiamente studiate, l'impatto della sindrome sulla qualità di vita non è stato indagato allo stesso modo. I problemi psicologici, cognitivi e sociali, sommati alle comorbidità della sindrome, potrebbero compromettere la qualità di vita dei pazienti con Sindrome di Klinefelter.

Turriff et al. (103), hanno dimostrato che il 75% dei pazienti intervistati pensa che la propria sindrome impatti, in maniera negativa, sulla propria qualità di vita, soprattutto a causa dell'infertilità e delle comorbidità psicologiche. La riduzione della qualità di vita viene confermata anche da altri studi (104–106); in particolare, *Close et al.* (104), hanno concluso che la severità dell'aspetto fenotipo è un fattore influenzante la qualità di vita: peggiore è il fenotipo clinico e peggiore è la qualità di vita.

Attualmente, la letteratura non supporta un impatto della terapia sostitutiva sulla qualità di vita. Tuttavia, questi risultati sono in disaccordo con le evidenze cliniche, tramite le quali si può chiaramente vedere il beneficio che la terapia con testosterone apporta nei pazienti con sindrome di Klinefelter, in termini di funzionalità sociale, sessuale, sonno ed energia.

4. SCOPO DELLO STUDIO

La SK risulta essere correlata ad alterazioni testicolari che conducono ad una condizione di infertilità; la SK è la causa dell'infertilità nel 10% dei maschi azoospermici e la causa dell'infertilità nel 2% della popolazione generale maschile.

Inoltre, la SK risulta essere correlata ad una serie di comorbidità (alterazioni dell'omeostasi del glucosio, alterazioni della mineralizzazione ossea, patologie cardiovascolari, ecc..) che impattano sull'aspettativa di vita e sulla qualità di vita.

Alla luce di tali considerazioni, è importante che i pazienti seguano un percorso di follow-up ma la condizione necessaria per l'avvio del monitoraggio è ovviamente la diagnosi.

Il presente studio si propone di indagare l'impatto che l'età al momento della prima visita ha sullo sviluppo delle alterazioni del metabolismo glicolipidico, sulle alterazioni del metabolismo osseo e sul potenziale di fertilità.

5. MATERIALI E METODI

Si tratta di uno studio retrospettivo nel quale sono stati valutati i dati clinici e biochimici di 445 pazienti affetti dalla sindrome di Klinefelter con genotipo classico 47 XXY, afferenti al Centro di Riferimento Regionale per la SK, presso la UOC Andrologia e Medicina della Riproduzione dell'Azienda Ospedale - Università di Padova, tra gennaio 2011 e febbraio 2023. I motivi per cui i pazienti si sono rivolti al centro sono stati: (1) ritardo puberale, (2) scarsa androgenizzazione, (3) ginecomastia, (4) azoospermia, (5) infertilità di coppia, (6) riscontro di ipogonadismo, (7) osteopenia o osteoporosi.

In seguito all'esecuzione di vari esami diagnostici, si è giunti alla diagnosi di sindrome di Klinefelter, confermata tramite l'esecuzione del cariotipo. In una minoranza di casi, i pazienti erano già a conoscenza della sindrome e si erano rivolti al centro per l'avvio del follow up. Infine, in alcuni pazienti, la diagnosi di SK era già stata fatta in epoca prenatale.

Sono stati valutati in maniera retrospettiva sia dati anamnestici, quali età del soggetto al momento della prima visita presso la nostra sede ed età del soggetto al momento della diagnosi, sia dati clinici, in particolare quelli correlati al metabolismo glicolipidico e al metabolismo osseo. Tra i dati anamnestici sono stati considerati anche l'abitudine tabagica e la terapia androgenica sostitutiva, attuale o pregressa.

Sono stati inclusi nello studio solo i soggetti con genotipo classico (47, XXY) e con età inferiore a 50 anni.

5.1. ANTROPOMETRIA

La maggior parte dei pazienti è stata sottoposta ad un esame obiettivo comprensivo di determinazione del peso (kg), dell'altezza (cm) e della circonferenza addominale (cm). E' stata considerata patologica una circonferenza addominale > 94 cm.

Conoscendo peso e altezza del paziente stato calcolato l'indice di massa corporea (*Body Mass Index*, BMI, kg/m²). Sono stati considerati sovrappeso o obesi i pazienti con un BMI ≥ 25 kg/m².

5.2. ESAMI EMATOCHIMICI ED ORMONALI

Sono state misurate le concentrazioni sieriche di LH (U/L), FSH (U/L), testosterone totale - TT (nmol/L), Sex Hormone Binding Globuline - SHBG (nmol/L), albumina (g/L), estradiolo (pg/mL), GGT (U/L), glucosio (mg/dL), emoglobina glicata (Hb1Ac)(%), insulina (mU/L), colesterolo totale (mg/dL), colesterolo LDL (mg/dL), colesterolo HDL (mg/dL), trigliceridi (mg/dL), omocisteina (umol/L), ALT (U/L), AST (U/L), PTH (ng/L), calcio (mmol/L), fosforo (mmol/L), PSA (ug/L) e vitamina D (nmol/L). La determinazione biochimica degli esami è stata effettuata prima delle 10 del mattino in tutti i casi.

Il riscontro di testosterone totale < 12 nmol/L è stato considerato indicatore di ipogonadismo. Tramite la formula di Vermeulen (testosterone totale, SHBG e albumina), è stato calcolato il testosterone libero (nmol/L). Il riscontro di testosterone libero < 0,225 nmol/L è stato considerato ipogonadismo calcolato su testosterone libero.

E' stato definito uno stato di alterata glicemia a digiuno in seguito al riscontro di un valore di glucosio plasmatico compreso fra 100 e 126 mg/dL mentre è stata fatta diagnosi di diabete se Hb1Ac > 6.5%. Tenendo in considerazione i valori glicemia e insulina plasmatica, è stato calcolato l'indice HOMA ed è stato definito alterato se > 2,4.

Il riscontro di LDL > 116 mg/dL è stato definito come ipercolesterolemia; il riscontro di trigliceridi > 150 mg/dL è stato definito come ipertrigliceride-

mia; il riscontro di omocisteina > 15 $\mu\text{mol/L}$ è stato definito iperomocistemia.

Il riscontro di vitamina D < 75 nmol/L è stato considerato ipovitaminosi D.

5.3. ECOCOLORDOPPLER SCROTALE

Tramite l'esecuzione di un ecocolordoppler scrotale sono stati misurati il volume testicolare destro e il volume testicolare sinistro (mL). Il volume testicolare è stato stimato utilizzando la formula dell'ellissoide (lunghezza x larghezza x altezza x 0.52). La somma dei due volumi è stata utilizzata per definire il volume bisticolare (mL).

5.4. DUAL ENERGY X-RAY ABSORPTIOMETRY (DEXA)

I valori di Bone Mineral Density (BMD) della colonna lombare e del femore sono stati misurati tramite una DEXA. I risultati sono stati espressi come Z-score nelle tre aree studiate: lombare, femorale e collo femorale. Sono state considerate patologiche le riduzioni dello Z score al di sotto di -2,0.

5.5. TESTICULAR SPERM EXTRACTION (TESE)

Nei pazienti in cui l'infertilità e la ricerca di prole hanno portato alla diagnosi, in seguito all'esecuzione di un esame seminale e in seguito al riscontro di azoospermia, è stata proposta una biopsia testicolare. Nei pazienti che hanno accettato l'intervento, è stata effettuata una TESE sotto anestesia (SCAB - Spermatic Cord Anesthesia Block). Dopo un'incisione trasversale della tunica albuginea sulla superficie anteriore del testicolo, sono state escisse due piccole porzioni di tessuto, dal diametro approssimativo di 5 mm. I campioni di testicolo sono stati posti in una capsula di Petri con 2 mL di terreno Biggers, Whitten e Whittingham (BWW) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA), sezionati meccanicamente mediante vetrini sterili e poi ulteriormente tritati delicatamente da aghi sterili. Dopo la triturazione testicolare, la sospensione testicolare è stata centrifugata per 5 minuti e quindi trasferita in una provetta conica da 15 mL contenente 2 mL di terreno fresco e centrifugata a $1200 \times g$ per 10 minuti. Il surnatante è stato quindi scartato e il pellet è stato sospeso con 1 mL di terreno BWW e agitato per 2 minuti. Sotto un microscopio a ingrandimento x400, la sospensione testicolare è stata con-

trollata per la presenza di spermatozoi maturi. Gli spermatozoi riscontrati sono stati congelati in vista di un loro futuro utilizzo per l'esecuzione di una ICSI- *Intracytoplasmatic Sperm Injection*.

5.6. ANALISI STATISTICA

Per le analisi statistiche è stato utilizzato il software "Statistical Package for the Social Sciences software IBM SPSS Statistics, Version 29.0".

Le variabili di tipo continuo sono state espresse come media ed errore standard mentre per le variabili di tipo nominale è riportata la frequenza in termini assoluti e in percentuale.

Prima delle analisi tra gruppi, è stata verificata la distribuzione normale per le variabili continue tramite il test di Kolmogorov–Smirnov. Data la distribuzione non normale della maggior parte delle variabili, le analisi di correlazione tra parametri sono state condotte tramite test non parametrico di Spearman. Per il confronto tra variabili discrete, è stato utilizzato il test Chi-square, o test di Fisher se la frequenza attesa era inferiore a cinque. Successivamente il campione è stato diviso in tre gruppi in base all'età alla prima visita. Per il confronto delle medie delle variabili di tipo continuo tra i tre gruppi è stata effettuata un'analisi non parametrica della varianza tramite il test di Kruskal-Wallis.

Per tutte le analisi la significatività è stata definita da un valore $p < 0,05$.

6. RISULTATI

Le caratteristiche cliniche dei 445 pazienti con genotipo classico 47 XXY e con età inferiore a 50 anni sono elencate nella **tabella III**.

L'età media alla prima visita è stata di $30,1 \pm 0,4$ anni mentre l'età media alla diagnosi è stata di $24,5 \pm 0,5$ anni.

In 420 pazienti è stata indagata l'abitudine tabagica. 176 pazienti (42%) hanno dichiarato di essere fumatori al momento dell'anamnesi mentre 244 pazienti (58%) hanno dichiarato di non aver mai fumato o di aver smesso da almeno 6 mesi.

Al momento dell'analisi, 75 pazienti (17%) stavano eseguendo una terapia androgenica sostitutiva o l'avevano sospesa da meno di 6 mesi mentre 78 pazienti (17%) l'avevano sospesa da almeno 6 mesi; infine, 292 pazienti (66%) hanno dichiarato di non aver mai intrapreso una terapia sostitutiva.

Le **tabelle IV, V e VI** mostrano la correlazione (correlazione di Pearson) tra l'età alla prima visita e le variabili studiate. La correlazione è stata considerata significativa per valori di $p < 0,05$.

Tabella III: valori antropometrici, sierici, volumetrici e densitometrici dei 445 pazienti con SK e genotipo classico 47 XXY.

