



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

Dipartimento di Medicina – DIMED

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

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Impatto dei polimorfismi dei geni FSHB e FSHR in pazienti con
sindrome di Klinefelter**

Relatore:

Ch.mo Prof. Alberto Ferlin

Correlatore:

Dott. Andrea Graziani

Laureando: Riccardo D'Andrea

Anno Accademico 2023-2024

INDICE

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	3
INTRODUZIONE	5
1. DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA	5
2. PATOGENESI	6
2.1 Anomalie cromosomiche	6
2.2 Ruolo del recettore degli androgeni	8
2.3 Alterazioni testicolari	19
2.4 Asse ipotalamico-ipofisario-testicolare	10
2.4.1 Ormone follicolo-stimolante.....	10
2.4.2 Polimorfismi dei geni FSHB/FSHR.....	11
2.4.3 Genotipo FHSB/FSHR nella sindrome di Klinefelter.....	12
3. FENOTIPO CLINICO	13
3.1 Assetto ormonale nelle varie fasi della vita	14
3.1.1 Età fetale e neonatale.....	15
3.1.2 Infanzia e adolescenza.....	15
3.1.3 Età adulta.....	16
3.2 Comorbidità	17
4. TRATTAMENTO DELLA SINDROME DI KLINEFELTER	20
4.1 Trattamento nelle varie fasi della vita	20
4.1.1 Infanzia.....	20
4.1.2 Adolescenza.....	20
4.1.3 Età adulta.....	21
4.2 Potenziale di fertilità nella sindrome di Klinefelter	22

5. SCOPO DELLO STUDIO.....	23
6. MATERIALI E METODI.....	24
6.1 Anamnesi ed esame obiettivo.....	24
6.2 Esami ematochimici.....	24
6.3 Ecocolordoppler scrotale.....	24
6.4 Analisi genetica.....	25
6.5 Testicular sperm extraction – TESE.....	25
6.6 Terapia sostitutiva con testosterone.....	26
6.7 Analisi statistica.....	26
7. RISULTATI.....	27
8. DISCUSSIONE.....	38
9. CONCLUSIONI.....	45
 BIBLIOGRAFIA.....	 46

RIASSUNTO

Premesse

La sindrome di Klinefelter (KS) (47, XXY) è la più comune causa genetica di infertilità nel sesso maschile e gli individui affetti presentano un assetto ormonale di ipogonadismo ipergonadotropo.

Studi condotti recentemente hanno dimostrato come i polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) dei geni *FSHB/FSHR* possano influenzare i livelli sierici sia di Ormone Follicolo-Stimolante (FSH) che di altri parametri andrologici.

Scopo dello studio

Lo scopo dello studio è indagare, in una coorte di pazienti affetti da KS, l'impatto che i SNP *FSHB-211 G>T* e *FSHR 2039A>G* possono avere su alcuni parametri, sia andrologici che metabolici

Materiali e Metodi

Lo studio retrospettivo ha selezionato una coorte di 473 pazienti con diagnosi certa di KS afferenti alla UOC di Andrologia e Medicina della Riproduzione della Azienda Ospedaliera - Università di Padova. Inizialmente è stata valutata l'associazione fra i SNPs *FSHB-211 G>T* e *FSHR 2039A>G*, separatamente, ed alcuni parametri andrologici e metabolici, indipendentemente dalla presenza o meno di una terapia sostitutiva con testosterone (TRT). Successivamente, per alcuni parametri andrologici, i pazienti sono stati ulteriormente stratificati anche in base alla presenza o assenza di TRT.

Risultati

Indipendentemente dalla presenza di TRT, è stato trovato che il genotipo *GT* di *FSHB -211G>T* presenta livelli medi di LH significativamente più alti rispetto al genotipo *GG*. Inoltre, il genotipo *GG* di *FSHB* è stato associato ad una prevalenza maggiore di ipercolesterolemia (Colesterolo LDL > 116 mg/dL) rispetto al genotipo *GT*. Il genotipo *FSHR 2039A>G* non è stato associato significativamente ad alcun parametro metabolico considerato. Nessun genotipo di *FSHB/FSHR* ha influenzato significativamente le percentuali di recupero di spermatozoi alla biopsia testicolare.

Stratificando i pazienti anche per la presenza o meno di TRT, nei pazienti con terapia attiva il Volume bitesticolare si riduce significativamente, sia per il genotipo *GG* che per il genotipo *GT* di *FSHB -211G>T*, rispetto ai pazienti non in terapia. Inoltre, per il genotipo *AG* di *FSHR 2039A>G*, la presenza di TRT abbassa significativamente i valori medi sia di che di FSH e Volume bitesticolare.

Discussione e conclusioni

Nella prima parte dello studio abbiamo evidenziato come i genotipi di *FSHB* e *FSHR* possano influenzare significativamente alcuni parametri: in merito ai parametri andrologici il genotipo *GT* di *FSHB* è stato associato a valori di LH più alti rispetto al genotipo *GG* indipendentemente dalla terapia. Nessuna associazione è stata trovata tra il genotipo di *FSHB* ed i parametri metabolici considerati, fatta eccezione per una maggior prevalenza di ipercolesterolemia nei pazienti con genotipo *GG*. Non è stata riscontrata alcuna associazione statisticamente significativa tra i parametri andrologici e metabolici studiati e i tre genotipi di *FSHR*. Inoltre, nessuno tra i genotipi di *FSHB/FSHR* si sono dimostrati determinanti nel recupero di spermatozoi alla biopsia testicolare.

Stratificando i pazienti anche in base alla presenza di TRT, è stato dimostrato come, sia per il genotipo *GG* che per il genotipo *GT* di *FSHB -211G>T*, è il solo Volume bitesticolare a ridursi significativamente nei pazienti con TRT presente.

In tal senso, nessuna variazione significativa di LH e FSH è stata trovata.

Per quanto concerne *FSHR 2039A>G*, nel genotipo *AG*, la presenza di TRT abbassa significativamente i valori medi sia di LH che FSH e Volume bitesticolare.

La presenza di alcune associazioni statisticamente significative rilevate in questo, in combinazione con i dati presenti in letteratura, non giustifica ad oggi l'uso dei SNPs dei SNPs *FSHB-211 G>T* e *FSHR 2039A>G* come marcatori clinici nella KS. Saranno necessari ulteriori studi in materia.

ABSTRACT

Introduction

Klinefelter Syndrome (KS) (47, XXY) represents the most common genetic cause of male infertility, characterized by a hypergonadotropic hypogonadism hormonal setting. Recent studies have demonstrated the influence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the *FSHB/FSHR* genes on serum levels of Follicle-Stimulating Hormone (FSH) and other andrological parameters.

Aim of the study

The aim of this study is to investigate the impact of *FSHB-211 G>T* and *FSHR 2039A>G* SNPs on andrological and metabolic parameters in a cohort of KS patients.

Materials and Methods

A retrospective study was conducted on 473 patients with KS with confirmed diagnosis attending the Andrology and Reproductive Medicine Unit at Padova University Hospital. The association between *FSHB-211 G>T* and *FSHR 2039A>G* SNPs and selected andrological and metabolic parameters was initially assessed independently of testosterone replacement therapy (TRT). Then, patients were further stratified based on TRT status for certain andrological parameters.

Results

Regardless of TRT status, the *GT* genotype of *FSHB-211 G>T* was found to be associated with significantly higher LH concentrations compared to the *GG* genotype. Additionally, the *GG* genotype of *FSHB* was associated with a higher prevalence of hypercholesterolemia (according to cLDL concentrations, above 116 mg/dL) compared to the *GT* genotype. The *FSHR 2039A>G* genotype was not significantly associated with any metabolic parameter considered. None of the *FSHB/FSHR* genotypes influenced sperm retrieval rates at testicular biopsy. Stratifying patients by TRT status, a significant reduction in bilateral testicular volume was observed in TRT-treated patients for both *GG* and *GT* genotypes of *FSHB-211 G>T*. Furthermore, for the *AG* genotype of *FSHR 2039A>G*, TRT

significantly lowered mean LH and FSH values as well as bilateral testicular volume.

Discussion and Conclusion

In the first part of the study, we highlighted significant influences of *FSHB* and *FSHR* genotypes on certain parameters. Considering andrological parameters, the *FSHB-GT* genotype was associated with higher LH values compared to *GG* genotype regardless of therapy. No association was found between *FSHB* genotype and studied metabolic parameters except for a higher prevalence of hypercholesterolemia in *GG* genotype patients. No statistically significant association was found between andrological and metabolic parameters studied and the three *FSHR* genotypes. Furthermore, none of the *FSHB/FSHR* genotypes proved to be determinants in sperm retrieval rates at testicular biopsy.

Stratifying patients based on TRT presence, it was demonstrated that, for both *GG* and *GT* genotypes of *FSHB-211 G>T*, only bilateral testicular volume was significantly reduced in patients with present TRT. In this regard, no significant variations in LH and FSH concentrations were found. Regarding *FSHR 2039A>G*, in the *AG* genotype, TRT presence significantly lowered mean LH and FSH values as well as bilateral testicular volume. The presence of some statistically significant associations observed in this study, in combination with existing literature data, does not justify the use of *FSHB-211 G>T* and *FSHR 2039A>G* SNPs as clinical markers in KS to date. Further studies will be necessary in this regard.

INTRODUZIONE

1. DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

La sindrome di Klinefelter (KS) è un disturbo caratterizzato dalla presenza di uno o più cromosomi sessuali X soprannumerari in pazienti di sesso maschile ($X_{1+n}Y$).

La KS è il disturbo cromosomico nonché la causa genetica di infertilità più frequente nel sesso maschile [1,2,3].

La sindrome fu descritta per la prima volta nel 1942, in una coorte di 9 pazienti maschi caratterizzata da ginecomastia, testicoli piccoli, scarsa virilizzazione e assenza di spermatogenesi [4]. Successivamente la KS venne associata alla presenza di un cromosoma X soprannumerario [5,6,7].

La prevalenza della KS è all'incirca di 1 maschio su 600, tuttavia solo il 25-50% dei soggetti con KS viene correttamente diagnosticata e seguita in un percorso di follow up [3,8,9,10].

Circa l'80-90% dei pazienti con KS presenta cariotipo 47,XXY; il restante 10-20% dei pazienti presenta, invece, aneuploidie di grado maggiore, mosaicismo 46,XY/47,XXY, oppure cromosomi X strutturalmente anomali e disfunzionali [10].

La KS è, come precedentemente accennato, la causa genetica di infertilità più frequente nei maschi: è presente nel 14.7% dei pazienti azoospermici e in circa il 3-4% di maschi infertili [11], [12].

2. PATOGENESI

2.1 Anomalie cromosomiche

La presenza di un cromosoma X in sovrannumero ($X_{1+n}Y$) rappresenta il principio del processo patogenetico nella KS e dunque dei suoi risvolti clinici e terapeutici. Nella forma classica di KS (cariotipo 47, XXY), il cromosoma X eccedente è dovuto ad una mancata disgiunzione meiotica, materna o paterna, durante la gametogenesi. La non disgiunzione (ovulare o spermatica) avviene con frequenza sovrapponibile fra padre e madre dei pazienti con KS classica (47, XXY) [13].

Nel 10-20% circa dei pazienti, invece, è presente mosaicismo per KS: in questi individui alcune cellule presentano cariotipo 47, XXY (proprio della KS), mentre altre cellule possiedono cariotipo normale (46, XY) [11,14]. La KS con mosaicismo deriva da una fallace disgiunzione mitotica durante le prime fasi dello sviluppo fetale, dunque cronologicamente successiva alla fecondazione dell'ovulo da parte dello spermatozoo. Tali pazienti presentano un fenotipo clinico più lieve [11,13].

Molto rari sono, invece, i pazienti con più di 2 cromosomi X (es: 48, XXX). Tendenzialmente, all'aumentare del numero dei cromosomi X, aumenta anche la gravità del fenotipo clinico, sia fisico che psichico. Questa considerazione suggerisce come la presenza di cromosomi X in eccesso sia responsabile, in primis, di un'anomala espressione genica, la quale è a sua volta alla base del fenotipo clinico descritto nella KS [3,13,14].

Normalmente, individui sani di sesso femminile presentano cariotipo 46, XX; individui maschili sani sono, invece, dotati di cariotipo 46, XY. Quest'ultima condizione è definita di emizigosi.

Nelle donne, per evitare un'espressione elevata dei geni localizzati sul cromosoma X, uno dei due cromosomi X, durante le prime fasi dello sviluppo embrionale, viene inattivato secondo un processo noto come lyonizzazione (in onore di Mary F. Lyon, ricercatrice inglese che per prima ipotizzò e descrisse il fenomeno) [15].

L'inattivazione del cromosoma X (XCI, X chromosome inactivation) si avvale di meccanismi genetici ed epigenetici di regolazione. Nelle cellule somatiche delle femmine, dunque, uno dei due cromosomi X viene inattivato. Ciò avviene nell'embriogenesi durante la gastrulazione. La scelta del cromosoma X da silenziare è del tutto casuale.

Il silenziamento di uno dei cromosomi X avviene mediante la metilazione di specifiche sequenze di DNA e la successiva formazione di cromatina, la quale è strutturalmente inaccessibile al complesso della RNA-polimerasi, rendendo di fatto impossibile l'espressione genica. Microscopicamente, il cromosoma X inattivato (Xi) è visibile nel nucleo come una regione di cromatina molto densa, detta corpo di Barr [15, 16].

Il gene che controlla la XCI è il gene XIST (X inactivation specific transcript), situato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq); questo locus genico produce un trascritto non codificante, XIST RNA, che agisce come uno dei determinanti principali nel processo di lyonizzazione. Nello specifico, è il Xi a produrre il trascritto. XIST RNA si localizza a livello del nucleo, non codifica per alcuna proteina e agisce appaiandosi ad una regione nota come X inactivation center (Xic, centro di inattivazione del cromosoma X), un locus cis-attivo che coordina il processo di XCI. XIST è assente nei maschi con cariotipo 46, XY.

All'interno della Xic, è presente un ulteriore elemento di rilievo nel processo, l'X control element (Xce, Elemento di controllo del cromosoma X), destinata a controllare quale cromosoma X inattivare. In pazienti con KS, il locus Xce sarà presente in eterozigosi, uno dei due locus sarà più attivo e ciò determinerà quale sarà il cromosoma X attivo per quella linea cellulare. In caso di omozigosi per Xce, la XCI avverrà sempre casualmente [11,17,18].

