



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

APPLICAZIONE DEL NEXT GENERATION SEQUENCING NEI
DISTURBI DELLO SVILUPPO SESSUALE

APPLICATION OF NEXT GENERATION SEQUENCING IN DISORDERS
OF SEXUAL DEVELOPMENT

Tesi di Laurea Magistrale
di:

MICHELANGELO PAOLINI

Relatore
Chiar.mo Prof.

FRANCESCO PIVA

Correlatore: (se previsto)

LIBORIO STUPPIA

Sessione Autunnale

Anno Accademico A.A. 2021/2022

INDICE

ABSTRACT

INTRODUZIONE

1. BASI MOLECOLARI DELLA DETERMINAZIONE E DELLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE

1.1. FORMAZIONE DELLA GONADE BIPOTENZIALE

1.2. DETERMINAZIONE E SVILUPPO DEL TESTICOLO

1.3 DIFFERENZIAZIONE DELL'OVAIO

2. DEFINIZIONE DSD E PREVALENZA

3. CLASSIFICAZIONE DSD

3.1 SEX CHROMOSOME DSD

3.1.1 Sindrome di Turner (45,X0 o 45,X0/46,XY)

3.1.2 Sindrome di Klinefelter (47,XXY)

3.2 XX, DSD

3.2.1 Disturbo dello sviluppo gonadico

3.2.1.1 Disgenesia gonadica

3.3.1.2 DSD testicolare

3.3.1.3 DSD ovotesticolare

3.2.2 Eccesso di androgeni

3.2.2.1 Androgeni esogeni

3.3 XY, DSD

3.3.1 Disturbo dello sviluppo gonadico

3.3.1.1 Disgenesia gonadica (sindrome di Swyer)

3.3.2 Disturbo nella sintesi/azione degli androgeni

3.3.2.1 Deficit di 5-alfa reduttasi

3.3.2.2 Deficit di StAR

3.3.2.3 Deficit di 17- β HSD

3.3.2.4 Deficit di 2,17 alfa- idrossilasi/17,20 liasi

3.3.3 SINDROME DA INSENSIBILITÀ AGLI ANDROGENI

3.3.3.1 CAIS

3.3.3.2 PAIS

4. MANAGEMENT DSD E FOLLOW UP

5 ASPETTI CLINICI

6. SCOPO DELLA TESI

7. MATERIALI E METODI

7.1 RECLUTAMENTO

7.2 SELEZIONE DEI GENI CANDIDATI E PANEL DESIGN

7.3 ESTRAZIONE DEL DNA

7.4 QUANTIFICAZIONE DNA

7.5 NEXT GENERATION SEQUENCING

7.5.1 Preparazione librerie

7.5.2 Purificazione librerie

7.5.3 Quantificazione Librerie

7.5.4 Fase di sequenziamento (Ion Torrent)

7.5.5 Data analisi

7.6 VALIDAZIONE SANGER

8. RISULTATI

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

BIBLIOGRAFIA

ABSTRACT

Lo “sviluppo sessuale” definisce l’insieme degli eventi biologici che conducono all’acquisizione differenziale, morfologica e funzionale, dei caratteri sessuali negli individui.

Tali eventi se alterati possono causare i disturbi dello sviluppo sessuale (DSD).

La diagnosi e la gestione dei pazienti affetti da DSD, specialmente se bambini o adolescenti, sono spesso fasi delicate e dall’esito incerto che coinvolgono tutta la famiglia ed il team multidisciplinare.

La conoscenza dei DSD si è notevolmente evoluta nell’ultimo decennio grazie alla ricerca sui meccanismi genetici alla base dei DSD e all’avvento delle tecnologie di sequenziamento.

Attraverso l’utilizzo di un pannello multigenico specifico per i DSD in diverse coorti di pazienti si è potuto constatare l’aumento esponenziale del tasso diagnostico.

Tuttavia, la presenza di VUS (varianti di significato incerto) complica la diagnosi dei DSD: l’arricchimento dei database delle varianti (Clinvar, Franklin, OMIM, e HGMD) e della letteratura scientifica correlata migliorerebbe l’interpretazione dei dati ottenuti.

INTRODUZIONE

1. BASI MOLECOLARI DELLA DETERMINAZIONE E DELLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE

La riproduzione sessuale nei mammiferi richiede due sessi caratterizzati da caratteristiche genetiche e anatomiche specifiche.

Il sesso fenotipico di un individuo è in gran parte determinato dal tipo di gonade che si sviluppa nell'embrione, un processo a sua volta determinato dal complemento dei cromosomi sessuali.

I maschi e le femmine umani hanno entrambi 22 paia di autosomi e differiscono solo per il complemento dei cromosomi sessuali. Tipicamente, le femmine hanno due cromosomi X (46,XX), mentre i maschi hanno una X e una Y (46,XY).

Dalla gonade bipotenziale iniziale, una cascata di geni consente la differenziazione in un testicolo o in un'ovaio, un processo noto come determinazione del sesso.

La scelta del destino delle cellule somatiche nella gonade in via di sviluppo nei mammiferi avviene in seguito all'attivazione dell'espressione di Sox9 da parte di Sry sul cromosoma Y, e il successivo mantenimento del destino delle gonadi può essere visto come una battaglia per il predominio tra i geni regolatori maschili (Dmrt1, Sox9) e femminili (Foxl2 e Wnt/b-catenina).

Pertanto, lo sviluppo e il mantenimento della gonade dei mammiferi è un processo biologico unico che è regolato da un doppio sistema repressivo in cui deve essere raggiunto l'equilibrio dei percorsi reciprocamente antagonisti per il normale sviluppo del testicolo o delle ovaie. (1)

Una volta che le gonadi si sono sviluppate e differenziate, iniziano a produrre ormoni specifici del sesso che, a loro volta, determinano lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari, inclusa la differenziazione dei genitali esterni (2).

I cambiamenti in questo delicato equilibrio possono causare i disturbi dello sviluppo sessuale (DSD) o infertilità nell'uomo. Alcuni di questi disturbi sono comuni, come testicoli ritenuti o ambiguità genitali, mentre altri sono rari e includono la totale mancanza della determinazione testicolare, disgenesia gonadica 46,XY completa o parziale o

formazione di testicoli su un background cromosomico femminile ovvero, la XX DSD testicolare. (1)

Studi sia sull'uomo che sui topi hanno identificato una serie di geni che svolgono ruoli critici nello sviluppo dei genitali interni ed esterni (3). In questo capitolo esamineremo alcuni dei geni chiave e dei percorsi genetici coinvolti nello sviluppo delle gonadi e dei genitali e come i difetti di questi geni determinino il DSD.

1.1. FORMAZIONE DELLA GONADE BIPOTENZIALE

Le gonadi inizialmente si sviluppano come strutture accoppiate indistinguibili tra i sessi, le gonadi bipotenziali. Queste derivano dall'epitelio celomico derivato dal mesoderma intermedio, che prolifera in una struttura epiteliale ispessita chiamata cresta genitale. Ciò si verifica sulla superficie ventromediale del rene embrionale intorno alla VI settimana gestazionale (GW) negli esseri umani.

In seguito, la differenziazione del sesso si verifica dalla VI alla X GW negli esseri umani. Durante lo sviluppo, le cellule della cresta genitale/celomiche si delaminano ed entrano nel mesenchima sottostante per differenziarsi nelle cellule di supporto, le cellule pregranulose nelle gonadi XX o le cellule pre-Sertoli in XY (4).

La cresta funge anche da fonte di cellule gonadiche interstiziali, comprese le cellule steroidogeniche maschili e femminili (Leydig o teca). Al contrario, le cellule germinali primordiali migrano verso la cresta genitale dalla base dell'allantoide e si moltiplicano quando la cresta genitale si ispessisce

I geni coinvolti nella differenziazione iniziale della gonade bipotenziale includono EMX2 (Empty Spiracles Homeobox 2), CBX2 (chromobox homolog2), WT1 (Wilms Tumor 1), NR5A1 (Nuclear Receptor Subfamily 5, Group A, Member 1), LHX9 (LIM homeobox factor 9), SIX 1/4 (Sine Oculis Homeobox Homolog) e GATA4 (GATA Binding Protein 4) (5).

Successivamente, le decisioni sul destino cellulare influenzano la differenziazione della cresta genitale bipotenziale verso il fenotipo maschile o femminile. Questo processo coinvolge una complessa rete di regolamentazione in quale l'attivazione di una via, cioè testicolare, porta alla repressione dell'altra via, ovarica, e viceversa (6).

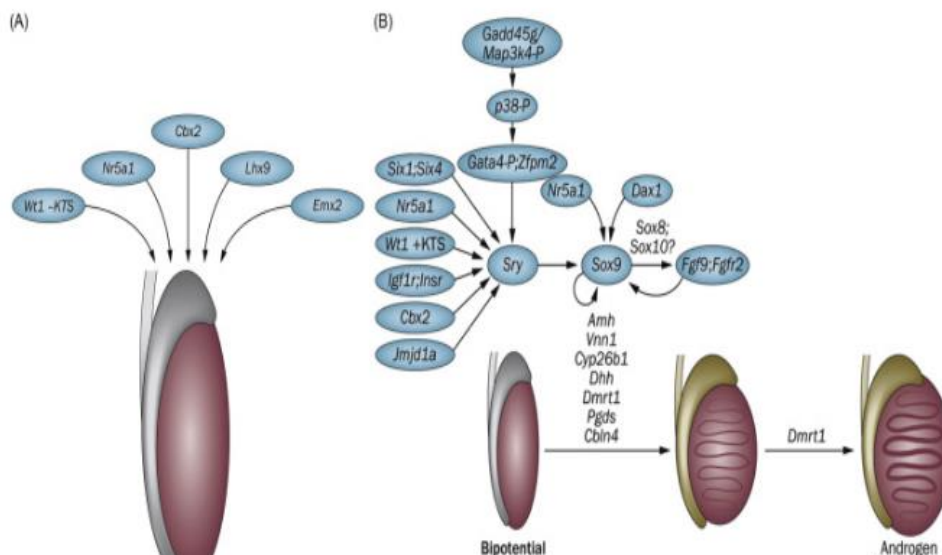


Figura 1: determinanti molecolari della formazione della gonade bipotenziale

1.2. FORMAZIONE DEL TESTICOLO

La presenza del gene SRY sul cromosoma Y sconvolge l'equilibrio tra i geni pro-testicolari e pro-ovarici, innescando la differenziazione del testicolo (6) (8).

SRY è il membro fondatore della famiglia di fattori di trascrizione del gruppo ad alta mobilità (HMG) box (SOX) correlata a SRY che è caratterizzata dalla presenza di un dominio di legame al DNA (DBD) HMG box e agisce come interruttori genetici che promuovono la differenziazione cellulare.

Nel testicolo in via di sviluppo, SRY, espresso nelle cellule pre-Sertoli, promuove l'espressione di SOX9.

Insieme a SRY e NR5A1, SOX9 genera un ciclo di feedback positivo per mantenere la sua espressione e promuovere lo sviluppo delle cellule di Sertoli. Due molecole di segnalazione paracrina a valle di SOX9, il fattore di crescita dei fibroblasti 9 (FGF9) e la prostaglandina D2 sintasi (PGD2) promuovono il mantenimento dello sviluppo testicolare (7).

FGF9 dalla regione centrale della gonade promuove l'espressione di SOX9 e antagonizza la segnalazione di WNT4. Altri geni rilevanti per la differenziazione testicolare includono CITED4 e altri membri della famiglia SOX, ovvero SOX3, SOX10 e SOX13 (8).

