

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



SCUOLA DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed
Odontostomatologiche

TESI DI DOTTORATO IN NEUROSCIENZE

XXXII CICLO

**Valutazione del profilo neuro-endocrinologico, metabolico
e riproduttivo del personale femminile in formazione
presso l'Accademia Aeronautica di Pozzuoli affette da
Amenorrea Ipotalamica Funzionale (FHA)**

Tutor:

Prof Carlo Alviggi

Candidato:

Giovanfrancesco Capuano

ANNO ACCADEMICO 2019/2020

Indice

SEZIONE BIBLIOGRAFICA

CAPITOLO I

| | |
|---|----|
| FISIOLOGIA DELL' APPARATO GENITALE FEMMINILE..... | 7 |
| 1 Concetti generali | 7 |
| 2 Ciclo ovarico | 8 |
| 3 Steroidogenesi ovarica | 11 |
| 4 Ciclo uterino o mestruale | 12 |
| 5 Secrezione ormonale non steroidea..... | 15 |

CAPITOLO II

| | |
|---|----|
| DISTURBI DEL CICLO MESTRUALE..... | 17 |
| 1 Disturbi del ciclo mestruale..... | 17 |
| 2 Amenorrea..... | 18 |
| 2.1 Epidemiologia ed etiopatogenesi | 19 |
| 2.2 Diagnosi | 21 |
| 2.3 Trattamento | 22 |

CAPITOLO III

| | |
|---------------------------------------|----|
| AMENORREA IPOTALAMICA FUNZIONALE..... | 23 |
| 1 Definizione ed etiologia | 23 |
| 2 Approccio ai pazienti con FHA..... | 26 |
| 3 Diagnosi | 28 |
| 4 Trattamento | 30 |

**SEZIONE SPERIMENTALE
S.P.E.R.A.**

CAPITOLO IV

INTRODUZIONE.....33

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI.....35

CAPITOLO VI

RISULTATI39

1 Indagini di laboratorio.....39

2 Quadri ecografici.....44

3 Valutazione dei questionari.....45

CAPITOLO VII

DISCUSSIONE.....46

1 Risultati ottenuti.....46

2 Limiti dello studio.....47

3 Correlazione delle evidenze con pregressi studi pubblicati in letteratura.....47

4 Risvolti futuri e conclusioni.....48

ALLEGATI

1 Modulo di consenso informato e trattamento dei dati personali.....51

2 Questionario anamnestico.....59

3 Questionario di valutazione rapida dello stress.....65

BIBLIOGRAFIA

I

SEZIONE BIBLIOGRAFICA

SOMMARIO:

CAP I: FISIOLOGIA DELL' APPARATO GENITALE FEMMINILE

CAP II: DISTURBI DEL CICLO MESTRUALE

CAP III: AMENORREA IPOTALAMICA FUNZIONALE

CAPITOLO I

FISIOLOGIA DELL'APPARATO GENITALE FEMMINILE

1. Concetti generali

L'attività funzionale riproduttiva dell'apparato genitale femminile inizia con la pubertà tra gli 11 e i 14 anni terminando con la menopausa tra i 48 e i 52 anni. Ovaio e utero sono sede di modificazioni anatomo-funzionali che si succedono ciclicamente durante l'età fertile. Tali manifestazioni sono l'espressione di meccanismi neuroendocrini che tramite fattori di rilascio ipotalamici regolano l'attività ciclica ormonale della adenoipofisi. La risultante non è altro che il ciclo ovarico, a livello dell'organo bersaglio dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio (Woo I *et al*, 2015).

Ovaio e endometrio si modificano in risposta alle variazioni dei livelli circolanti di estrogeni e progesterone. A sua volta la secrezione degli steroidi ovarici da parte dell'ovaio è controllata dalle gonadotropine ipofisarie, l'ormone follicolostimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH).

D'altra parte i livelli circolanti di FSH e LH dipendono dalla secrezione pulsatile ipotalamica del fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH) nei capillari del sistema portale ipotalamo-ipofisario (Eisenberg I *et al*, 2015). Il GnRH agisce sulle cellule gonadotrope a livello ipofisario attraverso specifici

recettori di membrana, in risposta a segnali centrali e periferici integrati fra loro. Il principale neurotrasmettitore in grado di stimolare la secrezione di GnRH a livello dei neuroni localizzati nel nucleo arcuato ipotalamico è la noradrenalina, mentre l'acido γ -ammino butirrico (GABA) ne inibisce il rilascio.

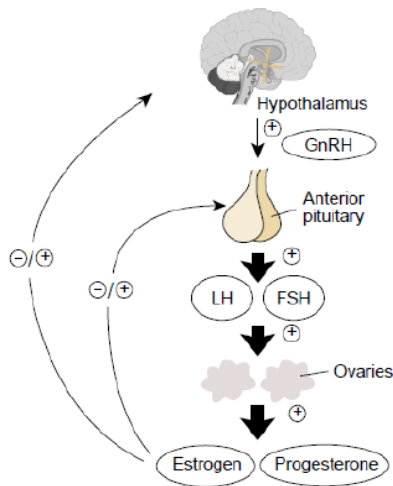


Figura 1.1

L'FSH, agendo sui recettori delle cellule della granulosa, promuove l'accrescimento del follicolo di Graaf e la sua maturazione, con conseguente secrezione di estrogeni; l'LH invece, attraverso i suoi recettori sulle cellule della teca interna, agisce quando il follicolo ovarico è maturo promuovendone la deiscenza e la formazione del corpo luteo. È pertanto considerato l'ormone che promuove l'ovulazione (Figura 1.1).

2. Ciclo ovarico

Il ciclo ovarico comprende la selezione, l'accrescimento e la maturazione di un follicolo fino all'ovulazione ed alla successiva formazione del corpo luteo.

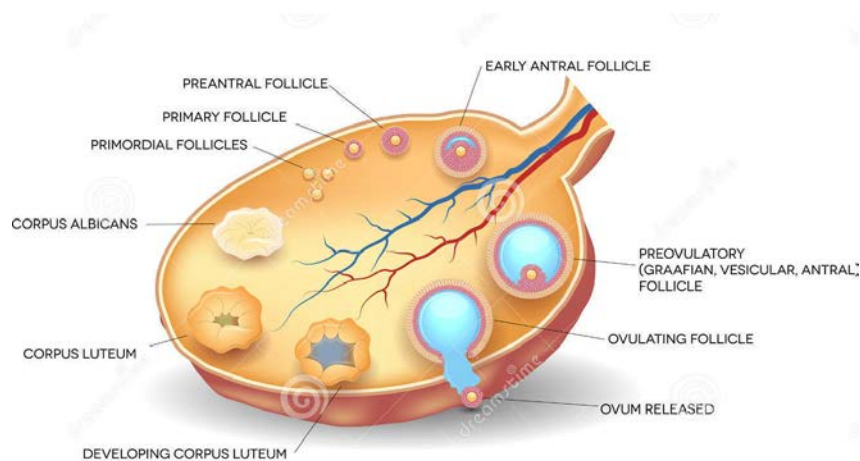


Figura 1.2

Ogni bambina nasce con un cospicuo patrimonio di follicoli primordiali (circa 1 milione); di questi solo una quota pari al 10% si svilupperà nel corso della vita della donna in follicolo primario, mentre i rimanenti andranno incontro ad atresia (Bazer FW *et al*, 2015).

È possibile suddividere il ciclo ovarico in una prima fase detta follicolare, una fase che corrisponde all'ovulazione ed un'ultima fase detta luteinica. Durante la prima fase uno dei follicoli primari viene reclutato e va incontro ad aumento di volume con proliferazione delle cellule della granulosa (follicolo antrale). In seguito avviene la comparsa della cavità del follicolo riempita di liquor follicoli (Kumar TR *et al*, 1997). In questa fase l'ovocita, attorniato dalle cellule della granulosa che formano il cumulo ooforo e che producono il liquido follicolare, è dislocato verso la periferia della cavità follicolare (follicolo di Graaf). A questo punto il follicolo maturo assume un diametro di 15-20 mm e l'ovocita è circondato dalla zona pellucida con funzione trofica di scambio con le cellule della granulosa (Figura 1.2).

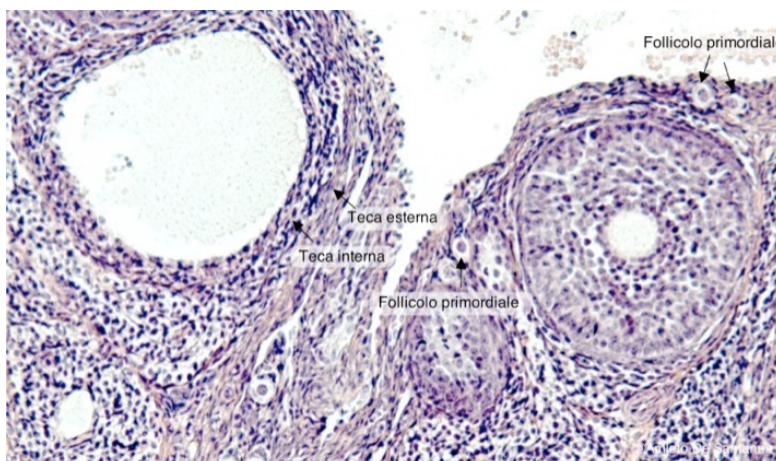


Figura 1.3

La parete del follicolo si compone di una membrana basale, all'esterno della quale vi è il connettivo disposto in due strati: quello più interno, denominato teca

interna, con funzione endocrina di produzione degli estrogeni; e quello esterno fibroso, denominato teca esterna, con funzione trofica (Figura 1.3).

Questo processo di maturazione follicolare si compie in circa due settimane e verso il 14° giorno del ciclo si verifica l'ovulazione, caratterizzata dalla deiscenza del follicolo, che consiste nella rottura della parete del follicolo stesso a livello di un'area detta stigma in cui essa è più sottile e avascolare.

L'ovocita viene così espulso dall'ovaio assieme al liquido follicolare (Kerin J *et al*, 1982). Ciò che resta del follicolo a livello ovarico va a costituire il corpo luteo, formazione di circa 17-20 mm, con carattere di ghiandola esocrina transitoria. È questa la fase luteale, in cui le cellule della granulosa si trasformano in cellule luteiniche, con funzione di produzione del progesterone, e le cellule della teca interna secernono estrogeni.

Il corpo luteo seguirà quindi l'evoluzione dell'ovocita. Se questo non viene fecondato, il corpo luteo avrà una vita di 12-14 giorni; se invece avviene la fecondazione e l'annidamento dell'uovo fecondato, esso andrà incontro ad ipertrofia e resterà in attività per i primi quattro mesi gestazionali. Nel primo caso, a livello del corpo luteo si avranno rapidi fenomeni di regressione con cessazione dell'attività endocrina e trasformazione in *corpus albicans*, formazione fibroso-connettivale che a sua volta andrà progressivamente

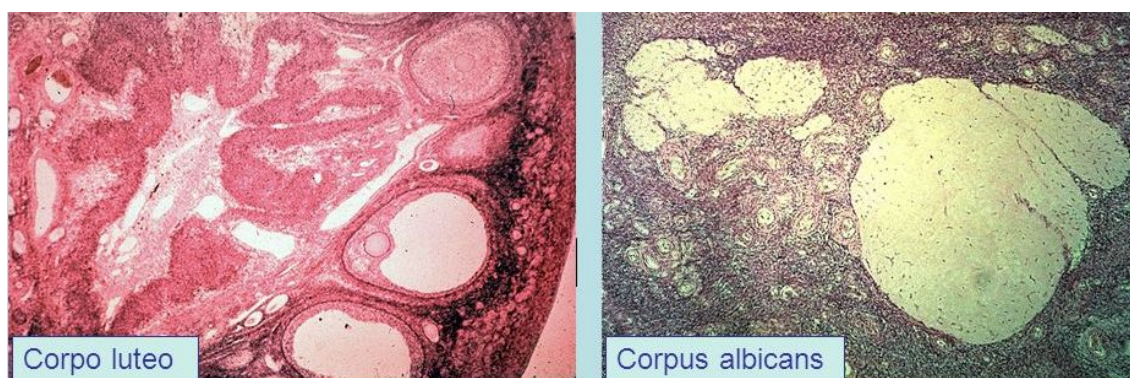
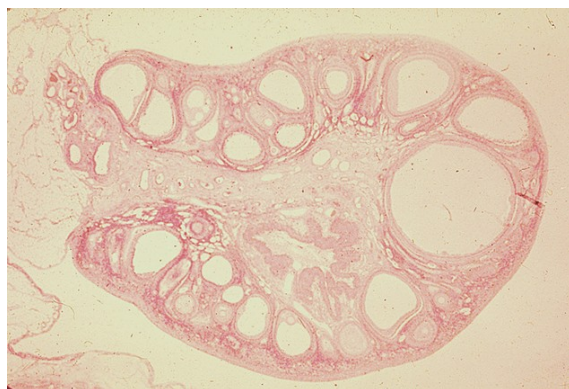


Figura 1.4



È da sottolineare la presenza a livello ovarico di follicoli nelle diverse fasi maturative, che vanno a costituire un

riducendosi fino ad una piccola cicatrice biancastra (Figura 1.4).

La durata della fase follicolare presenta spesso variabilità intra- e inter-individuale, mentre più costante è la durata della fase luteinica.

Figura 1.5

quadro polimorfo all'interno del quale solo un follicolo sarà reclutato e portato a maturazione (Figura 1.5).

3. Steroidogenesi ovarica

Il follicolo, per azione dell'FSH, produce principalmente estrogeni. Questi si distinguono in estradiolo (E2) ed estrone (E1), prodotti a livello ovarico dalle cellule della teca interna, ed estriolo (E3), prodotto dalla placenta.

Il corpo luteo invece produce prevalentemente progesterone per tutta la fase luteinica sotto l'azione dell'LH (Greene DN *et al*, 2015).

Questi ormoni derivano dal colesterolo: progesterone e testosterone sono i primi ad essere sintetizzati; solo successivamente questi vengono convertiti in estrogeni ad opera dell'enzima aromatasi.

