

**Protocollo diagnostico e management in età neonatale** (P. Ghirri, R.T. Scaramuzzo, N. Greggio, MC Salerno)

**PREMESSA.** La nascita di un neonato con difetto della differenziazione sessuale (DSD) associato ad anomalie dei genitali esterni rappresenta un evento emotivamente molto stressante per i genitori. Inoltre, alcuni DSD, anche non necessariamente associati a malformazioni clinicamente evidenti alla nascita, possono porre a rischio la vita stessa del neonato, qualora non tempestivamente diagnosticate e trattate (si pensi alla iperplasia surrenale congenita con perdita di sali).

Pertanto, i DSD con esordio in età neonatale devono essere considerati emergenze mediche e necessitano di una gestione attenta e ragionata. Il coinvolgimento di un *team* multidisciplinare ed esperto (neonatologo, endocrinologo pediatra, urologo pediatra, psicologo, psichiatra, genetista clinico) è presupposto imprescindibile per un corretto e completo inquadramento (Ghirri, 2011; Wiesniewski, 2012).

**CLASSIFICAZIONE E NOMENCLATURA.** Con termine generale, tutte le condizioni con discordanza tra sesso genetico, gonadico o anatomico vengono definite DSD. La *Consensus Conference* di Chicago del 2006 ha revisionato completamente l'argomento, proponendo una classificazione sulla base dell'assetto cariotipico, delle più recenti conoscenze di biologia molecolare e una nuova nomenclatura, che elimini definizioni gravate da pesanti stigmate socioculturali (Hughes, 2006) [Figura 1].

L'inquadramento diagnostico, dunque, è ragionato proprio sulla scorta di tale classificazione, ma resta comunque complesso, sia perché varie forme possono avere il medesimo fenotipo clinico, sia perché sussistono dei limiti negli esami di laboratorio e strumentali. Pertanto, un congruo numero di casi di DSD, in particolar modo tra quelli con cariotipo 46,XY, resta privo di diagnosi eziologica definitiva, il che pone dubbi gravosi sulla adeguatezza della stessa gestione clinica e sulla assegnazione del sesso (Hughes, 2012; Bertelloni, 2013).

**GESTIONE CLINICA DEL NEONATO.** La necessità di un algoritmo appropriato, da applicare sin dai primi giorni di vita allo scopo di formulare una diagnosi precoce, deriva dalla considerazione che l'eziologia del DSD ha conseguenze variabili per diversi aspetti di notevole rilevanza clinica: assegnazione del sesso, terapia ormonale sostitutiva, stima del rischio di neoplasie maligne delle gonadi, indicazione ad intervento chirurgico (Cools, 2011). E' opportuno ritardare la registrazione della nascita, informando l'ufficio anagrafe, perché per la legge italiana al momento della registrazione è necessario indicare il sesso maschile o femminile; così facendo sarà possibile guadagnare qualche settimana per poter arrivare ad una diagnosi e ad una appropriata assegnazione del sesso.

L'*assessment* biologico dei vari quadri clinici si basa su una sequenza logica e ordinata di esami ormonali e genetici, dettata da anamnesi approfondita (familiare, gravidica anche con focus su eventuali *endocrine disruptors*, neonatale) ed esame obiettivo dettagliato, comprensivo di ricerca di eventuali gonadi palpabili, misurazione delle dimensioni del micropene/clitoride, osservazione della posizione del meato uretrale e del grado di eventuale ipospadia, dell'aspetto dello scroto e di sua eventuale iperpigmentazione, nonché della ricerca di eventuali altre malformazioni, di restrizione di crescita intrauterina e di ipotonia. La caratterizzazione completa del fenotipo può richiedere anche l'esecuzione di un'ecografia per l'individuazione dell'utero (o suoi residui) ed eventualmente delle gonadi, nonché di una genitografia per la descrizione di un seno urogenitale (SIN; Balsamo, 2011; Ghirri, 2011).

L'attivazione fisiologica dell'asse ipofisi-gonadi nei primi giorni di vita consente di misurare le gonadotropine e gli steroidi sessuali, con risultati molto attendibili (Hughes, 2012). Nel maschio i livelli di androstenedione, testosterone e diidrotestosterone sono elevati nei primi 2 giorni di vita, si riducono successivamente con un nadir alla fine della 1° settimana, e si elevano nuovamente dalla fine della 2° settimana di vita ("mini-pubertà", fino al 3°-4° mese) (Migeon, 1994).

