

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Mediche Generali e dei Servizi

Ciclo XXVII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/H1

Settore Scientifico-Disciplinare: MED/40

**SINDROME DA INSENSITIVITA' COMPLETA AGLI  
ANDROGENI E MASSA OSSEA: VALUTAZIONE  
BASALE E LONGITUDINALE DOPO OLTRE 12 MESI  
DI TERAPIA ESTROGENICA.**

Presentata da:

Marta Berra

Coordinatore Dottorato

Chiar.mo Prof. Nicola Rizzo

Relatore

Dott.ssa M. Cristina Meriggiola

Esame finale Anno 2015

## INDICE

<b>1.</b>	Introduzione.....	pag.	3
<b>2.</b>	Materiale e metodi.....	pag.	5
	2.1. Popolazione		
	2.2. Disegno dello studio		
	2.3. Materiali		
	2.4. Statistica		
<b>3.</b>	Risultati.....	pag.	9
<b>4.</b>	Discussione.....	pag.	11
<b>5.</b>	Conclusioni.....	pag.	16
<b>6.</b>	Tabelle e illustrazioni.....	pag.	17
<b>7.</b>	Bibliografia.....	pag.	23

## 1. INTRODUZIONE

La Insensibilità Completa agli Androgeni (in inglese Congenital Androgen Insensitivity Syndrome da cui l'acronimo CAIS), è un Disordine dello Sviluppo Sessuale (DSD) a cariotipo 46XY.(1, 2,3)

La CAIS e' causata da un difetto di azione del testosterone causato da una mutazione del Recettore Androgenico (AR) localizzato sul cromosoma X (Xq11-12) che determina una completa assenza dell'azione androgenica e conseguentemente un fenotipo femminile omogeneo (4).

La prevalenza del disturbo è di 1/20000 nati (3-6), la trasmissibilità è X linked recessiva nel 70% dei casi, si riscontra invece una mutazione "de novo" nel 30%. Sono state descritte oltre 1000 mutazioni a carico dell' AR (<http://androgendb.mcgill.ca>)

La donna CAIS presenta un fenotipo perfettamente femminile alla nascita, in corso di sviluppo puberale e durante l'età adulta con genitali esterni regolari ma completa agenesia di utero e ovaia. La vagina, a fondo cieco, può essere normoconformata o ipoplasica.

Sono presenti gonadi maschili normalmente differenziate e secernenti androgeni che presentano localizzazione intraaddominale o in sedi variabili del canale inguinale. A livello laboratoristico, se non è stata praticata la gonadectomia, si riscontrano livelli di testosterone sierici compresi nei ranges maschili fisiologici; il testosterone non è però in grado di esplicare la sua azione recetteroriale e non è di conseguenza in grado di determinare alcuna azione mascolinizante (3).

La quasi totalità delle donne CAIS entro i primi anni postpuberali si sottopone a gonadectomia bilaterale al fine di prevenire la degenerazione maligna delle gonadi che, seppur rara nella forma completa dell'insensibilità, è descritta (7,10). Dopo la chirurgia le donne CAIS sono candidate alla terapia ormonale sostitutiva da continuarsi approssimativamente fino all'età di 50anni. In considerazione dell'assenza dell'utero, le donne CAIS non necessitano di progesterone e la terapia ormonale deve essere estrogenica esclusiva (7) ad un dosaggio adeguato per l'età giovane adulta.

E' conoscenza acquisita che il metabolismo osseo sia influenzato, nell'uomo e nella donna, in modo determinante dagli steroidi sessuali;

estrogeni ed androgeni contribuiscono entrambi al raggiungimento del picco di massa ossea ed al mantenimento del trofismo tissutale osseo ma, a livello osseo, l'azione singola e la sinergia tra i due tuttora non sono compresi interamente (11-14).

L'osso è considerato un tessuto target per l'azione degli steroidi sessuali.

Nelle cellule osteoblastiche sono stati identificati i recettori degli androgeni la cui attivazione stimola la proliferazione e la differenziazione degli osteoblasti e sembra inibire il riassorbimento osseo (12). Gli androgeni esplicano la loro azione con duplice modalità: direttamente a livello osseo attraverso la stimolazione del recettore degli androgeni (AR) da parte del testosterone o dopo conversione a diidrotestosterone per azione dell'enzima 5 $\alpha$ reduttasi, oppure indirettamente tramite il recettore degli estrogeni (ER) dopo aromatizzazione locale del testosterone in estradiolo.

Alcuni autori postulano però che l'azione degli androgeni sull'acquisizione della massa ossea sia prevalentemente indiretta e che la normale mineralizzazione ossea sia dovuta alla stimolazione dei ER in entrambi i sessi (14).

Le donne CAIS presentano un normale metabolismo estrogenico ma una totale insensibilità all'azione androgenica recettoriale a causa della mutazione completa del recettore androgenico (3) e sono, di conseguenza, un modello di studio ottimale per valutare il metabolismo osseo in condizioni di totale deprivazione dell'azione androgenica recettoriale.

Lo sviluppo e il mantenimento del compartimento osseo nelle donne CAIS sono stati studiati in alcuni studi precedenti, ma i risultati ottenuti non sono univoci e sono limitati all'osservazione basale (15-20).

Con il nostro studio abbiamo valutato longitudinalmente la densità minerale ossea (BMD) in un gruppo di donne adulte CAIS sottoposte a gonadectomia al momento della prima visita e dopo almeno 12 mesi di terapia estrogenica a pieno dosaggio.

Il principale obiettivo dello studio è stato di valutare se, nelle donne con insensibilità recettoriale androgenica, una ottimale estrogenizzazione potesse essere sufficiente nel mantenere/ripristinare una adeguata densità minerale ossea.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 POPOLAZIONE

Le pazienti partecipanti allo studio sono state selezionate tra le utenti afferenti all'ambulatorio di Ginecologia Endocrinologica e Disturbi della Differenziazione Sessuale presso la Clinica Ginecologica Azienda Ospedaliera Sant'Orsola Malpighi - Università degli studi di Bologna in un periodo compreso tra Gennaio 2010 e Dicembre 2014.

Essendo una clinica dell'adulto, la quasi totalità delle pazienti giunte alla nostra osservazione era in possesso di una diagnosi di certezza di CAIS o di un fondato sospetto diagnostico. Alle pazienti per le quali non era stata eseguita in precedenza l'analisi genetica è stata offerta la ricerca della mutazione del recettore degli androgeni che, in tutte le donne ammesse allo studio, è risultato positivo.

Trattandosi di una popolazione adulta molte pazienti CAIS sono giunte alla nostra osservazione in corso di trattamento con terapie ormonali prescritte in precedenza in altri centri. La terapia è stata uniformata in tutte le pazienti arruolate nello studio in corso della prima visita. Alle pazienti è stata proposta la terapia per os con Estradiolo Valerato (Progynova) 2mg/die o, in alternativa per coloro che rifiutavano l'assunzione per os, Estradiolo emidrato transdermico (Sandrena) 2mg/die.