A livello ovarico le cellule della teca, sotto lo stimolo dell'LH, sintetizzano l'androstenedione dal colesterolo. A sua volta l'LH incrementa il numero di recettori dell'FSH sulle cellule della granulosa. L'androstenedione diffonde quindi dalle cellule della teca a quelle della granulosa dove viene aromatizzato ad estrogeno in un processo regolato dalle FSH.

I livelli plasmatici degli ormoni steroidei ovarici sono legati ai livelli di specifiche globuline che ne permettono il trasporto, chiamate *sex hormone binding globulin* (SHBG). Circa il 40% di E2 è legato alla SHBG, il 60% è veicolato dall'albumina, mentre solo piccole percentuali circolano libere nel sangue.

La funzione estrogenica si esplica nella regolazione e mantenimento del ciclo mestruale, nella promozione della crescita dei follicoli ovarici e nella maturazione dell'endometrio. Gli estrogeni inoltre contribuiscono al trofismo a livello mammario e all'omeostasi ossea.

Ruolo principe del progesterone invece è l'induzione della fase secretiva dell'endometrio nonché la promozione dell'annidamento dell'uovo fecondato a livello della mucosa uterina.

4. Ciclo uterino o mestruale

Le modificazioni uterine seguono la ciclicità della secrezione ormonale ipofisaria e ovarica.

Queste riguardano solo la porzione “funzionale” dell'endometrio, che comprende circa i 4/5 superficiali dello spessore della mucosa, mentre non subisce notevoli variazioni la porzione basale a contatto con il miometrio, in quanto insensibile all'azione degli steroidi ovarici.

Anche a livello cervicale la mucosa partecipa alle modificazioni cicliche uterine. Durante l'ovulazione infatti vi è un'ipersecrezione di muco da parte delle ghiandole cervicali ipertrofiche sotto stimolo estrogenico, il quale permette e facilita la risalita degli spermatozoi per un'eventuale fecondazione.

È possibile suddividere il ciclo funzionale dell'endometrio in quattro fasi: proliferativa, secretiva, premestruale e desquamativa (Mihm M *et al*, 2011).

La fase proliferativa (5°-14° giorno) inizia al termine della mestruazione del ciclo precedente, in cui sotto l'influenza degli estrogeni, l'epitelio ghiandolare si allunga con lievi sinuosità, il calibro dei piccoli vasi comincia ad aumentare, così come aumenta anche lo spessore dell'endometrio stesso. Questo infatti da circa 1-1,5 mm, a causa dello sfaldamento prodottosi al termine della mestruazione precedente, raggiunge uno spessore di circa 6-8 mm.

In concomitanza con l'ovulazione, dal 15° al 24° giorno del ciclo (fase secretiva) l'azione del progesterone determina un ulteriore cambiamento dell'epitelio endometriale con un'attiva secrezione da parte delle ghiandole, che

assumono ora un calibro maggiore e un decorso a spirale. È questo appunto il periodo più adatto all'annidamento dell'uovo.

Nel momento in cui questo non viene fecondato, avverrà una regressione dello spessore della mucosa endometriale, evento caratteristico della fase premenstruale dal 25° al 27° giorno del ciclo.

La riduzione dei livelli estrogenici e la contemporanea regressione del corpo luteo determinano a questo punto uno spasmo vascolare con ischemia dell'endometrio. A questo succederà poi una vasodilatazione delle arteriole con conseguente travaso di sangue dalle pareti.

Ultima tra le modificazioni endometriale è la desquamazione dell'epitelio superficiale, al 28° giorno del ciclo, con successiva sua eliminazione in minuti brandelli insieme al sangue stravasato. L'emorragia dura circa 3-4 giorni e si arresta nel momento in cui le arteriole vanno incontro a vasocostrizione e ad obliterazione del lume.

Come detto, lo strato basale dell'endometrio non è sensibile all'azione degli ormoni steroidei ovarici e non partecipa quindi alle modificazioni che avvengono a livello dello strato superficiale. Dopo lo sfaldamento mestruale proprio da questo strato si rigenererà l'endometrio funzionale che crescerà poi sotto stimolazione estrogenica.

Come per il ciclo ovarico, le varie fasi del ciclo uterino sono dominate dall'azione degli ormoni ipofisari (Figura 1.6).

All'inizio del ciclo la maturazione del follicolo e la produzione di estrogeni sono correlate all'azione dell'FSH. Quando la concentrazione estrogenica diviene elevata, verrà esercitata un'azione a *feedback* negativo sulla secrezione dell'FSH, con graduale incremento dei livelli di LH, tali da verificare l'ovulazione.

A questo punto sarà l'LH che indurrà la formazione del corpo luteo e la conseguente secrezione di progesterone che aumenterà progressivamente fino a determinare anche esso un'azione a *feedback* negativo sullo stesso LH.

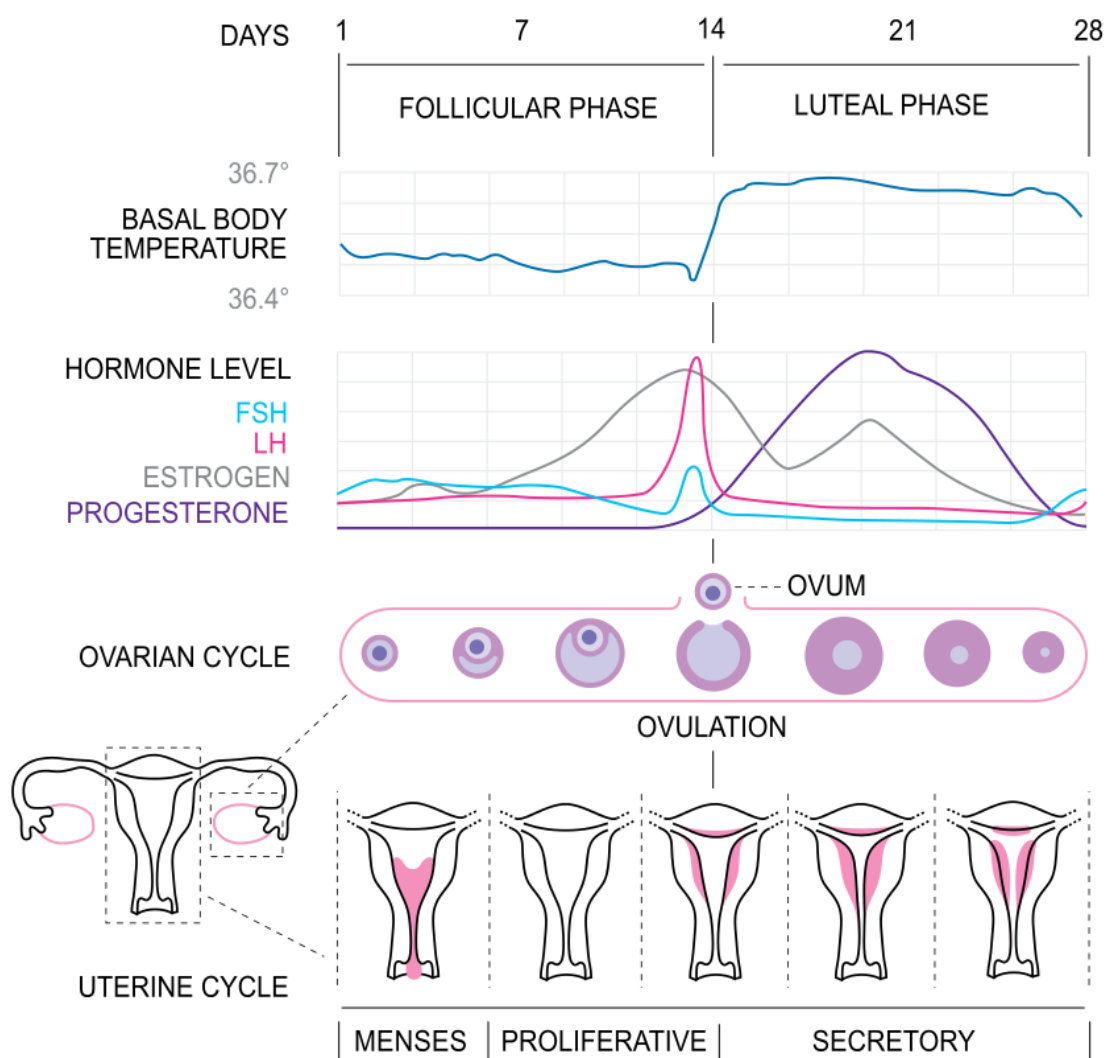


Figura 1.6

Venendo così a mancare le gonadotropine si avrà un arresto della secrezione degli estrogeni e del progesterone, che determinerà la crisi vascolare che porta alla mestruazione. Sempre per un meccanismo di *feedback* i centri ipotalamici, avvertendo la forte riduzione degli steroidi ovarici, ripristinerà il rilascio pulsatile di GnRH. Riprenderà quindi la secrezione dell'FSH da parte dell'adenipofisi e l'intero ciclo ricomincerà.

5. Secrezione ormonale non steroidea

Alla regolazione del ciclo ovarico, oltre agli ormoni steroidei, partecipano altri fattori ormonali non steroidei (Apter D *et al*, 1978) tra cui l'inibina, l'activina, la follistatina, il *Transforming Growth Factor* (TGF- α e β), l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) e l'*Insuline-like Growth Factor* (IGF), le prostaglandine, le citochine e la leptina.

Si tratta di ormoni ovarici non steroidei che con effetti autocrini, paracrini ed endocrini intervengono nella secrezione gonadotropinica, nello sviluppo del follicolo ovarico e nelle funzioni placentari.

Le inibine sono glicoproteine dimeriche appartenenti alla famiglia dei TGF di cui conosciamo un tipo A e un tipo B; la loro produzione a livello ovarico è stimolata dall'FSH e queste a loro volta agiscono con *feedback* negativo a livello ipofisario. La secrezione dell'inibina di tipo A e di tipo B avviene in alternanza durante il ciclo mestruale, partecipando così alla fase luteale e alla fase follicolare, rispettivamente (Figura 1.7).

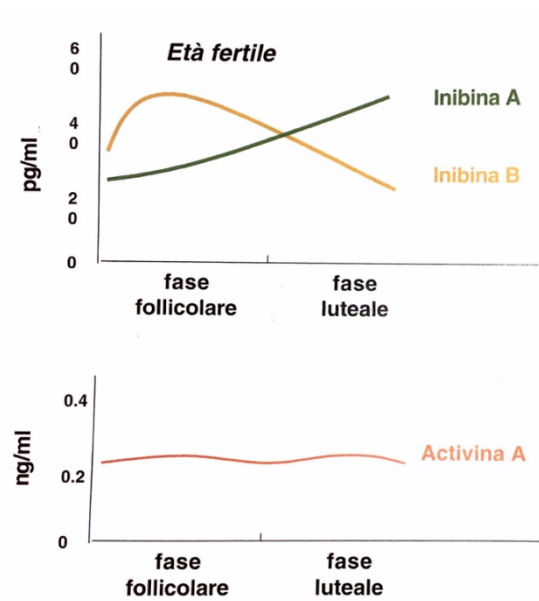


Figura 1.7

Le activine sono omodimeri di due subunità β che formano l'activina A e l'activina B. L'unica forma attiva è il tipo A che partecipa al rilascio di FSH, alla steroidogenesi e alla maturazione follicolare. I suoi livelli serici non si modificano sostanzialmente nel corso del ciclo mestruale. In contrapposizione ad essa, la follistatina che inibisce la secrezione di FSH.

Altri attori che partecipano alle complesse interazioni ormonali a livello ovarico sono le prostaglandine (PG), quali PGE2, PGF2, PGI2 e diversi leucotrieni. In particolare regolano l'ovulazione a più livelli: chemiotassi, permeabilità capillare, steroidogenesi, dinamica del flusso sanguigno.

Rilevante è infine il ruolo della leptina, ormone prodotto dalle cellule adipose che regola l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e l'alternarsi dei cicli ovulatori, di cui si approfondirà nel seguente capitolo.

CAPITOLO II

DISTURBI DEL CICLO MESTRUALE

1. Disturbi del ciclo mestruale

Il ciclo mestruale si svolge nel quadro delle cicliche variazioni ormonali tra l'ipotalamo che secreta il GnRH, l'ipofisi che secreta FSH e LH e l'ovaio che secreta estradiolo e progesterone. Per tutta la durata del ciclo mestruale anche l'utero è sottoposto a cambiamenti in risposta alle variazioni delle concentrazioni ematiche degli estrogeni e del progesterone. In particolare questi determinano a livello dell'endometrio il susseguirsi di diverse fasi: proliferativa, secretiva ed infine lo sfaldamento della mucosa endometriale, il cui risultato è il flusso mestruale. Esso si verifica con una cadenza di 28 ± 4 giorni e una durata di circa 4 ± 2 giorni. Il flusso mestruale normale varia tra 25-69 ml (Quint EH *et al*, 2003).

I disturbi del ciclo mestruale possono essere distinti in:

- anomalie del ritmo, quali la polimenorrea (intervallo tra due cicli mestruali inferiore ai 25 giorni), l'oligomenorrea (intervallo tra due cicli mestruali superiore ai 35 giorni) e l'amenorrea (assenza di mestruazioni per almeno tre mesi);
- anomalie di quantità e durata, quali l'ipomenorrea (perdita ematica inferiore a 20 ml), l'ipermenorrea (perdita ematica superiore agli 80 ml) e la menorragia (sanguinamento uterino prolungato e/o eccessivo);

- anomalie di presentazione, quali la metrorragia (sanguinamento uterino che si verifica in qualsiasi momento del periodo intermestruale) e la menometrorragia (sanguinamento uterino eccessivo e prolungato che si verifica ad intervalli frequenti ed irregolari) (Hickey M *et al*, 2003).

Può essere altresì riferita la presenza di mestruazioni dolorose (dismenorrea) e di sintomi correlati (dolore in regione pelvica, cefalea, sensibilità emotiva, diarrea), con intensità soggettiva (Yonkers KA *et al*, 2008).

I cicli mestruali, nei primi due anni dopo il menarca, sono irregolari nel 50%-60% delle adolescenti, con progressiva regolarizzazione a partire dal 2°-3° anno ginecologico. Inoltre, nei primi due anni dopo il menarca, il 55%-80% dei cicli mestruali sono anovulatori. L' assenza di un completo sviluppo maturativo follicolare e dell'ovulazione nei primi anni ginecologici è probabilmente la conseguenza dell'imaturità dell'asse ipotalamo-ipofisogonadi (Harel Z *et al*, 2006).