Successivamente, l'azione di due ormoni testicolari, AMH e androgeni, guida la differenziazione dei dotti interni, del seno urogenitale e dei genitali esterni. L'AMH, secreto dalle cellule del Sertoli, provoca la regressione dei dotti mulleriani nella VIII e IX settimana. Gli androgeni prodotti dalle cellule di Leydig inducono la stabilizzazione e la differenziazione dei dotti di Wolff, nonché la virilizzazione del seno urogenitale e dei genitali esterni tra le settimane VIII e XIII. Questi processi che si verificano nel primo trimestre di vita fetale sono indipendenti dalle gonadotropine ipofisarie fetali: l'espressione basale di AMH è guidata da un insieme di fattori di trascrizione e la produzione di androgeni è regolata dall'hCG placentare. Il fattore insulino-simile 3 (INSL3), prodotto dalle cellule di Ledyig, è coinvolto nella discesa testicolare (17).

Quando Sry è assente, Sox9 è sottoregolato e si verifica lo sviluppo delle ovaie.

1.3 FORMAZIONE DELL'OVAIO

Piuttosto che essere il "percorso predefinito", la differenziazione dell'ovaio è un processo attivo dipendente dall'attività di fattori specifici. WNT4 sopprime l'espressione di SOX9 nella cellula pregranulosa dell'ovaio in via di sviluppo. WNT4 e RSPO1 stabilizzano l'espressione della β -catenina. FOXL2 è un altro fattore di trascrizione ovarica e proteina nucleare cruciale per la differenziazione e il mantenimento della differenziazione ovarica (10).

Le proteine, WNT4 e RSPO1, promuovono l'accumulo di β catenina nel nucleo dove interagisce con LEF1 per promuovere la trascrizione di altri geni. FOXL2 e β catenina reprimono anche l'espressione SOX9. La via WNT4 sovraregola la follistatina, che inibisce l'attivina B e previene la formazione del sistema vascolare testicolo-specifico (11).

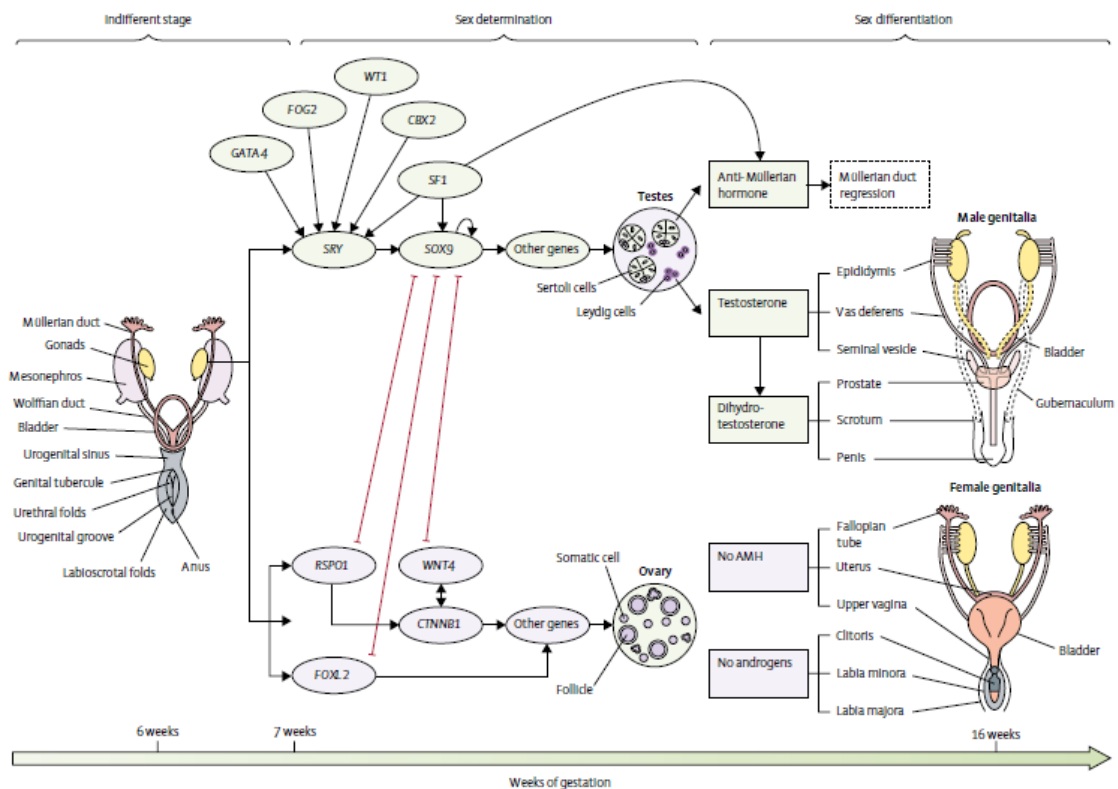


Figura 2: differenziazione ovarica e testicolare

2. DEFINIZIONE DSD E PREVALENZA

Le differenze di sviluppo sessuale (DSD; note anche come disturbi dello sviluppo sessuale) comprendono un ampio gruppo di condizioni congenite del tratto urogenitale e del sistema riproduttivo, che influenzano la determinazione e/o la differenziazione del sesso umano. La nomenclatura rimane controversa.

L'attuale classificazione medica è in gran parte basata sullo stato genetico del paziente. Queste condizioni possono essere associate a variazioni nei geni, nella programmazione dello sviluppo e negli ormoni. Gli individui affetti possono essere riconosciuti alla nascita a causa dell'ambiguità dei genitali esterni. Altri possono presentarsi in seguito con virilizzazione postnatale, pubertà ritardata/assente o infertilità. La frequenza stimata dell'ambiguità genitale è riportata nell'intervallo 1:2000-1:4500 (12). Secondo il registro centrale citogenetico danese, la prevalenza di femmine XY è 6,4 per 100.000 femmine nate vive. In questo registro, la prevalenza dell'insensibilità agli androgeni era di 4,1 per 100.000 nati vivi con un'età mediana alla diagnosi di 7,5 anni. La prevalenza della disgenesia gonadica XY era di 1,5 per 100.000 femmine nate vive con un'età mediana alla diagnosi di 17 anni (13). L'incidenza del DSD varia tra i gruppi etnici con la più alta incidenza nella popolazione dell'Africa meridionale.

3. CLASSIFICAZIONE DSD

I DSD sono classificati in diverse categorie.

La categoria di 46, XX DSD comprende donne virilizzate come ragazze con iperplasia surrenalica congenita virilizzante e ragazze con sviluppo ovarico aberrante.

La categoria di 46 pazienti con DSD XY comprende pazienti con differenziazione testicolare anormale, difetti nella biosintesi del testosterone e azione alterata del testosterone.

I DSD dei cromosomi sessuali includono la sindrome di Turner, la sindrome di Klinefelter e la disgenesia gonadica 45,X/46,XY. In generale, i pazienti con sindrome di Turner e sindrome di Klinefelter non presentano ambiguità genitale.

3.1 SEX CHROMOSOME DSD

L'aneuploidia dei cromosomi sessuali è una causa relativamente comune di sviluppo sessuale disordinato. L'aneuploidia del cromosoma sessuale puro probabilmente deriva dalla non disgiunzione meiotica dei cromosomi sessuali durante la gametogenesi. L'aneuploidia del cromosoma sessuale a mosaico deriva da errori mitotici dopo il concepimento. (14)

3.1.1 Sindrome di Turner (45,X0 o 45,X0/46,XY)

La sindrome di Turner è classicamente definita da un cariotipo 45,XO, risultante dalla non disgiunzione del cromosoma X durante la meiosi in un ovocita o spermatozooto. Si verifica anche la sindrome di Mosaic Turner con cromosomi 45,XO/46,XX o 45,XO/46,XY e altre varianti X. La sindrome di Turner è caratterizzata da bassa statura e insufficienza ovarica prematura nella maggior parte delle persone (15).

3.1.2 Sindrome di Klinefelter (47,XXY)

La sindrome di Klinefelter si verifica quando sono presenti cromosomi X aggiuntivi in un individuo XY. Il cariotipo classico per la sindrome di Klinefelter è XXY, sebbene siano stati riportati XXXY e XXXXY. Le stime suggeriscono che un maschio su 650 ha la sindrome di Klinefelter, ma solo circa la metà viene diagnosticata (16).

Gli individui affetti hanno una statura alta e proporzioni corporee eunucoide con braccia e gambe lunghe. La statura alta è presumibilmente dovuta a copie aggiuntive del gene SHOX nella regione del cromosoma X (17).

Gli uomini con la sindrome di Klinefelter hanno un ipogonadismo ipergonadotropo a causa di insufficienza testicolare. Le gonadi sono piccole e solide e la lunghezza del fallo è corta. La sindrome di Klinefelter è la causa più comune di infertilità maschile (16).

3.2 46 XX (DSD)

3.2.1 Disturbo dello sviluppo gonadico

3.2.1.1 Disgenesia gonadica

Le mutazioni della perdita di funzione nei geni che codificano per i fattori ovarici sono associate alla disgenesia ovarica e/o alla perdita accelerata dei follicoli primordiali con conseguente insufficienza ovarica prematura. Dopo la nascita, WNT4 viene rilevato negli ovociti e nelle cellule della granulosa (18).

La sindrome SERKAL è caratterizzata da un'inversione del sesso da femmina a maschio associata a disgenesia renale, surrenale e polmonare; questo disturbo è associato a una mutazione missenso recessiva omozigote in WNT4 (19).

Le mutazioni in FOXL2 sono associate alla sindrome blefarofimosi-ptosi epicanthis inversus che può essere associata a insufficienza ovarica prematura (BPES I). L'espressione continua di FOXL2 nell'ovaio è essenziale per mantenere un fenotipo ovarico (20).

Altri geni associati alla disgenesi ovarica e all'insufficienza ovarica prematura includono LHX8, MCM8, MCM9, NOBOX e FSHR (21, 22,23) .

3.2.1.2 DSD ovotesticolare

L' OT-DSD è caratterizzato dalla presenza di tessuto sia testicolare che ovarico in una paziente, nella stessa gonade o meno comunemente in diverse gonadi. Questo di solito è stabilito da una biopsia gonadica. È interessante notare che le porzioni ovariche degli ovotesti spesso appaiono normali con crescita follicolare e produzione di oestradiolo; circa il 50% degli ovotesti mostra evidenza di ovulazione. La presenza di oestradiolo di solito inibisce lo sviluppo degli spermatogoni e l'iperplasia delle cellule di Leydig è spesso vista quando la porzione testicolare regredisce con il tempo. Vari tipi di costituzione cromosomica sono alla base di OT DSD; Il 10% di questi casi ha un cariotipo 46,XY, il 25% ha un mosaicismo dei cromosomi sessuali e il restante 65% ha un cariotipo 46,XX (24).

3.2.1.3 DSD testicolare

46,XX T-DSD colpisce tra 1 su 20.000 25.000 maschi neonati (25).

È clinicamente caratterizzato da cariotipo 46,XX, genitali esterni maschili (che vanno da normali a ambigui), due testicoli e un'assenza di strutture mulleriane (8).

Circa il 15% di questi individui viene diagnosticato alla nascita con genitali ambigui, mentre l'85% si presenterà con piccoli testicoli, ginecomastia e azoospermia dopo la pubertà (8).