In presenza di ridotti livelli di testosterone, nel sospetto di un disordine dello sviluppo testicolare, è necessario considerare che possono esserci associate altre anomalie congenite a seconda del gene alterato: ipoplasia surrenalica e ipogonadismo ipogonadotropo (geni SF1, DAX1), tumore di wilms (gene WT1 – sindrome di Dennis Drash), anomalie congenite multiple (gene DMRT1), atassia, teleangectasie, ritardo mentale (gene ATRX), displasia campomelica (gene SOX9).

Gli ormoni surrenalici sono generalmente elevati nei primi 2-3 giorni di vita anche nei neonati senza difetti enzimatici della sintesi degli steroidi. Aumentati livelli di 17-idrossi-progesterone sono stati rilevati alla nascita in neonati pretermine, con successiva diminuzione e normalizzazione a un'età post-concezionale pari al termine (Nykänen, 2010). Il dosaggio dell'ormone anti-Mulleriano, secreto dalle cellule del Sertoli, completa lo studio della funzione testicolare (Hughes, 2012).

Il dosaggio del 7-deidro-colesterolo plasmatico è indicato, in presenza di IUGR e/o dimorfismi associati, per riconoscere la sindrome di Smith-Lemli-Opitz, caratterizzata da ridotti livelli di colesterolo e di tutti gli steroidi.

La figura 2 schematizza l'algoritmo proposto. Si noti che, pressoché quotidianamente nei primi giorni di vita, è necessario il controllo della glicemia e degli elettroliti plasmatici (sodio, potassio), nel sospetto di iperplasia surrenale congenita (Balsamo, 2011; Ghirri, 2011).

Per quanto attiene specificamente alla diagnostica genetica, il cariotipo è da considerarsi indubbiamente esame di prima linea. In modo mirato, in seguito all'approfondimento ormonale, si procederà poi alla valutazione di singoli geni candidati: i DSD, infatti, possono derivare dalla mutazione di qualunque dei geni che presiedono allo sviluppo e alla differenziazione sessuale. Inoltre, un fattore critico può essere il *timing* di espressione dei trascritti codificanti (si pensi ad esempio alla persistenza di strutture Mulleriane in caso di normale ma ritardata secrezione di androgeni e AMH nello sviluppo fetale - Wiesniewski, 2012).

Un nuovo approccio genetico-molecolare, la Next-Generation Sequencing (NGS), permette la sequenza simultanea di numerosi geni all'interno di piattaforme che si possono configurare a

seconda dell'applicazione clinica (fig. 3), e appare uno strumento importante per una diagnosi precoce soprattutto nei neonati con 46 XY DSD. Una volta individuata l'alterata sequenza di un gene con la NGS si procede alla conferma diagnostica con un sequenziamento classico tipo Sanger. Una nuova frontiera della diagnostica, attualmente solo a livello di ricerca, è costituita dallo studio *in vitro* della sensibilità dei tessuti alla azione degli ormoni, in particolare degli androgeni (Hughes, 2012).

L'assegnazione del sesso è conclusione diretta della diagnosi eziopatogenetica del DSD: per questo, rimane controversa in alcuni quadri 46,XY di definizione incerta [Tabella 1]. Nella decisione, condivisa tra genitori e staff sanitario, è necessario considerare le conseguenze mediche e i dati disponibili in Letteratura e quindi le possibili previsioni a lungo termine riguardo al potenziale di fertilità, alla possibilità di una stabile identità di genere, alle possibili opzioni chirurgiche, alla necessità di terapie sostitutive, alla possibilità di una normale funzione e soddisfazione sessuale, al rischio di malignità.

**GESTIONE DELLA FAMIGLIA.** La comunicazione della diagnosi ai genitori del neonato con DSD è questione estremamente delicata, sia nella fase iniziale di sospetto clinico che nelle successive di indagine diagnostica e definizione della prognosi. L'informazione deve essere necessariamente completa, per diritto umano universale prima ancora che per vincoli strettamente legati al consenso per le procedure diagnostiche: questo tipo di approccio comunicativo dovrebbe essere la costante metodologica del *team* multidisciplinare, in grado di fornire conoscenze, competenze ed esperienze, fornire qualità e cura, e affrontare le barriere emotive e culturali/religiose (D'Alberon, 2010). Solo in virtù di una comunicazione simile, la famiglia prima e il paziente stesso nelle età successive, sarà in grado di compiere scelte libere e consapevoli su eventuali interventi terapeutici e, in generale, sulla gestione della identità di genere e del ruolo di genere.