Criteri d'inclusione per l'ammissione allo studio sono stati: età > 18aa, fenotipo femminile normale associato a cariotipo 46XY normale, diagnosi di CAIS con riscontro di mutazione a carico del recettore degli androgeni AR, pregresso intervento di gonadectomia bilaterale, BMI compreso tra 18 e 30, assenza di comorbidità maggiori, assenza di terapie croniche con farmaci potenzialmente interferenti con il metabolismo osseo, firma del consenso informato per partecipazione allo studio.

## 2.2 DISEGNO DELLO STUDIO

Tutte le pazienti con diagnosi di CAIS arruolabili sono state sottoposte a:

- t0 : raccolta anamnestica, visione dei precedenti referti e delle precedenti terapie, programmazione dell'analisi genetica del AR quando non eseguita.

valutazione basale t1: DXA densitometria ossea (DXA) total body, rachide lombare L-4 e femorale prossimale. prescrizione di terapia ormonale Progynova 2mg/die o Sandrena gel 2mg/die. Prelievo ematico con dosaggio di markers ossei (PHT, osteocalcina, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Vitamina D, Ca, K.)

- t2 valutazione a 12 mesi: densitometria ossea (DXA) total body, rachide lombare L-4 e femorale prossimale. Prelievo ematico con dosaggio di markers ossei (PHT, osteocalcina, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Vitamina D, Ca, K.)

- t3 valutazione a 24 mesi : densitometria ossea (DXA) total body, rachide lombare L-4 e femorale prossimale. Prelievo ematico con dosaggio di markers ossei (PHT, osteocalcina, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Vitamina D, Ca, K.)

- t4 valutazione a 48 mesi: densitometria ossea (DXA) total body, rachide lombare L-4 e femorale prossimale. Prelievo ematico con dosaggio di markers ossei (PHT, osteocalcina, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Vitamina D, Ca, K.)

Per l'analisi dei dati le pazienti sono state suddivise in due gruppi:

-gruppo 1: già in terapia ormonale al t1; terapia uniformata alla terapia dello studio

-gruppo 2: pz non in terapia ormonale al t1; iniziata terapia

Nel periodo dello studio 29 donne CAIS sono giunte per la prima osservazione (t0) nel nostro ambulatorio. Di queste 5 non sono state arruolate nel gruppo di studio per i seguenti motivi:

-1 non ha mai eseguito DXA

-1 affetta da comorbidità richiedente terapia continuativa con corticosteroidi

-1 non aveva effettuato l'intervento di gonadectomia

-2 non hanno iniziato la terapia medica prescritta

## 2.3 MATERIALI

### Misurazione della BMD

Tutte le pazienti sono state sottoposte a DXA (Dual Energy X-ray Absorptiometry) con misurazione a livello del rachide lombare L1-L4, del femore prossimale e Total Body al t1 e dopo almeno 12 mesi di terapia. I risultati del comparto osseo sono riportati con Bone Mineral Density (BMD) calcolata dallo strumento dividendo il contenuto minerale osseo stimato della regione analizzata per l'area esaminata (lunghezza x profondità) . I valori di BMD sono espressi in g/cm<sup>2</sup> I valori di BMD sono stati rapportati ai valori standard di popolazione mediante lo Z SCORE come nei precedenti studi (Sobel V 2006) . Lo Z score indica il rapporto tra la densità minerale ossea del paziente esaminato espressa in Deviazioni Standard (DS) e la densità minerale ossea della media delle persone di pari età e pari sesso del paziente esaminato .

Per le pazienti CAIS, avendo un cariotipo 46XY, si è discusso se utilizzare i valori di riferimento maschili o quelli femminili. Non essendovi linee guida a riguardo, in accordo con la comunità scientifica, con precedenti lavori (Han, Danilovich) e con i gruppi di lavoro sui DSD, si è convenuto di riportare T score e Z score al modello femminile.

20/24 pazienti arruolate hanno effettuato entrambi gli esami presso il Dipartimento di Radiologia Azienda Ospedaliero-Universitaria S. Orsola-Malpighi, Bologna. Le restanti 4 pazienti hanno eseguito un esame DXA in un'altra struttura.

I risultati di BMD e Zscore sono espressi come valore medio  $\pm$  Deviazione Standard (SD).

Z score  $>-1$ : normalità; Zscore compreso tra  $-1$  e  $-2,5$ : osteopenia; Z score  $<-2,5$  osteoporosi

### Esami ematici

I livelli plasmatici di PHT, osteocalcina, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Vitamina D, Ca, K sono stati determinati con RIA. Il prelievo venoso è stato effettuato lo stesso giorno o in prossimità dell'esecuzione della DXA a t1, t2 e

t>2. I risultati sono espressi come valore medio  $\pm$  Deviazione Standard (SD). Non tutti i soggetti hanno acconsentito di sottoporsi al prelievo venoso

## 2.4. STATISTICA

I dati sono stati elaborati con il programma statistico SPSS versione 21.0. Sono state calcolate per ciascun gruppo la Media e la Deviazione Standard (DS) su BMD, T Score, Z Score, peso in kg, altezza in cm, BMI.

I valori al t<sub>2</sub> sono state comparate con i valori al t<sub>1</sub>, utilizzando il test statistico Test T di Student a due code con campioni abbinati quando si è confrontata la stessa popolazione dopo un intervallo di tempo, a campioni indipendenti quando sono stati confrontati il gruppo 1 vs il gruppo 2. Il test è ritenuto significativo quando  $p \leq 0.05$

I risultati, quando non diversamente specificato, sono espressi con valore medio + deviazione standard.

I grafici sono stati elaborati con i programmi Numbers e Excel.



### 3. RISULTATI

Al t1 la popolazione intera dello studio presentava: età media 30,16anni  $\pm$  13,4, peso medio di 63,52  $\pm$  12,64 Kg , l'altezza media di 167,8  $\pm$  6,10 cm e BMI medio di 22,54  $\pm$  5,74. Non sono state registrate variazioni significative di peso e BMI durante lo studio.

Le caratteristiche demografiche del campione sono riassunte nella Tabella 1. 18/24 pazienti sono giunte alla nostra osservazione già in terapia ormonale (gruppo 1). 6/24 pazienti non assumevano alcuna terapia ormonale (gruppo 2).

Tutte le 24 pz arruolate hanno eseguito la DXA al t1 con i seguenti risultati rispettivamente nel campione intero, gruppo 1 e gruppo 2 (tutti i valori di BMD sono espressi in g/cm<sup>2</sup>):

- BMD lombare L1-L4: 0.900  $\pm$  0.12; 0.918  $\pm$  0.12; 0.845  $\pm$  0,11 (Ttest tra gruppo 1 e il gruppo 2 non significativo p= 0,185)

- Zscore lombare: -1,98  $\pm$  0,11; -1,92  $\pm$  0,79; -2,13  $\pm$  1,15 (Ttest tra gruppo 1 e il gruppo 2 non significativo p= 0,703)

- BMD femorale: 0,831  $\pm$  0,14; 0,824  $\pm$  0,13; 0,857 $\pm$  0,17 (Ttest tra gruppo 1 e il gruppo 2 non significativo p= 0,756)

- Zscore femorale: -1,385  $\pm$  0,98; -1,40 $\pm$  1,00; -1,348  $\pm$  1,05 (Ttest tra gruppo 1 e il gruppo 2 non significativo p= 0,713).