Ad oggi non c'è ancora accordo tra gli autori su quale sia il momento in cui i cicli mestruali diventano ovulatori: secondo alcuni, l'età ginecologica gioca un ruolo determinante sulla frequenza dei cicli ovulatori, per cui si passerebbe dal 55-80% di cicli anovulatori nei primi due anni ginecologici all'80% dopo 5 anni.

2. Amenorrea

Si definisce amenorrea l'assenza del flusso mestruale (*American College of Obstetricians and Gynecologists*, ACOG, 1989).

Essa viene classificata in:

- Primaria, caratterizzata dalla mancata comparsa dei flussi mestruali dopo l'età di 14 anni in assenza dei caratteri sessuali secondari o dalla mancata

comparsa dei flussi mestruali dopo l'età di 16 anni in presenza dei caratteri sessuali secondari;

- Secondaria, caratterizzata dalla mancanza del flusso mestruale dopo 3 cicli mestruali o dopo 6 mesi in un soggetto precedentemente mestruato (Speroff L *et al*, 2005).

In alcuni periodi della vita di una donna la mancanza del flusso mestruale può essere definita fisiologica, in particolare prima della pubertà, dopo la menopausa, durante la gravidanza e, per un periodo più o meno lungo, durante l'allattamento.

2.1. Epidemiologia ed etiopatogenesi

Le cause di amenorrea primaria e secondaria sono numerose e alcune volte le condizioni patologiche che sottendono l'una o l'altra forma possono essere del tutto sovrapponibili.

L'amenorrea primaria è causata nel 60% dei casi da malformazioni congenite degli organi genitali, nel 30% dei casi è invece dovuta a pubertà ritardata ad eziologia ormonale o genetica.

Le forme secondarie sono più comuni (1-3% della popolazione femminile in età fertile) rispetto alle forme primarie (0.1-2.5%), dovute anche a patologie sistemiche, endocrinopatie (tireopatie, sindrome di Cushing), assunzione di farmaci (antidepressivi), irradiazione cranica.

Di seguito sono riportate le principali cause di amenorrea (Tabella 2.1).

| | AMENORREA PRIMARIA | AMENORREA SECONDARIA |
|--------------------|--|--|
| Cause ipotalamiche | <ul style="list-style-type: none"> • Neoplasie, traumi, infezioni • Sindrome di Kallman (agenesia dei neuroni GnRH-secerenti e anosmia) | <ul style="list-style-type: none"> • Forme organiche: tumori, ischemia, flogosi • Forme funzionali: malnutrizione o disturbi del comportamento alimentare, intenso esercizio fisico, stress psico-fisico (alterazioni della pulsatilità del GnRH), alterazioni metaboliche |
| Cause ipofisarie | <ul style="list-style-type: none"> • <i>Empty sella syndrome</i> • Neoplasie (adenomi ipofisari), traumi, infezioni | <ul style="list-style-type: none"> • Iperprolattinemia (organica, disfunzionale, iatrogena) • Sindrome di Sheehan (shock emorragico <i>postpartum</i> con necrosi ipofisaria) |
| Lesioni ovariche | <ul style="list-style-type: none"> • Sindrome dell'ovaio resistente • Sindrome di Morris (assenza del recettore periferico degli androgeni con conseguente femminilizzazione testicolare) • Sindrome di Turner (45, XO con disgenesia gonadica) | <ul style="list-style-type: none"> • Cisti disfunzionale dell'ovaio (follicolare o luteinica) • Menopausa precoce <40 anni • PCOS |
| Lesioni uterine | <ul style="list-style-type: none"> • Agenesia uterina (Sindrome di Rokitansky) | <ul style="list-style-type: none"> • Aborti • Interventi chirurgici • Sindrome di Asherman (sinecchie uterine iatrogene) |

Tabella 2.1.

2.2. Diagnosi

Nell'approccio diagnostico alle adolescenti con amenorrea le indagini fondamentali sono un'accurata anamnesi ed un attento esame obiettivo (*The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine*, 2004). Una particolare attenzione dovrà essere rivolta a: tempi e modalità di comparsa dell'amenorrea, eventuali variazioni ponderali, tipo di alimentazione, attività fisica ed entità dello svolgimento, aumento della peluria, comparsa di "flushing", presenza di algie pelviche (possibile espressione di raccolta di sangue nell'utero, ematometra, per impervietà delle vie genitali nelle amenorree primarie senza ritardo puberale), presenza di galattorrea, assunzione di farmaci, stress.

L'anamnesi dovrebbe inoltre includere domande riguardanti l'attività sessuale dell'adolescente: nelle amenorree secondarie è necessario infatti in prima istanza escludere una gravidanza.

Durante la valutazione clinica della paziente è importante effettuare dapprima una valutazione auxologia completa, con valutazione della curva di accrescimento staturale (sospetto di ritardo costituzionale di crescita), ponderale (aumento del BMI) e dello stadio puberale. Un aumento del BMI unitamente al reperto obiettivo di irsutismo ed acne potrebbe indurre il sospetto di PCOS. La presenza di bassa statura invece associata a caratteristiche dismorfiche potrebbe indurre il sospetto di Sindrome di Turner. Importante inoltre l'esame senologico, per escludere la presenza di galattorrea.

La visita ginecologica può fornire indicazioni utili in caso di malformazioni dell'apparato genitale (imene imperforato, setto vaginale trasverso) e per valutare la presenza di segni di ipoestrogenismo come ad esempio la presenza di vagina distrofica con collo uterino privo di muco (Carlson JL *et al*, 2007).

Tra le indagini di prima linea, è rilevante il ruolo dei dosaggi ormonali con valutazione di FSH, LH, PRL, estradiolo, funzionalità tiroidea, testosterone,

androstendione, DHEAS, 17OH-progesterone e cortisolemia delle 24h (in caso di storia di iperandrogenismo) e MAP test (test da stimolo con medrossiprogesterone acetato per valutazione dell'assetto estrogenico) ed ecografia pelvica.

Il risultato di tali indagini confermerà o meno il sospetto diagnostico e guiderà nella scelta di ulteriori approfondimenti laboratoristici-strumentali.

2.3. Trattamento

La terapia dell'amenorrea prevede la cura, ove possibile, dei fattori eziologici, che talvolta può basarsi semplicemente su modificazioni dello stile di vita (riduzione del peso, rimozione di situazioni stressanti) associate o meno all'impiego di terapie ormonali (estrogeni e progestinici) o a intervento chirurgico (come in caso di neoplasia ovarica o surrenalica, craniofaringiomi, anomalie del tratto genitale) (Heiman DL *et al*, 2006).

CAPITOLO III

AMENORREA IPOTALAMICA FUNZIONALE

1. Definizione ed etiologia

L'amenorrea ipotalamica funzionale (FHA) è una forma di anovulazione cronica legata ad un anomalo *signaling* tra ipotalamo e ipofisi in assenza di lesioni organiche (Gordon CM *et al*, 2010). Il termine "funzionale" implica che la correzione o il miglioramento dei fattori comportamentali causali ripristinerà la funzione ovulatoria ovarica.

Alla base dell'FHA vi è un'alterazione della secrezione pulsatile ipotalamica del fattore di rilascio delle gonadotropine (GnRH) (Genazzani AD *et al*, 2006). Questa si riflette in un'alterazione dei livelli di ormone follicolostimolante (FSH) e di ormone luteinizzante (LH), insufficienti per mantenere la follicologenesi, con conseguente diminuzione della produzione ovarica di estradiolo (E2) e quindi anovulazione.

I segnali neuromodulatori che alterano la funzione GnRH sono molti e includono sia *input* inibitori che stimolatori, determinati dall'interazione con l'ambiente interno ed esterno (Meczekalski B *et al*, 2008).

Le alterazioni dell'assetto ormonale femminile si correlano quindi a fattori esogeni scatenanti ed in particolare l'FHA è conseguente ad adeguamenti ipotalamici indotti da croniche condizioni di stress fisico e psicologico, cambiamenti dell'introito calorico giornaliero e variazioni dei ritmi sonno-veglia. In particolare, essa si associa frequentemente a condizioni di stress emotivo, esercizio fisico eccessivo e persistente o malnutrizione (Frisch RE *et*

al, 1987). Questi fattori, solitamente collegati e non facilmente distinguibili, scatenano come risposta adattativa la temporanea soppressione della funzione riproduttiva.

Esiste uno stretto legame tra deficit energetico nutrizionale e l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che si traduce in un aumento dei livelli di cortisolo e di oppioidi endogeni, entrambi potenti inibitori dell'espressione del GnRH (Nappi RE *et al*, 1993) (Figura 3.1). Anche disturbi dell'asse ipotalamo-ipofisi-tiroide con bassi livelli di tireotropina (TSH) e tri-iodotironina (T3) possono influire negativamente sulla secrezione pulsatile delle gonadotropine ipofisarie (Berga SL *et al*, 1989). La disregolazione di questi assi endocrinologici, collettivamente o in modo indipendente, può portare ad amenorrea, insufficienza luteinica ed anovulazione (Perkins RB *et al*, 1999).

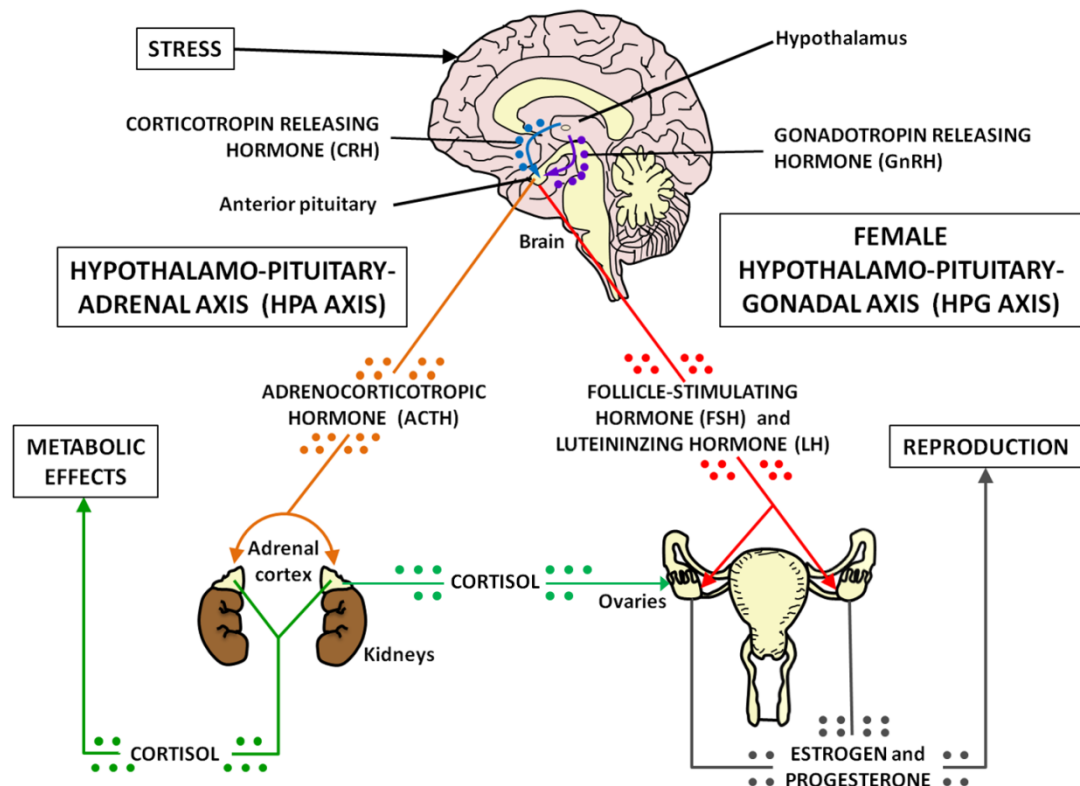


Figura 3.1

È stata proposta un'ipotesi di "peso critico" che sarebbe necessario mantenere per innescare il ciclo mestruale e sostenerne la regolarità (Bronson FH *et al*, 1991). Tuttavia alcuni reports hanno dimostrato che anomalie

mestruali possono verificarsi indipendentemente dal rapporto peso corporeo/massa grassa e che è possibile rilevare una disregolazione neuroendocrina e FHA anche nelle donne con peso corporeo normale (Laughlin GA *et al*, 1998).

Studi in atlete con FHA hanno riportato che l'assunzione sbilanciata di micro- e macro-nutrienti può contribuire allo sviluppo e al mantenimento dell'amenorrea (Marcus MD *et al*, 2001). Infatti le donne colpite da FHA hanno spesso errate abitudini alimentari (“*clinical eating disorders*”) o conducono diete non appropriate (Warren MP *et al*, 1999). Inoltre, le donne con FHA hanno maggiori concentrazioni di cortisolo (misurazione del cortisolo urinario delle 24 ore) rispetto ai controlli, evidenziando un andamento simile alle donne con disturbi alimentari (Hill JW *et al*, 2008).

Il punto di svolta cruciale sembra essere la presenza nella popolazione studiata di un dispendio energetico superiore rispetto alle disponibilità derivanti dall'alimentazione (*body intake*) ed alle riserve esistenti (massa grassa), con conseguente bilancio energetico negativo. Tali condizioni possono mediare modifiche nell'asse neuroendocrino (Loucks AB, 2003). È stata inoltre segnalata in queste donne una riduzione di glucosio e dei livelli di insulina, ma appare difficile determinare se questa è da considerarsi una risposta ad un evento stressante o un adattamento metabolico ai deficit nutrizionali (Sanci L *et al*, 2008).

Recentemente è stato proposto che la leptina, un ormone prodotto dal tessuto adiposo, può svolgere un ruolo nella relazione tra stato nutrizionale e disturbi legati alla riproduzione (Margetic S *et al*, 2002; Dardeno T *et al*, 2010). Questa agisce regolando il peso corporeo, l'accumulo di grasso totale (Smith GD *et al*, 2002) e la secrezione di neuropeptide Y e di altri fattori che regolano la produzione del GnRH (Sanchez M *et al*, 2013), influenzando quindi l'asse

ipotalamo-ipofisi-gonadi tramite un meccanismo indiretto (Castellano JM *et al*, 2009; Roman E *et al*, 2005) (Figura 3.2).