	N	Media ± Errore Std.
Età prima visita (anni)	445	30,07 ± 0,43
Età alla diagnosi (anni)	445	24,54 ± 0,52
Girovita (cm)	345	96,31 ± 0,89
BMI (kg/m²)	399	25,33 ± 0,26
LH (U/L)	417	19,75 ± 0,45
FSH (U/L)	412	32,06 ± 0,78
TT (nmol/L)	418	10,39 ± 0,29
cfT (nmol/L)	283	0,20 ± 0,01
SHBG (nmol/L)	335	33,24 ± 0,85
Albumina (g/L)	337	47,70 ± 0,20
Estradiolo (pg/mL)	399	96,41 ± 2,12
GGT (U/L)	367	21,22 ± 0,68
Glicemia (mg/dL)	395	83,45 ± 1,04
Hb1Ac (%)	380	5,40 ± 0,04
Insulina (mU/L)	367	11,50 ± 0,64
HOMA	366	2,52 ± 0,18
Colesterolo TOT (mg/dL)	398	183,65 ± 1,98
LDL (mg/dL)	397	117,14 ± 1,71
HDL (mg/dL)	395	49,21 ± 0,66
Trigliceridi (mg/dL)	389	108,54 ± 4,74
Omocisteina (umol/L)	367	15,03 ± 0,46
AST (U/L)	390	25,94 ± 0,51
ALT (U/L)	389	29,57 ± 0,93
PTH (ng/L)	384	39,07 ± 1,72
Calcemia (mmol/L)	394	2,44 ± 0,01
Fosforemia (mmol/L)	374	1,01 ± 0,02
PSA (ug/L)	387	0,66 ± 0,06
Vitamina D (nmol/L)	374	57,49 ± 1,48
Volume bitesticolare (mL)	388	4,12 ± 0,10
Volume prostatico (mL)	354	17,59 ± 0,34
BMD lombare	351	1,01 ± 0,01
BMD femorale	342	0,99 ± 0,01
Z score lombare	363	-0,74 ± 0,06
Z score femorale	347	-0,25 ± 0,05
Z score collo femorale	345	-0,17 ± 0,05

Tabella IV: correlazione tra l'età alla prima visita, antropometria e assetto ormonale; r = coefficiente r di Pearson.

	r	p
Girovita (cm)	0,452	<0,001
BMI (kg/m²)	0,383	<0,001
LH (U/L)	0,011	0,821
FSH (U/L)	-0,028	0,567
TT (nmol/L)	-0,227	<0,001
cfT (nmol/L)	-0,244	<0,001
Estradiolo (pg/mL)	-0,113	0,024

Tabella V: correlazione tra l'età alla prima visita e metabolismo glico-lipidico; r = coefficiente r di Pearson.

	r	p
Glicemia (mg/dL)	0,189	<0,001
Hb1Ac (%)	0,205	<0,001
Insulina (mU/L)	0,019	0,711
HOMA	0,04	0,443
Colesterolo TOT (mg/dL)	0,520	<0,001
LDL (mg/dL)	0,518	<0,001
HDL (mg/dL)	-0,052	0,302
Trigliceridi (mg/dL)	0,215	<0,001
Omocisteina (umol/L)	0,013	0,804

Tabella VI: correlazione tra l'età alla prima visita, metabolismo fosfo-calcico e densità minerale ossea (Bone Mineral Density - BMD); r = coefficiente r di Pearson.

	r	p
PTH (ng/L)	0,167	0,001
Calcemia (mmol/L)	-0,210	<0,001
Fosforemia (mmol/L)	-0,268	<0,001
Vitamina D (nmol/L)	-0,243	<0,001
BMD lombare	0,036	0,498
BMD femorale	0,158	0,003
Z score lombare	-0,129	0,014
Z score femorale	-0,002	0,972
Z score collo femorale	0,002	0,964

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: gruppo A (n=136) con età alla prima visita tra 14 e 24 anni; gruppo B (n=152) con età alla prima visita tra 25 e 34 anni; gruppo C (n=157) con età alla prima visita tra 35 e 49 anni. Le caratteristiche cliniche dei pazienti suddivisi nei tre gruppi sono riassunte nella **tabella VII**.

Sono stati messi a confronto le medie delle diverse variabili; nello specifico, i confronti sono stati effettuati tra il gruppo A e il gruppo B, tra il gruppo A e il gruppo C e infine tra il gruppo B e il gruppo C. Le differenze tra le coppie di gruppi sono state ritenute significative se $p < 0,05$. (**Figure 11 – 17**).

Tabella VII: le variabili continue sono state espresse come media ed errore standard; le singole variabili sono state studiate nelle tre fasce di età. Le differenze tra i tre gruppi di pazienti sono state espresse tramite il valore p, ritenuto statisticamente significativo se inferiore a 0,05.

TT = Testosterone Totale; cfT = calculated free testosterone (testosterone libero calcolato); V.Bistest = Volume Bitesticolare; V.Prost = Volume Prostatico.

	A (n=136) 14 ≤ età prima visita < 25	B (n=152) 25 ≤ età prima visita < 35	p A vs B	C (n=157) 35 ≤ età prima visita < 50	p A vs C	p B vs C
	Media ± Errore Std.	Media ± Errore Std.		Media ± Errore Std.		
Girovita (cm)	85,56 ± 1,47	97,55 ± 1,39	0,001	103,39 ± 1,32	<0,001	0,014
BMI (kg/m ²)	22,67 ± 0,44	25,77 ± 0,40	0,002	27,20 ± 0,42	<0,001	0,153
LH (U/L)	19,54 ± 1,00	20,22 ± 0,68	0,243	19,44 ± 0,66	0,04	0,308
FSH (U/L)	32,29 ± 1,73	32,48 ± 1,18	0,141	31,41 ± 1,17	0,068	0,698
TT (nmol/L)	12,36 ± 0,49	9,88 ± 0,47	0,005	9,21 ± 0,51	0,007	0,846
cfT (nmol/L)	0,25 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,017	0,17 ± 0,01	0,006	0,681
SHBG (nmol/L)	32,52 ± 1,44	31,51 ± 1,41	0,775	35,67 ± 1,52	0,477	0,244
Albumina (g/L)	48,77 ± 0,27	47,68 ± 0,23	0,001	46,77 ± 0,45	<0,001	0,276
Estradiolo (pg/mL)	101,81 ± 4,01	96,66 ± 3,46	0,001	91,42 ± 3,55	0,002	0,617
GGT (U/L)	16,21 ± 0,68	21,79 ± 1,32	0,057	24,46 ± 1,13	0,022	0,665
Glicemia (mg/dL)	79,11 ± 0,99	83,09 ± 1,66	0,241	87,63 ± 2,29	0,017	0,157
Hb1Ac (%)	5,21 ± 0,06	5,41 ± 0,09	0,702	5,55 ± 0,07	0,068	0,094
Insulina (mU/L)	11,52 ± 1,61	11,37 ± 0,85	0,084	11,62 ± 0,86	0,056	0,859

HOMA	2,50 ± 0,49	2,45 ± 0,21	0,095	2,62 ± 0,22	0,056	0,803
Colesterolo TOT (mg/dL)	155,41 ± 2,63	187,18 ± 2,89	0,001	204,62 ± 3,24	<0,001	0,027
LDL (mg/dL)	92,70 ± 2,35	120,18 ± 2,42	0,001	135,16 ± 2,87	<0,001	0,007
HDL (mg/dL)	49,78 ± 1,15	48,87 ± 0,97	0,543	49,09 ± 1,30	0,28	0,59
Trigliceridi (mg/dL)	81,27 ± 4,37	115,38 ± 10,43	0,08	125,24 ± 7,31	0,001	0,088
Omocisteina (umol/L)	15,04 ± 1,06	14,92 ± 0,75	0,269	15,14 ± 0,66	0,408	0,728
PSA (ug/L)	0,44 ± 0,03	0,72 ± 0,13	0,419	0,79 ± 0,10	0,196	0,582
V. bitest. (mL)	4,80 ± 0,18	3,72 ± 0,13	0,037	3,95 ± 0,18	0,152	0,414
V. prost (mL)	13,59 ± 0,39	17,72 ± 0,50	0,167	20,72 ± 0,64	<0,001	0,414
PTH (ng/L)	32,51 ± 2,04	37,49 ± 2,69	0,536	46,20 ± 3,65	0,125	0,013
Calcemia (mmol/L)	2,48 ± 0,01	2,43 ± 0,02	0,151	2,42 ± 0,01	0,001	0,04
Fosforemia (mmol/L)	1,21 ± 0,07	0,94 ± 0,02	0,059	0,93 ± 0,02	0,005	0,287
Vitamina D (nmol/L)	66,09 ± 2,79	56,59 ± 2,19	0,662	50,84 ± 2,56	0,049	0,074
BMD lombare	0,99 ± 0,01	1,02 ± 0,01	0,781	0,97 ± 0,01	0,697	0,902
BMD femorale	1,02 ± 0,01	0,99 ± 0,01	0,339	0,97 ± 0,01	0,142	0,561
Z score lombare	-0,51 ± 0,11	-0,84 ± 0,09	0,218	-0,83 ± 0,11	0,55	0,442
Z score femorale	-0,27 ± 0,10	-0,23 ± 0,08	0,815	-0,26 ± 0,08	0,856	0,625
Z score collo femorale	-0,22 ± 0,10	-0,12 ± 0,09	0,889	-0,20 ± 0,08	0,974	0,899

Figura 11: Circonferenza addominale, espressa come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. *p = 0,001; **p = < 0,001.

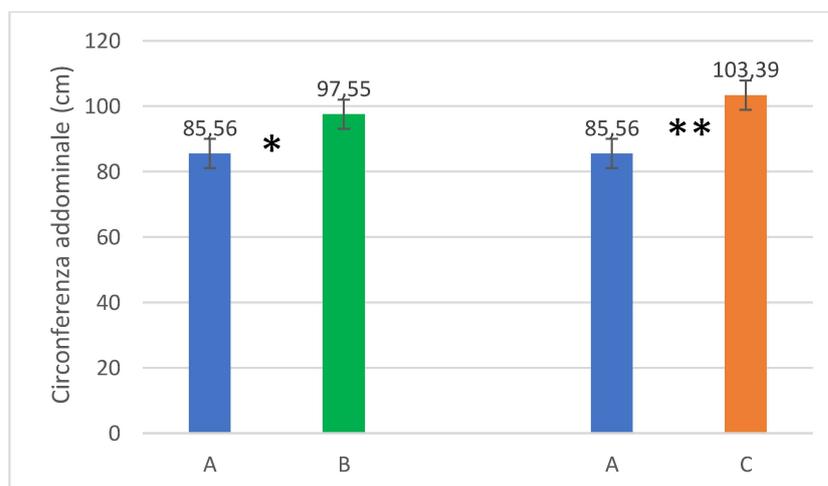


Figura 12: BMI, espresso come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. * $p = 0,002$; ** $p = < 0,001$.