Non tutti i soggetti si sono presentati omogeneamente agli appuntamenti stabiliti ed alcuni sono stati arruolati nel corso dell'ultimo anno dello studio per cui nel campione sono presenti soggetti che hanno esclusivamente il controllo DXA a t2 ed altri che non hanno effettuato la DXA a t2 ma che si sono presentati per il controllo t3 e/o t4. Si è quindi valutata la variazione della DXA dopo almeno 12 mesi di terapia raggruppando tutti i risultati della DXA eseguiti dopo almeno 12mesi di terapia (t>2), scegliendo, per i soggetti con più esami, il valore dell'ultimo esame eseguito. Es per il soggetto n9 che ha eseguito le DXA a t1, t2 e t3 è stato valutato il risultato di t3. per il soggetto n 13 che ha eseguito la DXA a t1, t3 e t4 è stato considerato il risultato di t4.

Dei 24 soggetti arruolati hanno eseguito la DXA al t2, t3 , t4 rispettivamente 14, 8 e 7 pazienti. Il gruppo t>2 (soggetti con almeno un esame ripetuto dopo 12 o più mesi) è composto da 17 soggetti.

I valori di BMD e Z score lombare e femorale nel campione totale, nel gruppo 1 e nel gruppo 2, dopo 12 mesi di terapia (t2), e dopo almeno 12 mesi di terapia (t >2) sono riportati nella Tabella 2 e graficati nel Grafico 1.

Nel campione considerato interamente la BMD lombare a t2 ( $0,950 \pm 0,07$ ,  $p=0,05$ ) e t>2 ( $0,957 \pm 0,11$ ,  $p=0,02$ ) risultava significativamente migliorata. Non si sono registrate variazioni significative in Zscore lombare, BMD e Zscore femorali.

A livello del rachide lombare al t1 16/24 donne CAIS presentavano osteopenia, (Zscore compreso tra -1 e -2,5); 6 /24 osteroporosi (Z score < -2,5). Al t>2 10/17 avevano un quadro di osteopenia e 5/17 di osteoporosi.

A livello del femore al t1 10/24 donne CAIS presentavano osteopenia, (Zscore compreso tra -1 e -2,5); 2 /24 osteroporosi (Z score < -2,5). Al t>2 11/17 avevano un quadro di osteopenia

All'esame basale t1 non erano presenti differenze significative di BMD e score nei gruppi 1 e 2: la comparazione dei valori di BMD e Z score al t1 tra gruppo 1 e gruppo 2 sono riportati in Tabella 3. L'assenza di differenze significative ha reso possibile l'accorpamento dei due gruppi per valutare complessivamente il campione.

E' stata valutata la relazione tra età della gonadectomia del campione e BMD e Z score al basale t1 (Tabella 4): 14/24 pazienti erano state sottoposte a gonadectomia in epoca prepuberale (età media  $7,5 \pm 4,7$ ), 10/24 in epoca post puberale (età media  $20,2 \pm 5,2$ ). Nel gruppo sottoposto a chirurgia prima della pubertà lo Z score lombare al basale era  $-2,05 \pm 0,525$ , tra le donne operate dopo  $-1,77 \pm 1,2$ .

Non tutti i soggetti hanno acconsentito a sottoporsi al prelievo venoso, i risultati di PHT, osteocalcina, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Vitamina D, Ca, K sono riportati nella Tabella 4 e sono stati considerati al t1, t2 e t>2 nella popolazione totale ( nel gruppo 2 solo 1 soggetto ha effettuato la ripetizione degli esami ematici a t>1). I risultati degli esami ematici, espressi in media  $\pm$  SD sono riportati in Tabella 5 ed espressi graficamente nel Grafico 3.

#### 4. DISCUSSIONE

Il nostro studio si è concentrato sulla valutazione della densità ossea nelle donne CAIS in età giovane adulta e come questa fosse influenzata da una prolungata terapia estrogenica a corretto dosaggio, dalla assunzione o meno di una terapia ormonale al momento dell'arruolamento nello studio e dall'età a cui il campione è stato sottoposto a gonadectomia.

I risultati sono stati valutati al tempo dell'arruolamento (t1), dopo 12 mesi di terapia (t2) e dopo un tempo maggiore a 12 mesi di terapia (t>2).

La CAIS è una patologia rara caratterizzata da una bassa incidenza ed una elevata dispersione dei pazienti soprattutto nell'età adulta. Nella valutazione della relazione tra CAIS e metabolismo osseo il nostro studio è tra i più ampi presenti in letteratura e, a nostra conoscenza, al momento l'unico che valuti i parametri ossei al basale e longitudinalmente a distanza di 12 e più mesi.

Tutte le donne CAIS arruolate nel nostro studio hanno avuto una diagnosi di certezza con riscontro di mutazione a livello del AR ed abbiamo la possibilità di valutare BMD e Z score su un campione con certa e assoluta assenza di attività recettoriale androgenica.

L'osso è considerato un tessuto target per l'azione degli steroidi sessuali (11-14, 21-26) ma non c'è consenso unanime su espressione e ruolo di AR e ER. Alcuni lavori che hanno valutato l'espressione recettoriale nel processo di differenziazione degli osteociti, hanno dimostrato che i livelli di ER erano elevati durante la differenziazione e la maturazione per poi ridursi nel processo di mineralizzazione mentre l'espressione dell'AR sembra essere più bassa durante i processi di proliferazione e aumentare durante la mineralizzazione(21,25).

Contemporaneamente ci sono consistenti evidenze che dimostrano come gli estrogeni contribuiscano anche nell'uomo allo sviluppo osseo(22, 24,25,28), ; uomini portatori di mutazione a livello di ER o deficit dell'aromatasi non presentano una adeguata crescita puberale, manifestano un ritardo nella maturazione ossea, mancata fusione delle epifisi e prosecuzione della crescita staturale con raggiungimento di una altezza finale estremamente elevata e BMD significativamente ridotta nell'età adulta (14)

Le pazienti CAIS mancano dell'azione degli androgeni e gli estrogeni dovrebbero essere gli unici ormoni sessuali attivi a determinare l'acquisizione della densità ossea in queste pazienti

Nei soggetti CAIS gli estrogeni esplicano correttamente la loro azione e possono esercitare la loro azione sull'osso. E' universalmente noto che gli estrogeni siano cruciali per il trofismo osseo e il peggioramento dei parametri ossei è riportato in tutte le situazioni cliniche caratterizzate da basse concentrazioni estrogeniche. Allo stesso tempo è noto che la somministrazione di androgeni aumenta la BMD in soggetti osteopenici sia uomini che donne e che gli uomini affetti da ipogonadismo mostrano una riduzione della massa ossea (BMD).