Di tutti i 46,XX casi di T-DSD, il 10-15% si presenterà con ipospadia di gravità variabile a causa di virilizzazione incompleta (26).

Inoltre, i maschi 46,XX sono spesso sterili a causa dell'assenza di fattori di azoospermia legati al cromosoma Y.

La maggior parte dei 46,XX casi di T-DSD sono causati da un guadagno di funzione nei geni chiave del percorso testicolare. Circa il 90% dei casi è causato da una traslocazione del gene SRY sul cromosoma X (27, 28, 29), sufficiente a guidare la differenziazione del testicolo nelle gonadi XX.

3.2.2 Eccesso di androgeni

La CAH è un gruppo di malattie autosomiche recessive che provocano difetti in una delle proteine o enzimi coinvolti nella biosintesi del cortisolo: proteina regolatoria acuta steroidogenica (StAR), P450 enzima di scissione della catena laterale del colesterolo (P450scc), P450 17idrossilasi/17,20-liasi (P450c17), P450 ossidoreduttasi (POR), 3b-idrossisteroide deidrogenasi tipo 2 (3bHSD2), P450 21-idrossilasi (21OH o P450c21) o 11b-idrossilasi (11bOH).

Le varie forme di CAH portano a diversi squilibri ormonali. La produzione di glucocorticoidi, mineralcorticoidi e steroidi sessuali potrebbe essere compromessa o, in alcuni casi, normale. La maggior parte delle forme di CAH può essere suddivisa in classica (o grave), che si manifesta alla nascita, e non classica, diagnosticata più tardi nella vita a causa di lieve iperandrogenismo che porta alla crescita e all'accelerazione dell'età ossea, pubarca precoce e aumento delle dimensioni del pene o del clitoride nell'infanzia (30, 31).

Il DSD viene presentato come conseguenza dell'eccesso di androgeni nei pazienti 46,XX.

I difetti steroidogenici surrenali che portano a 46,XX DSD sono il deficit di 21-idrossilasi (21OHD), di gran lunga la causa più prevalente, e il deficit di 11beta -idrossilasi (11bOHD)

3.2.2.1 Androgeni esogeni

L'iperandrogenismo materno durante la gestazione può essere dovuto al luteoma della gravidanza, ai tumori che secernono androgeni e all'esposizione agli androgeni esogeni (32).

3.3 XY, DSD

3.3.1 Disturbo dello sviluppo gonadico

3.3.1.1 Disgenesia gonadica

Questa categoria include pazienti con differenziazione testicolare anormale, difetti nella biosintesi del testosterone e alterata azione del testosterone. Il fenotipo può essere limitato alla differenziazione testicolare aberrante o può includere altre anomalie. Le mutazioni con perdita di funzione SOX9 sono tipicamente associate a disgenesia gonadica e displasia campomelica.

Le mutazioni in GATA4 possono anche essere associate a cardiopatie congenite oltre ad anomalie testicolari. I pazienti con Smith-Lemli Opitz associate a mutazioni della 7-deidrocolesterolo reductasi (DHCR7) manifestano tipicamente caratteristiche facciali e sindattilia del secondo e terzo dito.

Sono stati descritti diversi fenotipi per i pazienti con mutazioni WT1, comprese le sindromi Denys Drash, Frasier, Meacham e WAGR.

Altri geni associati alla disgenesia gonadica XY includono CBX2, DHH, DMRT1, DMRT2, MAP3K1 e SOX8 [26]. Negli individui XY, le mutazioni di MAP3K1 sembrano spostare le vie di segnalazione per sopprimere SOX9 e promuovere la differenziazione ovarica (33).

3.3.2 Disturbo nella sintesi/azione degli androgeni

3.3.2.1 Deficit di 5-alfa reduttasi

Il deficit di 5-alfa reduttasi deriva da mutazioni nel gene SRD5A2 (5-a reduttasi isoenzima 2). Il fenotipo del deficit di 5-a reduttasi dipende dal grado di funzione enzimatica. La carenza completa fa apparire i genitali esterni femminili. L'utero e il terzo superiore della vagina sono assenti a causa della produzione intatta di AMH da parte delle cellule del sertoli. Possono essere presenti clitoromegalia o ambiguità genitale. La virilizzazione si verifica durante la pubertà a causa della produzione di DHT da parte di SRD5A1 (isoenzima 1 della 5-a reduttasi) nei tessuti periferici (15).

3.3.2.2 Deficit di StAR

Il deficit di StAR causa una grave compromissione della steroidogenesi nelle ghiandole surrenali e nelle gonadi, che porta a concentrazioni minime di tutti gli steroidi. L'insufficienza surrenalica porta a ritardo della crescita, perdita di sale a causa della carenza di aldosterone, ipoglicemia a causa della carenza di cortisolo e conseguente aumento dell'ACTH e dell'attività della renina plasmatica (34). L'insufficienza testicolare è

limitata alla disfunzione delle cellule di Leydig, con ipoandrogenismo che porta a virilizzazione difettosa dei dotti di Wolff, del seno urogenitale e dei genitali esterni.

Al contrario, poiché l'AMH è normalmente prodotto dalle cellule del Sertoli all'inizio della vita fetale, non c'è utero o tube di Falloppio (35).

3.3.2.3 Carenza di 17-β HSD

La carenza di 17-beta HSD 3 è una causa rara di 46,XY DSD. 17-beta HSD converte l'androstenedione in testosterone nel testicolo. Questo enzima è assente dalla ghiandola surrenale, che non produce testosterone direttamente. Senza testosterone e DHT, i genitali esterni sono virilizzati in modo incompleto. Le cellule del Sertoli producono normalmente AMH, quindi l'utero e il terzo superiore della vagina regrediscono. Le gonadi possono scendere nel canale inguinale o nelle pieghe labioscrotali. Il fenotipo varia in base all'attività enzimatica dai genitali esterni maschili sottovirilizzati a completamente femminili (36).

3.3.2.4 Deficit di 17 alfa- idrossilasi/17,20 liasi

Il deficit di 17 alfa-idrossilasi/17, 20-liasi è una rara causa autosomica recessiva di 46XY DSD. Si traduce in una sovrapproduzione di mineralcorticoidi con carenza di glucocorticoidi e androgeni. Anche la sintesi degli androgeni testicolari è compromessa, con conseguente sottovirilizzazione del feto maschio. Le strutture interne sono normali a causa della produzione intatta di AMH delle cellule del sertoli (15).

3.3.3 SINDROME DA INSENSIBILITÀ AGLI ANDROGENI

Le mutazioni del gene del recettore degli androgeni (AR), che è codificato sul cromosoma X, possono risultare in 46,XY DSD con uno spettro di presentazioni cliniche (37).

3.3.3.1 CAIS

Nella sindrome da insensibilità agli androgeni completa (CAIS), la virilizzazione dei genitali esterni, la maturazione dei dotti di Wolff e la crescita sessuale dei peli sono tutti completamente assenti. Senza l'azione del DHT, i genitali esterni appaiono femminili. Poiché la produzione di AMH è intatta, l'utero, le tube di Falloppio e la cervice non si formano. Le strutture di Wolff sono piccole. Le gonadi possono essere in posizione inguinale, portando al riconoscimento nei periodi neonatali o infantili. Se mancato alla nascita, il CAIS si presenta spesso alla pubertà con amenorrea primaria. Lo sviluppo del seno avviene durante la pubertà, a causa dell'aromatizzazione del testosterone in estrogeni. I capelli sessuali sono radi, poiché dipendono dai recettori degli androgeni. Nei casi in cui l'insensibilità agli androgeni è completa (CAIS), è possibile identificare una mutazione nel gene AR nel 65-95% dei casi (38, 39, 40).

3.3.3.2 PAIS

Nella sindrome da insensibilità parziale agli androgeni (PAIS), l'aspetto genitale esterno mostra vari gradi di ambiguità, in base al grado di insensibilità agli androgeni. I maschi 46,XY non mostrano strutture mullerane a causa della normale risposta AMH. L'ipospadia penoscrotale con testicoli inguinali è una possibile presentazione. La ginecomastia può verificarsi al momento della pubertà e l'infertilità è comune (41). In PAIS (dove i genitali sono sottovirilizzati e ambigui), una mutazione in AR si trova in <50% dei casi. (39; 42; 40).

DSD - Classification

Sex chromosome DSD	46,XY DSD	46,XX DSD
47,XXY (Klinefelter syndrome and variants)	A: Disorders of gonadal (testicular) development 1. Complete or partial gonadal dysgenesis (e.g. SRY, SOX9, SF1, WT1, DHH etc) 2. Ovotesticular DSD 3. Testis regression B: Disorders in androgen synthesis or action 1. Disorders of androgen synthesis LH receptor mutations Smith-Lemli-Opitz syndrome Steroidogenic acute regulatory protein mutations Cholesterol side-chain cleavage (CYP11A1) 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (HSD3B2) 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (CYP17) P450 oxidoreductase (POR) 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B3) 5 α -reductase 2 (SRD5A2) 2. Disorders of androgen action Androgen Insensitivity Syndrome Drugs and environmental modulators	A: Disorders of gonadal (ovarian) development 1. Gonadal dysgenesis 2. Ovotesticular DSD 3. Testicular DSD (e.g. SRYp, dup SOX9, RSP01) B: Androgen excess 1. Fetal 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 2 (HSD3B2) 21-hydroxylase (CYP21A2) P450 oxidoreductase (POR) 11 β -hydroxylase (CYP11B1) Glucocorticoid receptor mutations 2. Fetoplacental Aromatase (CYP19) deficiency Oxidoreductase (POR) deficiency 3. Maternal Maternal virilizing tumours (e.g. luteomas) Androgenic drugs
45,X (Turner syndrome and variants)		
45,X/46,XY (mixed gonadal dysgenesis)		
46,XX/46,XY (chimerism)		

Hughes IA et al., Arch Dis Child 2005

Tabella 1: classificazione DSD

4. MANAGEMENT DSD E FOLLOW UP

Un neonato su 4500 nasce con anomalie dei genitali esterni (43).

Il rilevamento delle anomalie è spesso immediato e mette in moto una cascata di eventi che inizia con la valutazione diagnostica ed il chiarimento dello stato intersessuale del figlio ai genitori.

Tali episodi sono spesso percepiti come stressanti per le famiglie coinvolte e l'onere di ridurre il disagio ricade sul team di gestione multidisciplinare.

Vantaggi nel protocollo di trattamento nelle decadi recenti, come nel caso dell'iperplasia surrenalica congenita (44), hanno portato a risultati migliori per i pazienti;

l'insoddisfazione, però, è rimasta per la gestione del caso, comprese le domande relative alle decisioni di assegnazione di genere, necessità e tempistica degli interventi chirurgici nonché questioni relative alla divulgazione/consenso.

Ulteriore malcontento è stato espresso rispetto a ciò che molti considerano la nomenclatura insensibile e antiquata.

La European Society for Pediatric Endocrinology (ESPE) e la Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society (LWPES) hanno organizzato congiuntamente un incontro per affrontare i problemi generali di gestione. Il risultato è stato il Chicago Consensus sulla gestione dei disturbi intersessuali, ed è stato pubblicato come linee guida che abbracciano la gestione dalla nascita all'età adulta.

I progressi nell'identificazione delle cause genetiche molecolari del sesso anormale con una maggiore consapevolezza delle questioni etiche e delle preoccupazioni di difesa dei pazienti richiedono un riesame della nomenclatura.¹ Termini come intersessualità, pseudoermafroditismo, ermafroditismo, inversione del sesso ed etichette diagnostiche basate sul genere sono particolarmente controversi.