Studi recenti riguardanti il pattern di XCI hanno evidenziato come, in realtà, circa il 15% dei geni di ogni Xi sia in realtà comunque espresso nella cellula. Dei restanti geni, il 20% ha un pattern variabile di inattivazione, il 65% risulta sempre non espresso [17]. Questo pattern è descritto sia nelle femmine, sia in ogni altra situazione in cui sia presente più di un cromosoma X, come ad esempio nella

KS[19]. I geni che maggiormente sfuggono alla XCI, essendo dunque espressi, sono preferenzialmente localizzati sul braccio corto del cromosoma X (Xp)[17]; alcuni studi indicano tuttavia il braccio lungo del cromosoma X (Xq) come maggiormente implicato nella definizione del fenotipo del paziente con KS[19].

2.2 Ruolo del recettore degli androgeni

Il recettore degli androgeni (AR) è una proteina recettoriale appartenente alla famiglia dei recettori nucleari. AR è un fattore di trascrizione ligando-inducibile, con selettività esclusiva per gli androgeni. Il AR è costituito da tre domini: un dominio ad azione transattivante (TAD, trans-activating domain), localizzato all'estremità N-terminale, un dominio di legame a specifiche sequenze di DNA (DBD, DNA binding domain), ed un dominio ad alta affinità per il ligando androgenico (LBD, Ligand Binding Domain) [20].

L'ormone androgeno, fortemente lipofilo, attraversa la membrana cellulare e lega AR, formando un dimero. Il cambiamento conformazionale determinato dal legame ligando-recettore permette al complesso dimerico ligando-AR di traslare del nucleo e di legarsi alle sequenze genomiche specifiche per il DBD[21].

Il gene per AR è localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (locus Xq11-12) e possiede, a livello del primo esone, un alto grado di polimorfismo all'interno della popolazione. Il substrato genetico del polimorfismo è più precisamente localizzato nella regione codificante per TAD, una sequenza ricca di triplette nucleotidiche CAG [20, 22].

È stato dimostrato che questo polimorfismo è fortemente correlato all'affinità di AR con il proprio ligando: recettori con un minor numero di triplette CAG mostrano non solo un'affinità maggiore per i ligandi (formando un dimero ligando-recettore più stabile), ma anche una migliore capacità trans-attivante verso le sequenze DNA target. AR con un maggior numero di triplette, invece, presentano una minore stabilità nel legame ligando-recettore. In particolare, un numero di triplette maggiore di 40 determina una patologia X-linked nota come Malattia di Kennedy o Atrofia muscolare spino-bulbare (X-SBMA, X-linked

Spinobulbar muscle atrophy). In aggiunta al fenotipo neuromuscolare, alcune caratteristiche chiave della X-SBMA sono proprio l'ipogonadismo marcato e la ginecomastia [22, 23].

Teoricamente, nei pazienti con KS, l'inattivazione di uno dei due cromosomi X, e dunque di uno dei due loci di AR, dovrebbe essere casuale. In realtà, recenti studi hanno descritto come venga preferenzialmente inattivato il cromosoma X portatore del polimorfismo a minor numero di triplette CAG (quindi dell'AR a maggior attività)[23,24]. Un'elevata lunghezza delle triplette CAG è direttamente correlata ad un peggior assetto androgenico [22,24].

La lunghezza della sequenza a triplette CAG dell'AR si è, per ora, dimostrato l'unico parametro genetico in grado di descrivere l'ampio fenotipo clinico dei pazienti con KS, soprattutto per quanto riguarda l'ipogonadismo, l'infertilità, la ginecomastia e la mineralizzazione ossea [21, 23, 25].

2.3 Alterazioni testicolari

L'aneuploidia cromosomica presente nella KS determina una progressiva degenerazione testicolare accompagnata ad una spermatogenesi molto alterata o del tutto assente. Più specificatamente, il cromosoma X soprannumerario determinerebbe, a partire dall'età puberale, un processo di ialinizzazione e fibrosi a livello dei tubuli seminiferi [26]. La progressiva perdita di parenchima testicolare rappresenta uno dei determinanti principali della condizione di ipogonadismo in età adulta [27].

La deplezione delle cellule germinali (tramite morte cellulare per apoptosi), invece, sembrerebbe iniziare già durante la vita intrauterina [28]; questo processo subirebbe un primo rallentamento durante l'infanzia, per poi accelerare e degenerare durante pubertà e adolescenza, periodo in cui l'insufficienza androgenica inizia a rendersi evidente [29, 30].

2.4 Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi

L'ipotalamo produce e rilascia il fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH), il quale agisce a livello dell'ipofisi anteriore, stimolando la stessa a sintetizzare e rilasciare gli ormoni follicolo-stimolante (FSH) e luteinizzante (LH).

Questi due ormoni agiscono, nell'uomo, a livello testicolare.

L'FSH agisce sulle cellule di Sertoli stimolando la spermatogenesi, l'LH agisce sulle cellule di Leydig, stimolando la produzione di testosterone. Il testosterone prodotto sotto stimolo di LH, tra le molte funzioni che esercita, agisce anche coadiuvando l'FSH nello stimolo positivo per la spermatogenesi.

Il testosterone, inoltre, agisce mediante feedback inibitorio su ipotalamo ed ipofisi anteriore. Un ulteriore feedback inibitorio, a livello di questo asse ormonale, è dato dall'inibina B, prodotta a livello delle cellule di Sertoli sotto stimolo di FSH, questa agisce bloccando il rilascio di gonadotropine dall'ipofisi anteriore [31, 32].

Le funzioni del testosterone su tessuti, organi ed apparati sono numerose e diverse tra loro. Tra le principali: il supporto alla spermatogenesi, lo stimolo anabolico proteico mediante incremento di massa muscolare e densità ossea, lo stimolo alla produzione di eritropoietina a livello renale, lo stimolo all'emopoiesi midollare, il mantenimento di un buon apparato cutaneo mediante produzione di sebo e capelli, effetti neurali positivi come l'aumento della libido e il benessere della sfera psicocognitiva[33].

In epoca pre-natale, il testosterone stimola lo sviluppo degli organi genitali esterni, mentre in epoca puberale supporta la maturazione degli stessi e la determinazione dei caratteri sessuali secondari [31, 34].

2.4.1 Ormone follicolo-stimolante

FSH è un ormone glicoproteico la cui funzione è di regolare, in entrambi i sessi, la funzione gonadica. È pertanto definito una gonadotropina. Questa glicoproteina è composta da una subunità α , la cui struttura è comune e condivisa fra tutti gli

ormoni glicoproteici (LH, gonadotropina corionica, tireotropina), ed una subunità β , specifica e codificata dal gene *FSHB* (4.2 Kb) [35].

La specificità di funzione, fra le diverse glicoproteine elencate, è data dalla subunità β . L'interazione fra glicoproteina e corrispettivo recettore è molto selettiva e non presenta cross-reattività [36].

Il recettore per FSH (FSHR) appartiene alla famiglia dei recettori accoppiati a proteine G, ovvero a complessi transmembrana caratterizzati dalla presenza di un dominio a 7 eliche idrofobiche inserite nella membrana plasmatica e da altri due domini: intracellulare ed extracellulare [37]. Il dominio intracellulare di FSHR è associato ad una proteina Gs che comincia la cascata trasduzionale solo quando il ligando (FSH) ha legato la porzione extracellulare del recettore. FSHR si localizza principalmente a livello gonadico[38][39].

2.4.2 Polimorfismi dei geni *FSHB* e *FSHR*

I polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs o “snips”) sono delle variazioni nelle sequenze di DNA che si verificano quando un singolo nucleotide (A, T, C o G) nella sequenza di un gene cambia rispetto alla popolazione generale. Trattandosi comunque di polimorfismi, la frequenza di ogni singola variazione deve essere presente in almeno l'1% dei soggetti di una popolazione soggetta ad accoppiamento casuale ed occupante lo stesso habitat. Molti SNPs sono privi di effetti fenotipici a livello cellulare, mentre altri possono variare, positivamente o negativamente e più o meno lievemente, alcune funzioni della cellula [40].

Recentemente, sono stati eseguiti alcuni studi, riguardanti l'associazione fra alcuni SNPs dei geni *FSHB/FSHR* e la funzione ormonale e riproduttiva in pazienti maschi, sia fertili che infertili [41]. In particolare, alcuni tra i SNPs per i quali sono presenti più dati in letteratura sono *FSHB -211 G>T* ed il *FSHR 2039 A>G*.

Nelle donne, invece, alcuni polimorfismi, tra cui *FSHR2039 A>G*, si sono dimostrati capaci di influenzare le concentrazioni sieriche di FSH in vivo e la sensibilità dello stesso recettore alla stimolazione ormonale, sia durante il ciclo

mestruale, sia durante la terapia di stimolazione ovarica per la fecondazione assistita (In Vitro Fertilization, IVF) [41,42,43].

Negli uomini, tuttavia, la revisione di alcune meta-analisi riguardanti il solo SNP *FSHR2039 A>G* non ha dimostrato alcun particolare legame fra il genotipo di *FSHR* e i parametri di fertilità maschile [44, 45, 46, 47].

Più recentemente, invece, alcuni studi hanno descritto una possibile correlazione fra il SNP *FSHB-211 G>T*, i livelli sierici di FSH e la conta spermatica in coorti di pazienti maschi infertili [48,49,50]. Nello specifico, questi pazienti presentavano, per le varianti alleliche *GT* e *TT*, una riduzione nei valori suelencati. In aggiunta a questi studi, sempre di recente, è stato analizzato come la combinazione di questi 2 SNPs (*FSHB-211 G>T* e *FSHR2039 A>G*) possa impattare in maniera statisticamente significativa alcuni parametri riproduttivi maschili tra cui FSH ed LH sierici, conta spermatica totale e volumi testicolari, nello specifico portatori omozigoti dell'allele *G* di *FSHR 2039 A>G* presentavano livelli di FSH significativamente più alti e volumi testicolari più bassi in presenza delle varianti *GT/TT* di *FSHB 211 G>T* [41], [52].

2.4.3 Genotipo FSHB/FSHR nella KS

La letteratura è povera di dati e studi per quanto concerne una possibile associazione fra i genotipi di *FSHB/FSHR* e lo status clinico e riproduttivo nei pazienti con KS. Uno studio di Busch et al., pubblicato nel 2015, descrive come *FSHB-211 G>T* possa attenuare i livelli sierici di FSH nei pazienti con KS. Lo stesso studio evidenziava, inoltre, come la terapia sostitutiva con testosterone (TRT) si sia dimostrata efficace nel ridurre il tipico setting ipergonadotropo della KS, indipendentemente dal genotipo del paziente [53].

3. FENOTIPO CLINICO

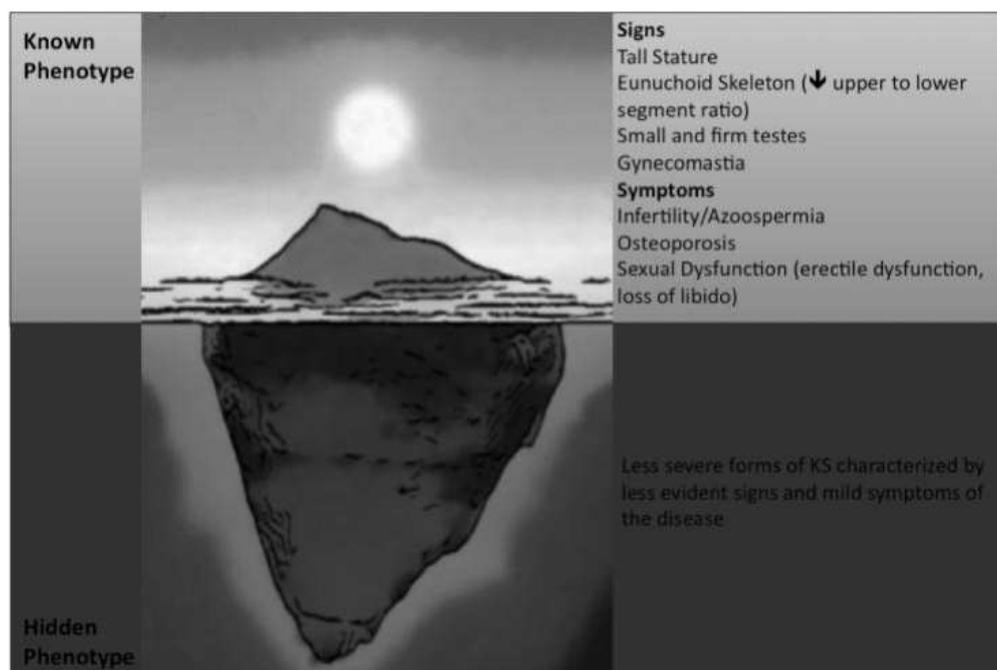


Figura 1 - Sindrome di Klinefelter: Segni e sintomi della KS in base alla gravità del fenotipo clinico[10].

Il fenotipo clinico nella KS differisce, anche per molti aspetti, a seconda dell'età di presentazione del paziente e della gravità dell'insufficienza androgenica.

In virtù della grande variabilità fenotipica, delle diverse cinetiche di insorgenza dei sintomi e dei segni della malattia e del fallimento da parte dei clinici nel riconoscere i tipici tratti della KS, solo circa il 25-50% dei pazienti ottengono una diagnosi di certezza della malattia e solo il 10% delle diagnosi avvengono in epoca pre-puberale o adolescenziale [2,11]. Molte diagnosi sono poste solamente in età adulta, ad un'età media di 30 anni [14, 53].

I principali elementi clinici riscontrabili nella KS sono: ipogonadismo, infertilità, squilibrio dell'assetto ormonale, anormalità nei caratteri sessuali secondari, problemi della sfera psico-cognitiva, osteoporosi, problematiche cardiovascolari e ridotto volume testicolare [1,2,3].

La presentazione clinica, così come l'assetto ormonale dei pazienti con KS, può essere molto variabile a seconda dell'età del paziente in questione. Prima dell'epoca puberale solo alcune caratteristiche della KS possono essere evidenti: volumi testicolari ridotti con aumentata consistenza degli stessi, lievi segni di scarsa androgenizzazione. Fenotipicamente, dunque, un bambino con KS differisce poco ed in maniera non evidente dagli altri coetanei non affetti dalla patologia [54].

Nell'adulto, invece, va posto il sospetto di KS in soggetti che si presentano con fenotipo "classico": infertilità (azoospermia/criptozoospermia/oligospermia severa), disordini della sfera sessuale (calo della libido, disfunzione erettile, mancato appagamento sessuale), severa ipotrofia testicolare (volume testicolare <5mL), alta statura con dismetria degli arti, ginecomastia, obesità viscerale con distribuzione ginoide del peso corporeo, ipogonadismo ipergonadotropo (livelli stabilmente elevati di LH e FSH) [54,55].