Le donne con cicli anovulatori e amenorrea presentano livelli di leptina inferiori alla popolazione femminile sana (Tataranni P *et al*, 1997). Ciò dimostrerebbe come le anomalie mestruali si

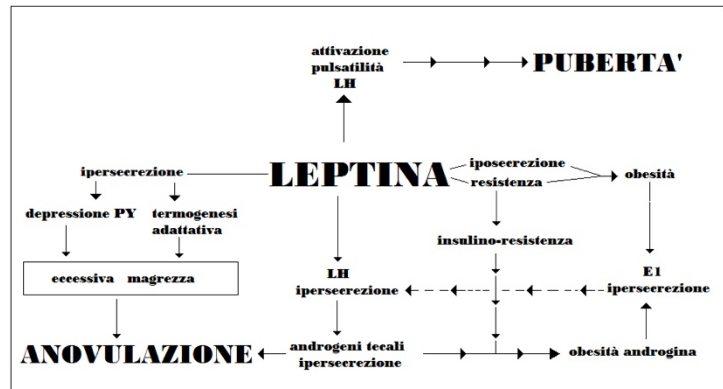


Figura 3.2

correlino con i diminuiti livelli di leptina conseguenti alla riduzione della massa grassa. La giusta concentrazione di leptina nel siero costituisce un messaggio all'ipotalamo che le riserve energetiche sono sufficienti a sostenere una gravidanza, permettendo così la normale funzione riproduttiva (Bray GA, 1997); diminuzioni dei livelli di leptina invece sono state osservate in pazienti con FHA (Kopp W *et al*, 1997; Miller KK *et al*, 1998) e sono causate da uno stato di carenza energetica cronica che comporta una conseguente *down-regulation* della funzione riproduttiva.

Indipendentemente dal fattore causale primario, la FHA riflette una risposta “psicobiologica” ad eventi scatenanti e non dovrebbe essere vista come anomalia riproduttiva isolata, ma come un mix di irregolarità neuroendocrine sinergiche provenienti dallo stress cronico e dallo squilibrio energetico (Dundon CM *et al*, 2010; Berga SL, 2008).

2. Approccio alle pazienti con FHA

L’FHA è una forma di anovulazione cronica, non dovuta a cause organiche identificabili, ma spesso associate a stress, perdita di peso, esercizio fisico

eccessivo o una loro combinazione (Berga SL *et al*, 1989). L'approccio a tali pazienti dovrebbe includere la valutazione etiologica sistemica ed endocrinologica, considerando che la FHA è una diagnosi di esclusione. È necessario un approccio multidisciplinare di trattamento, che includa il supporto medico, alimentare e psicologico. In particolare si mira alla prevenzione delle complicanze legate all'FHA, dovute alla combinazione delle alterazioni del metabolismo, della funzione neuroendocrina e dell'anovulazione alla base della patologia stessa (McCarthy MM, 2013).

Interventi comportamentali appropriati hanno il potenziale per favorire il recupero ovarico, neuroendocrino e metabolico, tuttavia una lunga durata dell'insulto comporterà maggiori tempi di recupero per ripristinare una regolarità mestruale (Gore AC *et al*, 2015).

Le complicanze acute più significative includono la pubertà ritardata e l'infertilità (Navarro VM *et al*, 2013).

Le complicanze croniche più significative sono legate all'ipoestrogenismo e includono la perdita di massa ossea o l'incapacità di raggiungere un adeguato picco di massa ossea (Ackerman KE *et al*, 2013; Grinspoon S *et al*, 1999; Nattiv A *et al*, 2007). Le donne con amenorrea indotta dall'esercizio fisico, in particolare se associata ad errate abitudini alimentari, presentano una diminuzione della densità ossea (Young N *et al*, 1994) ed alcune sviluppano osteoporosi e fratture (Robinson TL *et al*, 1995). Fratture da carico ("*stress fractures*") ripetute possono verificarsi in circa il 30% delle ballerine (Warren MP *et al*, 1986) ma anche in altre attività agonistiche come l'atletica leggera (De Souza MJ *et al*, 2014). Tali lesioni sono in parte dovute alla scarsa massa ossea e in parte a uno stato di ridotta disponibilità energetica, che inficia la formazione e il turnover osseo (Frusztajer NT *et al*, 1990) con conseguente danneggiamento dei normali meccanismi di riparo e quindi fratture traumatiche da uso eccessivo. È da sottolineare che il disaccoppiamento del turnover dell'osso (soppressione della neoformazione ossea e aumento del riassorbimento), sebbene possa essere riprodotto in situazioni di scarso apporto

calorico di breve durata anche nella popolazione sana, non è tipico dell'ipoestrogenismo ma, piuttosto, della cronica deprivazione nutrizionale (Hotta M *et al*, 2000; Dominguez J *et al*, 2007).

3. Diagnosi

La diagnosi di FHA è una diagnosi di esclusione, che va posta dopo aver escluso altre condizioni anatomiche o organiche che potrebbero essere alla base dell'amenorrea. La presenza di FHA dovrebbe essere sospettata nelle adolescenti e nelle donne che hanno intervalli di cicli mestruali che eccedono i 45 giorni in modo persistente e/o in quelle che presentano amenorrea per 3 o più cicli.

Le pazienti affette da FHA in genere fanno parte di popolazioni sottoposte a stress psico-fisico.

Stabilita la diagnosi di FHA, alla paziente sono fornite informazioni riguardo le disfunzioni ormonali e metaboliche alla base di tale patologia, precisando che le irregolarità mestruali non richiedono una valutazione immediata e non precludono un eventuale concepimento.

In pazienti con sospetta FHA è necessaria una dettagliata anamnesi personale con particolare attenzione alla dieta, alle restrizioni caloriche, all'esercizio fisico, alle fluttuazioni di peso, ai ritmi sonno-veglia, ai fattori di stress e all'abuso di sostanze. È importante valutare anche l'anamnesi familiare con attenzione ai disturbi alimentari e riproduttivi.

Si consiglia in prima istanza di escludere un'eventuale gravidanza in atto ed un esame obiettivo completo, incluso un esame ginecologico, per escludere un'eventuale eziologia organica di amenorrea.

I test laboratoristici necessari sono: β gonadotropina corionica umana (β HCG), emocromo, elettroliti, glucosio, bicarbonato, urea, creatinina, pannello epatico

ed eventualmente velocità di eritrosedimentazione (VES) e/o proteina C reattiva (PCR).

La valutazione iniziale dovrebbe altresì includere i seguenti esami bioumorali ormonali: ormone tireostimolante (TSH) sierico, tiroxina libera (fT4), prolattina, ormone luteinizzante (LH), ormone follicolostimolante (FSH), estradiolo (E2) e ormone anti-Mulleriano (AMH).

Importante è inoltre la determinazione dei livelli di testosterone e deidroepiandrosterone solfato (DHEA-S) nelle pazienti con iperandrogenismo clinico e di 17-idrossiprogesterone in caso di sospetto di iperplasia surrenale congenita del surrene (in particolare per la forma non classica, con esordio in adolescenza e quadro clinico suggestivo caratterizzato da clitoridomegalia, pubarca precoce, acne, irsutismo, irregolarità mestruali).

Dopo aver escluso un'eventuale gravidanza, si può provare a somministrare un progestinico per indurre il sanguinamento (come indicazione dell'esposizione cronica di estrogeni).

La presenza di spiccata bradicardia e marcata ipotensione sono indicazioni per un ricovero, dato che l'FHA si associa a un aumento di mortalità nelle persone con anoressia nervosa.

Le pazienti che presentano amenorrea associata a mal di testa di lunga durata, vomito persistente non autoindotto, cambiamenti del visus, della sete o della minzione non imputabili ad altre cause (segni neurologici che suggeriscono un'anomalia del sistema nervoso centrale o anomalie degli ormoni ipofisari) dovrebbero essere sottoposte a risonanza magnetica tomografica.

È indicata una misurazione della densità minerale ossea basale (BMD) mediante l'assorbimento di raggi X a doppia energia (DXA) in qualsiasi adolescente o donna con 6 o più mesi di amenorrea soprattutto se all'anamnesi si rileva una storia di grave carenza nutrizionale, altri stati di deficit energetico e/o fragilità scheletrica.

Nelle pazienti affette da FHA con sottostante sindrome dell'ovaio policistico (PCOS), si suggerisce una misurazione basale della BMD con DXA in quelle

con 6 o più mesi di amenorrea e con storia o sospetto di grave deficit nutrizionale, e monitoraggio clinico nelle pazienti trattate con gonadotropine esogene per l'infertilità (JCEM, *Clinical Practice Guideline* 2017).

4. Trattamento

Si raccomanda un'attenta valutazione delle pazienti affette da FHA con concomitante bradicardia, ipotensione, squilibrio elettrolitico.

Prima importante misura terapeutica è la correzione dello squilibrio energetico per migliorare la funzione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Le opzioni terapeutiche comprendono un aumento del consumo calorico e/o una migliore nutrizione e/o una diminuzione dell'attività fisica. In molti casi è necessario un aumento di peso.

È importante inoltre un supporto psicologico come ad esempio la terapia cognitivo-comportamentale (CBT).

Si consiglia di non utilizzare i contraccettivi orali (OCP) nelle pazienti con FHA al solo scopo di far ritornare il ciclo mestruale o di migliorare la densità minerale ossea. L'uso di estradiolo (E2) transdermico associato a progestinici ciclici orali può essere prescritto solo quando non si ottiene il ritorno delle mestruazioni dopo un intervento nutrizionale, psicologico e di rimodulazione dell'attività fisica.

Nelle pazienti con FHA che utilizzano OCP a scopo contraccettivo, è auspicabile da parte del medico educare le pazienti in merito al fatto che gli OCP possono mascherare il ritorno delle mestruazioni spontanee e che la perdita ossea può continuare, in particolare se non viene corretto lo squilibrio energetico.

Si suggerisce di utilizzare la terapia transdermica con E2 associata al progestinico orale per breve tempo (non contraccettivi orali o etinilestradiolo) nelle adolescenti e nelle donne che non hanno avuto un ritorno del ciclo dopo un ragionevole trattamento nutrizionale e psicologico.

Si suggerisce di non utilizzare i bisfosfonati, denosumab, testosterone e leptina per migliorare la BMD in questa categoria di pazienti.

Nelle pazienti con FHA che desiderano concepire, è indicato:

- trattamento con GnRH come prima linea o terapia con gonadotropine e induzione dell'ovulazione quando il GnRH non è disponibile;
- trattamento con clomifene citrato per indurre l'ovulazione se la donna ha un livello di estrogeni endogeni sufficiente;
- terapia cognitivo-comportamentale (CBT), dal momento che essa ha il potenziale per ripristinare cicli ovulatori e fertilità senza la necessità di un intervento farmacologico.

È sconsigliato invece l'uso di leptina per il trattamento di infertilità.

L'ovulazione dovrebbe essere indotta solamente nelle donne con FHA che hanno un Indice di Massa Corporea (BMI) di almeno 18,5 kg/m² e solo dopo aver tentato di normalizzare il bilancio energetico, per prevenire i rischi a lungo termine legati al basso peso durante un'eventuale gravidanza, quali aborto, bambini piccoli per età gestazionale, parto pretermine e parto cesareo (JCEM, *Clinical Practice Guideline* 2017).

II

SEZIONE SPERIMENTALE

**STUDIO DEL PROFILO ENDOCRINOLOGICO,
METABOLICO E RIPRODUTTIVO DEL PERSONALE
FEMMINILE IN FORMAZIONE PRESSO
L'ACCADEMIA AERONAUTICA
S.P.E.R.A.**

SOMMARIO:

CAP IV: INTRODUZIONE

CAP V: MATERIALI E METODI

CAP VI: RISULTATI

CAP VII: DISCUSSIONE

CAPITOLO IV

INTRODUZIONE

Dall'analisi della letteratura è chiaro come le alterazioni dell'assetto endocrino-metabolico sono prevalenti in comunità di soggetti che conducono una vita con ritmi intensi che dal punto di vista dell'attività fisica sia dal punto di vista psicologico, quali ad esempio Centri Sportivi Agonistici, Istituti di Formazione Coreutica, Istituti di Formazione Militare (Barrack MT *et al*, 2014; Cano Sokoloff N *et al*, 2015).

In queste popolazioni infatti la combinazione di alterazioni dietetiche con un'intensa attività fisica anche di tipo competitivo, con conseguente bilancio energetico negativo ed attivazione dei circuiti ormonali dello "stress", può condurre ad alterazioni mestruali e della sfera riproduttiva (ESHRE *Workshop Group*, 2006). In particolare nelle atlete si possono segnalare periodi variabili di amenorrea corrispondenti a intervalli di attività fisica intensa, seguiti da fasi caratterizzate dalla presenza di cicli mestruali irregolari o eumenorrea in concomitanza con la fine della stagione di formazione (Warren MP *et al*, 2002).

Nell'ambito dell'Accademia Aeronautica di Pozzuoli in particolare è emerso negli ultimi anni che circa il 60% delle allieve manifesta alterazioni del ciclo mestruale durante i primi mesi dall'ingresso nell'Istituto Militare. Tale manifestazione regredisce spontaneamente nella totalità dei casi nell'arco dei sei mesi successivi.

È lecito ritenere pertanto che tale popolazione rappresenti un modello ideale di studio delle dinamiche patogenetiche dell'FHA.

L'obiettivo dello studio è quello di valutare l'impatto di variabili antropometriche, endocrine, metaboliche ed immunologiche sulla regolarità del ciclo mestruale e sulla sfera riproduttiva in giovani donne militari esposte a fattori di stress legati alla vita accademica. Il fine ultimo è indagare la fisiopatologia di tali alterazioni in questa classe di soggetti, individuando i fattori scatenanti, in modo da poter mettere in atto eventuali strategie preventive e/o terapeutiche adeguate.

L'*endpoint* primario è la valutazione degli effetti dell'FHA sulla riserva ovarica tramite il dosaggio dell'ormone antimulleriano (AMH) e la Conta ecografica dei Follicoli Antrali (AFC).