Sfortunatamente, non esistono regole prestabilite: ogni situazione richiede una approfondita valutazione degli aspetti biologici, della storia naturale della specifica condizione, quando conosciuta, e anche del contesto socio-culturale e etnico in cui il bambino e la famiglia vivono. Ogni informazione può infatti sollevare problematiche rilevanti e psicologicamente impegnative, per cui ogni messaggio deve essere autorevole, comprensibile, ripetuto/integrato negli anni e adeguato alla capacità di comprensione dei genitori e del bambino stesso, man mano che questi cresce. La care deve essere individualizzata sia per il supporto psicologico alle famiglie sia per l'educazione appropriata all'età per i piccoli pazienti. Le associazioni dei genitori rappresentano, in questo contesto complesso, un valore aggiunto per gli stimoli che possono dare in ambito di *care* (Bertelloni, 2013).

**CONSORZI PER LA CLINICA E LA RICERCA.** I DSD sono, considerati singolarmente, patologie rare e storicamente ciò ha ostacolato sia la ricerca clinica che l'assistenza clinica basata sull'evidenza. Riconoscendo i limiti connessi a questa epidemiologia, le società scientifiche europee e statunitensi negli ultimi anni hanno prodotto dichiarazioni politiche (ad esempio: *Consensus Statement on Management of Intersex Disorders*) e documenti scientifici che sanciscono la necessità di *team* multidisciplinari e reti di collaborazione per la assistenza sanitaria ottimale dei pazienti con DSD. Inoltre, sempre più vengono promosse la costituzione di consorzi tra centri specializzati, la creazione di registri internazionali (Euro-DSD, I-DSD) e le iniziative di *e-learning*, allo scopo di tesaurizzare le energie per la ricerca oltre che standardizzare la gestione clinica. (Ahmed, 2010; Ahmed, 2014; Sandberg, 2015). Nella medesima ottica, risorsa preziosa costituiscono le associazioni di pazienti che si pongono anche l'obiettivo della divulgazione scientifica (ad esempio: AISIA).

## BIBLIOGRAFIA

- Ahmed SF, Rodie M, Jiang J, Sinnott RO - *The European disorder of sex development registry: a virtual research environment*. Sex Dev. 2010 Sep;4(4-5):192-8
- Ahmed SF, Bryce J, Hiort O - *International networks for supporting research and clinical care in the field of disorders of sex development*. Endocr Dev. 2014;27:284-92.
- Balsamo A, Cicognani A, Ghirri P, Scaramuzza RT, D'Alberton F, Bertelloni S, Boldrini A - *Disorders of Sexual Development*, Cap. 123 in G. Buonocore et al. (eds.), Neonatology. A Practical Approach to Neonatal Diseases. © Springer-Verlag Italia, 2011
- Bertelloni S, Dati E, Ghirri P, D'Alberton F, Baldinotti F, Baroncelli GI – *Gestione clinica dei disturbi della differenziazione sessuale con cariotipo 46,XY: aspetti emergenti*. Prospettive in Pediatria, 2013; 41 (170): 110-120
- Cools M, Wolffenbuttel KP, Drop SLS, Oosterhuis JW, Looijenga LH – *Gonadal development and tumor formation at the crossroads of male and female sex determination*. Sex Dev, 2011; 5:167-80
- D'Alberton F – *Disclosing disorders of sex development and opening the doors*. Sex Devel, 2010; 4: 304-309
- Ghirri P, Scaramuzza RT – *Approccio clinico-diagnostico al neonato con genitali ambigui*. Area Pediatrica, 2011; 12: 208-212
- Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA; LWPES Consensus Group; ESPE Consensus Group – *Consensus statement on management of intersex disorders*. Arch Dis Child, 2006; 91: 554-563
- Hughes IA, Morel Y, McElreavey K, Rogol A - *Biological assessment of abnormal genitalia*. J Pediatr Urol. 2012 Dec;8(6):592-6
- Migeon CJ, Berkovitz GD, Brown TR. *Sexual differentiation and ambiguity*. In: Wilkins L (eds). The diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence, 4th edition. Springfield: Charles C Thomas Publisher, 1994.
- Nykänen P, Heinonen K, Riepe FG, Sippell WG, Voutilainen R. *Serum concentrations of adrenal steroids and their precursors as a measure of maturity of adrenocortical function in very premature newborns*. Horm Res Paediatr 2010;74(5):358-64.
- Sandberg DE, Callens N, Wisniewski AB - *Disorders of Sex Development (DSD): Networking and Standardization Considerations*. Horm Metab Res. 2015 May;47(5):387-93
- Wisniewski AB, Krishnan S - *Ambiguous Genitalia in the Newborn*. In: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, Hershman JM, Koch C, McLachlan R, New M, Rebar R, Singer F, Vinik A, Weickert MO, editors. Source Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-2012 Nov 15.
- AISIA Associazione Italiana Sindrome Insensibilità Androgeni - *Linee guida cliniche per il Trattamento dei DSD in età infantile* ([www.aisia.org](http://www.aisia.org))
- Linee Guida SIN (Società Italiana di Neonatologia). *Genitali ambigui in età neonatale: gestione clinica* ([www.neonatologia.it](http://www.neonatologia.it))
- CONSORTIUM ON THE MANAGEMENT OF DISORDERS OF SEX DEVELOPMENT - *Clinical Guidelines for the Management of Disorders of Sex Development in Childhood* ([http://www.dsdguidelines.org/htdocs/clinical/protocols\\_newborn.html](http://www.dsdguidelines.org/htdocs/clinical/protocols_newborn.html))