La terapia con testosterone porta, in studi prospettici a lungo termine e studi retrospettivi su uomini affetti da ipogonadismo, ad un aumento della densità dopo due anni circa di terapia soprattutto a livello della colonna vertebrale. Dopo due anni di terapia la densità si stabilizza in linea con quanto si evidenzia durante la terapia con bifosfonati (22).

Le donne CAIS 46XY rappresentano un modello per valutare la prolungata deprivazione androgenica e il ruolo della terapia estrogenica pura nel migliorare e preservare il trofismo osseo.

La terapia estrogenica somministrata nel nostro studio, pari a 2mg di Estradiolo /die è riconosciuta come adeguata a sopperire alle esigenze estrogeniche di una donna giovane adulta.

I nostri dati confermano i dati della letteratura (15,18,19) confermando che le donne affette da CAIS presentano una densità ossea inferiore alla popolazione generale. Nel nostro campione questo riscontro si è mantenuto tale ad ogni intervallo di osservazione: t1, t2 e t>2.

L'omogeneità del campione in termini di BMD e Z score al t1 ha determinato la possibilità di valutare il valore di BMD basale considerando tutte le donne CAIS insieme (gruppo 1 + gruppo 2) dando maggiore potenza statistica allo studio

A livello del rachide lombare al t1 la quasi totalità del campione (22/24 donne CAIS) presenta uno Z score indicativo di osteopenia (16/24) o osteoporosi (6/24)

Dai nostri risultati emerge che, quando sottoposte per un periodo uguale e superiore a 12 mesi di terapia ormonale sostitutiva estrogenica a

pieno dosaggio, si assiste ad un trend in miglioramento dei parametri ossei, non tale però da riportarli ai valori medi della popolazione generale.

Tale miglioramento risulta statisticamente significativo valutando la BMD lombare nel campione totale a  $t_2$  ( $p=0,05$ ) e  $t_{>2}$  ( $p= 0,02$ ).

Z score lombare, BMD femorale e Z score femorale, seppur dimostrando un trend in miglioramento, non risultano modificati in maniera significativa

La non significatività rimane vero anche andando a scomporre il risultato nei gruppi 1 (già in terapia a  $t_0$ ) e gruppo 2 (non in terapia a  $t_0$ )

Da studi precedenti(15) e dalla nostra pratica clinica emerge in modo evidente che una scarsa compliance nell'assunzione della terapia ormonale sostitutiva estrogenica riduce ulteriormente i valori di BMD determinando un progressivo peggioramento dei parametri ossei. Ma, da sola, l'assunzione di estrogeni, anche se a dosaggio pieno, non pare essere sufficiente.

Il nostro risultato è consensuale ai lavori sull'osso nelle donne affette da anoressia nervosa(23) e supporta la tesi che la sola supplementazione di estrogeni, per quanto ad un dosaggio ottimale, sia insufficiente al raggiungimento e al mantenimento di una adeguata BMD.

Come negli studi di Sobel e Bertelloni, nel nostro campione di donne CAIS, il deficit maggiore nella BMD rispetto alla popolazione è presente a livello del rachide lombare rispetto al femore prossimale. Questo conferma la tesi che il sistema androgeno recettoriale abbia un ruolo determinante nella formazione e nel mantenimento dell'osso trabecolare, maggiormente rappresentato a livello del rachide.

Questo riscontro è consensuale ad alcuni lavori eseguiti sugli animali: nei topi knock out per il recettore degli androgeni la BMD sia dell'osso trabecolare che di quello corticale sono sensibilmente ridotte(28,29) nonostante la somministrazione esogena di androgeni a supporto dell'azione recettoriale androgenica.

Nella nostra valutazione abbiamo considerato se le donne CAIS post gonadectomia stavano o meno eseguendo una terapia ormonale sostitutiva al momento dell'arruolamento e l'età media della gonadectomia.

L'asportazione bilaterale delle gonadi, si associa ad una importante perdita di massa ossea che, se non contrastata con la terapia ormonale sostitutiva, risulta particolarmente pronunciata a livello della componente trabecolare delle ossa con ampia superficie di rimodellamento, ma si riscontra anche a

livello dei siti corticali, e ed è associata ad un maggior aumento dei markers biochimici del riassorbimento osseo piuttosto che di formazione (30).

E' interessante notare però che confrontando il gruppo 1 (CAIS già in terapia al t1) e il gruppo 2 (CAIS non in terapia al t1) non si apprezzano differenze statisticamente significative nella BMD lombare e femorale al t1 (Tabella 3)

Un'osservazione importante deve essere fatta a riguardo è rispetto all'età a cui sono state sottoposte a gonadectomia: nel gruppo 1 (già in terapia al t1) è di 11,6 anni mentre nel gruppo 2 (non in terapia al t1) è di 18,3. Nel gruppo 1 l'età media della gonadectomia presuppone che sia stata eseguita in epoca pre puberale. Nel gruppo 2 invece l'asportazione delle gonadi è stata mediamente eseguita in epoca post puberale permettendo lo sprout puberale orchestrato dalla secrezione ormonale endogena e permettendo, probabilmente, un miglior guadagno nella BMD. Questo dato, che presuppone un'azione protettiva delle gonadi se mantenute attraverso la pubertà, è concorde alla letteratura corrente sul tema del timing della gonadectomia nelle donne CAIS. (7,31-33) L'indicazione corrente è, in presenza di diagnosi di certezza, di asportazione delle gonadi in epoca post puberale per consentire lo sviluppo spontaneo dei caratteri sessuali secondari e possibilmente ottenere un miglior outcome a livello della BMD (7). Il rischio di degenerazione maligna delle gonadi nelle CAIS è difficilmente stimabile per l'esiguità della popolazione ma, nei lavori che lo hanno valutato è ipotizzato intorno al 2-3%.

Il ruolo dell'età della gonadectomia su BMD e Z score è stato anche valutato suddividendo il campione totale delle donne CAIS in base all'età dell'intervento. 14/24 lo avevano eseguito in epoca prepuberale (età media 7,5aa) mentre 10/14 erano state sottoposte all'asportazione delle gonadi dopo la pubertà (età media 20,2 aa). Lo Z score lombare e femorale del primo gruppo sono risutati rispettivamente  $-2,05 \pm 0,525$  e  $-1,657 \pm 0,728$  quelli del secondo gruppo (gonadi in situ durante l pubertà)  $-1,774 \pm 1,251$   $-1,094 \pm 1,192$

Sebbene nel disegno dello studio fosse stata inserita la valutazione dei markers di turnover osseo: il PHT, l'osteocalcina, la fosfatasi alcalina ossea, la vitamina D, CA e K, l'analisi di tali markers, per la esiguità di pazienti che si è sottoposta al prelievo venoso è di limitata utilità e di difficile interpretazione.