Questi termini sono percepiti come potenzialmente peggiorativi dai pazienti, e possono essere fonte di confusione sia per i medici che per i genitori.

Viene proposto il termine "disturbi dello sviluppo sessuale" (DSD), come definito da condizioni congenite in cui lo sviluppo del sesso cromosomico, gonadico o anatomico è atipico.

La nomenclatura ideale dovrebbe essere sufficientemente flessibile da incorporare nuove informazioni ma sufficientemente solida da mantenere un quadro coerente.

I termini dovrebbero essere descrittivi e riflettere l'eziologia genetica, quando disponibile, e adattarsi allo spettro della variazione fenotipica. Clinici e scienziati devono apprezzarne l'uso e deve essere comprensibile per i pazienti e le loro famiglie.

La valutazione e la gestione a lungo termine richiede la coordinazione di un team multidisciplinare che generalmente si trova nei centri di terzo livello (45) devono essere svolte al centro con un team multidisciplinare esperto.

Il management clinico ottimale degli individui con DSD (46) dovrebbe comprendere i seguenti punti:

- l'assegnamento di genere deve essere omesso prima della valutazione dell'esperto nei neonati;

- la valutazione e il follow up devono essere eseguiti in un centro con un team multidisciplinare con esperienza;
- tutti gli individui devono ricevere un assegnamento di genere;
- Solo i chirurghi con esperienza nella cura dei bambini e una formazione specifica nella chirurgia del DSD dovrebbero intraprendere procedure chirurgiche;
- In caso di donne virilizzate, l'intervento chirurgico dovrebbe essere preso in considerazione solo in caso di grave virilizzazione e deve essere effettuato in associazione, quando appropriato, con la riparazione del seno urogenitale comune;
- L'enfasi dell'intervento chirurgico in tutti i casi dovrebbe essere sull'esito funzionale piuttosto che strettamente sull'aspetto estetico;
- L'assistenza psicosociale fornita dal personale di salute mentale con esperienza in DSD dovrebbe essere parte integrante della gestione per promuovere un adattamento positivo per il paziente;
- aperta comunicazione con pazienti e famigliari è essenziale e la partecipazione nel processo decisionale è incoraggiato;
- le preoccupazioni di pazienti e famigliari dovrebbero essere rispettate e affrontate con la massima riservatezza. (clinical guidelines 2006)

Idealmente, il team include pediatri subspecializzati in endocrinologia, chirurgia o urologia o entrambi, psichiatri/psicologi, ginecologi, genetisti, neonatologi, e, se disponibili, assistenti sociali ed infermieri (45).

La composizione del gruppo varierà in base alla tipologia di DSD, alle risorse locali, al contesto evolutivo, e di locazione.

La comunicazione e l'aggiornamento del medico curante della famiglia sono aspetti essenziali.

Per i nuovi pazienti con DSD, il team dovrebbe progettare un piano per il management clinico rispettando la diagnosi, l'assegnamento di genere, e opzioni di trattamento prima di formulare qualsiasi raccomandazione (37).

Cure transizionali dovrebbero essere organizzate con un team multidisciplinare che opera in un ambiente che comprende specialisti con esperienza nella pratica adulta e pediatrica (47).

Storia prenatale e familiare, esame fisico generale con attenzione alle caratteristiche dismorfiche associate, e una valutazione dell'anatomia dei genitali rispetto alle norme pubblicate.

La conoscenza dei DSD si è notevolmente evoluta nell'ultimo decennio grazie alla ricerca all'avanguardia sullo sviluppo sessuale dei mammiferi e sui meccanismi genetici alla base dei DSD2–4. Parallelamente a questa ricerca, sono stati condotti diversi studi sugli esiti clinici; tuttavia, i risultati di questi studi sono inconcludenti a causa di campioni piccoli ed eterogenei, metodologia variabile e inclusione di trattamenti e tecniche chirurgiche a volte obsolete.

La mancanza di dati conclusivi sugli esiti per i pazienti con DSD ha innescato una ricerca collaborativa su larga scala che inizialmente si è concentrata su progetti scientifici di base (come il progetto EuroDSD) e dal 2012 ha iniziato ad affrontare questioni e risultati clinicamente orientati (ad esempio, dsd-LIFE).

Questi studi di orientamento clinico hanno fornito nuove informazioni sulle tendenze storiche (48), le comorbidità (49) e gli esiti di condizioni specifiche (50).

Lo sviluppo di registri internazionali, come l'I-DSD Registry, l'I-CAH Registry e il DSD Translational Research Network (51, 52), è stato fondamentale nello sviluppo di progetti di ricerca collaborativa. Ora che i registri sono stati istituiti, tuttavia, le sfide emergenti includono la creazione di modalità per consentire ai pazienti di accedere ai propri dati personali e lo sviluppo di metodi per la protezione ottimale della privacy.

In risposta alla dichiarazione di consenso del 2006, la DSD-Translational Research Network (DSD TRN), un istituto nordamericano, affronta la variabilità all'interno e tra gli aspetti sanitari medici, chirurgici e comportamentali dell'assistenza.

Il DSD-TRN è dedicato alla standardizzazione dei protocolli diagnostici e terapeutici al fine di migliorare la scoperta clinica e scientifica, nonché i risultati della qualità della vita per i pazienti e le loro famiglie.

Questo problema affronta la complessità dell'interpretazione delle varianti genetiche alla luce dei fenotipi variabili, affronta dilemmi etici imprevisti che una diagnosi potrebbe produrre, procede alla discussione dell'erogazione di servizi clinici, comprese le cure interdisciplinari e le sfide nell'istruzione, nonché i vantaggi dell'inclusione di un

ginecologo sul team clinico e si conclude con la complessa questione della valutazione della predisposizione al tumore delle gonadi e delle sue conseguenze sulla gestione (53).

5. ASPETTI CLINICI

I criteri che suggeriscono DSD includono:

- 1) palese ambiguità genitale (ad esempio, estrofia cloacale)
- 2) genitali apparentemente femminili con clitoride allargato, fusione labiale posteriore o una massa inguinale/labiale
- 3) genitali maschili apparenti con testicoli ritenuti bilaterali, micropene, ipospadia perineale isolata o ipospadia lieve con testicoli ritenuti
- 4) storia familiare di DSD come CAIS;
- 5) una discordanza tra aspetto dei genitali e cariotipo prenatale

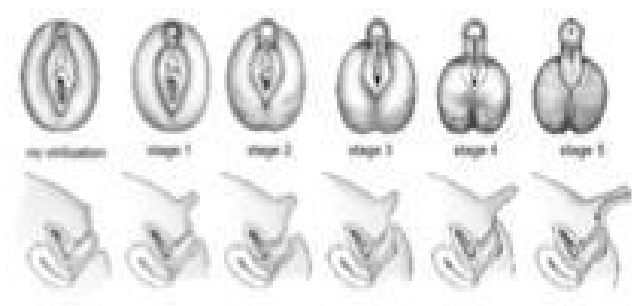


Figura 3: scala di Prader per determinare l'ambiguità genitale

Molte cause di DSD sono riconosciute nel periodo neonatale; bambini e giovani adulti presentano: ambiguità genitale precedentemente non riconosciuta; ernia inguinale in una ragazza; pubertà ritardata o incompleta; virilizzazione in una ragazza; amenorrea primaria; sviluppo del seno in un ragazzo; ed ematuria grossolana e occasionalmente ciclica in un ragazzo (12).

6. SCOPO DELLO STUDIO

I DSD, che si stima siano presenti nell'1,7% dei nati vivi (54), rappresentano una sfida diagnostica a causa dell'espressività e della pleiotrofia variabili, della sovrapposizione clinica dei diversi DSD e della loro significativa eterogeneità eziologica. Storicamente una diagnosi genetica è stata fatta solo nel 13% dei casi (55).

La resa dei test genetici single gene è, quindi, molto bassa e il sequenziamento di un singolo gene risulta dispendioso in termini di tempo se non si hanno evidenze cliniche che suggeriscano il gene da testare (56).

I miglioramenti nella tecnologia di sequenziamento genico in combinazione con la rapida diminuzione dei costi hanno portato all'uso di saggi di sequenziamento di nuova generazione (NGS) mirati. Questi consentono di sequenziare più geni noti che causano malattie in parallelo insieme alla valutazione clinica iniziale e alle indagini biochimiche, evitando potenzialmente la necessità di ulteriori e costose indagini biochimiche e radiologiche. (57).

Un approccio alternativo, riportato in un recente studio di Eggers e colleghi, consiste nell'utilizzare pannelli mirati di geni noti (e candidati) per un sequenziamento ad alto throughput (58).

Lo scopo di questo studio è dimostrare il miglioramento apportato dall'NGS multigene panel rispetto al single gene sequencing.

L'NGS mirato, infatti, disponendo di un'elevata produttività e un costo inferiore può individuare le regioni correlate alla malattia nel genoma in modo più efficiente e rilevare le varianti in modo più sensibile.

Questa tecnologia è stata ampiamente utilizzata nello screening delle varianti e nella diagnosi efficace dei DSD in ambito clinico (59) dimostrandosi una tecnica promettente

per migliorare il tasso di rilevamento del DSD, che aiuterebbe i medici nella diagnosi differenziale, nella consulenza genetica e nel trattamento tempestivo degli individui affetti. I dati presenti in letteratura mostrano il riconoscimento eziologico del disturbo non solo in pazienti con gravi difetti genitali ma garantiscono la rilevanza dell'esplorazione genetica anche nei fenotipi lievi. Per avvalorare la tesi si è ricorso al case report riportato di seguito.

7. MATERIALI E METODI

7.1 RECLUTAMENTO

Da settembre 2021 a settembre 2022 sono stati inviati al centro CAST 10 pazienti per consulenza genetica con sospetto DSD.

Tra questi, un bambino di 5 anni è stato inviato dal Centro Regionale di Diabetologia ed Endocrinologia Pediatrica di Chieti al laboratorio Center for Advanced Studies and Technology (CAST) per una consulenza specialistica sul micropene.

Alla valutazione clinica, i genitali apparivano fenotipicamente maschili e i testicoli erano palpabili bilateralmente nello scroto ed un micropene di 3,5 cm.

7.2 SELEZIONE DEI GENI CANDIDATI E PANEL DESIGN

L'analisi NGS è stata effettuata con un pannello sviluppato nel laboratorio del Center for Advanced Studies and Technology (CAST) e realizzato con Ion Torrent AmpliSeq Designer tool (ThermoFisher, Applied Biosystem, CA).

I 50 geni candidati riportati nel pannello sono stati ricavati dalla letteratura scientifica disponibile su pubmed e da database di varianti cliniche come clinvar, OMIM, Franklin e HGMD.