In aggiunta al fenotipo di KS definito "classico", molti pazienti, soprattutto con mosaicismo 46,XY/47,XXY potrebbero presentare solo alcuni di questi segni e, solitamente, di entità lieve o moderata [13,56]. Il paziente con fenotipo "non-classico" potrebbe presentare solamente alterazione del liquido seminale, ipotrofia testicolare, lieve innalzamento delle gonadotropine gonadiche [3].

3.1 Assetto ormonale nelle varie fasi della vita

Hallmark endocrinologico della KS è a condizione di ipogonadismo ipergonadotropo. Il pattern ormonale corrispondente a tale definizione è dunque caratterizzato da concentrazioni di testosterone basse o normali, elevata concentrazione di gonadotropine (LH e FSH), bassi livelli di inibinaB e di INSL3 (insulin-like 3), alti livelli di estradiolo [14,54].

La bassa quota di testosterone non è secondaria a patologia ipotalamica o ipofisaria, ma deriva da un'alterazione primaria del parenchima testicolare[58].

In merito al testosterone, la sua quota attiva (circa 1-2%) è la parte non legata a proteine plasmatiche, la restante parte si trova legata ad albumina e SHBG.

Se il legame testosterone-albumina è debole e reversibile, lo stesso non può dirsi a riguardo del legame testosterone-SHBG, per tale motivo la quota di testosterone legata ad SHBG è considerata non biodisponibile[34].

Nella pratica clinica si usa ricavare la quota di testosterone libero tramite la *formula di Vermeulen*, che mette in relazione testosterone totale (TT), SHBG ed albumina sierici [58,59]. Il testosterone libero calcolato (cFT), rispetto alla sua concentrazione plasmatica totale, è un indice sicuramente più accurato dello stato di ipogonadismo[2].

3.1.1 Età fetale e neonatale

Lo studio dei livelli di testosterone (settimane 16-20 di gestazione) nel liquido amniotico di feti con diagnosi prenatale di KS non ha mostrato differenze statisticamente significative rispetto ad una coorte controllo di feti con cariotipo 46,XY [28,57].

Il periodo neonatale dei pazienti con KS è stato definito una “mini pubertà”. I pazienti presentano infatti livelli di gonadotropine (FSH e LH) elevati. Ridotti, e dunque simili a quelli che si ripresentano poi durante lo sviluppo puberale, sono le concentrazioni di inibinaB e testosterone [61]. Questa iniziale condizione di ipoandrogenizzazione deriverebbe da un precoce status difettivo delle cellule di Leydig [43].

3.1.2 Infanzia e adolescenza

Durante l'infanzia (stadio pre-puberale) è stato descritto un normale assetto ormonale di testosterone, FSH, LH, INSL3 e InibinaB [62].

INSL3 è un ormone prodotto durante la vita fetale da cellule di Leydig sane e ben differenziate in risposta alla stimolazione da parte di LH: è pertanto un marker sensitivo di una disfunzione o anomala differenziazione delle stesse [63].

Durante la pubertà, le concentrazioni di INSL3 e testosterone calano progressivamente, fino ad assestarsi ai limiti inferiori di norma, nonostante i livelli di gonadotropine crescano progressivamente per assestarsi a livelli alti, con l'FSH che sembra mostrare un incremento più ampio e precoce [62]. Questo squilibrio ormonale, tuttavia, si dimostra ancora sufficiente al paziente con KS,

motivo per cui, in questi individui, la crescita e la maturazione proseguono, seppur con differenze interindividuali. Contestualmente, decrescono i livelli di InibinaB, mentre l'estradiolo si stabilizza a concentrazioni sieriche superiori rispetto alla norma[64].

Inoltre, lo sviluppo puberale è la fase in cui diventano evidenti le modificazioni patologiche del parenchima testicolare quali la regressione dei tubuli seminiferi, spermatogoni assenti e mancato differenziamento delle cellule di Sertoli e delle cellule di Leydig [29,61,63].

3.1.3 Età adulta

In linea con la definizione di ipogonadismo ipergonadotropo, nell'età adulta, la maggior parte dei pazienti con KS presentano valori di testosterone inferiori al limite di norma e valori di FSH ed LH fortemente elevati [11,64].

Le concentrazioni di INSL3 e di InibinaB calano drasticamente, se comparate a quelle di adulti non affetti dalla patologia [65,66].

I livelli di estradiolo, in genere, persistono elevati, come conseguenza dell'elevato stimolo sulle cellule di Leydig [66].

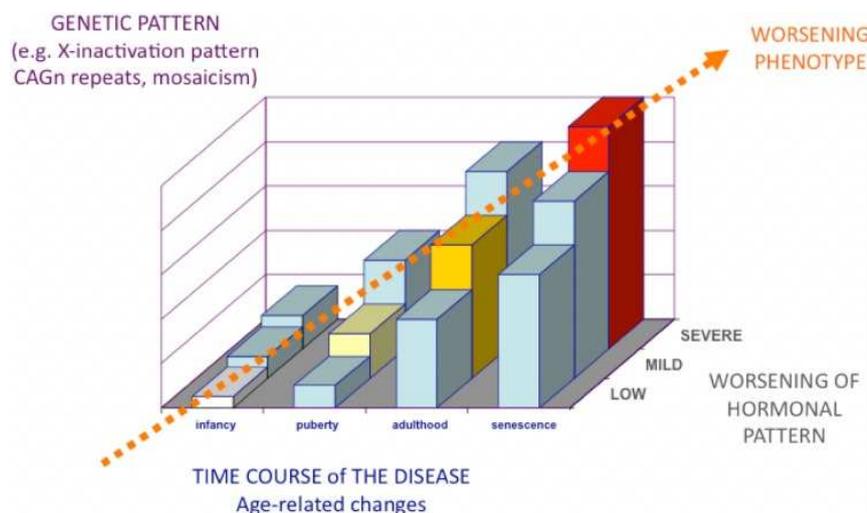


Figura 2 - Sindrome di Klinefelter: L'ampio spettro dei fenotipi nella KS dipende dalla gravità di tutti i suoi componenti (numero di cromosomi X soprannumerari, impatto genetico dei cromosomi X soprannumerari, gravità dell'ipogonadismo) così come dalla durata della malattia, dal ritardo nella diagnosi della carenza di testosterone e dall'età avanzata accompagnata dall'aumento di altre comorbidità [10].

3.2 Comorbidità

In aggiunta agli *hallmarks* clinici che contraddistinguono la KS, essa è associata ad un ventaglio di comorbidità che interessano diversi sistemi e apparati dell'organismo [1,3,11]. La frequenza e la presentazione delle stesse è molto variabile [68].

Malattie Cardiovascolari

La KS è stata associata ad un incremento del rischio relativo di cardiopatia ischemica, prolasso della valvola mitrale, varici degli arti inferiori, trombosi venosa profonda ed embolia polmonare [68,69,70].

Disordini Metabolici

L'aumentato deposito di grasso in sede viscerale, il quale riconosce come causa sia l'ipogonadismo che fattori genetici, è associato nella KS ad una aumentata prevalenza di sindrome metabolica, diabete mellito tipo 2, dislipidemia, ipertrigliceridemia e obesità [71,72,73]

Problematiche Respiratorie

Asma, Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva e polmoniti vengono diagnosticate più frequentemente nei pazienti con KS, se comparati con casi controllo [74,75].

Anomalie Muscolo-Scheletriche

La KS, come altre forme di ipogonadismo, è fortemente associata alla riduzione di massa e mineralizzazione ossea (osteopenia ed osteoporosi) [76,77]. Il rischio di fratture, in questi pazienti, è notevolmente aumentato rispetto alla popolazione generale[79].

In aggiunta al quadro di osteopenia/osteoporosi, individui con KS presentano più frequentemente osteoartriti, perdita di massa magra e debolezza muscolare[69,77]. Il quadro clinico "muscolare" tende ad essere presente anche dopo la terapia sostitutiva con testosterone [80].

Problematiche Neurologiche

La letteratura descrive un'aumentata prevalenza di tremore essenziale e parkinsonismo. In particolare, il tremore essenziale viene riportato da circa il 20-25% dei pazienti con KS [14].

Malattie Autoimmuni

I pazienti con KS presentano un aumentato rischio di sviluppare Sindrome di Sjögren, Lupus Eritematoso Sistemico, Malattia di Addison, Diabete Mellito tipo 1, Sclerosi Multipla, Artrite Reumatoide e Tiroidite di Hashimoto [67,69].

I disordini autoimmuni sono più frequenti nel sesso femminile, per motivi ormonali (alti livelli di estrogeni) e genetici (il trascritto XIST, implicato nella XCI, è stato dimostrato essere implicato nella patogenesi delle malattie autoimmunitarie)[81]. La presenza di un cromosoma X soprannumerario potrebbe essere, nei pazienti con KS, uno dei driver dell'aumentato rischio di malattie autoimmuni, essendo il rischio paragonabile a quello della popolazione femminile [82].

Problematiche Psico-Cognitive e Sociali

Disturbi dello sviluppo e dell'apprendimento, intesi come difficoltà nella concentrazione, nell'eloquio e nella memoria a breve termine, sono comuni (fino al 50% nei pazienti con KS "classica" [14,82,83].

Alcune problematiche neuropsichiatriche, come disturbi d'ansia, depressione e disturbi dello spettro autistico sono stati descritti come più comuni nella KS [82,83,84]. Il quoziente intellettivo dei pazienti con KS sembra essere solo lievemente ridotto (FSIQ medio 90) rispetto alla popolazione generale, e comunque ben lontano dal range di disabilità intellettiva [86].

Neoplasie

Nella KS, il rischio assoluto per tutte le neoplasie è invariato rispetto alla popolazione generale [67,69]; tuttavia vi è un aumento dell'incidenza di alcune neoplasie, tra cui il tumore alla mammella ed i tumori extragonadici a cellule germinali [86,87]. In contrapposizione a ciò, per via della ridotta stimolazione

androgenica presente nella KS, il carcinoma prostatico sembra avere minore incidenza rispetto alla popolazione generale[89].

L'ampio ventaglio clinico che può contraddistinguere il paziente affetto da KS è associato ad una ridotta aspettativa di vita (circa 5-6 anni di vita in meno, rispetto alla popolazione apparentemente sana) [67,89].

4. TRATTAMENTO

L'obiettivo principale della terapia nella KS è il compenso dello stato di ipogonadismo ipergonadotropo che caratterizza la malattia e la prevenzione o il trattamento delle comorbidità associate che possono presentarsi [2,90,91].

Data la grande variabilità delle condizioni che possono accompagnare la KS, il management terapeutico di questi pazienti può diventare molto complesso e richiedere un approccio multidisciplinare che coinvolga andrologi, endocrinologi, cardiologi, radiologi, urologi, neuropsichiatri infantili, etc.[14,90,91]. Inoltre, la terapia varia a seconda della presentazione clinica del paziente e della sua età. Più precoce è la diagnosi, migliore sarà l'efficacia del trattamento [10].

4.1 Trattamento nelle varie fasi della vita

4.1.1 Infanzia

Durante l'infanzia, i pazienti potrebbero necessitare di logopedia e di supporto linguistico volti a sviluppare e consolidare le competenze necessarie per il linguaggio e la comunicazione [93].

Per i deficit dell'attenzione o per i disturbi dello spettro autistico è richiesta l'esperienza di specialisti in neuropsichiatria infantile [82,84,93].

Per ciò che concerne la terapia sostitutiva con testosterone (TRT), le linee guida sulla KS della European Society of Endocrinology controindicano l'utilizzo del testosterone, ad eccezione dei pazienti che presentino micropene [2].

4.1.2 Adolescenza

Nel paziente adolescente il cui stato di ipogonadismo si trova compensato non è consigliata la TRT [3,14]. D'altro canto, la TRT è consigliata nel caso di un ritardo dell'accrescimento puberale o in presenza di segni e sintomi di ipogonadismo associata a livelli sierici di testosterone normali o solo lievemente ridotti.

Il principale *goal* della TRT, in questa fascia d'età, è il raggiungimento di uno sviluppo armonico delle caratteristiche sessuali secondarie, l'incremento della massa muscolare, della forza e garantire una corretta densità ossea [2,66].

Inoltre, la TRT si è dimostrata efficace anche nel migliorare il tono dell'umore, la concentrazione e le abilità sociali nei giovani pazienti aventi questo ventaglio di problematiche [80].

Il testosterone si è dimostrato in grado anche di correggere gradi lievi di anemia, per via della sua azione positiva sull'eritropoietina. In più promuove la sintesi di linfociti T soppressori[95].

Nonostante l'aumento dei livelli sierici di testosterone tramite TRT porti ad una riduzione dei valori di gonadotropine (FSH, LH), la terapia non ha effetti sul volume testicolare e sulla spermatogenesi [3,10,91].

Per quanto concerne la fertilità, i giovani pazienti con KS dovrebbero essere informati sulla possibilità di effettuare il prima possibile la criopreservazione di spermatozoi da liquido seminale o da biopsia testicolare [2,95,96].

4.1.3 Età adulta

Per quanto concerne l'infertilità in età adulta, è consigliata la criopreservazione degli spermatozoi da liquido seminale eiaculato o mediante estrazione testicolare degli stessi (TESE, Testicular Sperm Extraction), seguita dall'iniezione intracitoplasmatica degli spermatozoi all'interno dell'ovocita (ICSI- Intra Cytoplasmatic Sperm Injection) [98].

La TRT ed il follow up della stessa, invece, mirano a migliorare il desiderio sessuale, la funzione erettile, l'osteopenia, i disordini metabolici e tutte le altre comorbidity che possono avere come causa o concausa la scarsa androgenizzazione del paziente con KS [11,91].

4.2 Potenziale di fertilità nella KS

Una delle sfide clinico-terapeutiche più importanti nei pazienti con KS è il desiderio di paternità. Gli uomini con KS sono solitamente infertili (se non sterili), presentando gonadi molto piccole e azoospermia all'analisi dell'eiaculato [97,98]. Inoltre, come precedentemente spiegato, la storia naturale della degenerazione testicolare tipica della sindrome è data dalla progressiva fibrosi e ialinizzazione del parenchima testicolare, fino alla completa perdita di parenchima funzionale [27,57].

L'avanzamento nelle tecniche di raccolta e di preservazione del tessuto testicolare (TESE), e dunque di spermatozoi, ha portato ad un aumento sia dei tassi di raccolta spermatica (SRR, Sperm retrieval rate), sia conseguentemente dei tassi di gravidanze ottenute mediante metodiche di procreazione medicalmente assistita (PMA) [99,100].

Ulteriore elemento di complessità nella ricerca di spermatozoi da crioconservare nei pazienti con KS è il timing della procedura.