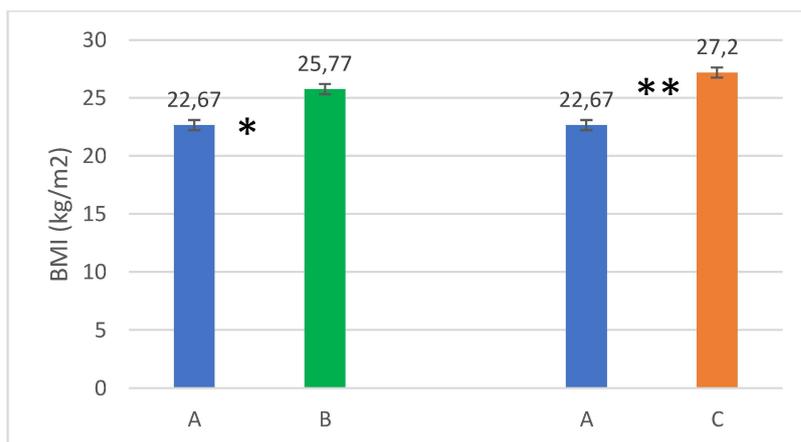


Figura 13: Testosterone Totale, espresso come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. * $p = 0,005$; ** $p = 0,007$.

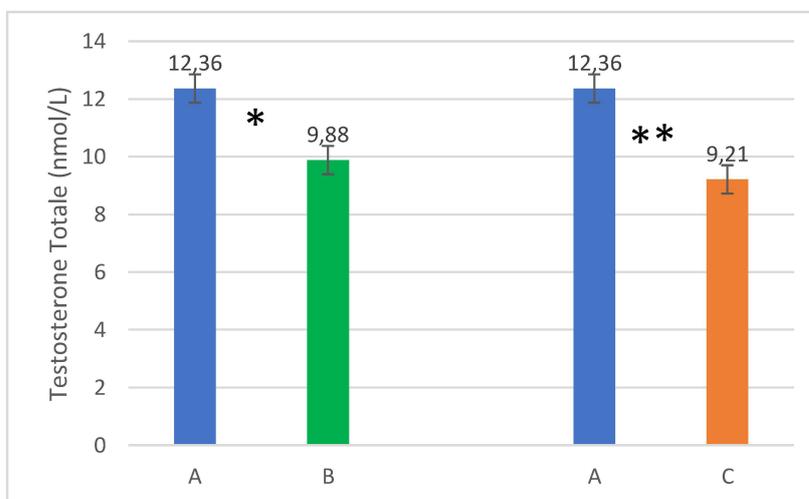


Figura 14: Testosterone libero calcolato, espresso come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. * $p = 0,017$; ** $p = 0,006$.

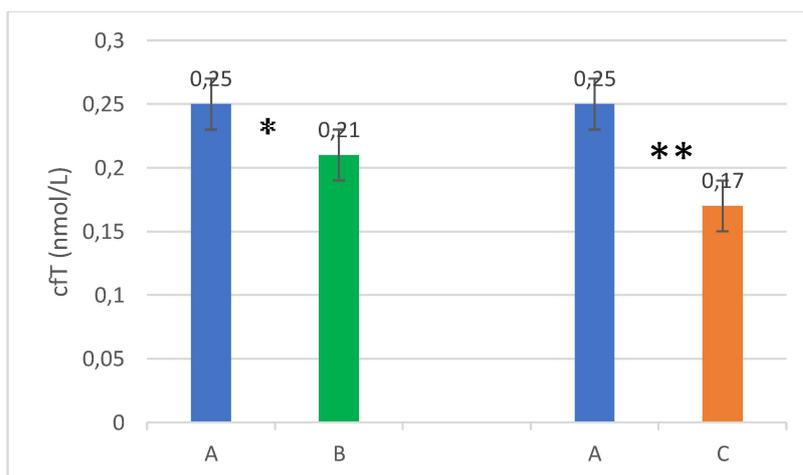


Figura 15: Glicemia, espressa come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. * $p = 0,017$.

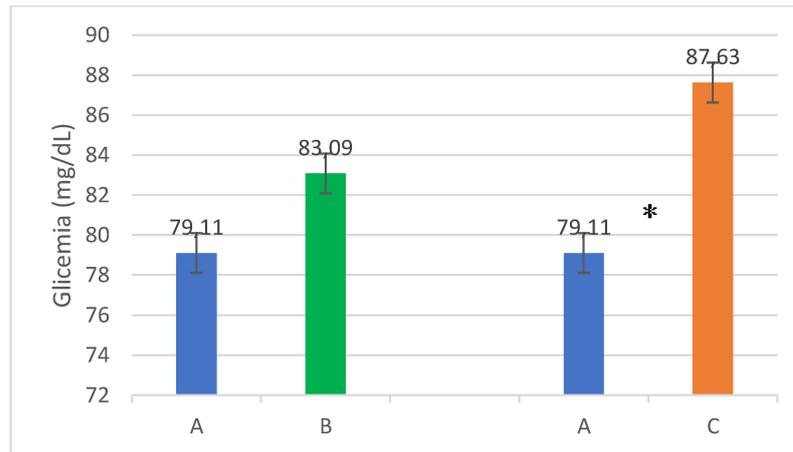


Figura 16: Colesterolo totale, espresso come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. * $p = 0,001$; ** $p < 0,001$.

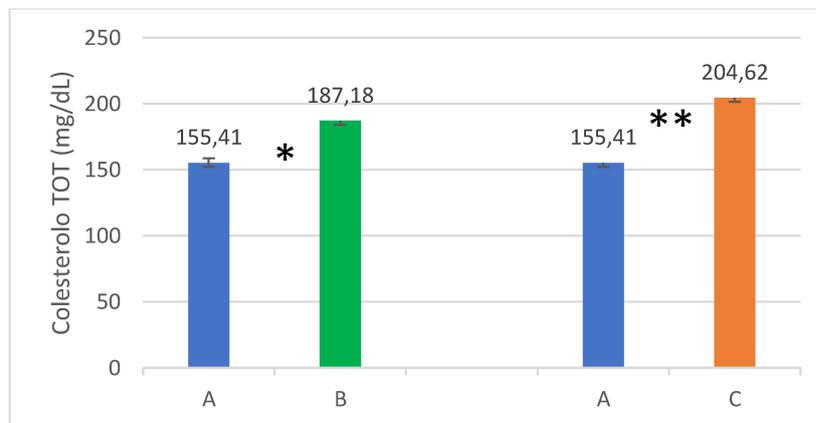
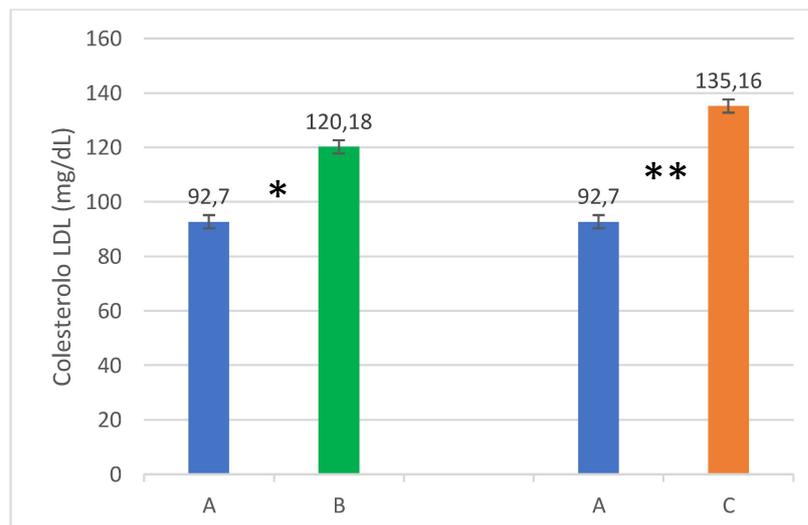


Figura 17: Colesterolo LDL, espresso come media ed errore standard, nei tre gruppi di pazienti. * $p = 0,001$; ** $p < 0,001$.



Nella **tabella VI** vengono mostrate tutte le variabili nominali studiate; sono indicati tutti i casi di aumento della circonferenza addominale oltre il cut-off di 94 cm, sovrappeso o obesità, ipogonadismo calcolato su TT, ipogonadismo calcolato su cFT, alterata glicemia a digiuno, diabete, insulino-resistenza, ipercolesterolemia, ipertrigliceridemia, iperomocisteinemia, ipovitaminosi D e osteoporosi.

Tabella VI: studio delle variabili nominali e frequenza nei tre gruppi di pazienti stratificati per età. Le differenze sono state ritenute significative per un p value < 0,05.

	Totale	Gruppo A (N=136) 14 ≤ età prima visita < 25	Gruppo B (N=152) 25 ≤ età prima visita < 35	Gruppo C (N=157) 35 ≤ età prima visita < 50	P value
Circonferenza addominale >94 cm	180	25 (25,80%)	64 (52,50%)	91 (72,20%)	< 0,001
Sovrappeso o obesità (BMI ≥ 25)	208	31 (25,40%)	81 (58,70%)	96 (68,60%)	< 0,001
Ipogonadismo calcolato su TT (TT < 12 nmol/L)	246	58 (47,50%)	96 (66,20%)	92 (65,20%)	0,003
Ipogonadismo calcolato su cFT (cFT < 0,225 nmol/L)	196	41 (51,20%)	71 (65,70%)	82 (75,90%)	0,002
Alterata glicemia a digiuno (glucosio 100-126 mg/dL)	24	3 (2,50%)	7 (5,00%)	14 (10,30%)	0,028
Diabete (Hb1Ac > 6.5%)	8	0 (0,00%)	2 (1,50%)	6 (4,50%)	0,041
Insulino-resistenza (HOMA > 2.4)	123	22 (22,00%)	48 (37,50%)	51 (51,50%)	0,007
Ipercolesterolemia (LDL > 116 mg/dL)	179	18 (15,40%)	74 (52,50%)	87 (64%)	< 0,001
Ipertrigliceridemia (TG > 150 mg/dL)	69	10 (7,40%)	24 (15,80%)	35 (22,30%)	0,006
Iperomocisteinemia (omocisteina > 15 umol/L)	107	24 (23,10%)	37 (27,40%)	46 (35,40%)	0,105
Ipovitaminosi D (vitamina D < 75 nmol/L)	316	90 (76,30%)	110 (82,70%)	116 (89,20%)	0,028
Osteoporosi (Z score < -2,0)	119	25 (22,90%)	46 (34,60%)	48 (39,00%)	0,028

Procedendo dal gruppo A al gruppo C si nota un aumento della frequenza assoluta e in percentuale per tutte le variabili studiate. Tra i tre gruppi vi sono differenze statisticamente significative in tutti i casi, ad eccezione dell'iperomocisteinemia (p=0,105). L'età alla prima visita sembra impattare in maniera particolarmente si-

gnificativa ($p < 0,001$) soprattutto nell'aumento della circonferenza addominale, nello sviluppo di sovrappeso o obesità e nello sviluppo di ipercolesterolemia (**Figure 18-20**).

Figura 18: Frequenza (%) di aumento della circonferenza addominale nei tre gruppi di pazienti stratificati per età alla prima visita.