	<i>Gene</i>	<i>OMIM</i>	<i>Refseq</i>		<i>Gene</i>	<i>OMIM</i>	<i>Refseq</i>
1	AKR1C2	600450	NM_001354.5	26	HSD17B4	601860	NM_000414.3
2	AKR1C4	600451	NM_001818.3	27	HSD3B2	613890	NM_000198.3
3	ANOS1	300836	NM_000216.3	28	INSL3	146738	NM_005543.4
4	AR	313700	NM_000044.3	29	LEP	164160	NM_000230.2
5	ATRX	300032	NM_000489.3	30	LHCGR	152790	NM_000233.3
6	AMHR2	600956	NM_020547.3	31	MAMLD1	300120	NM_005491.3
7	BMP15	300247	NM_005448.2	32	MAP3K1	600982	NM_005921.2
8	CHD7	608892	NM_017780.3	33	NR0B1	300473	NM_000475.4
9	DMRT1	601898	NM_004122.2	34	NR3C1	138040	NM_001018077.1
10	CYB5A	613218	NM_001914.3	35	NR5A1	184757	NM_004959.4
11	CYP11A1	118485	NM_000781.3	36	POR	124015	NM_000941.2
12	CYP11B1	610613	NM_000497.4	37	PROK2	607002	NM_00112128.1
13	CYP17A1	609300	NM_000102.4	38	PROKR2	607623	NM_144773.3
14	CYP19A1	107910	NM_000103.3	39	RXFP2	606655	NM_130806.3
15	DHH	605423	NM_021044	40	SOX9	608160	NM_000346.3
16	FGF8	600483	NM_006119.4	41	SRD5A2	607306	NM_000348.3
17	FGFR1	136350	NM_023110.2	42	WDR11	606417	NM_018117.11
18	FGFR2	176943	NM_000141.4	43	SRY	480000	NM_003140.3
19	FSHB	136530	NM_000510.2	44	WT1	607102	NM_024426.4
20	FSHR	136435	NM_000145.4	45	STAR	600612	NM_000349.2
21	GATA4	600576	NM_002052.3	46	TAC3	162330	NM_001178054.1
22	GNRH1	152760	NM_001083111	47	ZFPM2	603693	NM_012082.3
23	GNRHR	138850	NM_000406.2	48	PROP1	601538	NM_006261.4
24	HESX1	601802	NM_003865.2	49	RSPO1	609595	NM_001038633.3
25	HSD17B3	605573	NM_000197.1	50	DMRT2	602424	NM_021951.2

Tabella 3: pannello NGS contenenti 50 geni coinvolti nei DSD

7.3 ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA genomico è stato estratto da un tampone buccale attraverso estrazione automatica con l'estrattore Maxwell RSC (Promega Corp. – CodAS4500) usando il Kit di Purificazione di DNA con tampone buccale Maxwell RSC (Promega Corp. – CodAS1640), in accordo con il protocollo della ditta produttrice descritto nel manuale del kit.

Il processo di estrazione deve essere svolto nella zona apposita poiché priva di ampliconi di DNA (clear zone).

L'estrattore automatico può estrarre, in 40 minuti, più di 16 campioni simultaneamente con cartucce usa e getta pronte all'uso.

La purificazione richiede la separazione degli acidi nucleici attraverso l'uso di biglie magnetiche.

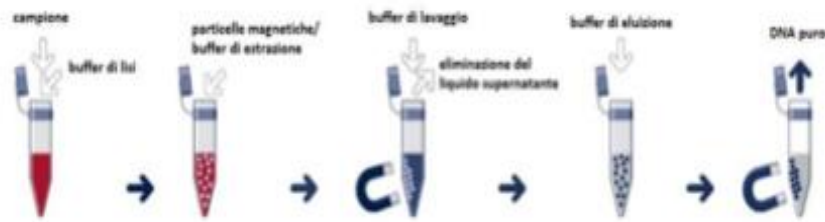


Figura 4: estrazione del DNA attraverso biglie magnetiche

Per il passaggio di lisi mescolare 300µl di Lysis Buffer + 30µl di Proteinase K (PK).
 Incubare il campione a 56°, a 900 rpm per 20 minuti.
 Porre il campione nelle cartucce di estrazione ed infine nell' estrattore.
 Il DNA estratto sarà poi rilasciato in 50 µL di buffer di eluizione.

7.4 QUANTIFICAZIONE DNA

I campioni di DNA sono stati quantificati con il fluorimetro Qubit 4 della Invitrogen usando il dsDNA HS assay kit (ThermoFisher, Applied Biosystem, CA, USA, Cod.Q33238).

Il Qubit è in grado di rilevare coloranti fluorescenti altamente specifici per una molecola bersaglio di interesse nei tuoi campioni.

I coloranti emettono fluorescenza solo quando sono legati ai loro target anche a basse concentrazioni rendendo le letture sono altamente sensibili.

Prima di effettuare la quantizzazione è necessario calibrare lo strumento leggendo i due standard contenuti nel kit Qubit dsDNA HS Assay.

Il kit prevede la preparazione di una miscela, per ogni standard, contenente: 199 µl di Buffer + 1 µl di fluorocromo.

Ora trasferire 190 µl di miscela in una provetta Qubit AssayTubes e aggiungere 10 µl di standard.

Per la lettura dei campioni è necessario preparare una miscela contenente 199 μ l di tampone + 1 μ l di fluorocromo. Per ogni campione, 198 μ l di miscela vengono aliquotati in ciascuna provetta, a cui vengono quindi aggiunti 2 μ l di DNA precedentemente estratto. Infine, i campioni possono essere letti utilizzando il fluorimetro: la concentrazione di acido nucleico espressa in ng/ μ l.

7.5 NEXT GENERATION SEQUENCING

7.5.1 Preparazione librerie

Il sistema Ion Chef (ThermoFisher, Applied Biosystem, CA, USA) è stato utilizzato per la preparazione della libreria e per il caricamento dei chip Ion 510, in accordo con il protocollo della ditta produttrice.

Per preparare la libreria si deve inizialmente frammentare la doppia elica di DNA in milioni di piccoli frammenti (lungi circa 150 pb).

Le estremità dei frammenti vengono rese sporgenti (blunt ends) per permettere la ligazione degli adattatori al 5' e al 3' di ogni frammento.

Successivamente si fa avvenire una reazione di amplificazione con una PCR multiplex per generare gli ampliconi.

Il passaggio successivo consiste nel digerire parzialmente le sequenze di primer per preparare le estremità degli ampliconi per gli adattatori necessari per la fase di sequenziamento.

Si aggiungono i barcode alla libreria consentendo l'esecuzione di più campioni contemporaneamente, aumentando così ulteriormente l'efficienza di NGS.

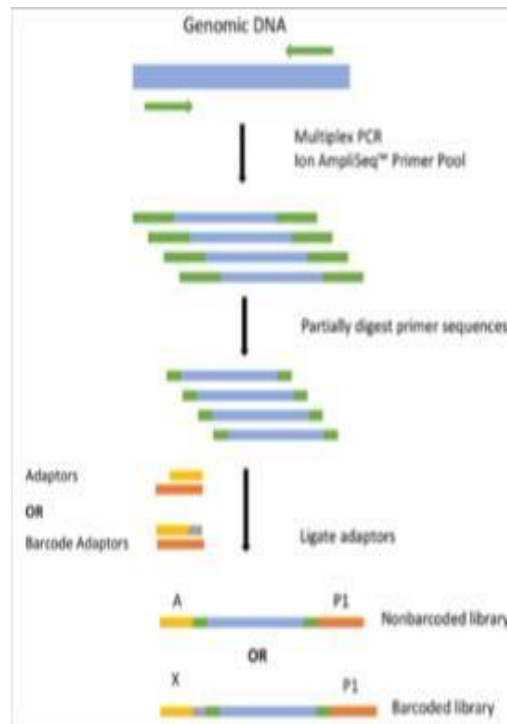


Figura 5: stadi di preparazione della libreria

Le regioni fiancheggianti dei 50 geni DSD sono state amplificate utilizzando un pannello Ion AmpliSeq personalizzato (ThermoFisher, Applied Biosystem, CA, USA).

Questo pannello è costituito da un pool di coppie di primer oligonucleotidici progettati per amplificare una regione genomica specifica utilizzando reagenti di libreria preconfezionati per un massimo di otto campioni in una singola corsa.

Per la reazione di amplificazione del DNA target il kit Ion AmpliSeq panel richiede:

5 µL di HiFi

5,5 µL di H₂O (UltraPure DNase/RNase Free)

2 µL DNA alla concentrazione ottimale di 10 ng/µl

Per ogni campione preparare una provetta con 5 µl di mix più 5 µl di pool1 e una provetta con 5 µl di mix più 5 µl di pool2.

Tutti gli ampliconi sono stati amplificati con gli stessi cicli di amplificazione, secondo le indicazioni standard del kit.

I campioni dei due pool vengono mescolati ed il volume finale deve ammontare a 20 μL . Aggiungere, infine, 2 μL di FuPa pipettando lentamente data la viscosità del reagente. Caricare sul termociclatore ed impostare sul ciclo FuPa (40 minuti circa).



Figura 6: protocollo ciclo FuPa

Finito il passaggio nel termociclatore con la FuPa, aggiungere 4 μL di switch solution, 2 μL di barcode diluiti e 2 μL di ligasi.

Caricare nel termociclatore con il programma ligation barcode per circa 40 minuti.



Figura 7: protocollo ciclo ligasi

7.5.2 Purificazione librerie

La purificazione avviene con 45 μL di beads elettromagnetiche che legano gli ampliconi seguiti da 2 Lavaggi con 150 μL di etanolo 70% di 2 minuti sul magnete lasciare le provette aperte 5 minuti a temperatura ambiente per far evaporare tutto l'etanolo.

Infine, aggiungere 50 μL di LOW TE per distaccare gli ampliconi dalle beads e prelevare 45 μL di surnatante e metterlo in nuove provette da 1,5 μL su cui scrivere nome, cognome e codice del paziente.

7.5.3 Quantificazione Librerie

Per la quantificazione delle librerie è stato utilizzato il sistema QuantStudio 5 Real-Time PCR.

Questo metodo si basa sul rilevamento di un segnale fluorescente.

Il protocollo prevede la formazione di tre standard costituiti da diluizioni seriali di E.Coli DH10B Control Library:

Standard 1: 3 μl di E. Coli + 27 μl di Nuclease free H₂O

Standard 2: 5 μl di Standard 1 + 45 μl di Nuclease free H₂O

Standard 3: 5 μl di Standard 2 + 45 μl di Nuclease free H₂O.

Il protocollo prevede la preparazione di una miscela di reazione per ogni campione, ogni controllo positivo e il bianco:

10 μl di "Ion Library TaqMan qPCR mix, 2X"

1 μl di "Ion Library TaqMan Quantification Test, 20X"

H₂O priva di nucleasi per raggiungere un volume totale di 15 μl .

11 ul di miscela e 9 ul di libreria (diluata 1:20) o controllo o bianco vengono aliquotati nella piastra a 96 pozzetti.

La reazione può essere visualizzata da un "plot di amplificazione", che viene generato una volta raggiunta la soglia di amplificazione.

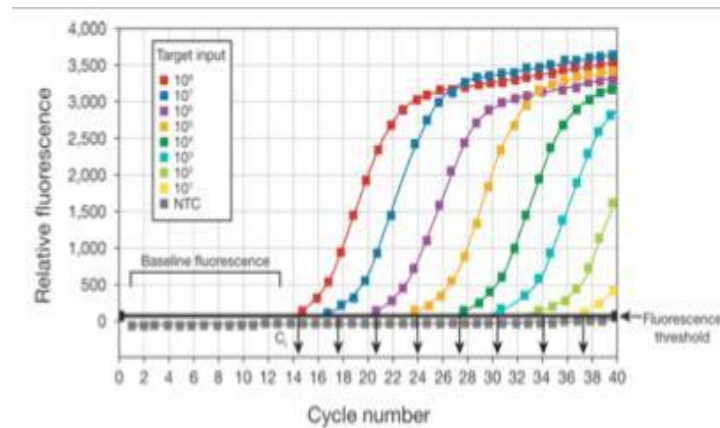


Figura 8: plot di amplificazione Real Time

7.5.4 Fase di sequenziamento (Ion Torrent)

L'NGS è stato allestito utilizzando un sistema Ion Torrent S5 (Thermo Fisher, Applied Biosystems; Foster City, CA, USA).