**Figura** – Rappresentazione schematica della classificazione dei DSD secondo la *Consensus Conference* di Chicago del 2006

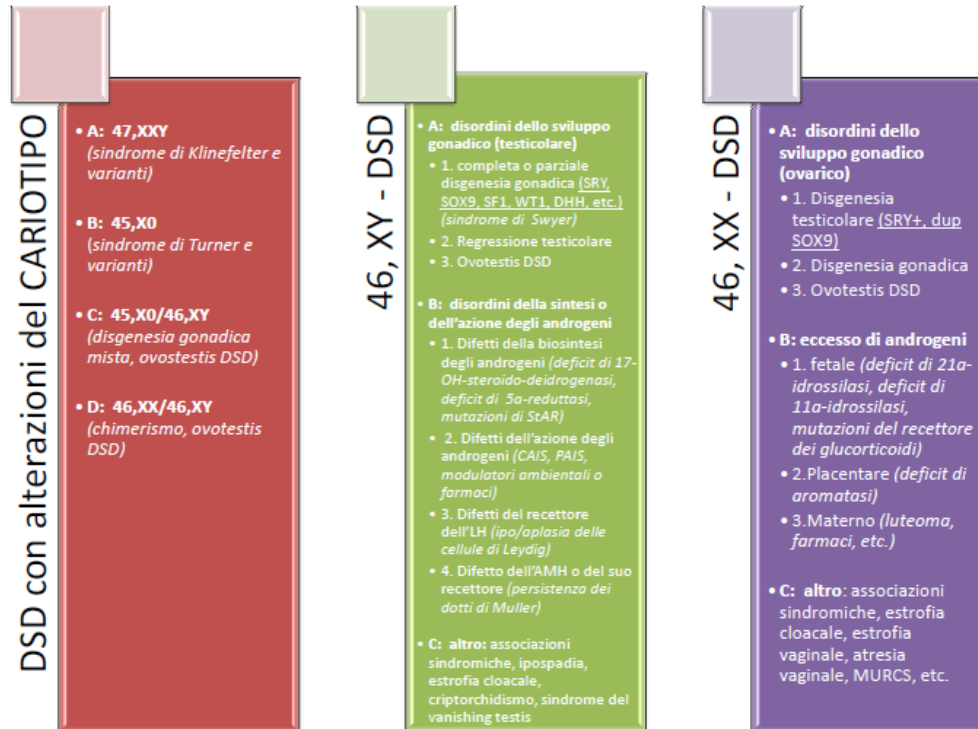


Figura - Algoritmo diagnostico dei DSD in età neonatale (Ghirri, 2011)