All'aumentare dell'età del paziente, sembra ridursi la possibilità che la ricerca di spermatozoi a livello testicolare sia positiva [14].

Sebbene in letteratura non vi sia una posizione forte ed univoca nel proporre la crioconservazione di tessuto testicolare in pazienti prepuberali o adolescenziali, essa dovrebbe essere sicuramente discussa e presa in considerazione nel rapporto fra medico andrologo, paziente e familiari [2,98].

L'età adolescenziale, inoltre, è solitamente il momento di inizio della TRT. In virtù del fatto che la presenza di testosterone esogeno nei testicoli sopprime la produzione spermatica endogena ed in virtù del fatto che la funzione testicolare inizia il suo declino in pubertà per poi calare rapidamente in età adulta, la raccolta per la criopreservazione potrebbe avere maggiori chances di successo se eseguita in età giovanile, e comunque prima di iniziare la TRT [79,98,101].

5. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è valutare una possibile associazione fra i SNPs dei geni *FSHB/FSHR* e alcuni parametri, sia clinici che laboratoristici in pazienti con KS.

La KS è una patologia caratterizzata da ipogonadismo ed ipo-androgenizzazione a genesi multifattoriale, essendo coinvolti fattori sia genetici che ormonali.

In particolare, pochi sono i dati presenti in letteratura sull'associazione fra i parametri riproduttivi maschili ed i SNPs dei geni *FSHB/FSHR* e ancor meno sono gli studi nei pazienti con KS; pertanto, fra gli obiettivi dello studio, vi è anche quello di porre delle basi per ulteriori, futuri, approfondimenti sul tema.

6. MATERIALI E METODI

Lo studio ha valutato retrospettivamente una coorte di 473 pazienti con diagnosi di KS e seguiti presso la UOC di Andrologia e Medicina della Riproduzione dell'Azienda Ospedaliera dell'Università degli Studi di Padova (Italia). Sono stati inclusi pazienti che hanno ricevuto diagnosi di KS (confermata mediante analisi genetica del cariotipo) e che sono stati seguiti dalla suddetta UOC in un arco temporale compreso fra marzo 2003 ed aprile 2024.

6.1 Anamnesi ed esame obiettivo

I soggetti sono stati sottoposti ad una completa valutazione andrologica, comprensiva di anamnesi ed esame obiettivo, con valutazione antropometrica.

In merito ad anamnesi ed esame obiettivo, ai fini dello studio sono stati inclusi parametri come: età alla prima visita (anni), girovita (cm), indice di massa corporea (BMI, body mass index, kg/m^2).

6.2 Esami ematochimici

Sono stati raccolti ed analizzati campioni di sangue venoso periferico. L'orario di prelievo era fra le 8:00 e le 10:00 ed i pazienti dovevano presentarsi a digiuno.

I parametri ematochimici inclusi nello studio sono stati: LH (U/L), FSH (U/L), TT (nmol/L), glicemia (mg/dL), emoglobina glicata (Hb1Ac, %), insulinemia (mU/L), trigliceridi (mg/dL), colesterolo totale (mg/dL), colesterolo HDL (mg/dL). Il colesterolo LDL (mg/dL) è stato calcolato mediante la *formula di Friedewald* [103]. Il riscontro di un colesterolo LDL calcolato > 116 mg/dL è stato considerato "ipercolesterolemia LDL >116 mg/dL".

Inoltre, è stata calcolata la sensibilità insulinica dei pazienti tramite indice HOMA (homeostasis model assessment) [104].

6.3 Ecocolordoppler scrotale

L'esecuzione di un ecocolordoppler scrotale presso gli ambulatori della UOC di Andrologia e Medicina della Riproduzione ha permesso la misurazione dei volumi testicolari (mL). La loro somma è stata utilizzata nel calcolo del Volume bitesticolare (mL), analizzato come parametro nello studio.

6.4 Analisi genetica – cariotipo e polimorfismi FSHB/FSHR.

Per l'analisi genetica, volta a confermare la diagnosi di KS mediante cariotipo e volta a determinare i polimorfismi per i geni FSHB e FSHR, è stata utilizzata la metodica PCR (Polymerase Chain Reaction) multipla su campione di DNA genomico estratto da sangue venoso periferico.

Il sequenziamento è stato processato dai sistemi: Illumina MiSeq e Amplyseq Library Plus+ Custom DNA Panel Illumina.

Successivamente il campione è stato diviso in diversi gruppi a seconda del genotipo presentante sia per i recettori FSHB (genotipi considerati *GG/GT*), sia per FSHR (genotipi *AA/AG/GG*). Un solo paziente presentava, per il SNP FSHB-211 G>T, il genotipo *TT*, ed è pertanto stato escluso in quanto avrebbe rappresentato un campione statisticamente non significativo.

6.5 Testicular sperm extraction – TESE

In seguito alla diagnosi di KS, ai pazienti è stata indicata l'esecuzione di un'analisi del liquido seminale. Confermata l'azoospermia, è stata poi proposta la biopsia testicolare per la ricerca di spermatozoi da crioconservare.

La procedura TESE è stata svolta sotto anestesia locale (Spermatic Chord Anesthesia Block) incidendo la tunica albuginea testicolare e prelevando 2 campioni di tessuto testicolare dal diametro di 5mm circa cadauno.

I campioni raccolti sono stati posizionati in una capsula Petri contenente 2mL di terreno Biggers, Whitten & Whittingham (BWW) (Irvine Scientific, Santa Ana, California, USA). Successivamente, i campioni sono stati sezionati prima e triturati finemente con aghi sterili poi, dunque centrifugati per 5 minuti. In seguito, la sospensione testicolare è stata posta in una provetta da 15mL, aggiungendo 2 mL di terreno fresco. È stata poi eseguita una ulteriore centrifugazione a 1200 x g x 10 minuti. Il surnatante è stato separato, mentre il pellet è stato sospeso con 1mL di terreno BWW. La sospensione è stata agitata per 10 minuti e successivamente analizzata dagli operatori mediante microscopia ad ingrandimento x400 per identificare la presenza degli spermatozoi.

I pazienti che si sono sottoposti alla biopsia testicolare sono poi stati suddivisi in base alla voce "Recupero spermatozoi".

6.6 Terapia sostitutiva con testosterone

I pazienti sono stati divisi in due gruppi, in base alla presenza o meno di TRT. Nello specifico il valore “Terapia Assente” indicava che il paziente non aveva mai assunto testosterone. “Terapia presente”, d’altro canto, era il gruppo di pazienti che erano in terapia al momento della valutazione andrologica.

6.7 Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con SPSS 23.0 per Windows (SPSS, Chicago, IL). I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard. Il test di Kolmogorov – Smirnov è stato utilizzato per verificare la normalità della distribuzione. Le variabili che non mostravano una distribuzione normale sono state trasformate in scala logaritmica. Le caratteristiche dei pazienti sono state confrontate con il test Chi-quadro per variabili nominali o il test t di Student per variabili continue. Per il confronto tra genotipi è stata effettuata un'analisi multivariata con post-hoc test a coppie e correzione di Bonferroni per confronti multipli. Valori $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

7. RISULTATI

Tabella 1

	<i>Totale (n)</i>	<i>Media ± Deviazione std</i>
<i>Età alla 1° visita (anni)</i>	473	31,42 ± 10,80
<i>Girovita (cm)</i>	362	96,95 ± 16,48
<i>BMI (kg/m²)</i>	421	25,44 ± 5,19
<i>LH (U/L)</i>	443	19,86 ± 9,16
<i>FSH (U/L)</i>	436	33,04 ± 22,51
<i>TT (nmol/L)</i>	446	16,58 ± 121,69
<i>Glicemia (mg/dL)</i>	417	84,05 ± 20,78
<i>Hb1Ac (%)</i>	400	5,50 ± 1,79
<i>Insulinemia (mU/L)</i>	383	11,38 ± 12,05
<i>HOMA index</i>	381	2,47 ± 3,36
<i>Colesterolo Totale (mg/dL)</i>	421	184,59 ± 40,43
<i>Colesterolo LDL (mg/dL)</i>	418	117,48 ± 34,02
<i>Colesterolo HDL (mg/dL)</i>	416	49,25 ± 13,06
<i>Trigliceridi (mg/dL)</i>	410	116,60 ± 122,10
<i>Volume bitesticolare (mL)</i>	412	4,07 ± 1,95

Abbreviazioni: BMI: body mass index; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; TT: testosterone totale; Hb1Ac: emoglobina glicata; Volume bitesticolare: somma dei volumi testicolari

La **Tabella 1** riassume le statistiche descrittive di diverse variabili cliniche misurate su un campione di pazienti. Per ogni variabile, viene riportato il numero totale di osservazioni (n), la media e la deviazione standard (SD).

Tabella 2

	<i>FSHB</i>		<i>p value</i>
	<i>GG (n=130)</i>	<i>GT (n=40)</i>	
<i>LH (U/L)</i>	19,29 ± 9,58	24,56 ± 10,49	0,001
<i>FSH (U/L)</i>	34,42 ± 16,74	30,00 ± 13,80	0,194
<i>TT (nmol/dL)</i>	9,72 ± 5,44	8,96 ± 5,20	0,140
<i>V bitesticolare (mL)</i>	4,08 ± 1,91	3,97 ± 2,54	0,410

Abbreviazioni; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; TT: testosterone totale; Volume bitesticolare: somma dei volumi testicolari

In **Tabella 2** è riportato il confronto fra i 2 genotipi del gene *FSHB* (*GG* e *GT*) ed alcuni parametri andrologici, LH, FSH, TT e Volume bitesticolare, espressi come media ± SD.

L'unica variabile, fra i parametri andrologici, che mostra una differenza statisticamente significativa è LH ($p=0.001$); in particolare, il genotipo *GT* è associato a livelli medi maggiori di LH rispetto al genotipo *GG*.

Le altre variabili (FSH, TT, Volume bitesticolare) non mostrano differenze statisticamente significative fra le due varianti genotipiche del gene *FSHB*.

Tabella 3

	<i>FSHB</i>		<i>p value</i>
	<i>GG (n=91)</i>	<i>GT (n=22)</i>	
<i>BMI (kg/m²)</i>	24,78 ± 5,23	23,44 ± 5,23	0,284
<i>Glicemia (mg/dL)</i>	88,92 ± 37,46	84,94 ± 10,31	0,623
<i>Hb1Ac (%)</i>	5,88 ± 3,60	5,26 ± 0,26	0,425
<i>Insulinemia (mU/L)</i>	13,19 ± 18,90	9,72 ± 5,47	0,307
<i>HOMA index</i>	3,26 ± 5,73	2,08 ± 1,35	0,341
<i>Colesterolo Totale (mg/dL)</i>	176,26 ± 34,50	166,50 ± 40,70	0,253
<i>Colesterolo LDL (mg/dL)</i>	112,76 ± 29,41	102,11 ± 35,35	0,146
<i>Colesterolo HDL (mg/dL)</i>	48,32 ± 12,71	52,41 ± 16,53	0,205
<i>Trigliceridi (mg/dL)</i>	106,60 ± 91,76	87,32 ± 49,39	0,344

Abbreviazioni: BMI: body mass index; Hb1Ac: emoglobina glicata;

La **Tabella 3** descrive un'analisi comparativa fra i due genotipi del gene *FSHB* e alcuni parametri metabolici quali BMI, Glicemia, Hb1Ac, Insulinemia, HOMA index, Colesterolo TOT, Colesterolo LDL, Colesterolo HDL e Trigliceridi, espressi come media ± SD.

Per ciascuna variabile elencata non sono stati riscontrate variazioni statisticamente significative tra i genotipi *GG/GT* del gene *FSHB*. Per tutte le variabili, i *p value* sono risultati superiori a 0,05.

Tabella 4

	<i>FSHR</i>			<i>p value</i>		
	<i>AA (n= 112)</i> <i>(Asn680Asn)</i>	<i>AG (n=181)</i> <i>(Asn680Ser)</i>	<i>GG (n=89)</i> <i>(Ser680Ser)</i>	<i>AA vs AG</i>	<i>AA vs GG</i>	<i>AG vs GG</i>
<i>FSH (U/L)</i>	32,31 ± 14,84	34,83 ± 30,20	30,51 ± 13,57	0,368	0,587	0,153
<i>TT (nmol/dL)</i>	9,99 ± 5,27	10,39 ± 5,76	9,77 ± 6,29	0,564	0,787	0,406
<i>V bitesticolare (ml)</i>	4,05 ± 1,67	4,09 ± 2,04	4,02 ± 1,83	0,851	0,906	0,761
<i>LH (U/L)</i>	20,22 ± 8,39	20,29 ± 9,96	19,16 ± 8,49	0,948	0,420	0,344

Abbreviazioni; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; TT: testosterone totale; Volume bitesticolare: somma dei volumi testicolari

La **Tabella 4** confronta i genotipi *AA/AG/GG* del gene *FSHR* (codificanti rispettivamente per i polimorfismi *Asn680Asn*, *Asn680Ser* e *Ser680Ser*) con le variabili andrologiche *FSH*, *TT*, *Volume bitesticolare*, *LH*, espresse come media ± SD.

Nessuna delle variabili elencate (*FSH*, *TT*, *Volume bitesticolare*, *LH*) mostra differenze statisticamente significative fra i genotipi *AA*, *AG*, *GG* del gene *FSHR*.

I p-value per tutti i confronti sono superiori a 0,005.