La tecnologia utilizzata sfrutta il principio per cui per ciascun nucleotide incorporato viene rilasciato un protone (H⁺) dal gruppo 3'-OH coinvolto nella formazione del legame fosfodiesterico.

La reazione di polimerizzazione avviene su un chip in grado di alloggiare milioni di biglie sulla cui superficie i frammenti di DNA hanno subito un processo di amplificazione clonale.

Durante la reazione di sequenziamento il sistema elettronico collegato al chip è in grado di rilevare variazioni di pH che sono proporzionali al numero di nucleotidi incorporati sequenzialmente.

La peculiarità di questa tecnologia sta nella maggiore semplicità, visto che non è richiesto un apparato ottico, normalmente più complesso e costoso, per la rilevazione del segnale. Questa piattaforma è in grado di generare fino a 60-80 milioni di letture di lunghezza fino a 600 nt.

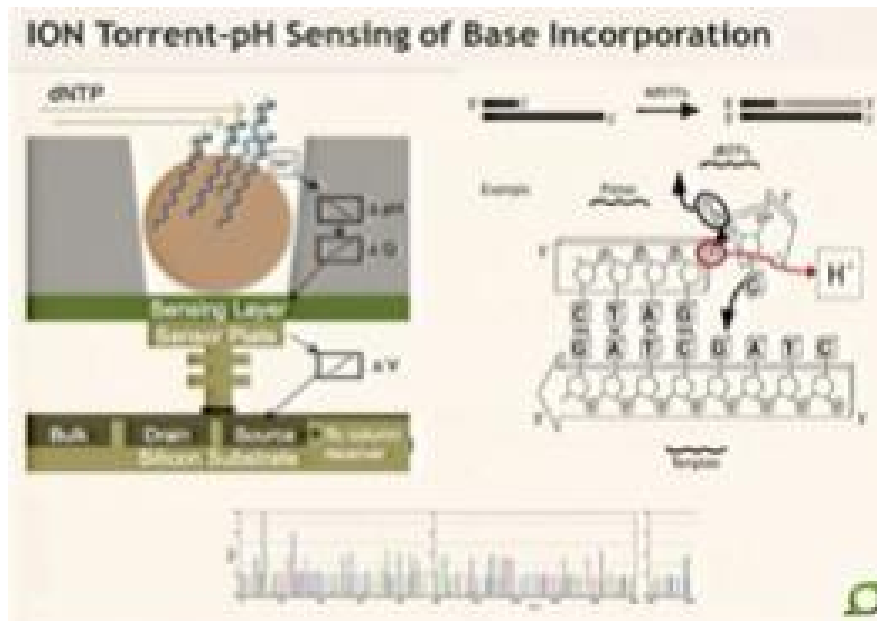


Figura 9: meccanismo di funzionamento ion torrent S5

7.5.5 data analisi

L'analisi dei dati NGS è stata eseguita utilizzando il software Ion Reporter 5.12 (Thermo Fisher; Foster City, CA, USA) che permette l'annotazione delle varianti.

Il software Ion Reporter indicherà per ogni variante identificata una serie di informazioni tra cui la posizione cromosomica, la copertura, il tipo di mutazione, la sua posizione sul DNA, ed infine i valori di predizione per gli effetti della mutazione e quindi la sua patogenicità o benignità.

La copertura si riferisce al numero di volte in cui una sequenza viene letta.

A livelli di copertura più elevati, ciascuna base è coperta da un numero maggiore di letture di sequenze allineate, quindi è possibile effettuare chiamate di base con un livello di certezza più elevato. In questo studio, è richiesta una copertura fissata a 100X. Ciò significa che ogni base viene letta 100 volte e quindi verranno generate almeno 100 letture per amplicone.

Inoltre, i valori vengono calcolati per valutare la qualità dell'identificazione di base come il Phred Score e il pValue.

L'uniformità della copertura di base è stata superiore al 98% in tutti i lotti e la copertura di base è stata superiore a 20 in tutte le regioni target.

7.6 CONFERMA SANGER

Il sequenziamento di Sanger è stato utilizzato per la conferma delle varianti geniche rilevate da NGS. Lo stesso sequenziamento di Sanger è stato eseguito per i genitori sani del bambino.

La mutazione nel gene CYP17A1 che è stata confermata dal sequenziamento di Sanger dell'esone 6 di questo gene.

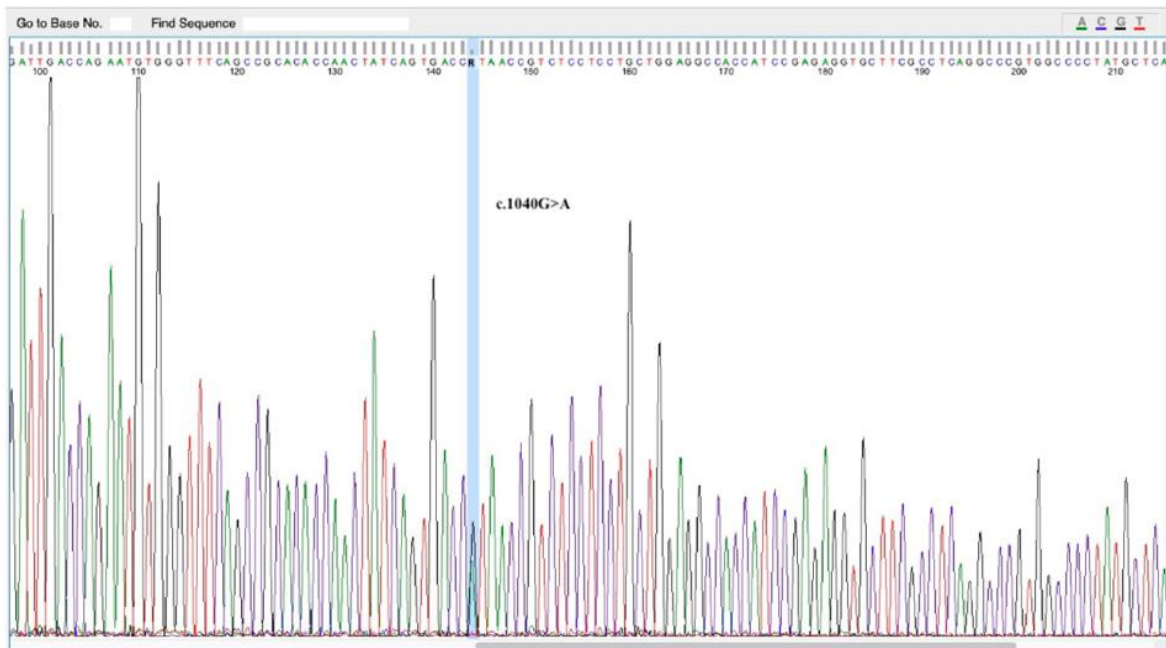


Figura 10: elettroforogramma del esone 6

8. RISULTATI

In questo studio (65), è stata rilevata una mutazione eterozigote c.1040G > A (p.Arg347His) nel gene CYP17A1 mediante analisi NGS. Questo gene si trova sul cromosoma 10q24.3 e produce un identico mRNA sia nelle ghiandole surrenali che nelle gonadi nei soggetti sani.

Nel presente case report, l'analisi di segregazione dei genitori del bambino ha rivelato la presenza della mutazione eterozigote solo nella madre, che non ha mai presentato alcun sintomo della malattia.

9. DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Sono state riscontrate VUS c.749A > G nel gene AKR1C4 e c926 G > A nel gene DHH in altri pazienti e, anche se, in letteratura è presente una correlazione tra i DSD e i suddetti geni, le mutazioni non hanno una validità clinica.

Il gene CYP17A1 codifica per l'enzima p450c17 che catalizza le attività degli steroidi 17 α -idrossilasi e 17,20-liasi (60). Il deficit di 17 α -idrossilasi/17, 20-liasi causato da una mutazione nel gene CYP17A1 è la forma meno comune di CAH, rappresentando meno dell'1% di tutti i casi (61). La figura rappresenta il percorso di biosintesi della steroidogenesi surrenale, con le attività dei due enzimi, 17-idrossilasi e 17,20-liasi, riportate in rosso.

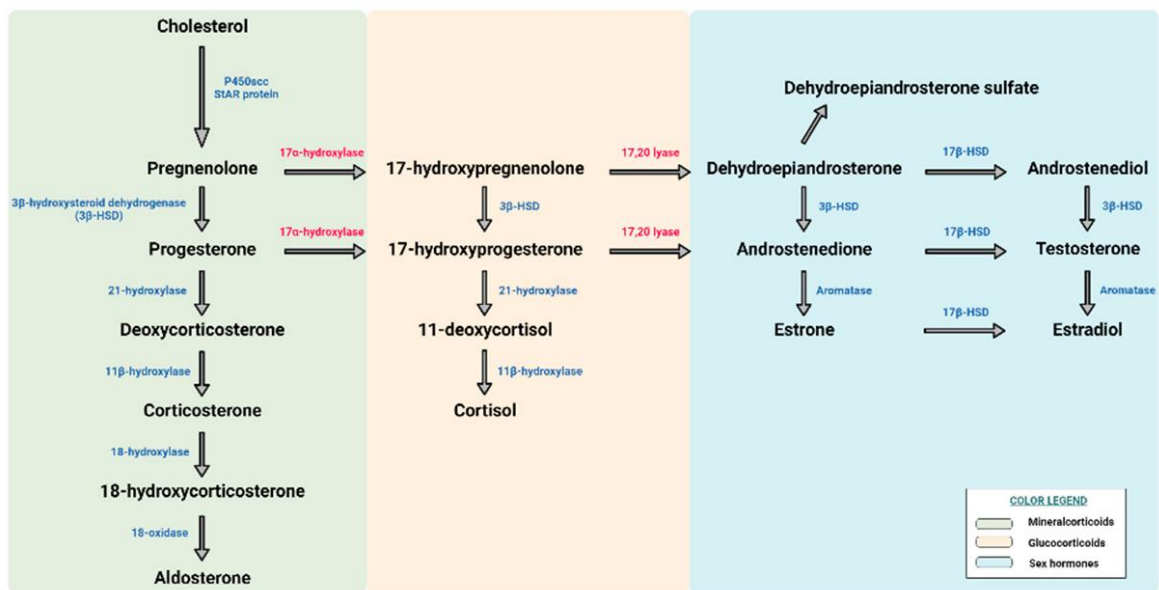


Figura 11: pathway steroidogenesi

Inoltre, una rappresentazione a nastro della struttura umana di CYP17A1 è mostrata nella Figura, con la posizione dei tre residui R347, R349 e R358 evidenziata con bastoncini. In particolare, tutti e tre i residui sono stati trovati mutati in pazienti affetti da CAH e le loro mutazioni interessano solo l'attività della liasi, prendendo parte alla superficie di interazione con il citocromo b5.