L'osteocalcina e la PBA sono markers di formazione di ossee e mostrano un trend in aumento in t>2.

Il pHT è un marker di riassorbimento osseo e mostra un trend in calo sia a t2 che a t>2.

Questo riscontro sembrerebbe supportare il contributo anabolico della terapia estrogenica a livello dell'osso ma per poter trarre conclusioni sulle modificazioni dei markers ossei sono necessari numeri più consistenti.

I bias dello studio sono legati alla scarsità del campione numerico, alla mancanza di alcuni controlli a t2 e t3 e alla non omogeneità del gruppo 1 e del gruppo2.

Come già sottolineato, la CAIS è una patologia rara, i numeri sono ridotti ed è particolarmente difficoltoso richiamare i soggetti, spesso residenti fuori regione, per i controlli.

La maggior parte dei dati che abbiamo sui DSD arriva dal setting pediatrico, lavorando con gli adulti è necessario far fronte a notevoli difficoltà. Spesso le informazioni sul percorso diagnostico e terapeutico intrapresi precedentemente sono lacunosi e sempre estremamente difforni tra i diversi soggetti. Quando il paziente DSD è stato seguito da un servizio pediatrico dedicato risente in modo importante del transito al setting della medicina dell'adulto e questo può risultare in dispersione dal servizio (7) Inoltre, le terapie eseguite i pazienti con DSD risentono dello stigmata associato alla patologia e tendono ad evitare l'accesso all'ambiente medico.

Una ulteriore precisazione deve essere fatta riguardo l'età media del campione; 29 aa; questo dato riflette le criticità a cui un servizio di medicina del DSD adulto deve far fronte. Il motivo del ritardo della prima visita può essere spiegato in diversi modi: la diagnosi di CAIS è spesso tardiva per normale fenotipo e sviluppo puberale, nelle pazienti più adulte talvolta è tenuta nascosta dai familiari, l'età di transizione dai servizi pediatrici è tardiva, la dispersione e l'uscita dal percorso medico sono significativi .

Queste considerazioni sono necessarie per sottolineare l'importanza e l'unicità dei dati raccolti che forniscono un tassello importante nella comprensione delle ripercussioni della terapia ormonale sostitutiva nelle donne CAIS adulte

## 5. CONCLUSIONI

I risultati del nostro studio supportano la tesi che gli androgeni, mediante l'azione recettoriale, abbiano una azione diretta nel raggiungere e mantenere la BMD.

Nelle donne CAIS una adeguata terapia ormonale sostitutiva estrogenica è indispensabile per prevenire un ulteriore perdita di BMD conseguente ad uno stato di ipoestrogenismo ma, da sola, non sembra in grado di ripristinare normali valori di BMD.

Dopo 12 e più mesi di terapia estrogenica la BMD del rachide lombare mostra un significativo miglioramento ma non sufficiente per riportare i valori nei ranges di normalità della popolazione controllo. Lo Z score lombare non presenta miglioramento significativo così come BMD e Z score femorali.

Il timing della gonadectomia sembra avere un ruolo nel raggiungimento della BMD e le donne CAIS che hanno mantenuto in situ le gonadi durante lo sviluppo puberale hanno valori di Z score più elevati.

Come tutti i DSA, la CAIS è una malattia rara caratterizzata da piccoli numeri e campioni disomogenei soprattutto nel campo della medicina dell'adulto. Sarebbe auspicabile aumentare ulteriormente il campione e incrementare il numero di controlli a 12 e più mesi di terapia per poter valutare il fenomeno su scala maggiore.



## 6. TABELLE E GRAFICI

Tabella 1. caratteristiche delle pazienti CAIS

	ETA'	ETA' GONADECTO MIA	PESO	ALTEZZA	BMI
<b>Totale (n 24)</b>	<b>30,167</b>	<b>13,417</b>	<b>63,070</b>	<b>1,679</b>	<b>22,270</b>
mediana	30,000	14,000	58,585	1,680	21,845
SD	8,287	7,598	12,830	0,061	3,768
<b>gruppo1 (n 18)</b>	<b>30,389</b>	<b>11,611</b>	<b>62,620</b>	<b>1,681</b>	<b>22,058</b>
mediana	30,083	14,000	58,393	1,680	21,800
SD	9,196	7,210	16,273	0,340	5,393
<b>gruppo2 (n 6)</b>	<b>29,500</b>	<b>18,833</b>	<b>64,600</b>	<b>1,673</b>	<b>22,990</b>
mediana	30,125	14,000	58,489	1,680	21,951
SD	9,751	6,922	18,759	0,430	6,397

gruppo 1: pazienti in terapia ormonale al t1, gruppo 2 pazienti non in terapia ormonale al t1

Tabella 2. BMD e Z score al rachide lombare L1-L4 e al femore prossimale. Valori di BMD e Z score a t1, t2 e t>2 rispettivamente nel campione totale, nel gruppo 1 (in terapia ormonale al t1) e nel gruppo 2 (non in terapia ormonale al t1).

RACHIDE LOMBARE L1-L4						
	t1		t2		t > 2	
	BMD g/cm	Z score	BMD g/cm	Z score	BMD g/cm	Z score
<b>Totale (n 24)</b>	0,900 ± 0,12	-1,976 ± 0,07	0,95 ± 0,07	-1,68 ± 0,55	0,957 ± 0,11	-1,78 ± 0,45
<b>T TEST vs t1</b>			p= 0,051	p= 0,838	p= 0,023	p= 0,441
<b>Gruppo 1 (n=18)</b>	0,918 ± 0,116	-1,924 ± 0,79	0,960 ± 0,07	-1,683 ± 0,30	0,936 ± 0,10	-1,923 ± 0,69
<b>T TEST vs t1</b>			p=0,127	p=0,493	p= 0,148	p= 0,536
<b>Gruppo 2 (n=6)</b>	0,845 ± 0,11	-2,125 ± 1,15	0,915 ± 0,06	-1,685 ± 1,11	1,055 ± 0,16	-1,067 ± 1,24
<b>T TEST vs t1</b>			p=0,362	p=0,530	p= 0,156	p= 0,735
FEMORE						
	t1		t2		t > 2	
	BMD g/cm	Z score	BMD g/cm	Z score	BMD g/cm	Z score
<b>Totale (n 24)</b>	0,831 ± 0,14	-1,385 ± 0,98	0,843 ± 0,10	-1,433 ± 0,61	0,885 ± 0,13	-1,044 ± 0,96
<b>T TEST vs t1</b>			p=0,699	p= 0,464	p= 0,863	p= 0,704
<b>Gruppo 1 (n=18)</b>	0,824 ± 0,13	-1,400 ± 1,00	0,843 ± 0,10	-1,320 ± 0,61	0,864 ± 0,13	-1,175 ± 0,91
<b>T TEST vs t1</b>			p=0,699	p= 0,683	p= 0,291	p= 0,859
<b>Gruppo 2 (n=6)</b>	0,857 ± 0,17	-1,348 ± 1,05	*	-2,02	0,977 ± 0,01	-0,650 ± 0,21
<b>T TEST vs t1</b>					p= 0,672	p= 0,207

\* nel gruppo 2 la DXA t2 è stata eseguita da tutti i soggetti che l'hanno ripetuta (n=3) presso una radiologia esterna dove non sono stati valutati BMD e Z score femorali. In 1 di questi 3 esami era riportato esclusivamente lo Z score.