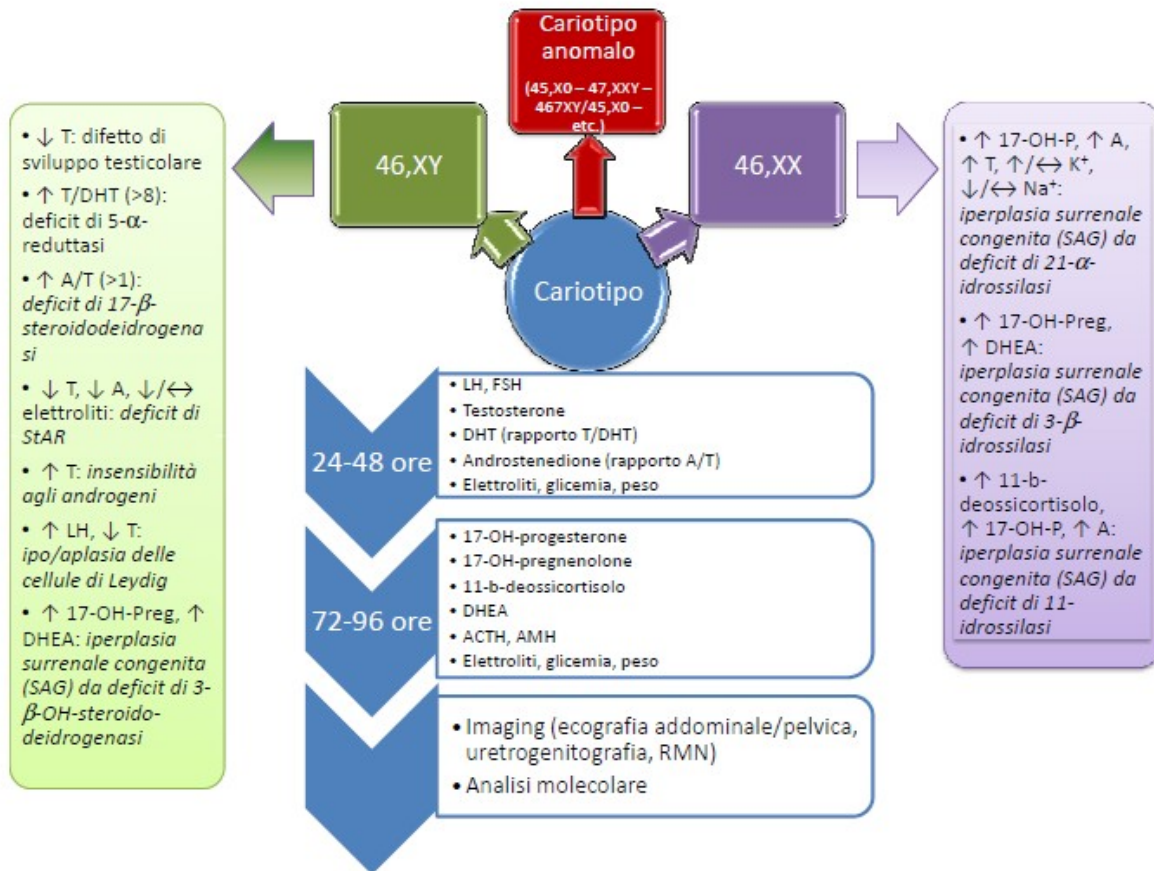


Figura 3 – Piattaforma dei geni per sequenza con Next-Generation Sequencing – UO Genetica Molecolare, Azienda Ospedaliero Universitaria Pisana, Pisa



### Geni della determinazione sessuale

GENE	Locus
CBX2	17q25.3
DHH	12q12-q13.1
DMRT1	9p24.3
DMRT2	9p24.3
GATA4	8p23.1-p22
MAP3K1	5q11.2
NR0B1	X p21.3-p21.2
NR5A1	9q33
RSPO1	1p34.3
SOX3	X q27.1
SOX9	17q24.3-q25.1
SRY	Yp11.3
WT1	11p13
WNT4	1p36.23-p35.1
WWOX	16q23.3-q24.1
ATRX	X q21.1

### Geni della differenziazione sessuale

GENE	Locus
AKR1C2	10p15-p14
AKR1C4	10p15-p14
AMH	19p13.3
AMHR2	12q13
AR	X q11.2-q12
CYP11A1	15q23-q24
CYP17A1	10q24.3
CYP21A2	6p21.3
FOXL2	3q23
HSD17B3	9q22
HSD3B2	1p13.1
LHCGR	2p21
MAMLD1	X q28
POR	7q11.2
SRD5A2	2p23
STAR	8p11.2
DHCR7	11q13.4

## NEXT-GENERATION SEQUENCING

**Tabella 1** - Indicazioni per l'assegnazione del sesso in 46,XY DSD (modificato da Bertelloni, 2013)

Forma clinica	Sesso da assegnare	Note
Deficit di sintesi del testosterone	preferibilmente maschile (soprattutto se diagnosi precoce)	Considerare la possibilità di riassegnazione del sesso maschile in soggetti allevati come femmine in rapporto a diagnosi molecolare, valutazione psico-comportamentale e storia di altre persone con stesso difetto genetico (se presenti in letteratura).
Deficit di 5 $\alpha$ -reduttasi	preferibilmente maschile (soprattutto se diagnosi precoce)	
SIA completa	femminile	Sesso femminile mai in dubbio, orientamento sessuale e attitudini femminili
SIA parziale	femminile o maschile	Da valutare caso per caso anche i rapporti alla teorica possibilità di androgenizzazione alla pubertà e alla storia di altre persone con stesso difetto genetico (se presenti in letteratura).
Deficit di virilizzazione grave "senza diagnosi"	Da valutare caso per caso anche in rapporto al livello di androgenizzazione del fenotipo*.	