Gli *endpoint* secondari sono invece i seguenti:

- Studiare l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi nelle donne che riferiscono FHA;
- Valutare l'impatto delle variabili antropometriche, endocrine, metaboliche ed immunologiche sullo sviluppo della FHA;
- Individuare possibili strategie preventive e/o terapeutiche tali da impedire un danno alla capacità riproduttiva e prevenire lo sviluppo della FHA.

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI

Il presente studio no profit è a carattere prospettico, interventistico non farmacologico con finalità clinico-diagnostica.

I dipartimenti che hanno partecipato afferiscono all'Università degli studi di Napoli "Federico II" e sono:

- Dipartimento di Neuroscienze Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche, UOC di Ostetricia e Ginecologia, Centro di Sterilità;
- Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, UOSD di Diagnostica Endocrinologica di Laboratorio del DAI di Medicina Interna e Patologia Clinica;
- Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie Mediche.

Il campione, composto da 44 pazienti, è stato selezionato tra le allieve dell'Accademia Aeronautica, sita in Pozzuoli, sulla base di specifici criteri di inclusione e di esclusione.

Nel dettaglio i criteri di inclusione sono stati i seguenti:

- Personale femminile dell'Accademia Aeronautica dal I al VI anno, appartenente al Ruolo Normale Naviganti, Ruolo Normale delle Armi e ai Ruoli Normali del Corpo del Genio Aeronautico, Commissariato Aeronautico e Sanitario Aeronautico;
- Età compresa tra i 18 e i 26 anni;

- Firma del consenso informato e autorizzazione al trattamento dei dati personali;
- Regolare attività fisica superiore alle 6 ore settimanali.

D'altra parte quelli di esclusione sono stati:

- Terapia con estro-progestinici interrotta nei sei mesi antecedenti l'arruolamento;
- BMI < 16,5 kg/m² e BMI > 30 kg/m²;
- Malattie endocrinologiche e disordini del metabolismo noti (diabete mellito tipo I – II, distiroidismi);
- Sindrome dell'ovaio policistico (criteri di Rotterdam);
- Storia di endometriosi pelvica documentata secondo i criteri ASRM;
- Patologie croniche (patologie neoplastiche, patologie autoimmunitarie, patologie reumatologiche, MICI);
- Disturbi psichiatrici (ansia, depressione, disturbi psichiatrici maggiori);
- Malattie a trasmissione genetica (cromosomopatie, anemia mediterranea);
- Gravidanza in atto.

La partecipazione allo studio è avvenuta su base volontaria, previa somministrazione e firma del modulo di consenso informato e trattamento dei dati personali (Allegato 1).

Sono stati dunque costituiti due gruppi di pazienti:

- Gruppo A: allieve iscritte al I anno dei Corsi Regolari presso l'Accademia Aeronautica, sottoposte a maggiore stress correlato alle attività accademiche e alle modifiche dello stile di vita conseguenti l'ingresso presso l'Istituto di formazione, per un totale di 11 pazienti;

- Gruppo B: allieve iscritte agli anni II, III, IV, V e VI dei Corsi Regolari presso l'Accademia Aeronautica, per un totale di 33 pazienti.

È stato quindi organizzato un calendario di appuntamenti per effettuare l'ecografia transvaginale e il prelievo ematico nel corso della 2°/3° giornata di ciclo mestruale, presso UOC di Ostetricia e Ginecologia, Centro di Sterilità edificio 9 III piano dell'Università Federico II di Napoli (Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche).

I prelievi ematici sono stati analizzati presso il Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali e UOSD di Diagnostica Endocrinologica di Laboratorio del DAI di Medicina Interna e Patologia Clinica.

Dal punto di vista laboratoristico sono stati quindi effettuati i dosaggi delle seguenti variabili endocrino-metaboliche:

- | | |
|--------------|--------------------------|
| • AMH | • Testosterone |
| • IGF-1 | • 17 β estradiolo |
| • Vit D | • Delta 4 androstendione |
| • TSH | • DHEA-S |
| • FSH | • 17 OH progesterone |
| • LH | • Ferritinemia |
| • Prolattina | • Insulina |

Ogni paziente ha effettuato un'ecografia pelvica transvaginale nel corso della quale è stata praticata la conta dei follicoli antrali (AFC) per la determinazione della riserva ovarica.

Nella stessa sede le pazienti hanno inoltre compilato un questionario anamnestico (Allegato 2) e un questionario di valutazione rapida dello stress (Allegato 3).

L'iter diagnostico-terapeutico è stato conforme ai protocolli stabiliti nei dipartimenti di afferenza in accordo con le norme di buona pratica clinica.

Le metodiche biochimiche utilizzate per lo studio dei campioni ematici sono state le seguenti:

- chemiluminescenza su siero per FSH, LH, 17β Estradiolo, Prolattina, Igf-1, Testosterone, DHEA-S, TSH, Delta 4 androstenedione, Vit D, Insulina, Ferritinemia;
- *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) per 17-OH progesterone e AMH.

Le analisi statistiche ha valutato le variabili antropometriche, endocrine e metaboliche.

Le variabili categoriche sono state presentate in percentuale mentre le variabili continue sotto forma di medie e deviazione standard. La distribuzione delle variabili continue è stata valutata con test di normalità *Shapiro Kolmogorov Smrinov*. Il test di *student* o *Mann Whitney U test* sono stati adoperati per le variabili continue a distribuzione normale e non parametrica, rispettivamente.

Il modello della regressione lineare è stato adoperato per valutare l'impatto delle variabili antropometriche, endocrine, metaboliche ed immunologiche (variabili indipendenti) sulla riserva ovarica, misurata mediante conta ecografica dei follicoli antrali e dosaggio dell'ormone antimulleriano (variabili dipendenti).

Il modello della regressione logistica è stato adoperato per valutare quale variabile indipendente risulti maggiormente predittiva per lo sviluppo FHA (variabile dipendente) nella popolazione oggetto di studio.

Il test Chi quadro è stato adoperato al fine di valutare i confronti tra le variabili categoriche.

Le analisi statistiche sono state effettuate mediante l'utilizzo di software dedicati (SPSS, Statistical Package for the Social Science versione 20.0).

Un valore di p inferiore a 0.05 è stato ritenuto come statisticamente significativo.

CAPITOLO VI

RISULTATI

1. Indagini di laboratorio

Nelle tabelle di seguito riportate sono illustrati i parametri antropometrici delle pazienti incluse nei due gruppi e i risultati degli esami strumentali e di laboratorio oggetto del presente studio.

La popolazione in esame è stata suddivisa in due gruppi sulla base del differente stile di vita assunto dalle allieve frequentanti i diversi anni di Corsi Regolari presso l'Accademia Aeronautica:

- gruppo A, allieve iscritte al I anno, sottoposte a maggiore stress psico-fisico, per un totale di 11 pazienti;
- gruppo B: allieve iscritte agli anni II, III, IV, V e VI sottoposte a minore stress, per un totale di 33 pazienti.

I due gruppi risultano omogenei per età, peso e *body mass index* (BMI) (Tabella 6.1).

| | Gruppo A (n = 11) | Gruppo B (n = 33) | p value |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------|
| Età | 19,45 ± 1,03 | 21,91 ± 1,62 | 0.0001 |
| Peso (kg) | 60,36 ± 5,69 | 60,17 ± 6,88 | 0.80 |
| BMI (kg/m ²) | 22,14 ± 2,39 | 21,43 ± 1,68 | 0.28 |

Tabella 6.1 Dati demografici. I valori riportati sono medie con deviazione standard.

Dall'analisi dei dati ematochimici (Tabella 6.2) non appaiono variazioni statisticamente significative tra i due gruppi nei valori ematici di gonadotropine, prolattina, testosterone, delta 4 androstenedione e DHEA solfato; inoltre si mantiene inalterato il profilo tiroideo.

| | Gruppo A (n = 11) | Gruppo B (n = 33) | p value |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|
| IGF-1 (ng/mL) | 310,06 ± 67,90 | 248,67 ± 61,57 | 0.007 |
| VIT D (ng/mL) | 18,76 ± 3,20 | 20,59 ± 6,39 | 0.36 |
| TSH (uUI/mL) | 1,11 ± 0,35 | 1,31 ± 0,44 | 0.17 |
| FSH (mUI/mL) | 4,78 ± 1,51 | 4,52 ± 2,63 | 0.76 |
| LH (mUI/mL) | 6,21 ± 4,04 | 4,05 ± 2,85 | 0.06 |
| Prolattina (ng/mL) | 5,83 ± 2,51 | 8,63 ± 5,77 | 0.12 |
| Testosterone (ng/mL) | 21,51 ± 4,98 | 21,61 ± 5,76 | 0.95 |
| 17 β estradiolo (pg/mL) | 49,81 ± 37,97 | 34,44 ± 11,13 | 0.04 |
| Delta 4 androstenedione (ng/mL) | 2,27 ± 0,62 | 1,92 ± 0,76 | 0.17 |
| DHEA-solfato (ug/mL) | 299,09 ± 139,90 | 242,15 ± 111,35 | 0.19 |
| 17 OH progesterone (ng/mL) | 0,46 ± 0,41 | 0,29 ± 0,11 | 0.03 |
| Ferritina (ng/mL) | 26,65 ± 19,80 | 36,69 ± 21,98 | 0.18 |
| Insulina (uUI/mL) | 42,18 ± 26,14 | 12,16 ± 9,96 | 0.0001 |

Tabella 6.2 Dati di laboratorio (espressi in media ± DS).

Nell'ambito dell'assetto ormonale però i livelli di 17 β estradiolo risultano più elevati (49,81 pg/mL ± 37,97 pg/mL) nel gruppo A rispetto al gruppo B (34,44 pg/mL ± 11,13 pg/mL) (Figura 6.1); inoltre nel gruppo A anche i livelli di 17 OH progesterone risultano significativamente più elevati rispetto ai controlli (Figura 6.2). Tali dati trovano spiegazione nel peculiare quadro ecografico di queste pazienti in seguito descritto.

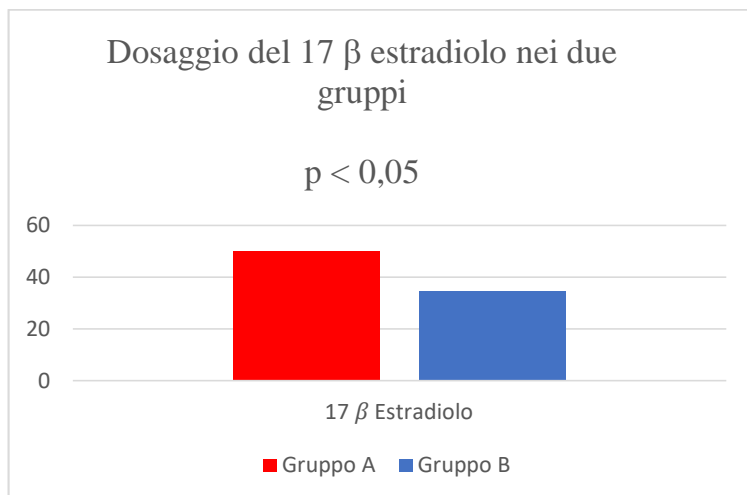


Figura 6.1

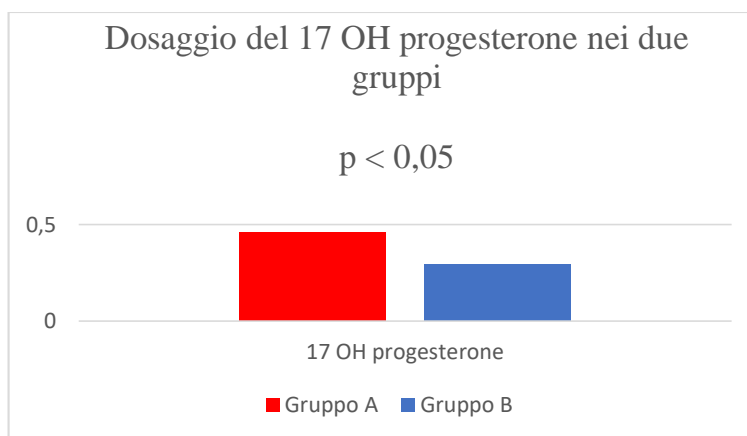


Figura 6.2

In relazione all'assetto metabolico, nel gruppo A risultano significativamente più elevati i valori ematici di insulina e IGF-1 (Figura 6.3 e 6.5).

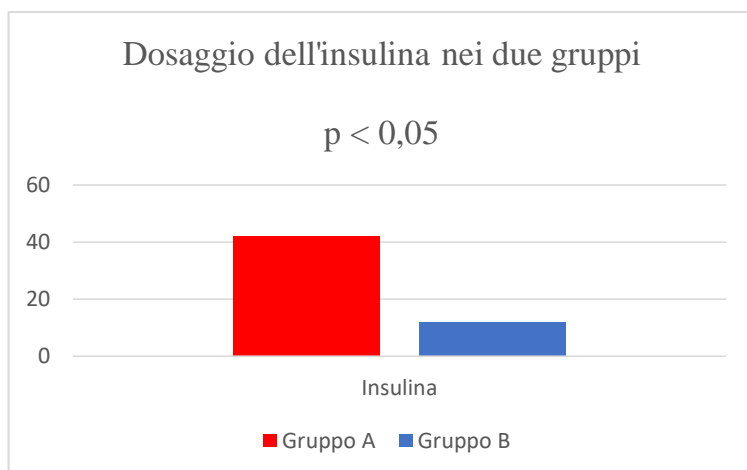


Figura 6.3

Nello specifico si evidenziano livelli circolanti medi di insulina di 42,18 uUI/mL \pm 26,14 uUI/mL rispetto ad una media di 12,16 uUI/mL \pm 9,96 uUI/mL del gruppo B ($p < 0,0001$), con picchi che superano le 70 uUI/mL in due pazienti (18%) del gruppo A (Figura 6.4).