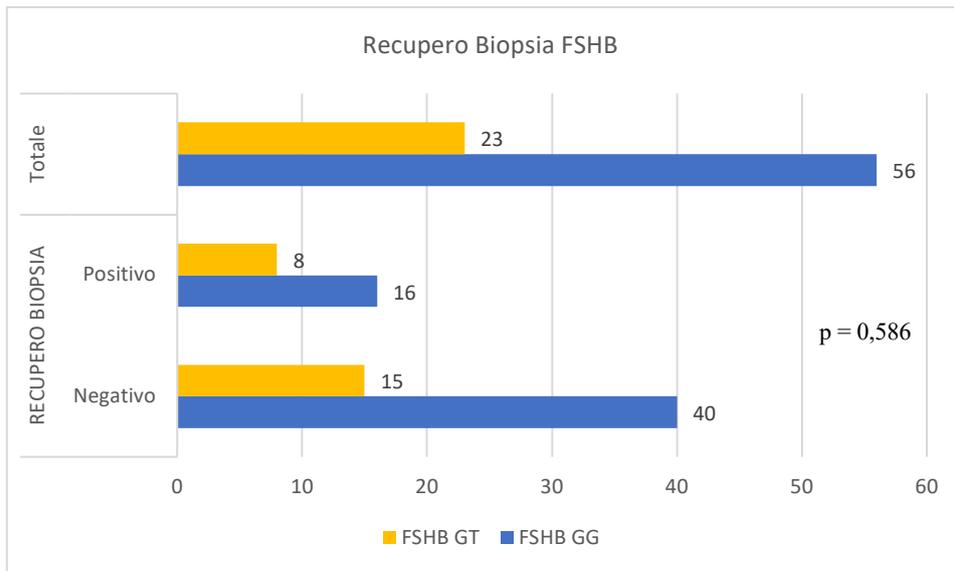
Tabella 5

	FSHR			p value		
	AA (n= 89) (Asn680Asn)	AG (n=143) (Asn680Ser)	GG (n=74) (Ser680Ser)	AA vs AG	AA vs GG	AG vs GG
BMI (kg/m ²)	25,45 ± 5,34	25,61 ± 5,31	25,67 ± 4,70	0,820	0,784	0,931
Glicemia (mg/dL)	84,43 ± 31,85	83,24 ± 21,30	82,08 ± 12,40	0,706	0,523	0,729
Hb1Ac (%)	5,41 ± 1,08	5,44 ± 1,02	5,82 ± 3,70	0,903	0,193	0,189
Insulinemia (mU/L)	11,45 ± 11,22	10,44 ± 8,34	12,07 ± 19,35	0,555	0,755	0,369
HOMA index	2,49 ± 2,83	2,22 ± 2,07	2,70 ± 6,00	0,571	0,713	0,348
Colesterolo TOT (mg/dL)	186,90 ± 41,33	186,97 ± 44,23	184,72 ± 36,92	0,990	0,740	0,706
Colesterolo LDL (mg/dL)	121,24 ± 34,21	118,96 ± 36,35	117,25 ± 32,72	0,628	0,467	0,732
Colesterolo HDL (mg/dL)	47,81 ± 11,49	48,81 ± 12,50	50,81 ± 16,36	0,580	0,155	0,298
Trigliceridi (mg/dL)	104,20 ± 71,51	114,62 ± 153,88	112,08 ± 144,77	0,562	0,706	0,894

Abbreviazioni: BMI: body mass index; Hb1Ac: emoglobina glicata;

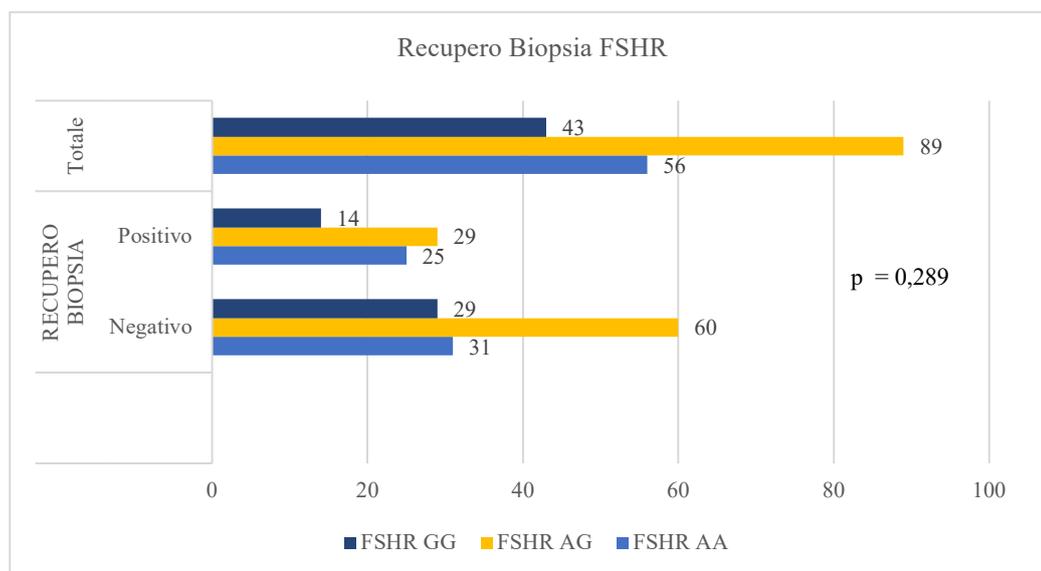
In **Tabella 5** sono riportate le seguenti variabili (BMI, Glicemia, Hb1Ac, Insulinemia, HOMA index, Colesterolo TOT, Colesterolo LDL, Colesterolo HDL e Trigliceridi) per i genotipi AA/AG/GG del gene *FSHR*, espresse come media± SD.

I p-value per tutti i confronti sono risultati superiori a 0,05, indicando l'assenza di differenze statisticamente significative tra i genotipi e le variabili considerate. Ciò implica come i diversi genotipi non influenzino in modo significativo queste variabili cliniche e biochimiche.

Figura 3

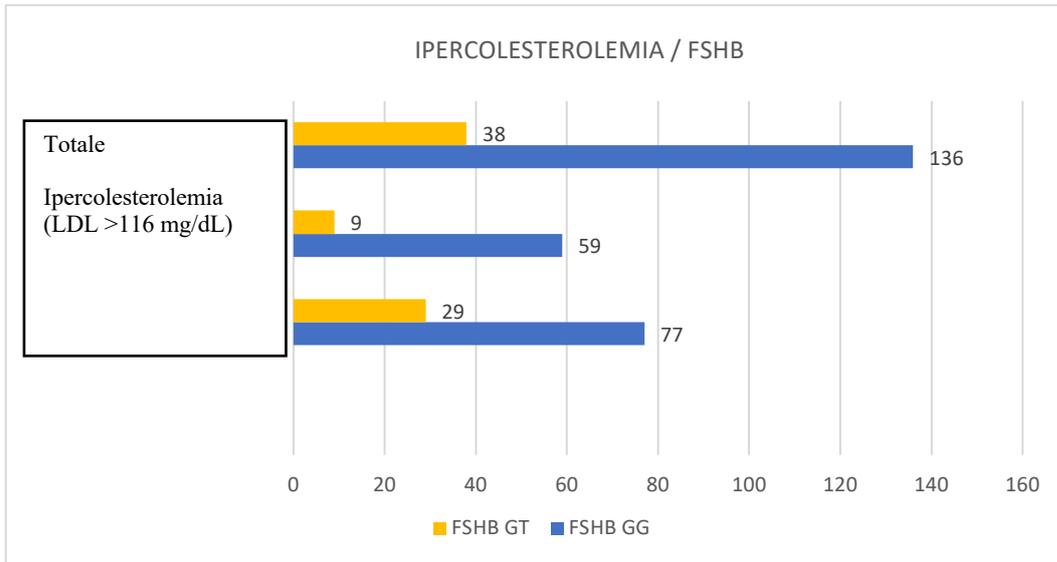
La **Figura 3** descrive il successo nel recupero degli spermatozoi alla biopsia testicolare (“Recupero Biopsia”) fra le due varianti genotipiche *GG/GT* del gene *FSHB*. Il gruppo *FSHB-GG* (n=56) presenta un numero di pazienti doppio rispetto al gruppo *FSHB-GT* (n=23), ma la distribuzione dei risultati (Recupero positivo vs Recupero negativo) è proporzionalmente simile fra i due gruppi.

Il p-value (p=0,586) indica l’assenza di una differenza statisticamente significativa nel recupero di spermatozoi alla biopsia testicolare fra le due varianti genotipiche *GG/GT*.

Figura 4

La **Figura 4** mostra i risultati del recupero degli spermatozoi alla biopsia testicolare per le tre varianti genotipiche del gene *FSHR* (*AA/AG/GG*). Il p-value riferito ($p=0,289$) indica che non vi sono differenze statisticamente significative nel recupero di spermatozoi fra i 3 gruppi genetici di pazienti.

Analizzando la distribuzione dei valori di recupero di spermatozoi fra i 3 genotipi, il genotipo *AA* presenta una maggiore percentuale di recuperi positivi rispetto agli altri 2 genotipi (44,6% vs 32,6% vs 32,6%), pur in assenza di significatività statistica.

Figura 5

La **Figura 5** mostra e analizza la distribuzione dei pazienti con e senza “Ipercolesterolemia” (Colesterolo LDL > 116 mg/dL) in relazione ai due genotipi di *FSHB* (*GG/GT*). Il genotipo *GG* mostra una maggiore prevalenza (43,4%) di Ipercolesterolemia rispetto al genotipo *GT* (23,7%) in maniera statisticamente significativa ($p=0,028$)

Tabella 6

	Terapia		<i>p value</i>
	<i>Assente (n = 290)</i>	<i>Presente (n = 152)</i>	
<i>LH (U/L)</i>	20.90 ± 8.21	17,78 ± 10,43	0,001

Tabella 7

	Terapia		<i>p value</i>
	<i>Assente (n = 287)</i>	<i>Presente (n = 148)</i>	
<i>FSH (U/L)</i>	35.66 ± 23.93	27,72 ± 18,26	<0,001

Tabella 8

	Terapia		<i>p value</i>
	<i>Assente (n = 273)</i>	<i>Presente (n = 139)</i>	
<i>V bitesticolare (mL)</i>	4.22 ± 1,76	3,77 ± 2,27	0,026

Abbreviazioni; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; Volume bitesticolare: somma dei volumi testicolari

Le **Tablelle 6,7,8** riportano i valori, descritti come $media \pm SD$, dei livelli ormonali dei parametri LH, FSH, Volume bitesticolare in relazione alla presenza o meno di terapia sostitutiva con testosterone (TRT), senza considerare i genotipi di *FSHB/FSHR*.

Sia per LH ($p=0,001$), che per FSH ($p<0,001$) e Volume bitesticolare ($p=0,026$) è presente una differenza statisticamente significativa fra i pazienti in terapia o meno. In particolare, una TRT attuale o pregressa riduce in maniera significativa i valori delle tre variabili andrologiche considerate.

Tabella 9

FHSR

	AA			AG			GG		
	Terapia Assente (n = 74)	Terapia Presente (n = 38)	P value	Terapia assente (n = 123)	Terapia presente (n = 58)	P value	Terapia assente (n = 62)	Terapia presente (n = 28)	P value
LH (U/L)	20.69 ± 7,54	19.31 ± 9,90	0,447	21,71 ± 8,87	17,27 ± 11,45	0,002	19.53±7.75	17.99±10.06	0.458
FSH (U/L)	34,18 ± 13,11	28,66 ± 17,35	± 0,228	38,77± 33,40	26,47 ± 19,70	0,001	31,29±10,69	28,35±18,47	0,574
V bitestis (mL)	4,04 ± 1,37	4,07 ± 2,17	0,944	4,32 ± 1,96	3,62 ± 2,15	0,021	4,25 ± 1,74	3,52 ± 1,93	0,086

Abbreviazioni; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; Volume bitesticolare: somma dei volumi testicolari

La **Tabella 9** descrive il rapporto fra i livelli di LH, FSH e Volume bitesticolare in relazione sia ai diversi genotipi di *FHSR* che in relazione alla presenza o meno di TRT.

Per LH, è presente significatività statistica solo nel confronto fra presenza o meno di terapia nel gruppo di pazienti con genotipo *AG* ($p=0,002$). I pazienti con genotipo *AG* ed in terapia sostitutiva presentano valori medi di LH significativamente inferiori rispetto ai pazienti *AG* non in terapia.

Anche per FSH ($p=0,001$) e per Volume bitesticolare ($p=0,021$) è presente significatività statistica solo nel confronto riguardante il genotipo *FHSR-AG*.

Per i genotipi *FHSR-AA* e *FHSR-GG*, le differenze fra i pazienti in TRT e non in terapia non sono risultate statisticamente significative in nessuno dei tre parametri andrologici considerati.

Tabella 10*FHSB*

	<i>GG</i>			<i>GT</i>		
	<i>Terapia assente</i> (<i>n</i> = 96)	<i>Terapia presente</i> (<i>n</i> = 35)	<i>p value</i>	<i>Terapia assente</i> (<i>n</i> = 29)	<i>Terapia presente</i> (<i>n</i> = 11)	<i>p value</i>
<i>LH (U/L)</i>	19,57 ± 8,32	18,21 ± 12,52	0,482	26,25 ± 10,30	20,09 ± 10,08	0,076
<i>FSH (U/L)</i>	35,25 ± 14,79	31,67 ± 21,27	0,259	32,79 ± 13,88	22,65 ± 10,99	0,075
<i>V bitesticolare</i> (<i>mL</i>)	4,29 ± 1,81	3,50 ± 2,04	0,048	4,41 ± 2,71	2,81 ± 1,55	0,027

Abbreviazioni; LH: ormone luteinizzante; FSH: ormone follicolo-stimolante; Volume bitesticolare: somma dei volumi testicolari

La **Tabella 10** mostra l'analisi fra i livelli di LH, FSH e Volume bitesticolare in relazione sia ai genotipi di *FHSB*, sia in base alla presenza o meno di TRT. La presenza di TRT, in linea generale, abbassa i valori medi di tutte e tre le variabili considerate, ma non tutte le variazioni sono però significative da un punto di vista statistico.

Per il genotipo *FHSB-GG*, la terapia ha un impatto statisticamente significativo solo sul Volume bitesticolare ($p=0,048$), mentre non si osservano differenze significative per LH ($p=0,482$) o per FSH ($p=0,259$).

Nel genotipo *FHSB-GT*, invece, la presenza di terapia determina una variazione statisticamente significativa nel Volume bitesticolare ($p=0,027$) e delle tendenze vicino alla significatività statistica per LH ($p=0,076$) ed FSH ($p=0,075$).

8. DISCUSSIONE

La KS (47, XXY) è la più frequente causa di infertilità nel sesso maschile. La sindrome è causata da un'aberrazione cromosomica (47,XXY o mosaicismo o aneuploidie di grado maggiore) che determina la presenza di almeno un cromosoma X soprannumerario nelle cellule dell'individuo maschile[10].

Inizialmente considerata fra le malattie rare, la KS è in realtà presente in circa 1 maschio su 600, rendendosi dunque una patologia ben prevalente ed impattante all'interno della popolazione generale di sesso maschile[8].

Tipicamente, i pazienti con KS presentano testicoli piccoli e fibrosi ed azoospermia all'analisi del liquido seminale. Altre caratteristiche tipicamente associate alla sindrome (ginecomastia, statura alta eunucoide, assenza di sviluppo dei caratteri sessuali secondari) sono presenti con differenze interindividuali anche marcate[10].

La KS è associata alla presenza di alcune comorbidità a carico di diversi organi e apparati come: disturbi cardiovascolari, respiratori, muscolo-scheletrici, metabolici, autoimmuni, neurologici, psico-cognitivi e sociali. Anche in virtù delle comorbidità che possono presentarsi nel paziente con KS, l'aspettativa di vita risulta lievemente ridotta[70], [76].