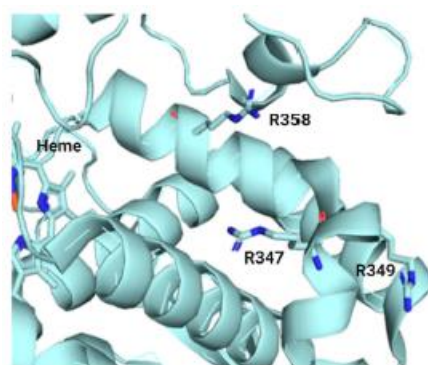


Figura 12: struttura parziale del CYP17A1 con focus sul sito della mutazione c.1040G > A (R347H)

CYP17A1 è il gateway esclusivo per la produzione di steroidi sessuali. Sono state segnalate circa 129 diverse varianti del gene CYP17A1, comprese varianti missenso, piccole inserzioni o delezioni e varianti del sito di giunzione per lo più associate alla

perdita completa delle attività sia della 17 α -idrossilasi che della 17,20-liasi; tuttavia, sono state riportate anche la perdita parziale di entrambe le attività enzimatiche e la perdita della sola attività dell'idrossilasi o della liasi (60).

La mutazione c.1040G > A (R347H) si trova sulla superficie dell'enzima e altera le interazioni del CYP17A1 con b5, spiegando così un deficit selettivo dell'attività della 17,20-liasi.

La mutazione del paziente descritto è stata precedentemente riportata in un individuo maschio affetto da ambiguità genitale, che, tuttavia, presentava una mutazione omozigote in questo sito, così come in altri pazienti con mutazioni eterozigoti composte del CYP17A1 (62, 63).

Nello studio di Van Den Akker, i pazienti 5 e 6, fratelli di genitori consanguinei, presentano genitali parzialmente virilizzati e la capacità di sintetizzare un po' di testosterone nel test hCG.

Tuttavia, i test in vitro non evidenziano l'attività della liasi.

La mutazione risiede sul dominio di interazione del partner redox, il quale contribuisce alla carica positiva della superficie prossimale di P450c17 ed è formato da residui chiave per l'interazione con proteine partner redox.

In Geller et al viene riportato che l'assenza di amminoacidi carichi altera selettivamente l'attività della 17,20 liasi senza sostanziali riduzioni dell'attività della di 17 α -idrossilasi o del legame del 17-idrossipregnenolone.

Le attività enzimatiche delle proteine mutate in vitro erano coerenti con i dati clinici e l'ipotesi che le mutazioni nel dominio di legame degli steroidi determinino un deficit combinato completo o parziale di 17 α -idrossilasi e 17,20-liasi, mentre le mutazioni nell'interazione del partner redox risultano del dominio in un deficit isolato di 17,20 liasi (63).

Nel case report, infatti, l'assenza di testosterone basale e dei suoi precursori, confermata dai test hCG e ACTH, associata ad una risposta del profilo dei glucocorticoidi e mineralcorticoidi al test di stimolo dell'ACTH ha portato a ipotizzare una riduzione dell'attività 17,20-liasica di p450c17 senza influire l'attività α -idrossilasica.

Sebbene la mutazione nel case report sia in eterozigosi, in quanto proveniente esclusivamente dalla controparte materna non è in contrasto con le evidenze riportate da Van Den Akker e Geller ovvero con la residua attività 17- α -idrossilasica.

Sono presenti, infatti, casi con diagnosi di deficit isolato di 17,20-liasi con presenza di micropene, una risposta normale degli steroidi 17 α idrossilati/ e steroidi 17,20 non scissi e nessuna risposta degli androgeni surrenali o gonadici agli stimoli.

Questi fenotipi mild possono essere diagnosticati come micropene idiopatico isolato senza tuttavia non riconoscere l'agente eziologico che sottende alla condizione.

Pertanto, la diagnosi eziologica di DSD è difficile da stabilire a causa della mancanza di standardizzazione della fenotipizzazione anatomica ed endocrina e della scarsa correlazione fenotipica del genotipo (64).

Attraverso il sequenziamento NGS, e i relativi pannelli utilizzati per un approccio multigenico, mirato ad individuare decine, se non centinaia, di geni responsabili di uno spettro esteso di malattie, come i DSD, è possibile ottenere una diagnosi accurata.

Risultati incoraggianti sono riportati nello studio di Dong et al del 2016 che attraverso il loro pannello personalizzato hanno ottenuto una diagnosi clinica precisa della malattia per DSD fenotipicamente o geneticamente eterogenei. Il loro approccio ha effettuato una chiara diagnosi genetica in otto pazienti (38,1%) e identificato VUS negli altri tre casi (14,3%).

Il target DSD gene panel ha garantito un tasso diagnostico ben più alto del single gene sequencing su diverse coorti di individui con DSD. Lo studio di Eggers et al del 2016, infatti, ha prodotto una diagnosi genetica per pazienti con DSD 46,XY nel 43 % dei casi.

Impiegare il target NGS in un'ampia e diversificata coorte di pazienti con DSD ha fornito una migliore comprensione dell'eziologia genetica alla base di questa condizione.

Uno studio pilota che utilizza un approccio NGS mirato per 35 geni DSD noti ha identificato le cause genetiche in due dei cinque pazienti con DSD non diagnosticati in precedenza (55).

In futuro, come indagini di prima linea, potrebbero essere utilizzati pannelli multigenici più ampi, approcci dell'intero esoma e persino dell'intero genoma, permettendo l'individuazione di varianti genetiche note o incognite.

L'aggiornamento dei software per l'analisi bioinformatica correlata all'arricchimento dei database delle varianti e ad una conoscenza più approfondita dei meccanismi molecolari alla base dei DSD può portare ad una maggiore certezza diagnostica riducendo così il numero delle VUS.

Nella maggior parte dei centri, tuttavia, questi approcci sono ancora limitati da costi e capacità.

BIBLIOGRAFIA

(1) Lucas-Herald AK, Bashamboo A. Gonadal development. *Endocr Dev.* 2014;27:1-16. doi: 10.1159/000363608. Epub 2014 Sep 11. PMID: 25247640.

(2) Eggers S, Ohnesorg T, Sinclair A. Genetic regulation of mammalian gonad development. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(11):673–83.

(3) Eggers S, Sinclair A. Mammalian sex determination-insights from humans and mice. *Chromosome Res.* 2012;20(1):215–38.

(4) Estermann MA, Major AT, Smith CA. Gonadal Sex Differentiation: Supporting Versus Steroidogenic Cell Lineage Specification in Mammals and Birds. *Front Cell Dev Biol.*

2020 Dec 18;8:616387. doi: 10.3389/fcell.2020.616387. PMID: 33392204; PMCID: PMC7775416.

(5) Rudigier LJ, Dame C, Scholz H, Kirschner KM. Ex vivo cultures combined with vivo-morpholino induced gene knockdown provide a system to assess the role of WT1 and GATA4 during gonad differentiation. *PLoS One*. 2017; 12:e0176296. [PubMed: 28426816]

(6) Lin YT, Capel B. Cell fate commitment during mammalian sex determination. *Curr Opin Genet Dev*. 2015; 32:144–52. [PubMed: 25841206]

(7) Kim Y, Bingham N, Sekido R, et al. Fibroblast growth factor receptor 2 regulates proliferation and Sertoli differentiation during male sex determination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:16558–63. [PubMed: 17940049]

(8) Grinspon RP, Rey RA. Disorders of Sex Development with Testicular Differentiation in SRY-Negative 46,XX Individuals: Clinical and Genetic Aspects. *Sex Dev*. 2016; 10:1–11. [PubMed: 27055195]

(9) Sekido R, Lovell-Badge R: Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. *Nature* 2008; 453: 930–934.].

(10) Georges A, Auguste A, Bessière L, et al. FOXL2: a central transcription factor of the ovary. *J Mol Endocrinol*. 2013; 52:R17–33. [PubMed: 24049064]

(11) Yao HH. The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 230:87–93. [PubMed: 15664455]

- (12) Hughes IA, Nihoul-Fékété C, Thomas B, et al. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2007; 21:351–65. [PubMed: 17875484]
- (13) Berglund A, Johannsen TH, Stochholm K, et al. Incidence, Prevalence, Diagnostic Delay, and Clinical Presentation of Female 46,XY Disorders of Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016; 101:4532–40. [PubMed: 27603905]
- (14) Kutney K, Konczal L, Kaminski B, Uli N. Challenges in the diagnosis and management of disorders of sex development. *Birth Defects Res C Embryo Today.* 2016 Dec;108(4):293-308. doi: 10.1002/bdrc.21147. PMID: 28033665
- (15) Vilain E, Sarafoglou K, Yehya N. Disorders of Sex Development. 2009. In: Seragoglou K, editor. *Pediatric endocrinology and inborn errors of metabolism.* New York: McGraw Hill Medical, pp. 527–555.
- (16) Davis SM, Rogol AD, Ross JL. Testis Development and Fertility Potential in Boys with Klinefelter Syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015 Dec;44(4):843-65. doi: 10.1016/j.ecl.2015.07.008. Epub 2015 Sep 28. PMID: 26568497; PMCID: PMC4648691.
- (17) Paduch DA, Bolyakov A, Cohen P, Travis A. Reproduction in men with Klinefelter syndrome: the past, the present, and the future. *Semin Reprod Med.* 2009 Mar;27(2):137-48. doi: 10.1055/s-0029-1202302. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19247915.
- (18) Ocal G, Berberoglu M, Siklar Z, Ruhi HI, Tukun A, Camtosun E, et al. The clinical and genetic heterogeneity of mixed gonadal dysgenesis: does ‘disorders of sexual development (DSD) ’ classification based on new Chicago consensus cover all sex chromosome DSD? *Eur J Pediatr* 2012;171:1497–502.

- (19) Mandel H, Shemer R, Borochowitz ZU, et al. SERKAL syndrome: an autosomal-recessive disorder caused by a loss-of-function mutation in WNT4. *Am J Hum Genet.* 2008; 82:39–47. [PubMed: 18179883]
- (20) Uhlenhaut NH, Jakob S, Anlag K, et al. Somatic sex reprogramming of adult ovaries to testes by FOXL2 ablation. *Cell.* 2009; 139:1130–42. [PubMed: 20005806]
- (21) Ren Y, Suzuki H, Jagarlamudi K, et al. Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biol.* 2015 Jun 16.13:39. [PubMed: 26076587]
- (22) Desai S, Wood-Trageser M, Matic J, et al. MCM8 and MCM9 Nucleotide Variants in Women with Primary Ovarian Insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017; 102:576–82. [PubMed: 27802094]
- (23) Katari S, Wood-Trageser MA, Jiang H, et al. A Novel Inactivating Mutation of the FSH Receptor in Two Siblings of Indian Origin with Premature Ovarian Failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015; 100:2154–7. [PubMed: 25875778]
- (24) Mekkawy MK, Kamel AK, Dessouky N, Elgharbawy M, Mazen I. Cytogenetic Spectrum of Ovotesticular Difference of Sex Development (OT DSD) among a Large Cohort of DSD Patients and Literature Review. *Sex Dev.* 2019;13(5-6):221-227. doi: 10.1159/000508153. Epub 2020 Jun 13. PMID: 32535607.
- (25) Alkhzouz C, Bucerzan S, Miclaus M, Mirea AM, Miclea D. 46,XX DSD: Developmental, Clinical and Genetic Aspects. *Diagnostics (Basel).* 2021 Jul 30;11(8):1379. doi: 10.3390/diagnostics11081379. PMID: 34441313; PMCID: PMC8392837.
- (26) Yiğman M, Tangal S, Haliloğlu AH, Çağlar GS. Erectile function in SRY positive 46,XX males with normal phenotype. *Cent European J Urol.* 2021;74(1):95-98. doi:

10.5173/ceju.2021.0284.R1. Epub 2021 Mar 11. PMID: 33976923; PMCID: PMC8097651.