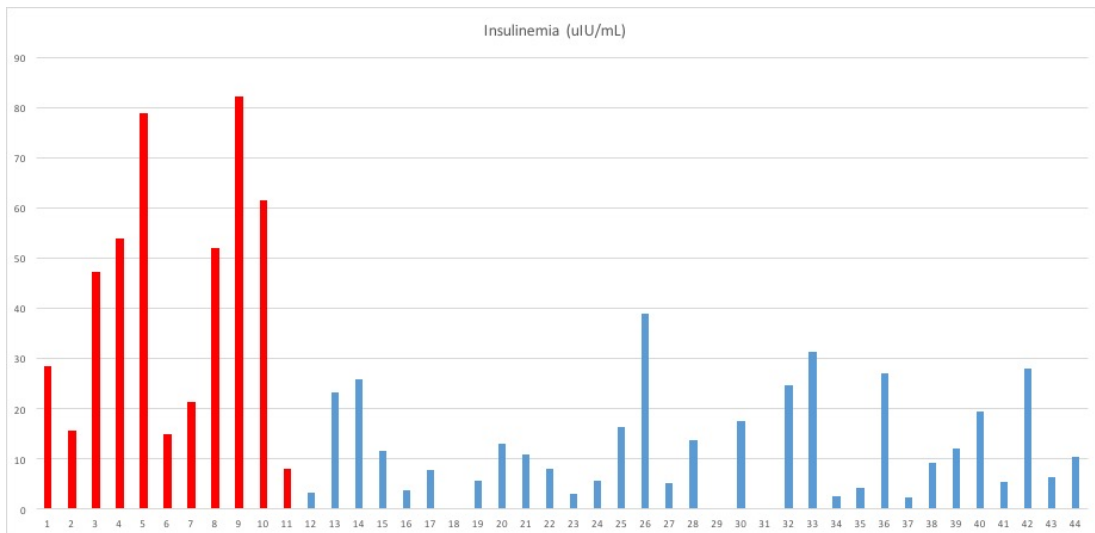


Figura 6.4 Confronto dei livelli insulinemici nel gruppo A (in rosso) e nel gruppo B (in blu).

Anche le differenze nei livelli di IGF-1 sono risultate statisticamente significative con valori medi di 310,06 ng/mL \pm 67,90 ng/mL nel gruppo A, rispetto a 248,67 ng/mL \pm 61,57 ng/mL del gruppo B (Figura 6.5).

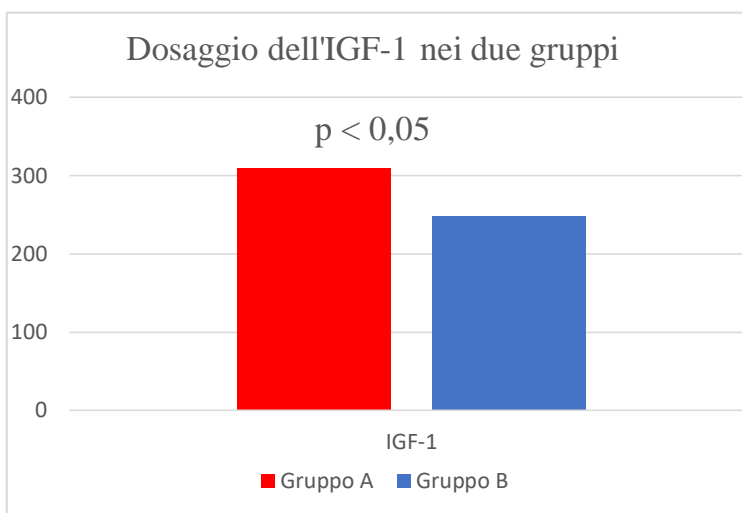


Figura 6.5

Questi valori sono da correlarsi alle alterazioni dei livelli insulinemici che potrebbero giocare un ruolo nella patogenesi dell’FHA che si instaura in circa il 60% delle allieve nell’arco dei primi mesi dall’ingresso in Accademia. Tale dato necessita di ulteriori approfondimenti con studi futuri con una più ampia numerosità campionaria.

| | Gruppo A (n = 11) | Gruppo B (n = 33) | p value |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|----------------|
| AMH (ng/mL) | 5,73 ± 3,15 | 6,01 ± 3,04 | 0.79 |
| AFC (2 – 9 mm) | 22,91 ± 10,83 | 19,56 ± 8,04 | 0.28 |

Tabella 6.3 Valutazione della riserva ovarica (dati espressi in media ± DS).

Per quanto concerne la valutazione della riserva ovarica, la conta dei follicoli antrali e i livelli di ormone anti-mulleriano (AMH) circolanti non sembrano essere influenzati né dalla subentrante condizione di stress né dall’amenorrea (Tabella 6.3): i livelli circolanti di AMH sono infatti comparabili nei due gruppi e adeguati all’età della popolazione in esame.

2. Quadri ecografici

Tutte le pazienti sono state sottoposte ad ecografia pelvica transvaginale; alle pazienti eumenorroiche il controllo ecografico è stato eseguito al 2°/3° giorno del ciclo mestruale.

I reperti ecografici hanno mostrato un quadro ovarico multi-follicolare in 29 su 44 pazienti (66%) della popolazione totale (Figure da 6.6 a 6.9).

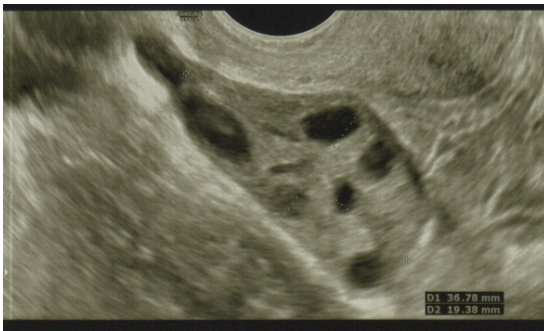


Figura 6.6



Figura 6.7

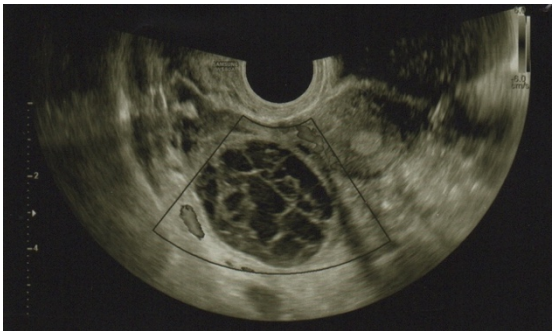


Figura 6.8

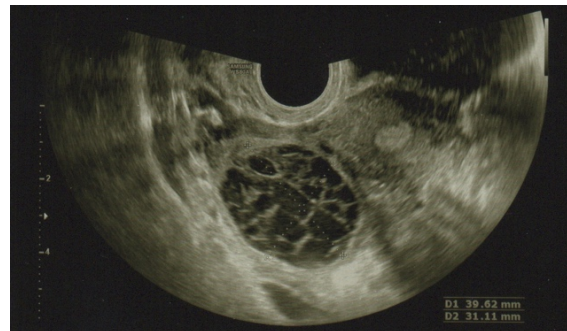


Figura 6.9

Nel gruppo A inoltre nel 64% dei casi (7 pazienti su 11) si sono riscontrate nel contesto ovarico formazioni transoniche di verosimile natura funzionale (Figura 6.10 e 6.11). Si tratta di follicoli ovarici persistenti la cui attività sostiene gli alti livelli di estrogeni e progesterone rilevati in tali pazienti, indipendentemente dai livelli di gonadotropine circolanti.



Figura 6.10

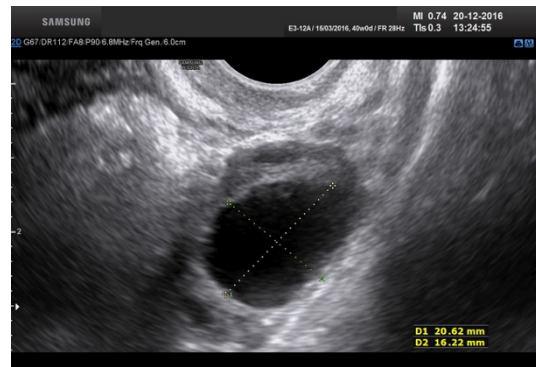


Figura 6.11

3. Valutazione dei questionari

Dall'analisi dei questionari somministrati alla popolazione in studio, nell'ambito dell'anamnesi personale prossima, non si rilevano particolari diete restrittive condotte dalle pazienti, anzi le allieve frequentanti il I anno dei corsi accademici riferiscono un aumento dell'introito calorico giornaliero conseguente all'intensa attività fisica sportiva e militare.

Per quanto riguarda l'anamnesi ginecologica invece, è emerso come le irregolarità mestruali siano molto frequenti in entrambi i gruppi: 30 pazienti (68%) su un totale di 44 riferiscono disturbi nella durata e nella quantità del flusso mestruale dopo l'ingresso in Accademia, mentre solo 14 di esse (32%) riferiscono dismenorrea. Per quel che concerne i segni di iperandrogenismo si rileva che 20 pazienti su 44 totali, per una percentuale pari al 45%, riportano un aumento della presentazione di acne e irsutismo nel contesto di vita accademica. Emerge infine un dato importante: con la cessazione dei ritmi di vita intensi, sia dal punto di vista fisico che dal punto di vista psicologico, peculiari del I anno accademico, si ripristina nel 97% (43 pazienti) delle 44 allieve in esame una situazione di eumenorrea.

CAPITOLO VII

DISCUSSIONE

1. Evidenze

Lo studio, attraverso la valutazione del profilo endocrinologico, metabolico e riproduttivo di una popolazione ideale di pazienti, costituisce un'opportunità unica in letteratura per fotografare l'esordio acuto di un'amenorrea ipotalamica funzionale, indagandone dunque i meccanismi etiopatogenici.

In particolare tale condizione è stata rilevata in 7 allieve su 11 (64%) appartenenti al gruppo A. È emerso che, nell'arco dei primi mesi in cui avvengono i cambiamenti dello stile di vita coincidenti con l'ingresso in Accademia Aeronautica, questa amenorrea è indipendente dai livelli circolatori di gonadotropine e dai parametri antropometrici.

Nello specifico, rapportando i valori biochimici della popolazione del gruppo A, esposta ai fattori di stress psico-fisico, con quelli del gruppo B, non esposto invece a tali fattori e considerato pertanto gruppo di controllo, si può evidenziare che il peso, il BMI ed i livelli di gonadotropine (FSH e LH) sono sovrapponibili. In aggiunta, anche i risultati della valutazione della riserva ovarica, effettuata attraverso la conta dei follicoli antrali e il dosaggio dei livelli di ormone anti-mulleriano (AMH) circolanti, non sembrano essere influenzati né dalla subentrante condizione di stress né dall'amenorrea stessa.

Ciò potrebbe essere considerato un indice di integrità della funzionalità di ipofisi ed ovaio, per cui si potrebbe ipotizzare che l'amenorrea in queste giovani

donne sia sostenuta solo da un'alterazione della ciclicità della secrezione ipotalamica di GnRH.

Significativamente più alti nel gruppo A sono risultati invece i valori di 17- β -estradiolo e di 17-OH-progesterone; tale dato, apparentemente paradossale, considerato che all'interno del gruppo A il 64% delle pazienti presentava l'FHA, potrebbe trovare spiegazione nei quadri ecografici di tali pazienti (Figure da 6.6 a 6.11): come precedentemente illustrato, infatti, è stata riscontrata a livello ovarico la presenza di formazioni transoniche di verosimile natura funzionale in un franco contesto multi-follicolare. Una struttura ovarica di questo tipo è indubbiamente responsabile della produzione di estrogeni e progesterone, giustificando i valori significativamente più elevati di questi ormoni steroidei nel gruppo A rispetto al gruppo B.

Altro dato interessante è l'osservazione nel gruppo A di un significativo incremento dei livelli circolanti di insulina, contestuale alla condizione clinica di FHA ed a considerevoli valori di AFC; questo fa supporre che l'amenorrea secondaria possa instaurarsi prima e forse indipendentemente dalle modificazioni quantitative delle gonadotropine circolanti e delle variazioni ponderali. Secondo questa ipotesi l'iperinsulinismo costituirebbe il "*primum movens*" nella genesi dell'amenorrea in queste pazienti. Tuttavia, potendo tale condizione di iperinsulinismo relativo essere preesistente e venire solo elicitata dalla vita in Accademia, risulta necessario confermare tale ipotesi con ulteriori indagini sull'assetto metabolico in studi futuri e su una campione numericamente più vasto.

In definitiva, dai controlli effettuati emerge come l'instaurarsi dell'amenorrea sia acuto e transitorio; tutte le pazienti ritornano infatti in breve tempo (3-4 mesi) ad uno stato eumenorrico, mantenendo inoltre livelli circolanti adeguati di FSH e LH. Questo denota una significativa modificazione

indotta dai fattori di stress psicofisico sull'assetto metabolico, senza variazioni, in un arco temporale così ridotto, dell'assetto ormonale di tali pazienti.

Interessante è notare che i livelli circolanti di insulina e IGF-1 permangono invece elevati anche dopo il ritorno ad una condizione di eumenorrea, dato evidenziabile dallo studio del gruppo B di controllo.

Questo potrebbe rafforzare ulteriormente l'ipotesi che le alterazioni metaboliche in queste pazienti siano un fattore predisponente e non un effetto dello stress psicofisico.

Lo studio, d'altra parte, nonostante la rilevante valenza scientifica, risulta limitato dalla dimensione campionaria relativamente esigua, legata al numero effettivo di allieve frequentanti i Corsi Regolari presso l'Accademia Aeronautica. Infatti, sulla base delle più recenti graduatorie (ultimo decennio), il personale femminile vincitore del concorso annuale di ammissione ai Corsi Regolari dell'Accademia Aeronautica, ricopre ogni anno solo il 15-20% dei posti totali messi a disposizione dal bando, risultando dunque in 10/15 nuove allieve per anno.

Inoltre mancano dati antecedenti l'inizio dei corsi, fondamentali per confermare o confutare le nostre ipotesi.

Entrambi questi limiti potrebbero essere abbattuti estendendo nel tempo lo studio e reclutando dunque nuove pazienti ogni anno.