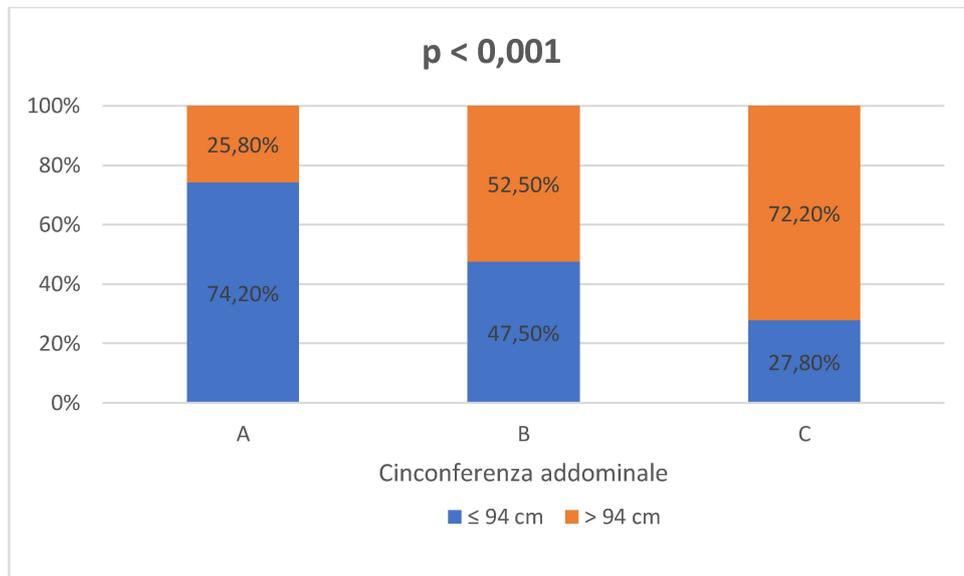


Figura 19: Frequenza (%) di sovrappeso e obesità nei tre gruppi di pazienti stratificati per età alla prima visita.

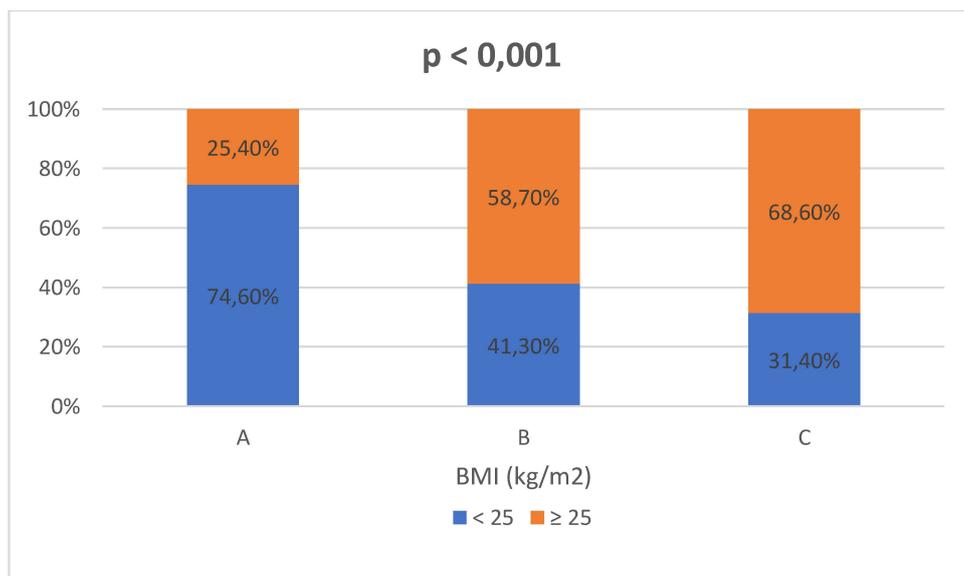
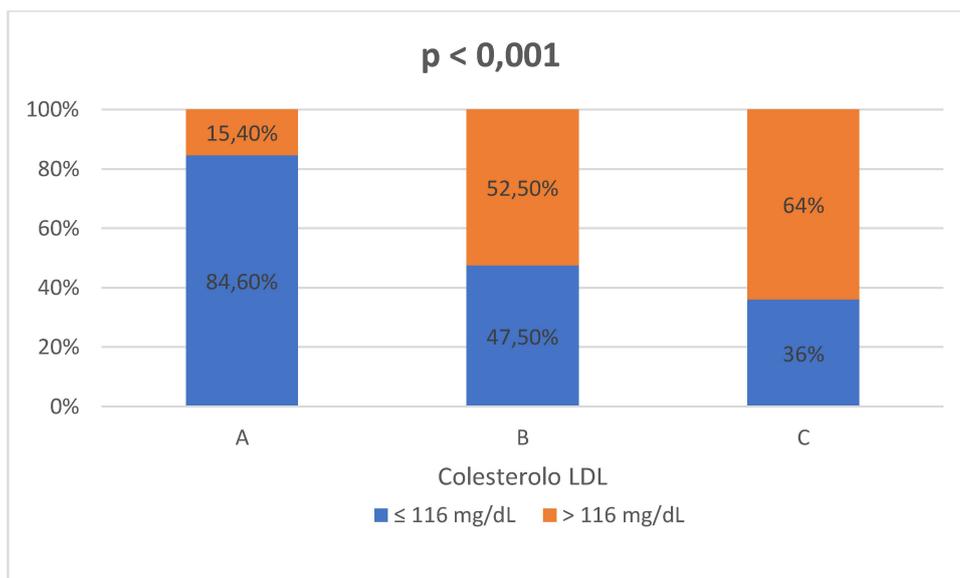


Figura 20: Frequenza (%) di ipercolesterolemia nei tre gruppi di pazienti stratificati per età alla prima visita.



Considerando il fumo come possibile fattore confondente, la significatività si mantiene per l'aumento della circonferenza addominale, il sovrappeso e l'obesità, l'ipogonadismo calcolato su TT, l'ipogonadismo calcolato su cfT, l'insulino-resistenza e l'ipercolesterolemia.

La differenza di frequenza di alterata glicemia a digiuno rispetto all'età alla prima visita resta significativa tra i fumatori, ma si perde tra i non fumatori; gli stessi risultati sono stati osservati anche per l'ipovitaminosi D.

La differenza di frequenza di osteoporosi rispetto all'età alla prima visita resta significativa tra i non fumatori ma la significatività viene persa tra i fumatori.

La differenza di frequenza di iperomocisteinemia rispetto all'età alla prima visita resta non significativa tra i non fumatori ma diventa significativa tra i fumatori.

Oltre al fumo, anche la terapia androgenica sostitutiva è stata considerata come possibile fattore confondente. Per questo motivo, sono stati presi in considerazione tutti quei pazienti che al momento della raccolta dei dati hanno dichiarato di non aver mai effettuato una terapia sostitutiva o di averla sospesa da almeno 6 mesi (n=370). Per questi pazienti è stata mantenuta la suddivisione nei gruppi A, B e C in base all'età alla prima visita. È stato dimostrato che le differenze delle frequenze di aumento della circonferenza addominale, sovrappeso e obesità, ipogonadismo calcolato su TT, ipogonadismo calcolato su cfT, alterata glicemia a di-

giuno, insulino-resistenza, ipertrigliceridemia e ipovitaminosi D sono significative.

Dei 445 pazienti, 199 hanno eseguito la biopsia testicolare (45%). Delle 199 biopsie eseguite, 72 hanno portato al recupero e alla criopreservazione di spermatozoi, con un tasso di recupero del 36,2%. **Figura 21.** Le caratteristiche cliniche dei 199 pazienti che si sono sottoposti alla biopsia testicolare sono elencate nella **tabella VII.**

Nel gruppo A, 59 pazienti si sono sottoposti alla biopsia testicolare e 27 di esse hanno avuto successo, con un tasso di recupero del 46%. Nel gruppo B, 82 pazienti si sono sottoposti alla biopsia testicolare e 30 di esse hanno avuto successo, con un tasso di recupero del 37%. Nel gruppo C, 58 pazienti si sono sottoposti alla biopsia testicolare e 15 di esse hanno avuto successo, con un tasso di recupero del 26%. **Figura 22.**

Sebbene si evidenzi una riduzione del tasso di recupero all'aumentare dell'età alla prima visita, tale riduzione non risulta statisticamente significativa ($p = 0,081$). Questo risultato viene confermato nel caso in cui si consideri il sottogruppo dei pazienti non in terapia ($N = 171$; $p = 0,053$) o quello dei pazienti in TRT ($N = 28$; $p = 0,352$). **Figure 23 e 24.**

Figura 21: esito delle 199 biopsie testicolari eseguite.

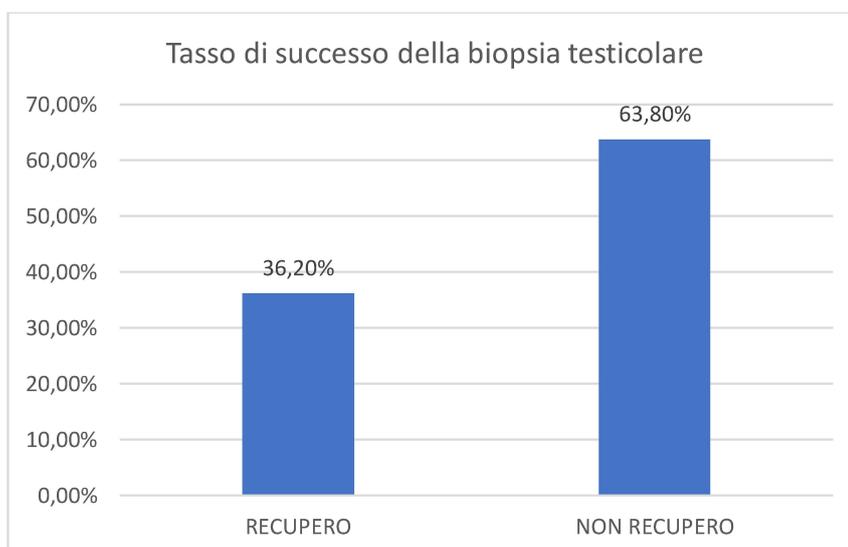


Tabella VII: caratteristiche cliniche dei pazienti che si sono sottoposti alla biopsia testicolare. 0 = nessun recupero; 1 = recupero di spermatozoi.