Tabella 3. Comparazione BMD e Z score all'esame basale t1 tra le pazienti già in terapia ormonale sostitutiva al momento dell'arruolamento (gruppo 1) e le pazienti non in terapia (gruppo 2).

	RACHIDE LOMBARE L1-L4	
	BMD g/cm	Z score
Gruppo 1 (n=18)	0,918 ± 0,116	-1,924 ± 0,79
Gruppo 2 (n=6)	0,845 ± 0,11	-2,125 ± 1,15
T TEST vs t1	p=0,185	p=0,727
	FEMORE	
	BMD g/cm	Z score
Gruppo 1 (n=18)	0,824 ± 0,13	-1,400 ± 1,00
Gruppo 2 (n=6)	0,857 ± 0,17	-1,348 ± 1,05
T TEST vs t1	p=0,927	p=0,799

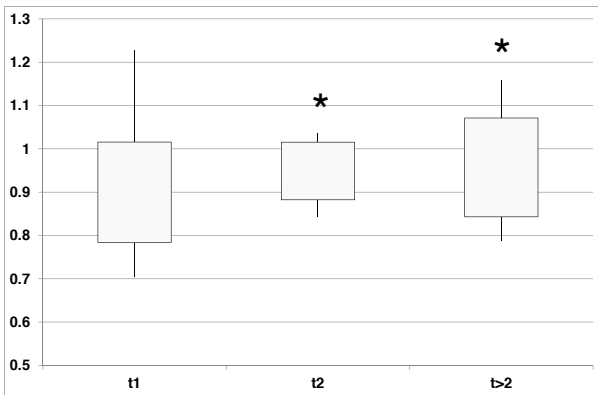
Tabella 4. BMD e Z score al t1 di rachide lombare e femore prossimale valutate rispetto all'età della gonadectomia.

	ETA' MEDIA della GONADECTOMIA	BMD T1 L1-L4	Z SCORE T1 L1-L4	BMD T1 FEMORE	Z SCORE T1 FEMORE
≤ 15aa (n=14)	7,5 + 4,7	0,908 ± 0,06	-2,05 ± 0,525	0,825 ± 0,127	-1,657 ± 0,728
≥ 15aa (n=10)	20,2 ± 5,2	0,884 ± 0,167	-1,774 ± 1,251	0,819 ± 0,641	-1,094 ± 1,192
		P= 0,641	P=0,469	P=0,764	P=0,282

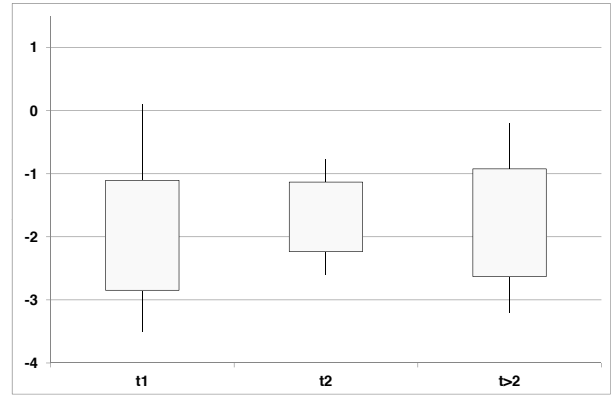
Tabella 5. Esami ematici (PHT, Osteocalcina, Vit D 25 OH, Fosfatasi alcalina isoenzima osseo, Ca e K) a t1, t2 e t>2

t1	t2	t>2	t1	t2	t>2
<b>PHT pg/mL</b>			<b>OSTEOCALCINA ng/mL</b>		
43,50 ± 15,86	40,67 ± 29,67	34,80 ± 22,75	29,27 ± 20,80	30,26 ± 10,41	35,50 ± 21,08
T test vs t1	0,50	0,55		0,630	0,920
<b>VIT D 25 OH ng/mL</b>			<b>FOSFATASI ALCALINA OSSEA microg/mL</b>		
24,19 ± 13,42	19,77 ± 4,69	22,52 ± 7,56	25,72 ± 21,54	15,56 ± 2,14	25,73 ± 21,07
T test vs t1	0,310	0,514		0,766	
<b>Ca mg/mL</b>			<b>K mg/mL</b>		
9,61 ± 2,69	7,5475 ± 3,58	9,57 ± 0,34	4,77 ± 1,46	4,30 ± 0,44	4,20 ± 0,39
	0,635	0,266			0,441

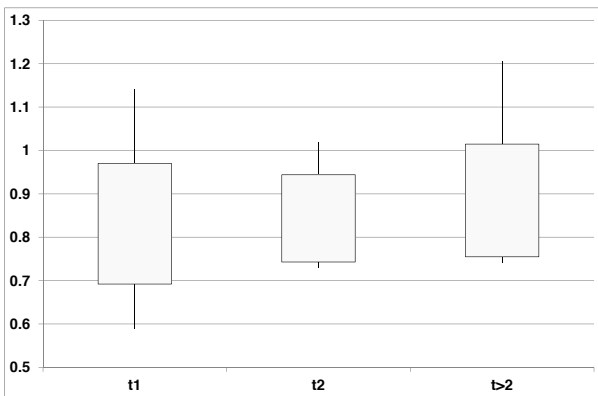
Grafico 1. BMD e Zscore lombari e femorali nel campione totale (n= 24) a t1, t2 e t>2