2. Conclusioni

Volendo proporre un confronto delle evidenze ottenute con pregressi studi presenti in letteratura (Barrack MT *et al* 2014, Gordon CM *et al* 2010, Robinson TL *et al* 1995) si notano dati discordanti in particolare per quanto riguarda i valori di gonadotropine circolanti. In letteratura questi *reports* dimostrano infatti come pazienti che conducano stili di vita intensi dal punto di vista psicofisico abbiano livelli di FSH e LH circolanti ai limiti bassi della norma, a differenza di quanto emerso dall'analisi della nostra popolazione di studio, in cui i valori rientravano nel *range* fisiologico. Spiegazione plausibile di tale discordanza potrebbe trovarsi nel fatto che il campione di donne in amenorrea secondaria indotta da stress fisico, psicologico o da disturbo alimentare psicogeno vengono normalmente studiate in letteratura a distanza di molto tempo dall'insorgenza dell'amenorrea stessa, ovvero dopo una prolungata esposizione a tali fattori di stress. Si può quindi dedurre che queste pazienti arrivino all'osservazione quando il quadro sintomatologico si sia già consolidato e l'amenorrea riferita abbia già una base fisiopatologica sottesa da meccanismi di feed-back a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio.

Secondo il nostro studio è verosimile invece che nella fase acuta di instaurazione dell'amenorrea in queste donne si perda solo la ciclicità della secrezione ormonale pulsatile a livello centrale senza effetti periferici e che il rapido ritorno alla normalità non comporti variazioni croniche e sequele a lungo termine.

Concordante è invece il nostro reperto relativo all'iperinsulinemia riscontrata nella nostra popolazione di studio, che correla con quadri ecografici ovarici multi-follicolari proprio come riportato nello studio di Alviggi *et al* (Alviggi C *et al*, 2017). L'iperinsulinemia riscontrata potrebbe essere espressione di un adattamento acuto a un incipiente stile di vita stressogeno e all'aumentato

introito calorico giornaliero, atto a sostenere l'incremento della massa muscolare necessario per lo svolgimento delle attività accademiche.

In conclusione lo studio dimostra come l'FHA e i quadri ecografici ovarici multi-follicolari presenti in queste pazienti possano esordire in acuto anche in assenza di una sottostante condizione ipogonadotropa e ancora prima che si instaurino modificazioni antropometriche. A conferma di tale dato emerge la necessità di effettuare in modo prospettico una valutazione analoga, ma antecedente l'ingresso in Accademia Aeronautica, in modo da poter confrontare il profilo endocrinologico, metabolico e riproduttivo iniziale delle allieve con quello instauratosi durante i primi mesi di esposizione ai fattori di stress psicofisico. Inoltre potrebbero essere aggiunte anche delle valutazioni bioimpedensiometriche, atte a esplorare le variazioni nel rapporto tra massa magra e massa grassa, che potrebbero accompagnare le alterazioni metaboliche rilevate.

ALLEGATI

SOMMARIO:

**ALLEGATO 1: MODULO DI CONSENSO INFORMATO E
TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI**

ALLEGATO 2: QUESTIONARIO ANAMNESTICO

**ALLEGATO 3: QUESTIONARIO DI VALUTAZIONE RAPIDA DELLO
STRESS**

ALLEGATO 1:

INFORMATIVA E MANIFESTAZIONE DEL CONSENSO DI PARTECIPAZIONE ALLO STUDIO

Informazioni per il paziente

Gentile paziente,

La presente nota informativa Le viene presentata per darLe tutti gli elementi di conoscenza necessari per la Sua partecipazione allo studio:

“Valutazione del profilo Endocrinologico, Metabolico e Riproduttivo del personale femminile in formazione presso l’Accademia Aeronautica”.

L’obiettivo è quello di comprendere meglio la fisiopatologia delle alterazioni mestruali che notoriamente si rilevano nel personale femminile durante i primi anni accademici. Diversi studi scientifici infatti dimostrano come tali alterazioni siano prevalenti in comunità di soggetti che conducono una vita con ritmi intensi sia dal punto di vista dell’attività fisica sia dal punto di vista psicologico.

I dati che ci proponiamo di ottenere saranno utili per valutare l’impatto di variabili antropometriche, endocrine e metaboliche sulla regolarità del ciclo mestruale e sulla sfera riproduttiva in relazione a condizioni di stress legate alla vita accademica. Il fine ultimo è quello di individuare i fattori scatenanti, in modo da poter mettere in atto eventuali strategie preventive e/o terapeutiche adeguate.

Lo studio prevede il reclutamento di tutto il personale femminile consenziente in formazione presso l'Accademia Aeronautica, con una numerosità campionaria iniziale pari a 44 donne.

Il team che condurrà lo studio è composto dai seguenti ricercatori:

- Dott. Antonio Mollo, Ricercatore confermato presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II – Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche;
- Prof. Giuseppe Matarese, Professore ordinario presso l'Università degli studi di Napoli Federico II – Dipartimento di Medicina molecolare e Biotecnologie Mediche;
- Prof. Giuseppe De Placido, Professore Ordinario presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II – Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche;
- Prof. Carlo Alviggi, Professore Associato presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II – Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche;
- Prof. Pietro Formisano, Professore Ordinario Presso l'Università degli studi di Napoli Federico II – Dipartimento di Scienze Mediche Translazionali.

Se Lei acconsente a prendere parte a questa valutazione, Le sarà chiesto di leggere e firmare il modulo di consenso informato dopo aver discusso con i medici di tutti gli aspetti di non immediata comprensione che riterrà di voler chiarire.

Nello specifico Lei effettuerà:

- Una valutazione della Sua storia clinica attraverso un apposito questionario (Allegato 2);
- Una valutazione rapida dello stress attraverso un apposito questionario (VRS, Allegato 3);

- Un prelievo ematico per lo studio dei profili ormonali e metabolici;
- Un'ecografia transvaginale con conta dei follicoli antrali (AFC) per la determinazione della riserva ovarica.

Le suddette indagini saranno condotte in regime ambulatoriale presso il Dipartimento di Neuroscienze, Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche da personale idoneo e qualificato seguendo le norme internazionali di “*good clinical practice*”, minimizzando in tal modo eventuali rischi legati alle procedure.

Lei non dovrà sostenere nessun costo per le visite, analisi di laboratorio o altre procedure.

L'esecuzione del prelievo ematico prevede copertura assicurativa da parte dell'Azienda Sanitaria.

Il trasporto del personale partecipante allo studio sarà effettuato con mezzo militare e sotto responsabilità assicurativa a carico dell'Accademia Aeronautica.

La polizza assicurativa, che garantisce la copertura dei danni da responsabilità civile derivante dalla sperimentazione stessa, non copre il valore eccedente il massimale ed è operante esclusivamente per i danni la cui richiesta di risarcimento sia stata presentata non oltre il periodo previsto in polizza. Tale limitazione non inficia comunque il diritto del soggetto danneggiato ad ottenere il risarcimento da parte del responsabile dell'eventuale danno.

Tutte le informazioni raccolte saranno rigorosamente coperte dal segreto professionale e dal rispetto della riservatezza dettato dalle norme sulla privacy. Il Suo nome e la Sua identità rimarranno confidenziali, in accordo a quanto previsto dal D. Lgs. 196/2003 “Codice in materia di protezione dei dati personali comuni e sensibili”, anche nell'ipotesi di una presentazione dei dati relativi allo studio su giornali e/o congressi medico-scientifici.

Lei ha tempo per poter decidere se partecipare allo studio o confrontarsi con un familiare o un altro medico di fiducia. La Sua partecipazione allo studio è totalmente volontaria; un Suo eventuale rifiuto non influirà in alcun modo sulla qualità dell'assistenza e dei trattamenti medici ritenuti opportuni per il Suo caso. Lei sarà comunque libera di ritirare il Suo consenso in qualsiasi momento, senza fornire alcuna spiegazione e/o giustificazione. Infatti, il ritiro dallo studio non comporta né la perdita di benefici di cui ha diritto o penalità, né pregiudizio nel caso di future cure mediche. D'altra parte Lei potrà essere esclusa dallo studio in ogni momento, anche contro la Sua volontà, per motivi legati alla corretta conduzione dello studio.

Inoltre, si sottolinea che per coloro che partecipano al corso di Laurea in Medicina e Chirurgia la partecipazione o la mancata adesione non avrà alcun risvolto sulle attività didattiche e sulla valutazione in sede di esame.

Il presente studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Manifestazione del consenso di partecipazione allo studio

Io sottoscritta _____
nata a _____ il _____ ho letto
le informazioni riportate nel documento “INFORMAZIONI PER IL
PAZIENTE”, che si considera parte integrante della presente dichiarazione, e
ho chiarito ogni dubbio ricevendo adeguate spiegazioni. Ho avuto tempo
sufficiente per riflettere sulle informazioni fornitemi. Ho ricevuto copia
completa di questo documento.

Dichiaro che all’atto della firma del presente documento mi sono state rese note
le informazioni circa le caratteristiche e le modalità di trattamento dei dati
personali ai sensi di quanto previsto dal D. Lgs. 196/2003 “Codice in materia di
protezione dei dati personali comuni e sensibili”.

Pertanto, consapevole dei miei diritti, autorizzo il titolare e il responsabile dei
dati relativi alla presente valutazione a sottoporre a trattamento (ai sensi indicati
dalla legge) i dati in oggetto. Acconsento che i dati, esclusivamente in forma
anonima, possano essere diffusi tramite pubblicazioni scientifiche e/o
presentazioni a congressi, convegni e seminari dopo essere stati resi a me noti.
Desidero, inoltre, ove mai da questa valutazione dovessero scaturire nuovi
modelli di studio o metodiche correlate, di esserne messo al corrente prima della
eventuale pubblicazione.

Napoli, lì

Firma del paziente

Napoli, lì

Firma leggibile del paziente per il trattamento dei dati sensibili

Napoli, lì

Firma del medico

INFORMATIVA E MANIFESTAZIONE DEL CONSENSO AL TRATTAMENTO DEI DATI PERSONALI

Titolari del trattamento e relative finalità

Il Centro di sperimentazione (UOC di Ostetricia e Ginecologia Centro di Sterilità, Dipartimento di Neuroscienze Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche) che ha commissionato lo studio che Le è stato descritto, in accordo alle responsabilità previste dalle norme della buona pratica clinica (d.l. 211/2003), tratterà i Suoi dati personali, in particolare quelli sulla salute, soltanto nella misura in cui questi siano indispensabili in relazione all'obiettivo dello studio.

Altri dati relativi alla Sua origine, ai Suoi stili di vita, alla Sua vita sessuale, ecc. (Variabili demografiche, antropometriche, endocrinologiche, metaboliche, immunologiche ed anamnestiche), saranno richiesti ed utilizzati esclusivamente in funzione della realizzazione dello studio.

A tal fine i dati indicati saranno raccolti esclusivamente dal Centro di sperimentazione, nessuna azienda farmaceutica o Ente esterno è coinvolto nello studio in oggetto e prenderà quindi visione di tali dati personali.

Il consenso al trattamento dei dati personali è indispensabile allo svolgimento dello studio: il rifiuto di conferirli non Le consentirà di parteciparvi.

Natura dei dati

Il medico che La seguirà nello studio La identificherà con un codice: i dati che La riguardano raccolti nel corso dello studio saranno registrati, elaborati e conservati unitamente a tale codice. Soltanto il medico e i soggetti autorizzati potranno collegare questo codice al Suo nominativo.

Modalità del trattamento

I dati, trattati mediante strumenti anche elettronici, saranno diffusi solo in forma rigorosamente anonima, ad esempio attraverso pubblicazioni scientifiche, statistiche e convegni scientifici. La Sua partecipazione allo studio implica che, in conformità alla normativa sulle sperimentazioni cliniche dei medicinali, il Comitato etico e le autorità sanitarie italiane e straniere potranno conoscere i dati che La riguardano, contenuti anche nella Sua documentazione clinica originale, con modalità tali da garantire la riservatezza della Sua identità.

Esercizio dei diritti

Potrà esercitare i diritti di cui all'art. 7 del Codice (accedere ai Suoi dati personali, integrarli, aggiornarli, rettificarli, opporsi al loro trattamento per motivi legittimi, ecc.) rivolgendosi direttamente al centro di sperimentazione (Dott. Antonio Mollo UOC di Ostetricia e Ginecologia Centro di Sterilità, Dipartimento di Neuroscienze Scienze Riproduttive ed Odontostomatologiche; Recapito telefonico 0817462699; Mail antmollo66@gmail.com). Potrà interrompere in ogni momento e senza fornire alcuna giustificazione la Sua partecipazione allo studio: in tal caso, i campioni biologici a Lei correlati verranno distrutti. Non saranno inoltre raccolti ulteriori dati che La riguardano, fermo restando l'utilizzazione di quelli eventualmente già raccolti per determinare, senza alterarli, i risultati della ricerca.

Consenso

Sottoscrivendo tale modulo acconsento al trattamento dei miei dati personali per gli scopi della ricerca nei limiti e con le modalità indicate nell'informativa fornitami con il presente documento.

Napoli, lì

Nome e Cognome dell'interessato (in stampatello)

Firma dell'interessato

ALLEGATO 2:

QUESTIONARIO ANAMNESTICO

Dati anagrafici

Nome e cognome:

Luogo e data di nascita:

Telefono:

E-mail personale:

Anamnesi familiare

Tra i Suoi familiari (compresi nonni, zii, cugini) qualcuno soffre o ha sofferto di una o più delle seguenti malattie:

- patologie cardiache (ipertensione, infarti, ictus, flebiti, trombosi)

sì no chi? quale malattia? a che età?

- colesterolo/trigliceridi elevati:

sì no chi? a che età?

- diabete:

sì no chi? a che età?

- malattie a trasmissione genetica (cromosomopatie, anemia mediterranea, emofilia, distrofia muscolare ecc.):

sì no chi? quale malattia? a che età?

- patologie oncologiche:

sì no chi? quale? a che età?

- patologie tiroidee:

sì no chi?

a che età?

Anamnesi personale remota

Eventi avvenuti in passato (malattie importanti, malattie ereditarie o infettive, malattie esantematiche dell'infanzia, traumi):

È stata mai ricoverata? sì no per quale motivo?

Ha subito interventi? sì no di che tipo?

Anamnesi personale prossima

Eventuali patologie presenti (tiroidee, endocrine, infettive, ecc.):

Eventuali trattamenti sanitari/estetici in atto:

Fuma? sì no se sì, specificare quante sigarette al giorno: da quanti anni?