	Recupero	N	Media \pm Errore Std.	P value
Biopsia				
Girovita (cm)	0	100	94,99 \pm 1,43	0,382
	1	57	92,88 \pm 1,96	0,387
BMI (kg/m²)	0	115	25,23 \pm 0,42	0,08
	1	63	23,96 \pm 0,59	0,083
LH (U/L)	0	122	21,23 \pm 0,83	0,3
	1	71	19,85 \pm 1,02	0,291
FSH (U/L)	0	122	34,58 \pm 1,59	0,183
	1	71	31,34 \pm 1,63	0,157
TT (nmol/L)	0	122	10,00 \pm 0,46	0,113
	1	72	11,19 \pm 0,60	0,114
cfT (nmol/L)	0	83	0,21 \pm 0,02	0,726
	1	51	0,22 \pm 0,01	0,703
SHBG (nmol/L)	0	98	32,04 \pm 1,57	0,485
	1	60	33,83 \pm 2,01	0,486
Albumina (g/L)	0	99	47,95 \pm 0,25	0,33
	1	60	47,28 \pm 0,77	0,416
Estradiolo (pg/mL)	0	118	99,90 \pm 3,44	0,398
	1	67	95,13 \pm 4,35	0,391
GGT (U/L)	0	110	19,02 \pm 0,98	0,357
	1	65	20,88 \pm 2,02	0,411
Glicemia (mg/dL)	0	116	81,30 \pm 0,95	0,922
	1	68	81,46 \pm 1,46	0,926
Hb1Ac (%)	0	114	5,32 \pm 0,03	0,347
	1	67	5,38 \pm 0,07	0,406
Insulina (mU/L)	0	105	10,52 \pm 0,72	0,542
	1	64	9,68 \pm 1,31	0,574
HOMA	0	105	2,18 \pm 0,16	0,9
	1	63	2,14 \pm 0,36	0,911
Colesterolo TOT (mg/dL)	0	117	183,45 \pm 3,33	0,511
	1	69	179,68 \pm 4,87	0,524
LDL (mg/dL)	0	118	119,52 \pm 3,00	0,252
	1	68	113,64 \pm 4,28	0,263
HDL (mg/dL)	0	116	50,20 \pm 1,38	0,718
	1	67	49,39 \pm 1,73	0,714
Trigliceridi (mg/dL)	0	114	93,76 \pm 4,54	0,554
	1	67	99,09 \pm 8,82	0,593
Omocisteina (mg/dL)	0	113	15,06 \pm 0,86	0,353
	1	65	13,85 \pm 0,84	0,315
PTH (ng/L)	0	114	37,10 \pm 3,85	0,794

	1	62	35,63 ± 2,80	0,758
Calcemia (mmol/L)	0	114	2,42 ± 0,02	0,182
	1	67	2,45 ± 0,01	0,113
Fosforemia (mmol/L)	0	112	0,95 ± 0,02	0,437
	1	64	0,98 ± 0,02	0,43
PSA (ug/L)	0	115	0,52 ± 0,03	0,077
	1	69	0,89 ± 0,27	0,17
Vitamina D (nmol/L)	0	110	58,10 ± 2,34	0,869
	1	63	57,42 ± 3,64	0,874
Volume bitesticolare	0	117	3,80 ± 0,14	0,014
	1	70	4,44 ± 0,24	0,022
Volume prostatico	0	105	17,59 ± 0,51	0,595
	1	65	17,11 ± 0,81	0,614

Figura 22: esiti delle biopsie testicolari nei tre gruppi di pazienti, stratificati in base all'età alla prima visita. A = età alla prima visita tra 14 e 24 anni; B = età alla prima visita tra 25 e 34 anni; C = età alla prima visita tra 35 e 49 anni.

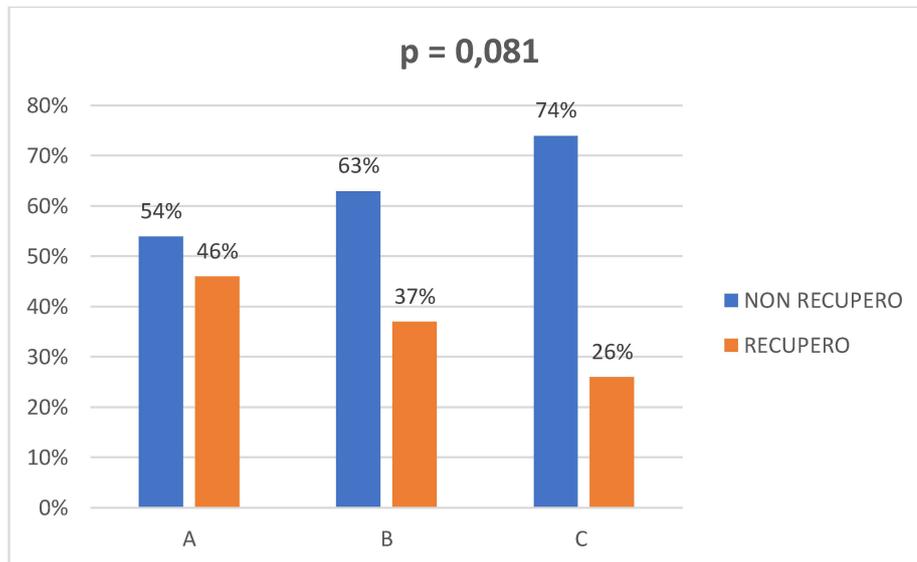


Figura 23: esiti delle biopsie testicolari eseguite nei pazienti (N = 171) non in terapia androgenica sostitutiva (TRT).

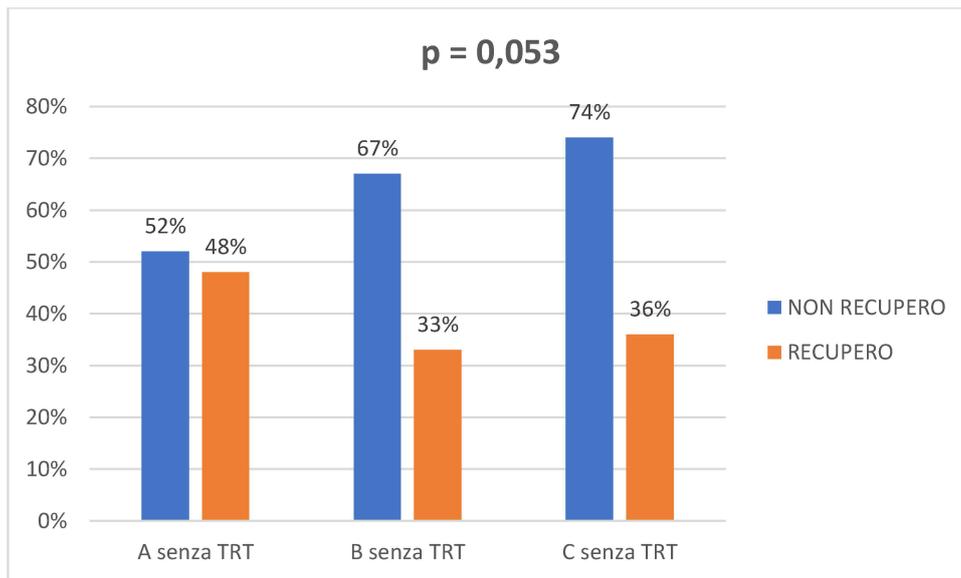
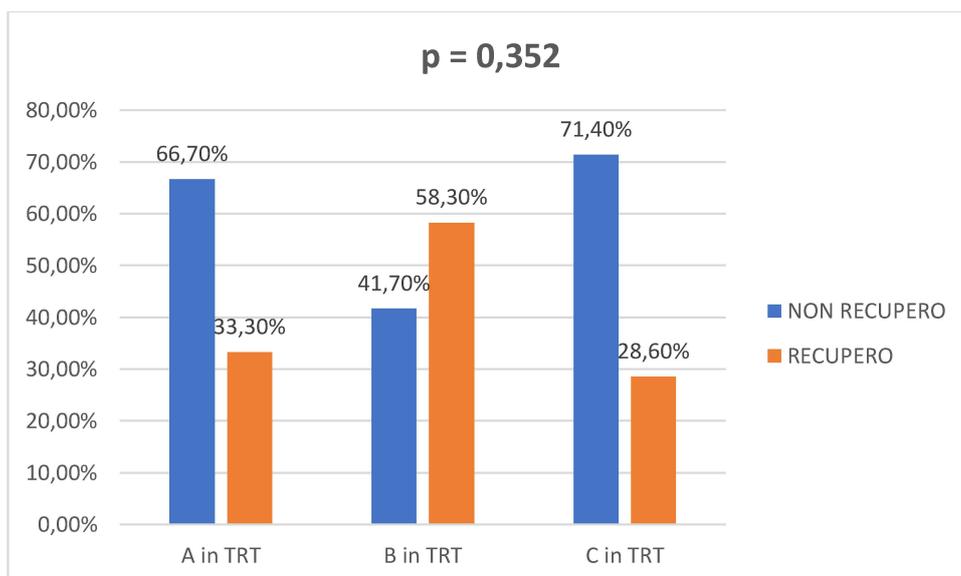


Figura 24: esiti delle biopsie testicolari eseguite nei pazienti (N = 28) in corso di terapia androgenica sostitutiva (TRT).



7. DISCUSSIONE

L'incidenza della sindrome di Klinefelter (SK) è pari a 1 maschio nato vivo su 500 (1:500)(2) ma è possibile che sia sotto-stimata a causa della presentazione fenotipica, spesso molto sfumata (4,29).

La diagnosi precoce della sindrome di Klinefelter è di fondamentale importanza per prevenire o ridurre le comorbidità nella vita futura dei pazienti. La SK, infatti, risulta essere correlata ad alterazioni testicolari che conducono ad una condizione di infertilità (19), ad alterazioni dell'omeostasi del glucosio (31) e ad alterazioni della mineralizzazione ossea, con riduzione della BMD (40).

Inoltre, la SK si accompagna ad una serie di comorbidità di natura cardiovascolare (60), tromboembolica (62), neoplastica (73,75) e autoimmune (79).

Una diagnosi precoce permette l'avvio del monitoraggio del paziente tramite visite di follow-up e, in caso di necessità, una tempestiva terapia androgenica sostitutiva (TRT) e/o una tempestiva integrazione di vitamina D.

Questo studio retrospettivo, condotto su 445 pazienti affetti dalla sindrome di Klinefelter, ha preso in considerazione l'età alla prima visita e l'impatto che questa rivesta sullo sviluppo delle complicanze associate alla sindrome, in particolare quelle relative al metabolismo glicolipidico e osseo. Lo studio, inoltre, ha indagato una possibile relazione tra il potenziale di fertilità e l'età alla prima visita.

L'età media alla prima visita è stata di $30,1 \pm 0,4$ anni mentre l'età media alla diagnosi è stata di $24,5 \pm 0,5$ anni. In questa casistica, dunque, l'età media alla diagnosi risulta essere più bassa rispetto a quella riportata dalla Società Italiana di Andrologia e Medicina della Sessualità (SIAMS), pari a $37,4 \pm 13,4$ anni (28).

I pazienti sono stati suddivisi in tre gruppi: gruppo A (n=136) con età alla prima visita tra 14 e 24 anni, gruppo B (n=152) con età alla prima visita tra 25 e 34 anni, gruppo C (n=157) con età alla prima visita tra 35 e 49 anni.

7.1. ANTROPOMETRIA E METABOLISMO GLICOLIPIDICO

In letteratura è ampiamente descritto che i pazienti con SK hanno un fenotipo metabolico sfavorevole, con tendenza allo sviluppo di obesità, insulino-resistenza e diabete mellito di tipo II (32).

Tra i 445 pazienti dello studio, 208 (46,7%) sono risultati sovrappeso o obesi, in 24 pazienti (5,3%) è stata riscontrata un'alterata glicemia a digiuno, in 123 (27,6%) è stata riscontrata un'insulino-resistenza e in 8 (1,7%) è stata fatta diagnosi di diabete. La percentuale di alterata glicemia a digiuno risulta essere più alta rispetto a quella riportata da *Bojesen et al.* (32), mentre la percentuale di diabete risulta essere più bassa.

La probabilità che il paziente con SK sia sovrappeso o obeso o abbia una diagnosi di alterata glicemia a digiuno, insulino-resistenza o diabete aumenta all'aumentare dell'età al momento della prima visita.