Una delle caratteristiche salienti della KS è la presenza di un ipogonadismo ipergonadotropo, caratterizzato da concentrazioni sieriche di testosterone inferiori alla norma (o normali) e livelli costantemente elevati di LH e FSH[66].

Il trattamento della KS si articola essenzialmente su 3 filoni tematici:

1. La TRT, volta a compensare la mancata produzione di testosterone endogeno determinata dalla progressiva perdita di parenchima testicolare propria della storia naturale della malattia. La TRT si è dimostrata efficace nel miglioramento della qualità di vita dei pazienti con KS, nonché nella prevenzione e nel miglioramento di alcune delle comorbidità associate[3], [80], [92].
2. Il trattamento dell'infertilità, il quale ha subito drastici miglioramenti in seguito allo sviluppo e al progresso delle nuove metodiche di recupero e crioconservazione di spermatozoi mediante biopsia testicolare (TESE),

permettendo ad un numero sempre maggiori di pazienti con KS di realizzare il proprio desiderio di paternità[99], [100], [101].

3. Il trattamento delle eventuali comorbidità associate, che rende ragione di un approccio multidisciplinare alla patologia[70].

Negli individui di sesso maschile, l'interazione fra FSH ed il suo recettore FSHR stimola la proliferazione delle cellule di Sertoli dall'età fetale all'età puberale; nell'adulto, invece, FSH è fondamentale nella spermatogenesi, funzionando come fattore di sopravvivenza per gli spermatogoni[105], [106]. Per raggiungere una corretta, qualitativamente e quantitativamente, spermatogenesi è necessario che l'interazione FSH-FSHR sia ottimale[38].

Recentemente, è andato in crescendo l'interesse a riguardo del possibile effetto che i diversi SNPs dei geni *FSHB* ed *FSHR* possano avere sui parametri riproduttivi maschili[41], [47], in particolare verso i polimorfismi *FSHB -211G>T* ed *FSHR 2039A>G*.

Se nelle donne sono stati descritti diversi effetti fenotipici a seconda delle diverse varianti genotipiche, l'associazione con parametri riproduttivi e metabolici maschili rimane ancora poco chiara[42], [43]. Inoltre, ancor meno è stato studiato il potenziale di questi SNPs nei pazienti con KS[53].

In letteratura è stato descritto come, nella popolazione maschile con infertilità idiopatica, per il SNP *FSHB -211G>T*, la presenza di almeno un *allele T* (genotipi *GT/TT*) sia associata a livelli significativamente inferiori di FSH sierico e di Volume testicolare[49], [50], nonché a livelli di LH significativamente superiori per quanto riguarda i pazienti con genotipo *TT*[52]. Inoltre, anche i livelli di testosterone si sono dimostrati statisticamente inferiori nei soggetti con genotipo *GT/TT*[107].

Per quanto riguarda invece il SNP *FSHR 2039A>G*, la presenza dell'*allele-G* è stata associata, in alcuni studi, a livelli di FSH superiori e di Volume testicolare inferiori rispetto ai pazienti con genotipo *FSHR-AA*. Gli stessi studi, tuttavia non

identificano variazioni sufficientemente significative dei valori di LH in base al genotipo FSHR [52], [108]. Altri studi, d'altro canto, non hanno descritto una chiara associazione fra *FSHR 2039A>G* e i parametri riproduttivi maschili in coorti di pazienti infertili[41], [47].

È stato inoltre descritto come, per questi due SNPs (*FSHB -211G>T* e *FSHR 2039A>G*), le varianti genotipiche meno prevalenti nel sesso maschile siano associate significativamente a parametri andrologici peggiori (infertilità, oligo/azoospermia) rispetto ai genotipi più frequenti (*FSHB-GG* e *FSHR-AA*)[50], [51], [109].

In aggiunta, alcune combinazioni genotipiche fra i SNPs di *FSHB* e *FSHR* sono state associate a parametri seminali peggiori: in particolare, *FSHB -211G>T* sembra avere un impatto 2-3 volte superiore rispetto a *FSHR 2039A>G* sui valori di FSH e di Volume testicolare [52].

È stato inoltre dimostrato come la presenza di un trattamento a base di FSH possa migliorare alcuni parametri riproduttivi in pazienti infertili con polimorfismo di FSHR. È stato quindi suggerito che questi SNPs possano, in futuro, rappresentare dei marcatori e dei predittori sia della funzione riproduttiva maschile che di una eventuale risposta terapeutica[48], [51].

Quanto appena descritto, però, riguarda studi su popolazioni di individui maschi con infertilità di coppia idiopatica, reclutati solo dopo aver escluso cause note di infertilità (oncologiche, infettive, genetiche, etc..).

La KS è, infatti, la causa genetica di infertilità maggiormente prevalente nel sesso maschile: fra tutte le possibili cause di infertilità, essa è presente in circa il 3-4% dei maschi infertili[11].

In letteratura, un solo studio (Busch et al, 2015) ha indagato il possibile effetto che *FSHB -211G>T* e *FSHR 2039A>G* possano avere nel setting ipergonadotropo tipico della KS[53]. In particolare, i pazienti coinvolti sono stati divisi in pazienti con TRT attiva ed in pazienti senza TRT. In merito a *FSHB -211G>T*, significativo è stato il riscontro, da parte di Busch et al. di livelli sierici ridotti di

FSH per i genotipi *GT/TT* nella coorte di pazienti non trattati. Altri parametri andrologici (come LH, TT e Volume bitesticolare) non hanno trovato associazioni significative.

Inoltre, è importante menzionare come lo studio di Busch et al. dimostri che la presenza di TRT abolisca sia la precedente associazione fra livelli sierici di FSH e l'allele *T* del gene *FSHB* che in generale le differenze nei livelli di FSH fra i vari genotipi di *FSHB*.

Per quanto riguarda *FSHR 2039A>G*, Busch et al. non hanno dimostrato alcuna associazione significativa per i parametri andrologici considerati, sia nei pazienti in trattamento che nei pazienti in assenza di terapia[53].

Il nostro studio è il secondo che indaga la possibile associazione fra alcuni parametri andrologici (LH, FSH, TT, Volumi testicolari), i polimorfismi *FSHB -211G>T* e *FSHR 2039A>G* e la presenza o meno di TRT nei pazienti con KS. È inoltre il primo studio, sempre in una coorte di pazienti con KS, che vuole descrivere se e come cambiano, in base ai genotipi studiati, la percentuale di recupero di spermatozoi da biopsia testicolare e l'andamento di alcuni parametri metabolici (BMI, Glicemia, Hb1Ac, Insulinemia, HOMA index, Colesterolo TOT, Colesterolo LDL, Colesterolo HDL e Trigliceridi).

La prima parte dello studio ha indagato la possibile associazione fra i genotipi di *FSHB/FSHR*, alcuni parametri andrologici (LH, FSH, TT, Volume bitesticolare), altri metabolici (BMI, Glicemia, Hb1Ac, Insulinemia, HOMA index, Colesterolo TOT, Colesterolo LDL, Colesterolo HDL e Trigliceridi) e la percentuale di successo nel recupero di spermatozoi da biopsia testicolare, il tutto valutando la significatività statistica indipendentemente dalla presenza o meno di TRT.

In merito a *FSHB -211G>T* è stato trovato che il genotipo *GT* presenta livelli medi di LH significativamente più alti rispetto al genotipo *GG* ($19,29 \pm 9,58$ vs $24,56 \pm 10,49$; $p=0,001$). Quanto trovato risulta in linea con alcuni studi riguardanti l'associazione fra l'allele-*T* di *FSHB -211G>T* e l'infertilità maschile

idiopatica[52]. Per contro, altri studi condotti in pazienti maschi infertili hanno segnalato una variazione significativa nei valori di FSH, TT, Volume bitesticolare in base all'allele *T*: ciò non è stato dimostrato nel nostro studio[49], [50], [107].

Lo studio di Busch et al. nei pazienti con KS ha valutato questi 4 parametri unicamente dopo stratificazione dei pazienti in base alla presenza o meno di TRT, pertanto non è stato possibile effettuare un confronto[53].

In merito alla valutazione dei parametri metabolici, non è stata trovata nessuna variazione statisticamente significativa fra i valori medi delle variabili considerate ed i genotipi *GG/GT*. Tuttavia, considerando la presenza di ipercolesterolemia (se Colesterolo LDL > 116 mg/dL) è stato notato come il genotipo *GG* sia associato significativamente ad una prevalenza maggiore di soggetti affetti da ipercolesterolemia (43,4% vs 23,7%; $p=0,028$). Per quanto riguarda il recupero di spermatozoi alla biopsia testicolare non sono state riscontrate differenze statisticamente significative fra i due genotipi in esame.

Per quanto riguarda il SNP *FSHR 2039A>G*, nessuna variabile fra LH, FSH, TT e volume bitesticolare una variazione significativa fra i tre genotipi. Quanto appena esposto è in linea con alcuni studi che non hanno dimostrato un impatto significativo del genotipo di *FSHR*[41], [47]. Alcuni studi, tuttavia, hanno dimostrato variazioni statisticamente significative di LH in base al genotipo di *FSHR*[52], [108].

In merito ai parametri metabolici precedentemente considerati e alla percentuale di successo nel recupero di spermatozoi alla biopsia testicolare, non sono state trovate associazioni statisticamente significativi nel confronto tra genotipi.

Pur in assenza di significatività statistica, il genotipo *FSHR-AA* presenta una maggiore percentuale di recuperi positivi rispetto agli altri due genotipi (44,6% vs 32,6% vs 32,6%).

La seconda parte di analisi statistica ha valutato il potenziale impatto dei genotipi di *FSHB/FSHR* anche in base alla presenza o meno di una TRT (sezione 6. "Materiali e Metodi").

In primis è stato dimostrato come, indipendentemente dal genotipo di *FSHB/FSHR*, la presenza di TRT abbassa significativamente i livelli di LH ($p=0,001$), FSH ($p<0,001$) e Volume bitesticolare ($p=0,026$) nei pazienti in TRT, rispetto ai pazienti che non hanno mai assunto terapia sostitutiva in passato. Quanto appena detto è in linea con la letteratura scientifica, in quanto la presenza di testosterone (in questo caso esogeno) agisce mediante feedback inibitorio sull'asse ipotalamico-ipofisario[34].

La nostra analisi ha dimostrato che, sia per il genotipo *GG* che per il genotipo *GT* di *FSHB -211G>T*, è il solo Volume bitesticolare a ridursi significativamente nei pazienti con TRT. Inoltre, nessuna variazione significativa di LH e FSH è stata trovata in relazione alla TRT.

Per quanto concerne il SNP *FSHR 2039A>G* è emerso che, per il genotipo *AG*, la presenza di TRT abbassa significativamente i valori medi sia di LH ($p=0,002$), che FSH ($p=0,001$) e Volume bitesticolare ($p=0,021$).

Per una completa valutazione dei risultati ottenuti, sebbene statisticamente rilevanti, è necessario riconoscere e discutere alcune limitazioni dello studio:

- La mancanza del genotipo *TT* del SNP *FSHB -211G>T*: questo genotipo è stato descritto come potenzialmente impattante sui parametri andrologici considerati nell'ambito della valutazione del potenziale di fertilità maschile; tuttavia la coorte di pazienti presa in esame presentava un solo paziente con genotipo *FSHB-TT*, motivo per cui il paziente è stato escluso dallo studio in quanto avrebbe rappresentato un campione statistico numericamente non significativo[51], [52], [107].
- L'impossibilità di valutare i pazienti con KS a mosaico, in quanto variante genetica non inclusa nello studio. Le forme di KS con mosaicismo sono tendenzialmente associate ad un fenotipo clinico ed un assetto ormonale meno alterati rispetto alla forma classica o alle forme con aneuploidie di grado maggiore; pertanto, anche questo sottogruppo cariotipico potrebbe beneficiare di ulteriori studi in merito[13].

- La mancata stratificazione dei pazienti per età e BMI, in quanto entrambe si sono dimostrate variabili determinanti nell'influenzare i livelli di gonadotropine e dei parametri riproduttivi nel sesso maschile[110], [111].
- Un ulteriore limite del nostro studio è l'assenza di una stratificazione approfondita della terapia nella coorte di pazienti. Si raccomandano pertanto ulteriori studi, aggiungendo un ulteriore cut-off temporale nella stratificazione dei pazienti in base alla terapia assunta.

9. CONCLUSIONI

In conclusione, solo recentemente è stato indagato il possibile ruolo che i polimorfismi a singolo nucleotide dei geni *FSHB/FSHR* possano avere nel determinare i parametri andrologici e riproduttivi in coorti di pazienti maschi con infertilità idiopatica di coppia; per quanto concerne la sindrome di Klinefelter la letteratura presenta un numero ancor più esiguo di dati.

Sebbene il nostro studio abbia evidenziato delle associazioni statisticamente significative fra alcuni parametri andrologici e/o metabolici ed il genotipo di *FSHB/FSHR*, i risultati ottenuti, tuttavia, non supportano ancora un loro utilizzo nella stratificazione clinico-terapeutica dei pazienti con KS.

Sarà necessario condurre ulteriori studi per consolidare e ampliare le conoscenze acquisite.

BIBLIOGRAFIA

- [1] K. A. Groth, A. Skakkebak, C. Høst, C. H. Gravholt, e A. Bojesen, «Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, fasc. 1, pp. 20–30, gen. 2013, doi: 10.1210/jc.2012-2382.
- [2] M. Zitzmann *et al.*, «European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology», *Andrology*, vol. 9, fasc. 1, pp. 145–167, gen. 2021, doi: 10.1111/andr.12909.
- [3] F. Lanfranco, A. Kamischke, M. Zitzmann, e E. Nieschlag, «Klinefelter's syndrome», *The Lancet*, vol. 364, fasc. 9430, pp. 273–283, lug. 2004, doi: 10.1016/S0140-6736(04)16678-6.
- [4] H. F. KLINEFELTER JR., E. C. REIFENSTEIN JR., e F. ALBRIGHT JR., «Syndrome Characterized by Gynecomastia, Aspermatogenesis without A-Leydigism, and Increased Excretion of Follicle-Stimulating Hormone¹», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 2, fasc. 11, pp. 615–627, nov. 1942, doi: 10.1210/jcem-2-11-615.
- [5] P. A. Jacobs e J. A. Strong, «A Case of Human Intersexuality Having a Possible XXY Sex-Determining Mechanism», *Nature*, vol. 183, fasc. 4657, pp. 302–303, gen. 1959, doi: 10.1038/183302a0.
- [6] J. T. BRADBURY, R. G. BUNGE, e R. A. BOCCABELLA, «CHROMATIN TEST IN KLINEFELTER'S SYNDROME», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 16, fasc. 5, p. 689, mag. 1956, doi: 10.1210/jcem-16-5-689.
- [7] R. G. Bunge e J. T. Bradbury, «Newer Concepts of the Klinefelter Syndrome», *J. Urol.*, dic. 1956, doi: 10.1016/S0022-5347(17)66763-6.
- [8] A. Berglund, M. H. Viuff, A. Skakkebak, S. Chang, K. Stochholm, e C. H. Gravholt, «Changes in the cohort composition of turner syndrome and severe non-diagnosis of Klinefelter, 47,XXX and 47,XXY syndrome: a nationwide cohort study», *Orphanet J. Rare Dis.*, vol. 14, fasc. 1, p. 16, gen. 2019, doi: 10.1186/s13023-018-0976-2.