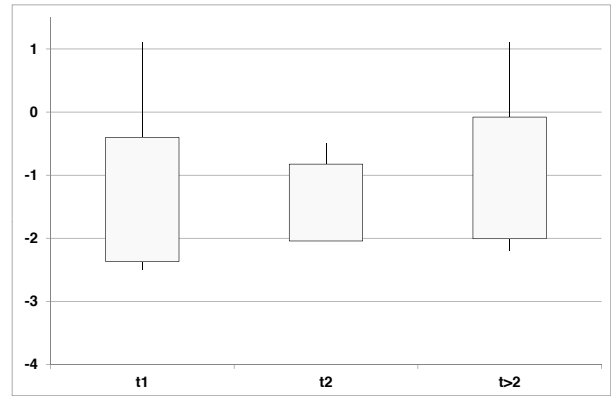
BMD lombare a t1, t2, t>2



Z score lombare a t1, t2, t>2



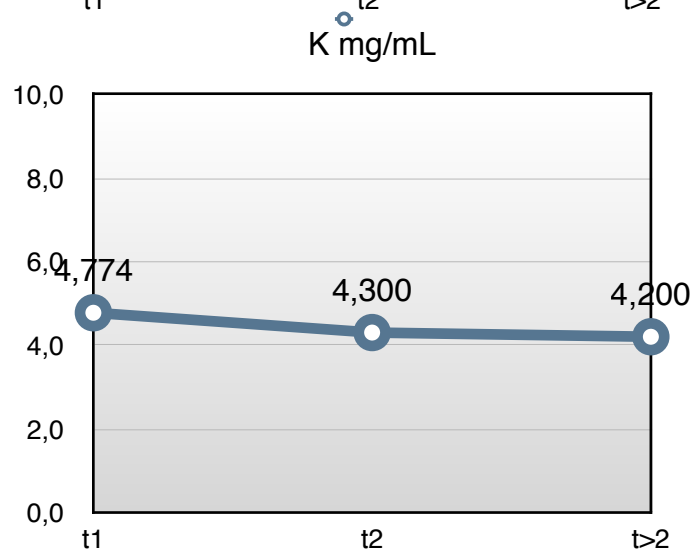
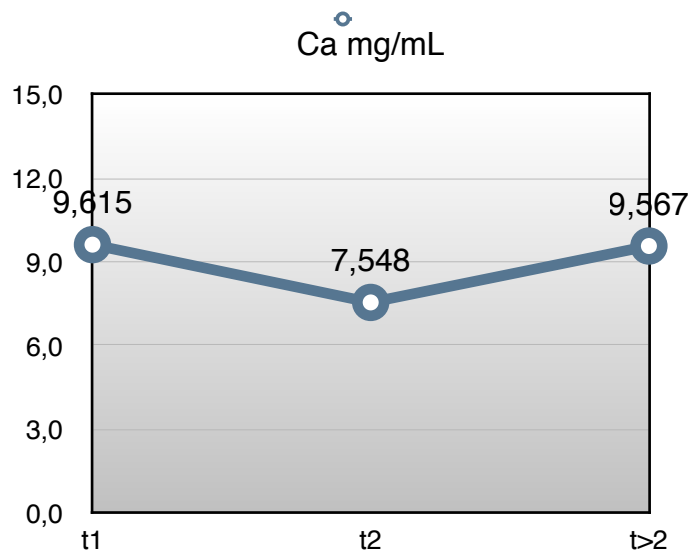
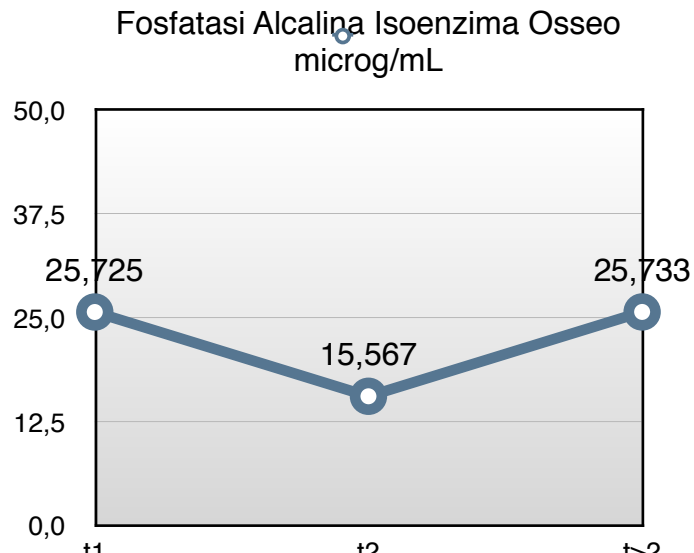
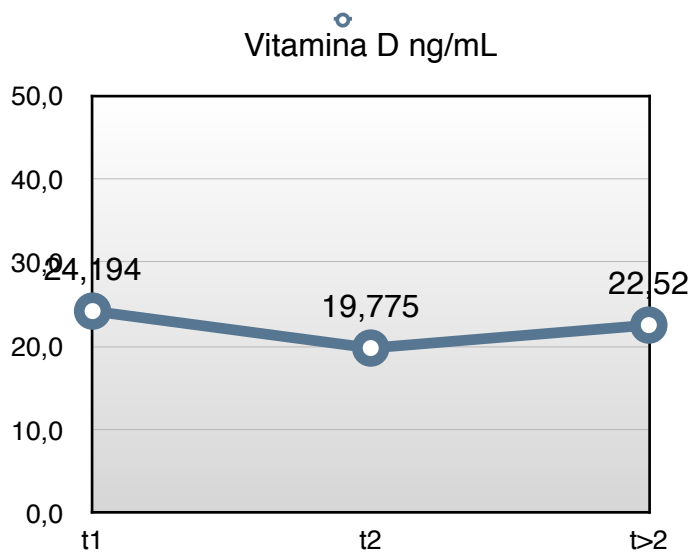
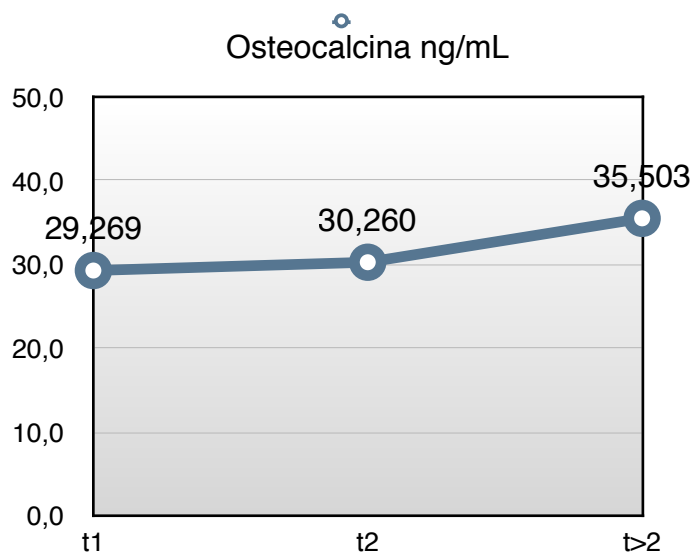
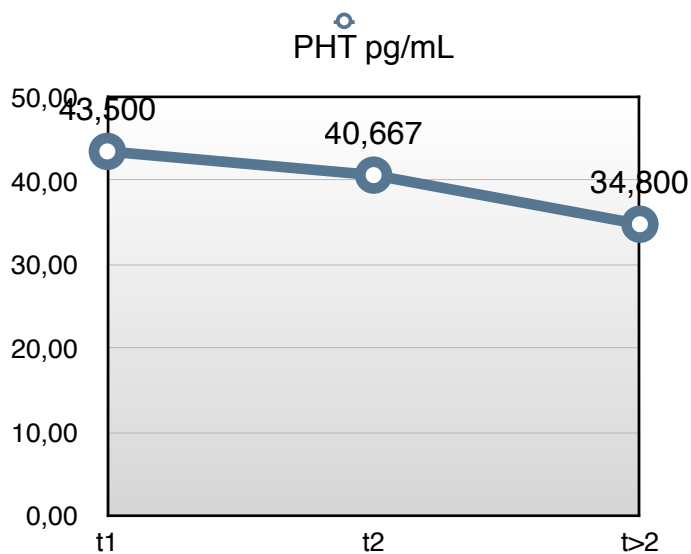
BMD femorale t1, t2, t>2