Secondo *Bojesen et al.*, il principale fattore predittivo lo sviluppo di sindrome metabolica è l'adiposità viscerale e in particolare il *truncal fat (BFtr)*: per ogni valore di BMI, i pazienti con SK hanno una percentuale maggiore di BFtr rispetto ai soggetti controllo, anche per valori di BMI che rientrano nel range di norma (**figura 3**). In questo lavoro non è stata studiata l'incidenza di sindrome metabolica; tuttavia, sono stati studiati la circonferenza addominale, il BMI e il profilo lipidico. Il nostro studio conclude che i pazienti che vengono presi in carico più tardivamente non solo hanno una maggiore probabilità di essere sovrappeso o obesi, ma hanno anche una maggiore probabilità di aumento della circonferenza addominale oltre il cut-off di 94 cm, di ipercolesterolemia e di ipertrigliceridemia, con riduzione significativa dei valori di colesterolo HDL. In altre parole, i soggetti SK presi in carico più tardivamente hanno un aumentato rischio di avere un profilo lipidico sfavorevole.

Effettuando la correzione per il fattore confondente fumo, le differenze tra le tre fasce di età restano significative, tranne nel caso di alterata glicemia a digiuno, diabete e ipertrigliceridemia. Dunque, nei soggetti fumatori, il rischio di sviluppare queste alterazioni dipende più dall'abitudine tabagica che dall'età alla prima visita.

In ogni caso, è importante una precoce presa in carico del paziente per una precoce modifica dello stile di vita, con l'incremento dell'attività fisica e con l'abolizione del fumo di sigaretta, nel caso in cui il paziente sia fumatore.

7.2. MINERALIZZAZIONE OSSEA

La riduzione della BMD e le alterazioni della microarchitettura ossea sono state descritte in molti studi su pazienti con diagnosi di SK (40). La riduzione della BMD è clinicamente rilevante: secondo studi epidemiologici sulla mortalità e sulla mortalità nei pazienti SK, la riduzione della BMD si associa ad un aumento del rischio di ospedalizzazione e di morte a causa di fratture osteoporotiche (41).

Sebbene non esistano ancora dei programmi di screening per l'osteoporosi maschile, è raccomandato effettuare una DEXA nei pazienti ipogonadici, quindi anche nei pazienti con SK. Tramite l'esecuzione della DEXA è possibile valutare la BMD, ricordando, tuttavia, che non tutte le fratture da fragilità vengono riscontrate in pazienti osteoporotici. Tali fratture, infatti, possono essere riscontrate anche in pazienti osteopenici o addirittura con una BMD normale (107).

Per questo motivo, l'esecuzione della DEXA nei pazienti con SK è assolutamente necessaria, ma probabilmente non sufficiente per definire in maniera chiara il rischio di frattura in questi pazienti (108).

In 316 pazienti (71%) di questo studio è stata riscontrata un'ipovitaminosi D, con differenze statisticamente significative tra le tre fasce d'età ($p=0,028$). La significatività si mantiene nei soggetti fumatori ma si perde in quelli non fumatori.

119 pazienti (26,7%), sono stati definiti osteoporotici; anche per quanto riguarda l'osteoporosi, sono state riscontrate differenze statisticamente significative tra le tre fasce d'età ($p=0,028$). La percentuale di osteoporosi riscontrata risulta essere più alta rispetto a quella riportata da *Grande et al.* (108), pari a 6-15%. Le differenze di osteoporosi nelle 3 fasce di età si perdono nel momento in cui si effettua la correzione per il fumo.

Infine, considerando solo i pazienti non in terapia androgenica sostitutiva, restano significativamente diversi tra le tre fasce di età i casi di ipovitaminosi D, ma non quelli di osteoporosi.

È noto che la testicolopatia presente nei soggetti con SK porti ad una carenza di vitamina D. Le cellule di Leydig, infatti, esprimono *CYP2R1*, un enzima che permette la conversione del *colecalfiferolo* in 25-OH-D3 (*calcifediolo*), che può essere ulteriormente idrossilata a livello renale ed essere dunque convertita nella

forma attiva 1,25(OH)₂-D₃ (109). Questo crea un collegamento tra la testicolopatia, i ridotti livelli di 25-OH-D₃ e le alterazioni ossee. Nei pazienti trattati con testosterone e calcifediolo si ha un aumento della BMD lombare e dello Z score significativamente maggiore ai pazienti trattati solo con testosterone (90).

Alla luce di questo aspetto è importante l'integrazione della vitamina D nei pazienti SK che mostrino un'ipovitaminosi, anche in quelli con livelli di testosterone nel range di norma. In questi pazienti l'integrazione andrebbe effettuata con il calcifediolo piuttosto che con il colecalciferolo (108).

7.3. POTENZIALE DI FERTILITA'

La sindrome di Klinefelter viene diagnosticata nel 10% dei maschi azoospermici e nel 2% della popolazione maschile infertile (91). Fino al 1966 la SK è stata considerata una condizione di assoluta infertilità; in quell'anno, tuttavia, fu effettuata la prima Testicular Sperm Extraction (TESE) con esito positivo (92).

Il tasso di recupero di spermatozoi tramite cTESE o mTESE, secondo una *overview* di diversi studi pubblicati, si attesta intorno al 50%, mentre secondo la metanalisi di Corona et al (6) si attesta intorno al 44%.

In questa coorte di pazienti, 199 soggetti hanno eseguito la biopsia testicolare (45%), tramite la procedura convenzionale (cTESE). Delle 199 biopsie eseguite, 72 hanno portato al recupero e alla criopreservazione di spermatozoi, con un tasso di recupero del 36,2%. Il tasso di successo misurato in questo studio risulta essere analogo a quello riportato da *Garolla et al.* (34,2%)(20). Questa differenza potrebbe essere dovuta al fatto che i pazienti coinvolti in questi studi erano tutti italiani, così come quelli studiati da *Garolla et al.*; nella metanalisi di Corona et al, invece, figurano nella maggior parte dei casi studi non italiani e dunque effettuati su soggetti non italiani.

Nel gruppo A, 59 pazienti si sono sottoposti alla biopsia testicolare e 27 di esse hanno avuto successo, con un tasso di recupero del 46%. Nel gruppo B, 82 pazienti si sono sottoposti alla biopsia testicolare e 30 di esse hanno avuto successo, con un tasso di recupero del 37%. Nel gruppo C, 58 pazienti si sono sottoposti alla biopsia testicolare e 15 di esse hanno avuto successo, con un tasso di recupero del 26% (**Figura 15**).

Sebbene si evidenzi una riduzione del tasso di recupero all'aumentare dell'età alla prima visita, tale riduzione non risulta statisticamente significativa ($p = 0,081$); considerando solo i soggetti non in terapia sostitutiva, la SRR continua ad essere indipendente dall'età alla prima visita ($p=0,053$).

L'età alla prima visita non è stata presa in considerazione da altri studi come possibile fattore predittivo il successo della biopsia testicolare. Lo studio di *Garolla et al.*(20), ha misurato un tasso di successo del 34,2% risultato indipendente dall'età anagrafica. Il nostro studio, non trovando correlazione tra l'età alla diagnosi e il tasso di successo della biopsia testicolare, potrebbe essere in qualche modo considerato in linea con lo studio sopracitato.

8. CONCLUSIONI

Una diagnosi precoce della sindrome di Klinefelter e una precoce presa in carico del paziente sono di fondamentale importanza per prevenire o ridurre le comorbidità nella vita futura. Il metabolismo glucidico, lipidico e fosfo-calcico, infatti, si modificano in base all'età alla prima visita e già a partire dai 25 anni i pazienti presentano un peggioramento significativo dei parametri metabolici. Per modificare il corso della SK sarebbe importante diagnosticarla precocemente al fine di prevenire le comorbidità.

Inoltre, una precoce presa in carico dei pazienti potrebbe aumentare la probabilità di recupero di spermatozoi tramite la biopsia testicolare. Infatti, il tasso di recupero si è rivelato maggiore nei soggetti più giovani. Una precoce esecuzione della biopsia testicolare sembra in grado di aumentare le probabilità dei pazienti con diagnosi di SK di avere dei figli biologici.

Per ridurre la probabilità che la sindrome di Klinefelter resti misconosciuta sono auspicabili campagne di prevenzione, che spingano i soggetti di sesso maschile a sottoporsi ad una visita andrologica già in epoca pre o peri-puberale. Inoltre, è necessario aumentare la consapevolezza della sindrome tra i professionisti del campo medico. In merito a ciò è importante ricordare che il fenotipo che viene classicamente descritto in letteratura, caratterizzato da elevata statura e corporatura ginoide, è in realtà riscontrabile solo in una piccola percentuale di pazienti.

9. BIBLIOGRAFIA

1. KLINEFELTER HF JR, REIFENSTEIN EC JR, ALBRIGHT F JR. Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 novembre 1942;2(11):615–27.
2. Los E, Ford GA. Klinefelter Syndrome. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [citato 4 giugno 2023]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482314/>
3. Higurashi M, Iijima K, Ishikawa N, Hoshina H, Watanabe N. Incidence of major chromosome aberrations in 12,319 newborn infants in Tokyo. *Hum Genet.* 1 gennaio 1979;46(2):163–72.
4. Bonomi M, Rochira V, Pasquali D, Balercia G, Jannini EA, Ferlin A, et al. Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism. *J Endocrinol Invest.* febbraio 2017;40(2):123–34.
5. Pizzocaro A, Vena W, Condorelli R, Radicioni A, Rastrelli G, Pasquali D, et al. Testosterone treatment in male patients with Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Endocrinol Invest.* dicembre 2020;43(12):1675–87.
6. Corona G, Pizzocaro A, Lanfranco F, Garolla A, Pelliccione F, Vignozzi L, et al. Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 1 maggio 2017;23(3):265–75.
7. Jacobs PA, Strong JA. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature.* 31 gennaio 1959;183(4657):302–3.
8. Jacobs PA, Hassold TJ, Whittington E, Butler G, Collyer S, Keston M, et al. Klinefelter's syndrome: an analysis of the origin of the additional sex chromosome using molecular probes. *Ann Hum Genet.* maggio 1988;52(2):93–109.
9. Wikström AM, Painter JN, Raivio T, Aittomäki K, Dunkel L. Genetic features of the X chromosome affect pubertal development and testicular degeneration in adolescent boys with Klinefelter syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2006;65:92–7.

10. Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab.* febbraio 2003;88(2):622–6.
11. Schibler D, Brook CG, Kind HP, Zachmann M, Prader A. Growth and body proportions in 54 boys and men with Klinefelter's syndrome. *Helv Paediatr Acta.* ottobre 1974;29(4):325–33.
12. Smyth CM, Bremner WJ. Klinefelter syndrome. *Arch Intern Med.* 22 giugno 1998;158(12):1309–14.
13. Bruining H, Swaab H, Kas M, van Engeland H. Psychiatric characteristics in a self-selected sample of boys with Klinefelter syndrome. *Pediatrics.* maggio 2009;123(5):e865-870.
14. De Rocco Ponce M, Selice R, Di Mambro A, De Toni L, Foresta C, Garolla A. Estradiol-Testosterone Imbalance Is Associated with Erectile Dysfunction in Patients with Klinefelter Syndrome. *J Clin Med.* 26 maggio 2021;10(11):2319.
15. Nieschlag E, Behre HM, Wieacker P, Meschede D, Kamischke A, Kliesch S. Disorders at the Testicular Level. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, curatori. *Andrology* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [citato 4 giugno 2023]. p. 193–238. Disponibile su: http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-78355-8_13
16. Linden MG, Bender BG, Robinson A. Sex chromosome tetrasomy and pentasomy. *Pediatrics.* ottobre 1995;96(4 Pt 1):672–82.
17. Winge SB, Dalgaard MD, Belling KG, Jensen JM, Nielsen JE, Aksglaede L, et al. Transcriptome analysis of the adult human Klinefelter testis and cellularity-matched controls reveals disturbed differentiation of Sertoli- and Leydig cells. *Cell Death Dis.* 22 maggio 2018;9(6):586.
18. Groth KA, Skakkebaek A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A. Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* gennaio 2013;98(1):20–30.
19. Mau-Holzmann UA. Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women. *Cytogenet Genome Res.* 2005;111(3–4):317–36.

20. Garolla A, Selice R, Menegazzo M, Valente U, Zattoni F, Iafrate M, et al. Novel insights on testicular volume and testosterone replacement therapy in Klinefelter patients undergoing testicular sperm extraction. A retrospective clinical study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;88(5):711–8.
21. Wikström AM, Raivio T, Hadziselimovic F, Wikström S, Tuuri T, Dunkel L. Klinefelter syndrome in adolescence: onset of puberty is associated with accelerated germ cell depletion. *J Clin Endocrinol Metab*. maggio 2004;89(5):2263–70.
22. Skakkebaek NE. Two types of tubules containing only Sertoli cells in adults with Klinefelter's syndrome. *Nature*. 9 agosto 1969;223(5206):643–5.
23. Sciurano RB, Luna Hisano CV, Rahn MI, Brugo Olmedo S, Rey Valzacchi G, Coco R, et al. Focal spermatogenesis originates in euploid germ cells in classical Klinefelter patients. *Hum Reprod Oxf Engl*. settembre 2009;24(9):2353–60.
24. Yamamoto Y, Sofikitis N, Mio Y, Loutradis D, Kaponis A, Miyagawa I. Morphometric and cytogenetic characteristics of testicular germ cells and Sertoli cell secretory function in men with non-mosaic Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl*. aprile 2002;17(4):886–96.
25. Salbenblatt JA, Bender BG, Puck MH, Robinson A, Faiman C, Winter JS. Pituitary-gonadal function in Klinefelter syndrome before and during puberty. *Pediatr Res*. gennaio 1985;19(1):82–6.
26. Aksglaede L, Juul A. Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. *Eur J Endocrinol*. aprile 2013;168(4):R67-76.
27. Giagulli VA, Campone B, Castellana M, Salzano C, Fisher AD, de Angelis C, et al. Neuropsychiatric Aspects in Men with Klinefelter Syndrome. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 1 gennaio 2019;19(2):109–15.
28. Pasquali D, Chiodini P, Simeon V, Ferlin A, Vignozzi L, Corona G, et al. First baseline data of the Klinefelter ItaliaN Group (KING) cohort: clinical features of adult with Klinefelter syndrome in Italy. *J Endocrinol Invest*. settembre 2022;45(9):1769–76.
29. Lanfranco F, Kamischke A, Zitzmann M, Nieschlag E. Klinefelter's syndrome. *Lancet Lond Engl*. 17 luglio 2004;364(9430):273–83.

30. Paulsen CA, Gordon DL, Carpenter RW, Gandy HM, Drucker WD. Klinefelter's syndrome and its variants: a hormonal and chromosomal study. *Recent Prog Horm Res.* 1968;24:321–63.
31. Nielsen J, Johansen K, Yde H. Frequency of diabetes mellitus in patients with Klinefelter's syndrome of different chromosome constitutions and the XYY syndrome. Plasma insulin and growth hormone level after a glucose load. *J Clin Endocrinol Metab.* agosto 1969;29(8):1062–73.
32. Bojesen A, Kristensen K, Birkebaek NH, Fedder J, Mosekilde L, Bennett P, et al. The metabolic syndrome is frequent in Klinefelter's syndrome and is associated with abdominal obesity and hypogonadism. *Diabetes Care.* luglio 2006;29(7):1591–8.
33. Pitteloud N, Hardin M, Dwyer AA, Valassi E, Yialamas M, Elahi D, et al. Increasing insulin resistance is associated with a decrease in Leydig cell testosterone secretion in men. *J Clin Endocrinol Metab.* maggio 2005;90(5):2636–41.
34. Yialamas MA, Dwyer AA, Hanley E, Lee H, Pitteloud N, Hayes FJ. Acute sex steroid withdrawal reduces insulin sensitivity in healthy men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 novembre 2007;92(11):4254–9.
35. Rotondi M, Coperchini F, Renzullo A, Accardo G, Esposito D, Groppelli G, et al. High circulating levels of CCL2 in patients with Klinefelter's syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80(3):465–7.
36. Corona G, Monami M, Rastrelli G, Aversa A, Sforza A, Lenzi A, et al. Type 2 diabetes mellitus and testosterone: a meta-analysis study. *Int J Androl.* dicembre 2011;34(6 Pt 1):528–40.
37. Selice R, Caretta N, Di Mambro A, Torino M, Palego P, Ferlin A, et al. Prostate volume and growth during testosterone replacement therapy is related to visceral obesity in Klinefelter syndrome. *Eur J Endocrinol.* dicembre 2013;169(6):743–9.
38. Zitzmann M, Bongers R, Werler S, Bogdanova N, Wistuba J, Kliesch S, et al. Gene expression patterns in relation to the clinical phenotype in Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* marzo 2015;100(3):E518–523.

39. Ferlin A, Foresta C. Cross-talk testicolo e osso. *L'Endocrinologo*. 1 agosto 2014;15(4):158–64.
40. Bojesen A, Birkebæk N, Kristensen K, Heickendorff L, Mosekilde L, Christiansen JS, et al. Bone mineral density in Klinefelter syndrome is reduced and primarily determined by muscle strength and resorptive markers, but not directly by testosterone. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. maggio 2011;22(5):1441–50.
41. Swerdlow AJ, Higgins CD, Schoemaker MJ, Wright AF, Jacobs PA, United Kingdom Clinical Cytogenetics Group. Mortality in patients with Klinefelter syndrome in Britain: a cohort study. *J Clin Endocrinol Metab*. dicembre 2005;90(12):6516–22.
42. Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, Hannoush P, Haddad G, Dlewati A, et al. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. agosto 2000;85(8):2670–7.
43. Luisetto G, Mastrogiacomo I, Bonanni G, Pozzan G, Botteon S, Tizian L, et al. Bone mass and mineral metabolism in Klinefelter's syndrome. *Osteoporos Int*. novembre 1995;5(6):455–61.
44. Wong FH, Pun KK, Wang C. Loss of bone mass in patients with Klinefelter's syndrome despite sufficient testosterone replacement. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA*. gennaio 1993;3(1):3–7.
45. Tahani N, Nieddu L, Prossomariti G, Spaziani M, Granato S, Carlomagno F, et al. Long-term effect of testosterone replacement therapy on bone in hypogonadal men with Klinefelter Syndrome. *Endocrine*. agosto 2018;61(2):327–35.
46. Ferlin A, Schipilliti M, Foresta C. Bone density and risk of osteoporosis in Klinefelter syndrome. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. giugno 2011;100(6):878–84.
47. Overvad S, Bay K, Bojesen A, Gravholt CH. Low INSL3 in Klinefelter syndrome is related to osteocalcin, testosterone treatment and body composition, as well as measures of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Andrology*. maggio 2014;2(3):421–7.

48. Aksglaede L, Molgaard C, Skakkebaek NE, Juul A. Normal bone mineral content but unfavourable muscle/fat ratio in Klinefelter syndrome. *Arch Dis Child*. gennaio 2008;93(1):30–4.
49. Kübler A, Schulz G, Cordes U, Beyer J, Krause U. The influence of testosterone substitution on bone mineral density in patients with Klinefelter's syndrome. *Exp Clin Endocrinol*. 1992;100(3):129–32.
50. Vena W, Pizzocaro A, Indirli R, Amer M, Maffezzoni F, Delbarba A, et al. Prevalence and determinants of radiological vertebral fractures in patients with Klinefelter syndrome. *Andrology*. novembre 2020;8(6):1699–704.
51. Mazziotti G, Bianchi A, Cimino V, Bonadonna S, Martini P, Fusco A, et al. Effect of gonadal status on bone mineral density and radiological spinal deformities in adult patients with growth hormone deficiency. *Pituitary*. 2008;11(1):55–61.
52. Mazziotti G, Bianchi A, Bonadonna S, Cimino V, Patelli I, Fusco A, et al. Prevalence of vertebral fractures in men with acromegaly. *J Clin Endocrinol Metab*. dicembre 2008;93(12):4649–55.
53. Mazziotti G, Porcelli T, Mormando M, De Menis E, Bianchi A, Mejia C, et al. Vertebral fractures in males with prolactinoma. *Endocrine*. giugno 2011;39(3):288–93.
54. Di Nisio A, De Toni L, Rocca MS, Ghezzi M, Selice R, Tagliavero G, et al. Negative Association Between Sclerostin and INSL3 in Isolated Human Osteocytes and in Klinefelter Syndrome: New Hints for Testis-Bone Crosstalk. *J Clin Endocrinol Metab*. 1 maggio 2018;103(5):2033–41.
55. Shanbhogue VV, Hansen S, Jørgensen NR, Brixen K, Gravholt CH. Bone geometry, volumetric density, microarchitecture, and estimated bone strength assessed by HR-pQCT in Klinefelter syndrome. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res*. novembre 2014;29(11):2474–82.
56. Adachi JD, Adami S, Gehlbach S, Anderson FA, Boonen S, Chapurlat RD, et al. Impact of prevalent fractures on quality of life: baseline results from the global longitudinal study of osteoporosis in women. *Mayo Clin Proc*. settembre 2010;85(9):806–13.