(27) Margarit, E., Coll, M.D., Oliva, R., G´omez, D., Soler, A. and Ballesta, F. (2000) SRY gene transferred to the long arm of the X chromosome in a Y-positive XX true hermaphrodite. *Am. J. Med. Genet.* 90, 25–28 CrossRef PubMed

(28) Sharp, A., Kusz, K., Jaruzelska, J., Tapper, W., Szarras-Czapnik, M., Wolski, J. and Jacobs, P. (2005) Variability of sexual phenotype in 46,XX(SRY+) patients: the influence of spreading X inactivation versus position effects. *J. Med. Genet.* 42, 420–427 CrossRef PubMed

(29) McElreavey, K., Vilain, E., Abbas, N., Herskowitz, I. and Fellous, M. (1993) A regulatory cascade hypothesis for mammalian sex determination: SRY represses a negative regulator of male development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3368–3372 CrossRef PubMed

(30) Trapp CM, Speiser PW, Oberfield SE. Congenital adrenal hyperplasia: an update in children. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2011;18:166–70.

(31) Laue L, Rennert OM. Congenital adrenal hyperplasia. Molecular genetics and alternative approaches to treatment. *Adv Pediatrics* 1995;42:113–43.

(32) Witchel SF. Disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018 Apr;48:90-102. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2017.11.005. Epub 2017 Nov 22. PMID: 29503125; PMCID: PMC5866176.

(33) Loke J, Pearlman A, Radi O, et al. Mutations in MAP3K1 tilt the balance from SOX9/FGF9 to WNT/ β -catenin signaling. *Hum Mol Genet.* 2014; 23:1073–83. [PubMed: 24135036]

- (34) Podgórski R, Aebischer D, Stompor M, Podgórska D, Mazur A. Congenital adrenal hyperplasia: clinical symptoms and diagnostic methods. *Acta Biochim Pol.* 2018;65(1):25-33. doi: 10.18388/abp.2017_2343. Epub 2018 Mar 15. PMID: 29543924.
- (35) Miller WL. Disorders in the Initial Steps of Steroid Hormone Synthesis. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2017) 165:18–37. doi: 10.1016/j.jsbmb.2016.03.009
- (36) El-Maouche D, Hargreaves CJ, Sinaii N, Mallappa A, Veeraraghavan P, Merke DP. Longitudinal Assessment of Illnesses, Stress Dosing, and Illness Sequelae in Patients With Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* (2018) 103:2336–45. doi: 10.1210/jc.2018-00208
- (37) Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, Pasterski V, Mastroyannopoulou K, MacDougall J. Androgen insensitivity syndrome. *Lancet.* 2012 Oct 20;380(9851):1419-28. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60071-3. Epub 2012 Jun 13. PMID: 22698698.
- (38) Weidemann W, Linck B, Haupt H, et al. 1996. Clinical and biochemical investigations and molecular analysis of subjects with mutations in the androgen receptor gene. *Clin Endocrinol* 45: 733–739.
- (39) Gottlieb B, Beitel LK, Nadarajah A, et al. 2012. The androgen receptor gene mutations database: 2012 update. *Hum Mutation* 33:887–894.
- (40) Lek N, Miles H, Bunch T, et al. 2014. Low frequency of androgen receptor gene mutations in 46XY DSD and fetal growth restriction. *Arch Dis Child* 99:358–361.
- (41) Mendoza N, Motos MA. 2012. Androgen insensitivity syndrome. *Gynecol Endocrinol* 9:1–5.

- (42) Veiga-Junior NN, Medaets PA, Petroli RJ, et al. 2012. Clinical and Laboratorial Features that may differentiate 46,XY DSD due to Partial Androgen Insensitivity and 5 alpha reductase type 2 deficiency. *Int J Endocrinol* 2012:964876.
- (43) Achermann JC & Hughes IA. Disorders of sex development. In Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, et al. (eds.). *Williams textbook of endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 2007.
- (44) Clayton PE, Miller WL, Oberfield SE et al. Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society and the European Society for Pediatric Endocrinology. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 4048–4053.
- (45) Lee PA. A perspective on the approach to the intersex child born with genital ambiguity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2004;17:133–40.
- (46) Schweizer, K., Brunner, F., Gedrose, B., Handford, C. & Richter-Appelt, H. Coping with diverse sex development: treatment experiences and psychosocial support during childhood and adolescence and adult well-being. *J. Pediatr. Psychol.* 42, 504–519 (2017).
- (47) Gomez-Lobo V. Multidisciplinary care for individuals with disorders of sex development. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2014 Oct;26(5):366-71. doi: 10.1097/GCO.000000000000101. PMID: 25110979; PMCID: PMC4451936.
- (48) Kolesinska, Z. et al. Changes over time in sex assignment for disorders of sex development. *Pediatrics* 134, e710–e715 (2014).
- (49) Cox, K. et al. Novel associations in disorders of sex development: findings from the I-DSD Registry. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, E348–E355 (2014).

(50) Lucas-Herald, A. et al. The long-term outcome of boys with partial androgen insensitivity syndrome and a mutation in the androgen receptor gene. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 101, 3959–3967 (2016).

(51) Ahmed, S. F., Bryce, J. & Hiort, O. International networks for supporting research and clinical care in the field of disorders of sex development. *Endocr. Dev.* 27, 284–292 (2014).

(52) Adam, M. P. & Vilain, E. Emerging issues in disorders/ differences of sex development (DSD). *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.* 175, 249–252 (2017).

(53) Cools M, Nordenström A, Robeva R, Hall J, Westerveld P, Flück C, Köhler B, Berra M, Springer A, Schweizer K, Pasterski V; COST Action BM1303 working group 1. Caring for individuals with a difference of sex development (DSD): a Consensus Statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 Jul;14(7):415-429. doi: 10.1038/s41574-018-0010-8. PMID: 29769693; PMCID: PMC7136158.

(54) Blackless M, Charuvastra A, Derrtyck A, Fausto-Sterling A, Lauzanne K & Lee E. How sexually dimorphic are we? Review and synthesis. *American Journal of Human Biology* 2000 12 151–166. ([https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6300\(200003/04\)12:2<151::AIDAJHB1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6300(200003/04)12:2<151::AIDAJHB1>3.0.CO;2-F))

(55) Arboleda VA, Lee H, Sánchez FJ, Délot EC, Sandberg DE, Grody WW, Nelson SF & Vilain E. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development. *Clinical Genetics* 2013 83 35–43. (<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01879.x>)

(56) Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen AH, Conway G, Edwards ZL, Elford S, Hughes IA, Izatt L, Krone N, Miles HL, O'Toole S, Perry L, Sanders C, Simmonds M, Wallace AM, Watt A, Willis D. UK guidance on the initial evaluation of an infant or an

adolescent with a suspected disorder of sex development. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011 Jul;75(1):12-26. doi: 10.1111/j.1365-2265.2011.04076.x. PMID: 21521344; PMCID: PMC3132446.

(57) Ahmed SF, Bashamboo A, Lucas-Herald A, McElreavey K. Understanding the genetic aetiology in patients with XY DSD. *Br Med Bull*. 2013;106:67-89. doi: 10.1093/bmb/ldt008. Epub 2013 Mar 25. PMID: 23529942.

(58) Buonocore F, Achermann JC. Human sex development: targeted technologies to improve diagnosis. *Genome Biol*. 2016 Dec 15;17(1):257. doi: 10.1186/s13059-016-1128-4. PMID: 27978845; PMCID: PMC5159992.

(59) Parivesh A, Barseghyan H, Délot E, Vilain E. Translating genomics to the clinical diagnosis of disorders/differences of sex development. *Curr Top Dev Biol*. 2019;134:317-375. doi: 10.1016/bs.ctdb.2019.01.005. Epub 2019 Mar 20. PMID: 30999980; PMCID: PMC7382024.

(60) Auchus, R.J. Steroid 17-hydroxylase and 17,20-lyase deficiencies, genetic and pharmacologic. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*. 2017, 165, 71–78. [CrossRef]

(61) Biason-Lauber A, Leiberman E, Zachmann M. A single amino acid substitution in the putative redox partner-binding site of P450c17 as cause of isolated 17,20-lyase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Nov;82(11):3807-12. doi: 10.1210/jcem.82.11.4380. PMID: 9360545.

(62) Geller, D.H.; Auchus, R.J.; Mendonça, B.B.; Miller, W.L. The genetic and functional basis of isolated 17,20-lyase deficiency. *Nat. Genet*. 1997, 17, 201–205. [CrossRef]

(63) Van Den Akker, E.L.; Koper, J.W.; Boehmer, A.L.; Themmen, A.P.; Verhoef-Post, M.; Timmerman, M.A.; Otten, B.J.; Drop, S.L.; De Jong, F.H. Differential inhibition of

17alpha-hydroxylase and 17,20-lyase activities by three novel missense CYP17 mutations identified in patients with P450c17 deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002, 87, 5714–5721. [CrossRef]

(64) Barseghyan H, Délot E, Vilain E. New genomic technologies: an aid for diagnosis of disorders of sex development. *Horm Metab Res.* 2015 May;47(5):312-20. doi: 10.1055/s-0035-1548831. Epub 2015 May 13. PMID: 25970709.

(65) Saltarelli MA, Ferrante R, Marcello FD, David D, Valentinuzzi S, Pilenzi L, Federici L, Rossi C, Stuppia L, Tumini S. A Novel Heterozygous Mutation of the CYP17A1 Gene in a Child with a Micropenis and Isolated 17,20-Lyase Deficiency. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Jun 4;19(11):6880. doi: 10.3390/ijerph19116880. PMID: 35682463; PMCID: PMC9180258. (citazione case report)

(66) Eggers S, Sadedin S, van den Bergen JA, Robevska G, Ohnesorg T, Hewitt J, Lambeth L, Bouty A, Knarston IM, Tan TY, Cameron F, Werther G, Hutson J, O'Connell M, Grover SR, Heloury Y, Zacharin M, Bergman P, Kimber C, Brown J, Webb N, Hunter MF, Srinivasan S, Titmuss A, Verge CF, Mowat D, Smith G, Smith J, Ewans L, Shalhoub C, Crock P, Cowell C, Leong GM, Ono M, Lafferty AR, Huynh T, Visser U, Choong CS, McKenzie F, Pachter N, Thompson EM, Couper J, Baxendale A, Gecz J, Wheeler BJ, Jefferies C, MacKenzie K, Hofman P, Carter P, King RI, Krausz C, van Ravenswaaij-Arts CM, Looijenga L, Drop S, Riedl S, Cools M, Dawson A, Juniarto AZ, Khadilkar V, Khadilkar A, Bhatia V, Dũng VC, Atta I, Raza J, Thi Diem Chi N, Hao TK, Harley V, Koopman P, Warne G, Faradz S, Oshlack A, Ayers KL, Sinclair AH. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol.* 2016 Nov 29;17(1):243. doi: 10.1186/s13059-016-1105-y. PMID: 27899157; PMCID: PMC5126855.

(67) Dong Y, Yi Y, Yao H, Yang Z, Hu H, Liu J, Gao C, Zhang M, Zhou L, Asan, Yi X, Liang Z. Targeted next-generation sequencing identification of mutations in patients with

disorders of sex development. *BMC Med Genet.* 2016 Mar 15;17:23. doi: 10.1186/s12881-016-0286-2. PMID: 26980296; PMCID: PMC4791760.