Beve alcolici? sì no se sì, specificare: da quanti anni?

Evacuazione:

Appetito:

Digestione:

N° di pasti giornalieri:

Diete alimentari in passato:

Dieta alimentare presente:

Intolleranze Alimentari:

Allergie alimentari:

Integratori e/o prodotti erboristici:

ETÀ: ____ ALTEZZA: ____ PESO: ____ BMI (a cura del medico): _____

Il Suo peso è variato negli ultimi 6-12 mesi?

Sì no Se sì, di quanto?

Ci sono state oscillazioni di peso dall'ingresso in Accademia Aeronautica?

Sì no Se sì, di quanto?

Indichi il mese e l'anno di ingresso in Accademia Aeronautica: (precisare se già militare, eventuali Scuole Militari o anni di servizio prestati precedentemente presso altri Enti delle FF.AA.)

Sport praticato in passato: Per quante ore settimanali?

Attualmente quali sport pratica? Per quante ore settimanali?

Prende regolarmente dei medicinali? Se sì, quali e in che dosaggio?

Anamnesi ginecologica

Età del menarca (prima mestruazione):

1. PRIMA DELL'INGRESSO IN ACCADEMIA (o precedente F.A., scuola militare, ecc.)

- I cicli si presentavano con regolarità o con quale frequenza?
- Erano preceduti da sindrome premestruale?
Se sì, con che sintomi?
- Quanti giorni durava il ciclo mestruale?

Specifichi la quantità del flusso:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Indichi il grado percepito di dolore:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Definisca come si presentava il dolore (se era presente in tutti i cicli, se compariva solo nei primi giorni o se perdurava anche verso la fine del ciclo ecc.):

Prima dell'ingresso in F.A. ha mai rilevato la comparsa di acne?

Se sì indichi su scala il grado di presenza:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Prima dell'ingresso in F.A. lamentava la presenza di peluria in zone insolite?

Se sì indichi su scala il grado di presenza:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Indicare eventuali gravidanze e/o aborti:

Indichi eventuali interventi ginecologici [diatermocoagulazioni o trattamenti laser al collo dell'utero ("bruciature di piaghetto"), asportazioni di cisti ovariche, polipi, fibromi, ecc.]:

Effettuava regolarmente visite ginecologiche?

Dalle ultime visite effettuate sono emerse patologie di rilievo (ovaio policistico, endometriosi, ecc.)?

2. DOPO L'INGRESSO IN ACCADEMIA (o precedente F.A., scuola militare, ecc.)

Negli anni ha potuto notare cambiamenti del ciclo mestruale?

(Più frequenti, irregolari, meno frequenti, molto abbondanti, più dolorosi ecc.)

Quanti giorni dura adesso il ciclo mestruale?

Specifichi la quantità del flusso:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Dolore percepito:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Ha notato cambiamenti nella comparsa di acne, nella distribuzione della peluria, eventuale irsutismo o al contrario risoluzione dello stesso?

Indichi su scala il grado di presenza:

ACNE:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

PELURIA:

| | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|

Secondo Lei, a cosa sono dovuti tali cambiamenti?

Fa uso di pillola anticoncezionale? Se sì, quale?

Perché e quando ha iniziato la terapia?

Ultima visita ginecologica:

Ha mai praticato un Pap-test? Se sì, indichi quando e con che risultato:

Napoli, ____/____/_____

FIRMA

ALLEGATO 3:

QUESTIONARIO DI VALUTAZIONE RAPIDA DELLO STRESS

| | | |
|----------|-------|------|
| COGNOME: | NOME: | ETÀ: |
|----------|-------|------|

Leggerà alcune frasi che rispecchiano comuni stati d'animo o reazioni fisiche. Per ogni frase segni con una croce la risposta che meglio descrive come si sente al momento della compilazione. Non ci sono risposte giuste o sbagliate.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 1 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 2 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 3 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 6 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 7 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 8 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 9 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

Adesso segni con una croce la risposta che meglio La descrive negli ultimi 6 mesi della Sua vita.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 10 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 11 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 12 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 13 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 14 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 15 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |

BIBLIOGRAFIA

Woo I, Tobler K, Khafagy A, *et al.* Predictive Value of Elevated LH/FSH Ratio for Ovulation Induction in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *J Reprod Med.* 2015 Nov-Dec; 60(11-12):495-500.

Eisenberg I, Kotaja N, Goldman-Wohl D, *et al.* MicroRNA in Human Reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2015; 888:353-87.

Bazer FW. History of Maternal Recognition of Pregnancy. *Adv Anat Embryol Cell Biol.* 2015; 216:5-25.

Kumar TR, Wang Y, Lu N, *et al.* Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat. Genet.* 1997 Feb; 15(2):201-4.

Kerin J. Ovulation detection in the human. *Clin Reprod Fertil.* 1982 Mar; 1(1):27-54.

Greene DN, Grenache DG. Education Committee of the Academy of Clinical Laboratory Physicians and Scientist. Pathology consultation on human chorionic gonadotropin testing for pregnancy assessment. *Am. J. Clin. Pathol.* 2015 Dec; 144(6):830-6.

Mihm M, Gangooly S, Muttukrishna S. The normal menstrual cycle in women. *Anim. Reprod. Sci.* 2011 Apr; 124(3-4):229-36.

Apter D, Viinikka L, Vihko R. Hormonal patterns of adolescent menstrual cycles. *J Clin Endocrinol Metab.* 1978; 47:944–54.

Quint EH and Smith YR. Abnormal Uterine Bleeding in Adolescents. *J Midwifery Womens Health.* 2003; 48(3):186-91.

Hickey M and Balen A. Menstrual disorders in adolescence: investigation and management. *Hum Reprod Update.* 2003; 9(5):493-504.

Yonkers KA, O'Brien PM, Eriksson E. Premenstrual syndrome. *Lancet.* 2008; 371(9619):1200-10.

Harel Z. Dysmenorrhea in adolescents and young adults: etiology and management. *J Pediatr Adolesc Gynecol.* 2006; 19(6):363-71.

American College of Obstetricians and Gynecologists. Amenorrhea (ACOG Technical Bulletin 128). Washington D.C: ACOG, 1989.

Speroff L, Fritz MA. Amenorrhea. In: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility.* 7th ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 401-64.

The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Current evaluation of amenorrhea. *Fertil Steril.* 2004; 82(1):33-9.

Carlson JL, Curtis M and Halpern-Felsher B. Clinician Practices for the Management of Amenorrhea in the Adolescent and Young Adult Athlete. *Journal of Adolescent Health.* 2007; 40:362-365.

Master-Hunter T, Heiman DL. Amenorrhea: evaluation and treatment. *Am Fam Physician.* 2006; 73(8):1374-82.

Gordon CM. Functional hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med* 2010; 363:365–71.

Genazzani AD, Ricchieri F, Lanzoni C, *et al.* Diagnostic and therapeutic approach to hypothalamic amenorrhea. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1092:103

Meczekalski B, Podfigurna-Stopa A, Warenik-Szymankiewicz A, Genazzani AR. Functional hypothalamic amenorrhea: current view on neuroendocrine aberrations. *Gynecol Endocrinol* 2008; 24:4–11.

Frisch RE. Body fat, menarche, fitness and fertility. *Hum Reprod* 1987; 2:521–33.

Nappi RE, Petraglia F, Genazzani AD, *et al.* Hypothalamic amenorrhea: evidence for a central derangement of hypothalamic pituitary-adrenal cortex axis activity. *Fertil Steril* 1993; 59:571–6.

Berga SL, Mortola JF, Girton L, *et al.* Neuroendocrine aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:301–8.

Perkins RB, Hall JE, Martin K. Neuroendocrine abnormalities in hypothalamic amenorrhea: spectrum, stability, and response to neurotransmitter modulation. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1905–11.

Bronson FH, Manning JM. The energetic regulation of ovulation: a realistic role for body fat. *Biol Reprod* 1991; 44:945–50.

Laughlin GA, Dominguez CE, Yen SS. Nutritional and endocrine-metabolic aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:25–32.

Marcus MD, Loucks TL, Berga SL. Psychological correlates of functional hypo-thalamic amenorrhea. *Fertil Steril* 2001; 76:310–6.

Warren MP, Voussoughian F, Geer EB, *et al.* Functional hypothalamic amenorrhea: hypoleptinemia and disordered eating. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:873–7.

Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008; 294:827–30.

Loucks AB. Energy availability, not body fatness, regulates reproductive function in women. *Exerc Sport Sci Rev* 2003; 31:144–8.

Sanci L, Coffey C, Olsson C, *at al.* Childhood sexual abuse and eating disorders in females. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2008; 162:261–7.

Margetic S, Gazzola C, Pegg GG, *at al.* Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int J ObesRelatMetabDisord* 2002; 26:1407–33.

Dardeno Ta, Chou SH, Moon HS, *at al.* Leptin in human physiology and therapeutics. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31:377–93.

Smith GD, Jackson LM, Foster DL. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology* 2002; 57:73–86.

Sanchez-Garrido M, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *HormBehav* 2013; 64:187–94.

Castellano JM, Roa J, Luque RM, *et al.* KiSS-1/kisspeptins and the metabolic control of reproduction: physiologic roles and putative physiopathological implications. *Peptides* 2009; 30:139–45.

Roman E, Ricci G, Faletti G. Leptin enhances ovulation and attenuates the effects produced by food restriction. *Mol Cell Endocrinol* 2005; 242:33–41.

Tataranni P, Monroe MB, Dueck C, *et al.* Adiposity, plasma leptin concentration and reproductive function in active and sedentary females. *Int J ObesRelatMetabDisord* 1997; 21:818–21.

Bray GA. Obesity and reproduction. *Hum Reprod* 1997; 12:26–32.

Kopp W, Blum WF, von Prittwitz S, *et al.* Low leptin levels predict amenorrhea in underweight and eating disordered females. *Mol Psychiatry* 1997; 2: 335–40.

Miller KK, Parulekar MS, Schoenfeld E, *et al.* Decreased leptin levels in normal weight women with hypothalamic amenorrhea: the effects of body composition and nutritional intake. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2309–12.

Dundon CM, Rellini AH, Tonani S, Nappi R. Mood disorders and sexual functioning in women with functional hypothalamic amenorrhea. *Fertil Steril* 2010; 94:2239–43.

Berga SL. Stress and reproduction: a tale of false dichotomy? *Endocrinology* 2008; 149:867–8.

Berga SL, Mortola JF, Girton L, *et al.* Neuroendocrine aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989;68(2): 301–308.

McCarthy MM. A piece in the puzzle of puberty. *Nat Neuroscien.* 2013; 16(3):251–253.

Navarro VM, Kaiser UB. Metabolic influences on neuroendocrine regulation of reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2013; 20(4):335–341.

Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, *et al.* EDC-2: The Endocrine Society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocr Rev.* 2015; 36(6): E1–E150.

Ackerman KE, Patel KT, Guereca G, *et al.* Cortisol secretory parameters in young exercisers in relation to LH secretion and bone parameters. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013; 78(1):114–119.

Grinspoon S, Miller K, Coyle C, *et al.* Severity of osteopenia in estrogen deficient women with anorexia nervosa and hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84(6):2049–2055.

Nattiv A, Loucks AB, Manore MM, *et al.* American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. The female athlete triad. *Med Sci Sports Exerc.* 2007; 39(10):1867–1882.

Young N, Formica C, Szmukler G, Seeman E. Bone density at weight-bearing and nonweight-bearing sites in ballet dancers: the effects of exercise, hypogonadism, and body weight. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78(2):449–454.

Robinson TL, Snow-Harter C, Taaffe DR, *et al.* Gymnasts exhibit higher bone mass than runners despite similar prevalence of amenorrhea and oligomenorrhea. *J Bone Miner Res.* 1995; 10(1):26–35.

Warren MP, Brooks-Gunn J, Hamilton LH, *et al.* Scoliosis and fractures in young ballet dancers. Relation to delayed menarche and secondary amenorrhea. *N Engl J Med.* 1986;314(21):1348–1353.

De Souza MJ, Nattiv A, Joy E, *et al.* Female Athlete Triad Coalition; American College of Sports Medicine; American Medical Society for Sports Medicine; American Bone Health Alliance. 2014 Female Athlete Triad Coalition consensus statement on treatment and return to play of the female athlete triad: 1st International Conference held in San Francisco, CA, May 2012, and 2nd International Conference held in Indianapolis, IN, May 2013. *Clin J Sport Med.* 2014; 24(2):96–119.

Frusztajer NT, Dhuper S, Warren MP, *et al.* Nutrition and the incidence of stress fractures in ballet dancers. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(5):779–783.

Hotta M, Fukuda I, Sato K, *et al.* The relationship between bone turnover and body weight, serum insulin-like growth factor (IGF) I, and serum IGF-binding protein levels in patients with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(1):200–206.

Dominguez J, Goodman L, Sen Gupta S, *et al.* Treatment of anorexia nervosa is associated with increases in bone mineral density, and recovery is a biphasic process involving both nutrition and return of menses. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86(1):92–99.

Gordon M *et al.* Functional Hypothalamic Amenorrhea: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab (JCEM)*, May 2017; 102(5):1–27

Barrack MT, Gibbs JC, De Souza MJ, *et al.* Higher incidence of bone stress injuries with increasing female athlete triad-related risk factors: a prospective multisite study of exercising girls and women. *Am J Sports Med.* 2014; 42(4):949–958.

Cano Sokoloff N, Eguiguren ML, Wargo K, *et al.* Bone parameters in relation to attitudes and feelings associated with disordered eating in oligo-amenorrheic athletes, eumenorrheic athletes, and nonathletes. *Int J Eat Disord.* 2015; 48(5):522–526.

ESHRE Capri Workshop Group. Nutrition and reproduction in women. *Hum Reprod Update.* 2006; 12(3):193–207.

Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP, *et al.* Osteopenia in exercise-associated amenorrhea using ballet dancers as a model: a longitudinal study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(7):3162–3168.

Alviggi C, Conforti A, De Rosa P, *et al.* The distribution of strom and antral follicles differs between insulin-resistance and hyperandrogenism-related polycystic ovarian syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2017; 8:117.