57. Jalava T, Sarna S, Pylkkänen L, Mawer B, Kanis JA, Selby P, et al. Association between vertebral fracture and increased mortality in osteoporotic patients. *J Bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* luglio 2003;18(7):1254–60.
58. Bojesen A, Gravholt CH. Morbidity and mortality in Klinefelter syndrome (47,XXY). *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. giugno 2011;100(6):807–13.
59. Price WH, Clayton JF, Wilson J, Collyer S, De Mey R. Causes of death in X chromatin positive males (Klinefelter's syndrome). *J Epidemiol Community Health.* dicembre 1985;39(4):330–6.
60. Pasquali D, Arcopinto M, Renzullo A, Rotondi M, Accardo G, Salzano A, et al. Cardiovascular abnormalities in Klinefelter syndrome. *Int J Cardiol.* 30 settembre 2013;168(2):754–9.
61. Salzano A, Arcopinto M, Marra AM, Bobbio E, Esposito D, Accardo G, et al. Klinefelter syndrome, cardiovascular system, and thromboembolic disease: review of literature and clinical perspectives. *Eur J Endocrinol.* luglio 2016;175(1):R27-40.
62. Zöller B, Ji J, Sundquist J, Sundquist K. High Risk of Venous Thromboembolism in Klinefelter Syndrome. *J Am Heart Assoc.* 20 maggio 2016;5(5):e003567.
63. Glueck CJ, Goldenberg N, Wang P. Testosterone Therapy, Thrombophilia, Venous Thromboembolism, and Thrombotic Events. *J Clin Med.* 21 dicembre 2018;8(1):11.
64. Verp MS, Simpson JL, Martin AO. Hypostatic ulcers in 47,XXY Klinefelter's syndrome. *J Med Genet.* aprile 1983;20(2):100–1.
65. Zollner TM, Veraart JCJM, Wolter M, Hesse S, Villemur B, Wenke A, et al. Leg ulcers in Klinefelter's syndrome - further evidence for an involvement of plasminogen activator inhibitor-1. *Br J Dermatol.* marzo 1997;136(3):341–4.
66. Dissemmond J, Knab J, Lehnen M, Goos M. Increased activity of factor VIII coagulant associated with venous ulcer in a patient with Klinefelter's syndrome. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV.* marzo 2005;19(2):240–2.

67. Norris PG, Rivers JK, Machin S, Dowd PM, Griffiths WA. Platelet hyper-aggregability in a patient with Klinefelter's syndrome and leg ulcers. *Br J Dermatol*. 1 luglio 1987;117(1):107–9.
68. De Morentin HM, Dodiuk-Gad RP, Brenner S. Klinefelter's syndrome presenting with leg ulcers. *Skinmed*. 2004;3(5):274–8.
69. Ramaker J, Goerdts S, Zouboulis CC, Schramm W, Orfanos CE. [Recurrent thrombophlebitis and ulcera crurum as manifestations of hereditary blood coagulation disorders and Klinefelter syndrome. Discussion based on 4 case examples]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb*. 1 settembre 1997;48(9):634–9.
70. Depaire-Duclos F, Gris JC, Dandurand M, Guillot B. Thrombotic Klinefelter syndrome associated with factor V Leiden mutation. *Arch Dermatol*. agosto 1997;133(8):1051–2.
71. Ozbek M, Oztürk MA, Ureten K, Celeni O, Erdogan M, Haznedaroglu IC. Severe arterial thrombophilia associated with a homozygous MTHFR gene mutation (A1298C) in a young man with Klinefelter syndrome. *Clin Appl Thromb*. 1 luglio 2008;14(3):369–71.
72. Chang S, Skakkebaek A, Davis SM, Gravholt CH. Morbidity in Klinefelter syndrome and the effect of testosterone treatment. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. giugno 2020;184(2):344–55.
73. Williams LA, Pankratz N, Lane J, Krailo M, Roesler M, Richardson M, et al. Klinefelter syndrome in males with germ cell tumors: A report from the Children's Oncology Group. *Cancer*. 1 ottobre 2018;124(19):3900–8.
74. Gómez-Raposo C, Zambrana Tévar F, Sereno Moyano M, López Gómez M, Casado E. Male breast cancer. *Cancer Treat Rev*. ottobre 2010;36(6):451–7.
75. Brinton LA. Breast cancer risk among patients with Klinefelter syndrome. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. giugno 2011;100(6):814–8.
76. Sanctis V, Fiscina B, Soliman A, Giovannini M, Yassin M. Klinefelter syndrome and cancer: from childhood to adulthood. *Pediatr Endocrinol Rev*. 1 settembre 2013;11:44–50.

77. Debruyne FMJ, Behre HM, Roehrborn CG, Maggi M, Wu FCW, Schröder FH, et al. Testosterone treatment is not associated with increased risk of prostate cancer or worsening of lower urinary tract symptoms: prostate health outcomes in the Registry of Hypogonadism in Men. *BJU Int.* 2017;119(2):216–24.
78. Brand JS, van der Tweel I, Grobbee DE, Emmelot-Vonk MH, van der Schouw YT. Testosterone, sex hormone-binding globulin and the metabolic syndrome: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Int J Epidemiol.* febbraio 2011;40(1):189–207.
79. BIZZARRO A, VALENTINI G, MARTINO GD, DAPONTE A, DE BEL-LIS A, IACONO G. Influence of Testosterone Therapy on Clinical and Immunological Features of Autoimmune Diseases Associated with Klinefelter's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 gennaio 1987;64(1):32–6.
80. Norton ME, Jelliffe-Pawlowski LL, Currier RJ. Chromosome abnormalities detected by current prenatal screening and noninvasive prenatal testing. *Obstet Gynecol.* novembre 2014;124(5):979–86.
81. Ishikawa T, Yamaguchi K, Kondo Y, Takenaka A, Fujisawa M. Metabolic syndrome in men with Klinefelter's syndrome. *Urology.* giugno 2008;71(6):1109–13.
82. Herlihy AS, McLachlan RI. Screening for Klinefelter syndrome. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* giugno 2015;22(3):224–9.
83. Nieschlag E, Ferlin A, Gravholt CH, Gromoll J, Köhler B, Lejeune H, et al. The Klinefelter syndrome: current management and research challenges. *Andrology.* maggio 2016;4(3):545–9.
84. López Krabbe HV, Holm Petersen J, Asserhøj LL, Johannsen TH, Christiansen P, Jensen RB, et al. Reproductive hormones, bone mineral content, body composition and testosterone therapy in boys and adolescents with Klinefelter syndrome. *Endocr Connect.* 1 aprile 2023;EC-23-0031.
85. Mehta A, Paduch DA. Klinefelter syndrome: an argument for early aggressive hormonal and fertility management. *Fertil Steril.* agosto 2012;98(2):274–83.

86. Swerdloff RS, Wang C, Cunningham G, Dobs A, Iranmanesh A, Matsumoto AM, et al. Long-term pharmacokinetics of transdermal testosterone gel in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* dicembre 2000;85(12):4500–10.
87. Kabilan A, Skakkebaek A, Chang S, Gravholt CH. Evaluation of the Efficacy of Transdermal and Injection Testosterone Therapy in Klinefelter Syndrome: A Real-Life Study. *J Endocr Soc.* 1 giugno 2021;5(6):bvab062.
88. Ross JL, Kushner H, Kowal K, Bardsley M, Davis S, Reiss AL, et al. Androgen Treatment Effects on Motor Function, Cognition, and Behavior in Boys with Klinefelter Syndrome. *J Pediatr.* giugno 2017;185:193-199.e4.
89. Bhasin S, Brito JP, Cunningham GR, Hayes FJ, Hodis HN, Matsumoto AM, et al. Testosterone Therapy in Men With Hypogonadism: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 1 maggio 2018;103(5):1715–44.
90. Ferlin A, Selice R, Di Mambro A, Ghezzi M, Di Nisio A, Caretta N, et al. Role of vitamin D levels and vitamin D supplementation on bone mineral density in Klinefelter syndrome. *Osteoporos Int J Establ Result Coop Eur Found Osteoporos Natl Osteoporos Found USA.* agosto 2015;26(8):2193–202.
91. Vloeberghs V, Verheyen G, Santos-Ribeiro S, Staessen C, Verpoest W, Gies I, et al. Is genetic fatherhood within reach for all azoospermic Klinefelter men? *PloS One.* 2018;13(7):e0200300.
92. Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, Van Assche E, Devroey P, Bonduelle M, et al. Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod Oxf Engl.* agosto 1996;11(8):1644–9.
93. Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, Veeck LL, Zaninovic N, Menendez S, et al. Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med.* 26 febbraio 1998;338(9):588–90.
94. Colpi GM, Colpi EM, Piediferro G, Giacchetta D, Gazzano G, Castiglioni FM, et al. Microsurgical TESE versus conventional TESE for ICSI in non-obstructive azoospermia: a randomized controlled study. *Reprod Biomed Online.* marzo 2009;18(3):315–9.

95. Manning M, Jünemann KP, Alken P. Decrease in testosterone blood concentrations after testicular sperm extraction for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Lancet Lond Engl.* 4 luglio 1998;352(9121):37.
96. Ramasamy R, Yagan N, Schlegel PN. Structural and functional changes to the testis after conventional versus microdissection testicular sperm extraction. *Urology.* giugno 2005;65(6):1190–4.
97. Rohayem J, Fricke R, Czeloth K, Mallidis C, Wistuba J, Krallmann C, et al. Age and markers of Leydig cell function, but not of Sertoli cell function predict the success of sperm retrieval in adolescents and adults with Klinefelter's syndrome. *Andrology.* settembre 2015;3(5):868–75.
98. Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* novembre 2005;90(11):6263–7.
99. Mehta A, Paduch DA, Schlegel PN. Successful testicular sperm retrieval in adolescents with Klinefelter syndrome treated with at least 1 year of topical testosterone and aromatase inhibitor. *Fertil Steril.* ottobre 2013;100(4):e27.
100. Maiburg MC, Hoppenbrouwers AC, van Stel HF, Giltay JC. Attitudes of Klinefelter men and their relatives towards TESE-ICSI. *J Assist Reprod Genet.* settembre 2011;28(9):809–14.
101. Rives N, Milazzo JP, Perdrix A, Castanet M, Joly-Hélas G, Sibert L, et al. The feasibility of fertility preservation in adolescents with Klinefelter syndrome. *Hum Reprod Oxf Engl.* giugno 2013;28(6):1468–79.
102. Gies I, Oates R, De Schepper J, Tournaye H. Testicular biopsy and cryopreservation for fertility preservation of prepubertal boys with Klinefelter syndrome: a pro/con debate. *Fertil Steril.* febbraio 2016;105(2):249–55.
103. Turriff A, Macnamara E, Levy HP, Biesecker B. The Impact of Living with Klinefelter Syndrome: A Qualitative Exploration of Adolescents and Adults. *J Genet Couns.* agosto 2017;26(4):728–37.

104. Close S, Fennoy I, Smaldone A, Reame N. Phenotype and Adverse Quality of Life in Boys with Klinefelter Syndrome. *J Pediatr.* settembre 2015;167(3):650–7.
105. de Ronde W, de Haan A, Drent ML. Quality of life is reduced in patients with Klinefelter syndrome on androgen replacement therapy. *Eur J Endocrinol.* marzo 2009;160(3):465–8.
106. Herlihy A, McLachlan RI, Gillam L, Cock M, Collins V, Halliday J. The psychosocial impact of Klinefelter syndrome and factors influencing quality of life. *Genet Med.* 2011;13(7):632–42.
107. Therdyothin A, Amphansap T, Apiromyanont K. Trabecular bone score as an additional therapeutic decision tool in osteoporosis and osteopenia. *Osteoporos Sarcopenia.* 1 settembre 2022;8(3):123–30.
108. Grande G, Graziani A, Mambro A, Selice R, Ferlin A. Osteoporosis and bone metabolism in patients with Klinefelter syndrome. *Endocr Connect.* 1 maggio 2023;
109. Porcelli T, Maffezzoni F, Pezzaioli LC, Delbarba A, Cappelli C, Ferlin A. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Male osteoporosis: diagnosis and management - should the treatment and the target be the same as for female osteoporosis? *Eur J Endocrinol.* 1 settembre 2020;183(3):R75–93.