- [9] A. S. Herlihy, J. L. Halliday, M. L. Cock, e R. I. McLachlan, «The prevalence and diagnosis rates of Klinefelter syndrome: an Australian comparison», *Med. J. Aust.*, vol. 194, fasc. 1, pp. 24–28, gen. 2011, doi: 10.5694/j.1326-5377.2011.tb04141.x.
- [10] M. Bonomi, V. Rochira, D. Pasquali, G. Balercia, E. A. Jannini, e A. Ferlin, «Klinefelter syndrome (KS): genetics, clinical phenotype and hypogonadism», *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 40, fasc. 2, pp. 123–134, 2017, doi: 10.1007/s40618-016-0541-6.
- [11] M. Punab *et al.*, «Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts», *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 32, fasc. 1, pp. 18–31, gen. 2017, doi: 10.1093/humrep/dew284.
- [12] G. Forti, G. Corona, L. Vignozzi, C. Krausz, e M. Maggi, «Klinefelter's Syndrome: A Clinical and Therapeutical Update», *Sex. Dev.*, vol. 4, fasc. 4–5, pp. 249–258, lug. 2010, doi: 10.1159/000316604.
- [13] A. Frühmesser e D. Kotzot, «Chromosomal variants in klinefelter syndrome», *Sex. Dev. Genet. Mol. Biol. Evol. Endocrinol. Embryol. Pathol. Sex Determ. Differ.*, vol. 5, fasc. 3, pp. 109–123, 2011, doi: 10.1159/000327324.
- [14] C. H. Gravholt, S. Chang, M. Wallentin, J. Fedder, P. Moore, e A. Skakkebaek, «Klinefelter Syndrome: Integrating Genetics, Neuropsychology, and Endocrinology», *Endocr. Rev.*, vol. 39, fasc. 4, pp. 389–423, ago. 2018, doi: 10.1210/er.2017-00212.
- [15] M. F. Lyon, «Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.)», *Nature*, vol. 190, fasc. 4773, pp. 372–373, apr. 1961, doi: 10.1038/190372a0.
- [16] M. L. Barr e E. G. Bertram, «A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis», *Nature*, vol. 163, fasc. 4148, pp. 676–677, apr. 1949, doi: 10.1038/163676a0.
- [17] L. Carrel e H. F. Willard, «X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females», *Nature*, vol. 434, fasc. 7031, pp. 400–404, mar. 2005, doi: 10.1038/nature03479.

- [18] I. M. van den Berg *et al.*, «X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos», *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 84, fasc. 6, pp. 771–779, giu. 2009, doi: 10.1016/j.ajhg.2009.05.003.
- [19] F. Tüttelmann e J. Gromoll, «Novel genetic aspects of Klinefelter's syndrome», *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 16, fasc. 6, pp. 386–395, giu. 2010, doi: 10.1093/molehr/gaq019.
- [20] R. A. Davey e M. Grossmann, «Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside», *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 37, fasc. 1, pp. 3–15, feb. 2016.
- [21] C. A. Heinlein e C. Chang, «The Roles of Androgen Receptors and Androgen-Binding Proteins in Nongenomic Androgen Actions», *Mol. Endocrinol.*, vol. 16, fasc. 10, pp. 2181–2187, ott. 2002, doi: 10.1210/me.2002-0070.
- [22] A. R. Zinn, P. Ramos, F. F. Elder, K. Kowal, C. Samango-Sprouse, e J. L. Ross, «Androgen Receptor CAG_n Repeat Length Influences Phenotype of 47,XXY (Klinefelter) Syndrome», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, fasc. 9, pp. 5041–5046, set. 2005, doi: 10.1210/jc.2005-0432.
- [23] A. Bojesen, J. M. Hertz, e C. H. Gravholt, «Genotype and phenotype in Klinefelter syndrome - impact of androgen receptor polymorphism and skewed X inactivation», *Int. J. Androl.*, vol. 34, fasc. 6 Pt 2, pp. e642-648, dic. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2605.2011.01223.x.
- [24] M. Zitzmann, M. Depenbusch, J. Gromoll, e E. Nieschlag, «X-Chromosome Inactivation Patterns and Androgen Receptor Functionality Influence Phenotype and Social Characteristics as Well as Pharmacogenetics of Testosterone Therapy in Klinefelter Patients», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, fasc. 12, pp. 6208–6217, dic. 2004, doi: 10.1210/jc.2004-1424.
- [25] Ceccato F., Zuccarello. D, Selice R., Foresta C., «New Perspectives in Klinefelter Syndrome», 2006.
- [26] U. A. Mau-Holzmann, «Somatic chromosomal abnormalities in infertile men and women», *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 111, fasc. 3–4, pp. 317–336, set. 2005, doi: 10.1159/000086906.

- [27] L. Rocher *et al.*, «Testis ultrasound in Klinefelter syndrome infertile men: making the diagnosis and avoiding inappropriate management», *Abdom. Radiol. N. Y.*, vol. 41, fasc. 8, pp. 1596–1603, ago. 2016, doi: 10.1007/s00261-016-0713-z.
- [28] W. Coerdts, H. Rehder, I. Gausmann, R. Johannisson, e A. Gropp, «Quantitative histology of human fetal testes in chromosomal disease», *Pediatr. Pathol.*, vol. 3, fasc. 2–4, pp. 245–259, 1985, doi: 10.3109/15513818509078785.
- [29] L. Aksglæde, A. M. Wikström, E. R.-D. Meyts, L. Dunkel, N. E. Skakkebaek, e A. Juul, «Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome», *Hum. Reprod. Update*, vol. 12, fasc. 1, pp. 39–48, gen. 2006, doi: 10.1093/humupd/dmi039.
- [30] A. W. Bradshaw, N. A. Deebel, M. C. Xu, S. Kogan, A. Atala, e H. Sadri-Ardekani, «Examining potential mechanisms of testicular fibrosis in Klinefelter Syndrome: A review of current understanding», *Andrology*, vol. 11, fasc. 3, pp. 435–443, mar. 2023, doi: 10.1111/andr.13327.
- [31] F. T. L. Neto, P. V. Bach, B. B. Najari, P. S. Li, e M. Goldstein, «Spermatogenesis in humans and its affecting factors», *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 59, pp. 10–26, nov. 2016, doi: 10.1016/j.semcdb.2016.04.009.
- [32] «WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen». Consultato: 23 maggio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>
- [33] G. N. Nassar e S. W. Leslie, «Physiology, Testosterone», in *StatPearls*, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2024. Consultato: 25 maggio 2024. [Online]. Disponibile su: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526128/>
- [34] Attanasio R, Borretta G, Papini E, et al., *Manuale di Endocrinologia Clinica*. Associazione Medici Endocrinologi (AME), 2010.
- [35] T. Lamminen, P. Jokinen, M. Jiang, P. Pakarinen, H. Simonsen, e I. Huhtaniemi, «Human FSH β subunit gene is highly conserved», *Mol. Hum. Reprod.*, vol. 11, fasc. 8, pp. 601–605, ago. 2005, doi: 10.1093/molehr/gah198.
- [36] Q. R. Fan e W. A. Hendrickson, «Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor», *Nature*, vol. 433, fasc. 7023, pp. 269–277, gen. 2005, doi: 10.1038/nature03206.

- [37] J. W. George, E. A. Dille, e L. L. Heckert, «Current Concepts of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene Regulation», *Biol. Reprod.*, vol. 84, fasc. 1, p. 7, gen. 2011, doi: 10.1095/biolreprod.110.085043.
- [38] M. Simoni, J. Gromoll, e E. Nieschlag, «The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology*», *Endocr. Rev.*, vol. 18, fasc. 6, pp. 739–773, dic. 1997, doi: 10.1210/edrv.18.6.0320.
- [39] M. Spaziani *et al.*, «Extra-Gonadal and Non-Canonical Effects of FSH in Males», *Pharmaceuticals*, vol. 16, fasc. 6, p. 813, mag. 2023, doi: 10.3390/ph16060813.
- [40] «Genomics.energy.gov--genome programs of the U.S. Department of Energy». Consultato: 29 maggio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://web.archive.org/web/20120422140027/http://genomics.energy.gov/>
- [41] Q. Wu *et al.*, «The susceptibility of FSHB -211G > T and FSHR G-29A, 919A > G, 2039A > G polymorphisms to men infertility: an association study and meta-analysis», *BMC Med. Genet.*, vol. 18, p. 81, ago. 2017, doi: 10.1186/s12881-017-0441-4.
- [42] R. R. Greb *et al.*, «A common single nucleotide polymorphism in exon 10 of the human follicle stimulating hormone receptor is a major determinant of length and hormonal dynamics of the menstrual cycle», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, fasc. 8, pp. 4866–4872, ago. 2005, doi: 10.1210/jc.2004-2268.
- [43] M. Perez Mayorga, J. Gromoll, H. M. Behre, C. Gassner, E. Nieschlag, e M. Simoni, «Ovarian response to follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation depends on the FSH receptor genotype», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, fasc. 9, pp. 3365–3369, set. 2000, doi: 10.1210/jcem.85.9.6789.
- [44] F. de Castro *et al.*, «Role of follicle-stimulating hormone receptor Ser680Asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone», *Fertil. Steril.*, vol. 80, fasc. 3, pp. 571–576, set. 2003, doi: 10.1016/s0015-0282(03)00795-7.

- [45] F. Tüttelmann, E. R.-D. Meyts, E. Nieschlag, e M. Simoni, «Gene polymorphisms and male infertility – a meta-analysis and literature review», *Reprod. Biomed. Online*, vol. 15, fasc. 6, pp. 643–658, gen. 2007, doi: 10.1016/S1472-6483(10)60531-7.
- [46] A. K. Lend *et al.*, «Follicle-stimulating hormone receptor gene haplotypes and male infertility in estonian population and meta-analysis», *Syst. Biol. Reprod. Med.*, vol. 56, fasc. 1, pp. 84–90, feb. 2010, doi: 10.3109/19396360903456676.
- [47] W. Wu *et al.*, «Follicle stimulating hormone receptor G-29A, 919A>G, 2039A>G polymorphism and the risk of male infertility: a meta-analysis», *Gene*, vol. 505, fasc. 2, pp. 388–392, set. 2012, doi: 10.1016/j.gene.2012.02.023.
- [48] R. Selice, A. Garolla, M. Pengo, N. Caretta, A. Ferlin, e C. Foresta, «The response to FSH treatment in oligozoospermic men depends on FSH receptor gene polymorphisms», *Int. J. Androl.*, vol. 34, fasc. 4, pp. 306–312, ago. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2605.2010.01086.x.
- [49] M. Grigorova, M. Punab, K. Ausmees, e M. Laan, «FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men», *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 23, fasc. 9, pp. 2160–2166, set. 2008, doi: 10.1093/humrep/den216.
- [50] M. Grigorova *et al.*, «Increased Prevalance of the -211 T allele of follicle stimulating hormone (FSH) beta subunit promoter polymorphism and lower serum FSH in infertile men», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, fasc. 1, pp. 100–108, gen. 2010, doi: 10.1210/jc.2009-1010.
- [51] A. Ferlin, C. Vinanzi, R. Selice, A. Garolla, A. C. Frigo, e C. Foresta, «Toward a pharmacogenetic approach to male infertility: polymorphism of follicle-stimulating hormone beta-subunit promoter», *Fertil. Steril.*, vol. 96, fasc. 6, pp. 1344-1349.e2, dic. 2011, doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.09.034.
- [52] F. Tüttelmann, M. Laan, M. Grigorova, M. Punab, S. Söber, e J. Gromoll, «Combined effects of the variants FSHB -211G>T and FSHR 2039A>G on male reproductive parameters», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 97, fasc. 10, pp. 3639–3647, ott. 2012, doi: 10.1210/jc.2012-1761.

- [53] A. S. Busch, F. Tüttelmann, M. Zitzmann, S. Kliesch, e J. Gromoll, «The FSHB –211G>T variant attenuates serum FSH levels in the supraphysiological gonadotropin setting of Klinefelter syndrome», *Eur. J. Hum. Genet.*, vol. 23, fasc. 5, pp. 700–703, mag. 2015, doi: 10.1038/ejhg.2014.142.
- [54] A. Bojesen, S. Juul, e C. H. Gravholt, «Prenatal and Postnatal Prevalence of Klinefelter Syndrome: A National Registry Study», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 88, fasc. 2, pp. 622–626, feb. 2003, doi: 10.1210/jc.2002-021491.
- [55] A. Ferlin *et al.*, «Endocrine and psychological aspects of sexual dysfunction in Klinefelter patients», *Andrology*, vol. 6, fasc. 3, pp. 414–419, 2018, doi: 10.1111/andr.12474.
- [56] H. Okada *et al.*, «Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic», *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 14, fasc. 4, pp. 946–952, apr. 1999, doi: 10.1093/humrep/14.4.946.
- [57] K. Belling *et al.*, «Klinefelter syndrome comorbidities linked to increased X chromosome gene dosage and altered protein interactome activity», *Hum. Mol. Genet.*, vol. 26, fasc. 7, pp. 1219–1229, apr. 2017, doi: 10.1093/hmg/ddx014.
- [58] A. M. Wikström e L. Dunkel, «Testicular function in Klinefelter syndrome», *Horm. Res.*, vol. 69, fasc. 6, pp. 317–326, 2008, doi: 10.1159/000117387.
- [59] A. Vermeulen, L. Verdonck, e J. M. Kaufman, «A Critical Evaluation of Simple Methods for the Estimation of Free Testosterone in Serum», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 84, fasc. 10, pp. 3666–3672, ott. 1999, doi: 10.1210/jcem.84.10.6079.
- [60] A. VERMEULEN, T. STOÏCA, e L. VERDONCK, «The Apparent Free Testosterone Concentration, An Index of Androgenicity», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 33, fasc. 5, pp. 759–767, nov. 1971, doi: 10.1210/jcem-33-5-759.
- [61] S. G. Ratcliffe, «The sexual development of boys with the chromosome constitution 47,XXY (Klinefelter's syndrome)», *Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 11, fasc. 3, pp. 703–716, nov. 1982, doi: 10.1016/s0300-595x(82)80008-x.

- [62] M. G. Bastida *et al.*, «Establishment of testicular endocrine function impairment during childhood and puberty in boys with Klinefelter syndrome», *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, vol. 67, fasc. 6, pp. 863–870, dic. 2007, doi: 10.1111/j.1365-2265.2007.02977.x.
- [63] A. Hussain, R. Swaminathan, A. Sankaralingam, P. V. Carroll, G. Hampson, e B. M. McGowan, «Plasma insulin-like factor 3 (INSL3) in male patients with osteoporosis and Klinefelter's syndrome», *Ital. J. Anat. Embryol. Arch. Ital. Anat. Ed Embriologia*, vol. 118, fasc. 1 Suppl, pp. 34–36, 2013.
- [64] A. M. Wikström, T. Raivio, F. Hadziselimovic, S. Wikström, T. Tuuri, e L. Dunkel, «Klinefelter Syndrome in Adolescence: Onset of Puberty Is Associated with Accelerated Germ Cell Depletion», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 89, fasc. 5, pp. 2263–2270, mag. 2004, doi: 10.1210/jc.2003-031725.
- [65] «47,XXY Klinefelter syndrome: Clinical characteristics and age-specific recommendations for medical management - Aksglaede - 2013 - American Journal of Medical Genetics Part C: Seminars in Medical Genetics - Wiley Online Library». Consultato: 25 maggio 2024. [Online]. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ajmg.c.31349>
- [66] A. H. Lizarazo, M. McLoughlin, e M. G. Vogiatzi, «Endocrine aspects of Klinefelter syndrome», *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, vol. 26, fasc. 1, p. 60, feb. 2019, doi: 10.1097/MED.0000000000000454.
- [67] H. V. López Krabbe *et al.*, «Reproductive hormones, bone mineral content, body composition, and testosterone therapy in boys and adolescents with Klinefelter syndrome», *Endocr. Connect.*, vol. 12, fasc. 7, p. e230031, giu. 2023, doi: 10.1530/EC-23-0031.
- [68] A. Bojesen, S. Juul, N. H. Birkebæk, e C. H. Gravholt, «Morbidity in Klinefelter Syndrome: A Danish Register Study Based on Hospital Discharge Diagnoses», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 91, fasc. 4, pp. 1254–1260, apr. 2006, doi: 10.1210/jc.2005-0697.

- [69] «Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders | Journal of Endocrinological Investigation». Consultato: 26 maggio 2024. [Online]. Disponibile su: https://link.springer.com/article/10.1007/s40618-017-0619-9?utm_source=getftr&utm_medium=getftr&utm_campaign=getftr_pilot
- [70] G. A. Kanakis e E. Nieschlag, «Klinefelter syndrome: more than hypogonadism», *Metabolism*, vol. 86, pp. 135–144, set. 2018, doi: 10.1016/j.metabol.2017.09.017.
- [71] T. Gagliano-Jucá e S. Basaria, «Testosterone replacement therapy and cardiovascular risk», *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 16, fasc. 9, pp. 555–574, set. 2019, doi: 10.1038/s41569-019-0211-4.
- [72] C. H. Gravholt, A. S. Jensen, C. Høst, e A. Bojesen, «Body composition, metabolic syndrome and type 2 diabetes in Klinefelter syndrome», *Acta Paediatr.*, vol. 100, fasc. 6, pp. 871–877, 2011, doi: 10.1111/j.1651-2227.2011.02233.x.
- [73] A. Bojesen *et al.*, «The Metabolic Syndrome Is Frequent in Klinefelter's Syndrome and Is Associated With Abdominal Obesity and Hypogonadism», *Diabetes Care*, vol. 29, fasc. 7, pp. 1591–1598, lug. 2006, doi: 10.2337/dc06-0145.
- [74] S. Chang *et al.*, «Anthropometry in Klinefelter syndrome--multifactorial influences due to CAG length, testosterone treatment and possibly intrauterine hypogonadism», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 100, fasc. 3, pp. E508-517, mar. 2015, doi: 10.1210/jc.2014-2834.
- [75] A. Berglund, K. Stochholm, e C. H. Gravholt, «Morbidity in 47,XYY syndrome: a nationwide epidemiological study of hospital diagnoses and medication use», *Genet. Med.*, vol. 22, fasc. 9, pp. 1542–1551, set. 2020, doi: 10.1038/s41436-020-0837-y.
- [76] L. O. Ridder, A. Berglund, K. Stochholm, S. Chang, e C. H. Gravholt, «Morbidity, mortality, and socioeconomics in Klinefelter syndrome and 47,XYY syndrome: a comparative review», *Endocr. Connect.*, vol. 12, fasc. 5, p. e230024, apr. 2023, doi: 10.1530/EC-23-0024.

- [77] A. Ferlin *et al.*, «Bone Mass in Subjects with Klinefelter Syndrome: Role of Testosterone Levels and Androgen Receptor Gene CAG Polymorphism», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, fasc. 4, pp. E739–E745, apr. 2011, doi: 10.1210/jc.2010-1878.
- [78] A. Bojesen *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.*, vol. 22, fasc. 5, pp. 1441–1450, mag. 2011, doi: 10.1007/s00198-010-1354-7.
- [79] W. Vena *et al.*, «Prevalence and determinants of radiological vertebral fractures in patients with Klinefelter syndrome», *Andrology*, vol. 8, fasc. 6, pp. 1699–1704, 2020, doi: 10.1111/andr.12841.
- [80] S. Chang, A. Skakkebaek, S. M. Davis, e C. H. Gravholt, «Morbidity in Klinefelter syndrome and the effect of testosterone treatment», *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, vol. 184, fasc. 2, pp. 344–355, giu. 2020, doi: 10.1002/ajmg.c.31798.
- [81] V. R. Moulton, «Sex Hormones in Acquired Immunity and Autoimmune Disease», *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 2279, ott. 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.02279.
- [82] D. R. Dou *et al.*, «Xist ribonucleoproteins promote female sex-biased autoimmunity», *Cell*, vol. 187, fasc. 3, pp. 733-749.e16, feb. 2024, doi: 10.1016/j.cell.2023.12.037.
- [83] V. A. Giagulli *et al.*, «Neuropsychiatric Aspects in Men with Klinefelter Syndrome», *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, vol. 19, fasc. 2, pp. 109–115, 2019, doi: 10.2174/1871530318666180703160250.
- [84] C. A. Samango-Sprouse, M. P. Hamzik, K. Khaksari, M. R. Brooks, T. Sadeghin, e A. L. Gropman, «Novel Neurocognitive Profile in a Minority of Boys with 47,XXY (Klinefelter Syndrome)», *J. Dev. Behav. Pediatr.*, vol. 43, fasc. 9, p. e623, dic. 2022, doi: 10.1097/DBP.0000000000001111.
- [85] H. Bruining, H. Swaab, M. Kas, e H. van Engeland, «Psychiatric Characteristics in a Self-Selected Sample of Boys With Klinefelter Syndrome», *Pediatrics*, vol. 123, fasc. 5, pp. e865–e870, mag. 2009, doi: 10.1542/peds.2008-1954.

- [86] R. Boada, J. Janusz, C. Hutaff-Lee, e N. Tartaglia, «The Cognitive Phenotype in Klinefelter Syndrome: A Review of the Literature Including Genetic and Hormonal Factors», *Dev. Disabil. Res. Rev.*, vol. 15, fasc. 4, pp. 284–294, 2009, doi: 10.1002/ddrr.83.
- [87] A. J. Swerdlow, M. J. Schoemaker, C. D. Higgins, A. F. Wright, e P. A. Jacobs, «Cancer Incidence and Mortality in Men with Klinefelter Syndrome: A Cohort Study», *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 97, fasc. 16, pp. 1204–1210, ago. 2005, doi: 10.1093/jnci/dji240.
- [88] C. R. Nichols, N. A. Heerema, C. Palmer, P. J. L. Sr, S. D. Williams, e L. H. Einhorn, «Klinefelter's syndrome associated with mediastinal germ cell neoplasms.», *J. Clin. Oncol.*, set. 2016, doi: 10.1200/JCO.1987.5.8.1290.
- [89] «Risk of solid tumors and hematological malignancy in persons with Turner and Klinefelter syndromes: A national cohort study - Ji - 2016 - International Journal of Cancer - Wiley Online Library». Consultato: 26 maggio 2024. [Online]. Disponibile su:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.30126>
- [90] A. J. Swerdlow, C. D. Higgins, M. J. Schoemaker, A. F. Wright, P. A. Jacobs, e United Kingdom Clinical Cytogenetics Group, «Mortality in patients with Klinefelter syndrome in Britain: a cohort study», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 90, fasc. 12, pp. 6516–6522, dic. 2005, doi: 10.1210/jc.2005-1077.
- [91] E. Nieschlag, S. Werler, J. Wistuba, e M. Zitzmann, «New approaches to the Klinefelter syndrome», *Ann. Endocrinol.*, vol. 75, fasc. 2, pp. 88–97, mag. 2014, doi: 10.1016/j.ando.2014.03.007.
- [92] S. Bhasin *et al.*, «Testosterone Therapy in Men with Androgen Deficiency Syndromes: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 95, fasc. 6, pp. 2536–2559, giu. 2010, doi: 10.1210/jc.2009-2354.
- [93] M. St John *et al.*, «Speech and language in children with Klinefelter syndrome», *J. Commun. Disord.*, vol. 78, pp. 84–96, 2019, doi: 10.1016/j.jcomdis.2019.02.003.

- [94] A. L. C. de Vries *et al.*, «Mental Health of a Large Group of Adults With Disorders of Sex Development in Six European Countries», *Psychosom. Med.*, vol. 81, fasc. 7, pp. 629–640, set. 2019, doi: 10.1097/PSY.0000000000000718.
- [95] I. H. Koçar, Z. Yesilova, M. Ozata, M. Turan, A. Sengül, e I. Ozdemir, «The effect of testosterone replacement treatment on immunological features of patients with Klinefelter's syndrome», *Clin. Exp. Immunol.*, vol. 121, fasc. 3, pp. 448–452, set. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2249.2000.01329.x.
- [96] N. Rives *et al.*, «The feasibility of fertility preservation in adolescents with Klinefelter syndrome», *Hum. Reprod. Oxf. Engl.*, vol. 28, fasc. 6, pp. 1468–1479, giu. 2013, doi: 10.1093/humrep/det084.
- [97] I. Gies, R. Oates, J. De Schepper, e H. Tournaye, «Testicular biopsy and cryopreservation for fertility preservation of prepubertal boys with Klinefelter syndrome: a pro/con debate», *Fertil. Steril.*, vol. 105, fasc. 2, pp. 249–255, feb. 2016, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.12.011.
- [98] C. Krausz e G. Forti, «Sperm cryopreservation in male infertility due to genetic disorders», *Cell Tissue Bank.*, vol. 7, fasc. 2, pp. 105–112, 2006, doi: 10.1007/s10561-005-1967-9.
- [99] S. Bhasin e R. D. Oates, «Fertility Considerations in Adolescent Klinefelter Syndrome: Current Practice Patterns», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 105, fasc. 4, pp. e1918–e1920, dic. 2019, doi: 10.1210/clinem/dgz308.
- [100] G. Corona *et al.*, «Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis», *Hum. Reprod. Update*, vol. 23, fasc. 3, pp. 265–275, mag. 2017, doi: 10.1093/humupd/dmx008.
- [101] D. J. Hawksworth, A. A. Szafran, P. W. Jordan, A. S. Dobs, e A. S. Herati, «Infertility in Patients With Klinefelter Syndrome: Optimal Timing for Sperm and Testicular Tissue Cryopreservation», *Rev. Urol.*, vol. 20, fasc. 2, pp. 56–62, 2018, doi: 10.3909/riu0790.
- [102] A. Mehta e D. A. Paduch, «Klinefelter syndrome: an argument for early aggressive hormonal and fertility management», *Fertil. Steril.*, vol. 98, fasc. 2, pp. 274–283, ago. 2012, doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.06.001.

- [103] W. T. Friedewald, R. I. Levy, e D. S. Fredrickson, «Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge», *Clin. Chem.*, vol. 18, fasc. 6, pp. 499–502, giu. 1972.
- [104] D. R. Matthews, J. P. Hosker, A. S. Rudenski, B. A. Naylor, D. F. Treacher, e R. C. Turner, «Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man», *Diabetologia*, vol. 28, fasc. 7, pp. 412–419, lug. 1985, doi: 10.1007/BF00280883.
- [105] T. M. Plant e G. R. Marshall, «The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates», *Endocr. Rev.*, vol. 22, fasc. 6, pp. 764–786, dic. 2001, doi: 10.1210/edrv.22.6.0446.
- [106] L. Lazaros, N. Xita, A. Takenaka, N. Sofikitis, G. Makrydimas, T. Stefos, I. Kosmas, K. Zikopoulos, E. Hatzi, I. Georgiou, «Synergistic effect of follicle-stimulating hormone receptor and androgen receptor gene variants on semen quality». Consultato: 9 giugno 2024. [Online]. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/and.12021>
- [107] M. Grigorova *et al.*, «Genetically determined dosage of follicle-stimulating hormone (FSH) affects male reproductive parameters», *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, fasc. 9, pp. E1534-1541, set. 2011, doi: 10.1210/jc.2011-0632.
- [108] «Study in 1790 Baltic men: FSHR Asn680Ser polymorphism affects total testes volume - Grigorova - 2013 - Andrology - Wiley Online Library». Consultato: 9 giugno 2024. [Online]. Disponibile su: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2047-2927.2012.00028.x>
- [109] «FSHR Single Nucleotide Polymorphism Frequencies in Proven Fathers and Infertile Men in Southeast Turkey - Balkan - 2010 - BioMed Research International -
- [110] E. V. Moroz e N. S. Verkhatsky, «Hypophyseal-gonadal system during male aging», *Arch. Gerontol. Geriatr.*, vol. 4, fasc. 1, pp. 13–19, apr. 1985, doi: 10.1016/0167-4943(85)90013-5.

[111] J. E. Chavarro, T. L. Toth, D. L. Wright, J. D. Meeker, e R. Hauser, «Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic», *Fertil. Steril.*, vol. 93, fasc. 7, pp. 2222–2231, mag. 2010, doi: 10.1016/j.fertnstert.2009.01.100.