Z score femorale t1, t2, t>2

\*  $p \leq 0,05$

Grafico 2. Andamento dei markers di formazione ossea a t1, t2 e t>2. I valori riportati corrispondono al valore medio. E' stato eseguito il T test tra i valori a t2 t>2 vs t1 senza riscontro di significatività



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Hughes, I. A.. Disorders of sex development: A new definition and classification. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 22, 119-34. (2008)
2. Pasterski V, Prentice P, Hughes I. Consequences of the Chicago Consensus on Disorders of Sex Development (DSD): current practices in Europe. *Arch Dis Child* 2009;22
3. Dreger, A. D., Chase, C., Sousa, A., Gruppuso, P. A., & Frader, J. Changing the nomenclature/taxonomy for intersex: A scientific and clinical rationale. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 18, 729-33. (2005).
4. Mendonca BB, Domenice S, Arnhold IJ, Costa EM. 46,XY disorders of sex development (DSD). *Clin Endocrinol (Oxf)* 2009;70:173–87.
5. Bertelloni S, Dati E, Ghirri P, D'Alberona F, Baldinotti F, & Baroncelli, G. I. Gestione clinica dei disturbi della differenziazione sessuale con cariotipo 46,XY: Aspetti emergenti. *Società Italiana Di Pediatria*.
6. Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., & Lee, P. A. C. P. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child*, 91, 554-63. (2006).
7. Berra M, Liao LM, Creighton SM, Conway GS. Long term health issues of women with XY karyotype. *Maturitas*. 2010;65(2):172-8.
8. Cools M, Drop SL, Wolffenbuttel KP, Oosterhuis JW, Looijenga LH. Germ cell tumors in the intersex gonad: old paths, new directions, moving frontiers. *Endocr Rev* 2006;27(August):468–84.
9. Manuel M, Katayama PK, Jones Jr HW. The age of occurrence of gonadal tumors in intersex patients with a Y chromosome. *Am J Obstet Gynecol* 1976;124(February):293–300.
10. Bertelloni, S., Dati, E., & Baroncelli, G. I. Disorders of sex development: Hormonal management in adolescence. *Gynecological Endocrinology*, 24, 339-346. (2008).
11. Kasperk, C. H., Wakley, G. K., Hierl, T., & Ziegler, R. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism in vitro. *J Bone Miner Res*, 12, 464-71. (1997).

12. Kasperk, C. H., Wergedal, J. E., Farley, J. R., Linkhart, T. A., Turner, R. T., & Baylink, D. J. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology*, 124, 1576-8. (1989).
13. Kousteni, S., Bellido, T., Plotkin, L. I., O'Brien, C. A., Bodenner, D. L., Han, L., et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: Dissociation from transcriptional activity. *Cell*, 104, 719-30. (2001)
14. Taes Y., Lapauw, B., Vandewalle, S., Zmierczak, H., Goemaere, S., Vanderschueren, D., et al.. Estrogen-specific action on bone geometry and volumetric bone density: Longitudinal observations in an adult with complete androgen insensitivity. *Bone*, 45, 392-7. (2009).
15. Han TS, Goswami D, Trikudanathan S, Creighton SM, Conway GS. Comparison of bone mineral density and body proportions between women with complete androgen insensitivity syndrome and women with gonadal dysgenesis. *Eur J Endocrinol* 2008;159:179–85.
16. Marcus, R., Leary, D., Schneider, D. L., Shane, E., Favus, M., & Quigley, C. A. The contribution of testosterone to skeletal development and maintenance: Lessons from the androgen insensitivity syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 1032-7. (2000).
17. Danilovic, D. L., Correa, P. H., Costa, E. M., Melo, K. F., Mendonca, B. B., & Arnhold, I. J. Height and bone mineral density in androgen insensitivity syndrome with mutations in the androgen receptor gene. *Osteoporos Int*, 18, 369-74. (2007).
18. Sobel V1, Schwartz B, Zhu YS, Cordero JJ, Imperato-McGinley J. Bone mineral density in the complete androgen insensitivity and 5alpha-reductase-2 deficiency syndromes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Aug; 91(8):3017-23. Epub 2006 May 30.
19. Bertelloni, S., Baroncelli, G. I., & Mora, S. Bone health in disorders of sex differentiation. *Sex Dev*, 4, 270-84. (2010).
20. Bertelloni, S., Baroncelli, G. I., Federico, G., Cappa, M., Lala, R., & Saggese, G. Altered bone mineral density in patients with complete androgen insensitivity syndrome. *Horm Res*, 50, 309-14. (1998).
21. Wiren, K. M., Chapman Evans, A., & Zhang, X. W. Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J Endocrinol*, 175, 683-94. (2002).



22. Manolagas, S. C., O'Brien, C. A., & Almeida, M. C. P. C. N. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 9, 699-712.
23. Falahati-Nini, A., Riggs, B. L., Atkinson, E. J., O'Fallon, W. M., Eastell, R., & Khosla, S. C. P. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest*, 106, 1553-60. (2000).
24. Leder, B. Z., LeBlanc, K. M., Schoenfeld, D. A., Eastell, R., & Finkelstein, J. S. Differential effects of androgens and estrogens on bone turnover in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 204-10. (2003).
25. Yasui, T., Uemura, H., Tomita, J., Miyatani, Y., Yamada, M., Miura, M., et al. Association of serum undercarboxylated osteocalcin with serum estradiol in pre-, peri- and early post-menopausal women. *J Endocrinol Invest*, 29, 913-8. (2006).
26. Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M. K., Bouillon, R., & Ohlsson, C. Androgens and bone. *Endocr Rev*, 25, 389-425. (2004)
27. Singhal V, a Madhusmita Misra, a, b and Anne Klibanskib Endocrinology of anorexia nervosa in young people: recent insights. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014 Feb; 21(1): 64–70.
28. Vandenput L, Swinnen JV, Boonen S, Van Herck E, Erben RG, Bouillon R, Vanderschueren D 2004 Role of the androgen receptor in skeletal homeostasis: the androgen-resistant testicular feminized male mouse model. *J Bone Miner Res* 19:1462–1470
29. Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C 2002 Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13498–13503
30. Vanderschueren, D., Vandenput, L., Boonen, S., Lindberg, M. K., Bouillon, R., & Ohlsson, C. *Androgens and bone*. *Endocr Rev*, 25, 389-425. (2004).
31. Esegbona G, Cutner AS, Cuckow PM, Creighton SM. Laparoscopic gonadectomy in paediatric and adolescent girls with intersex disorders. *BJOG* 2003;110:210–2.

32. Pleskacova, J., Hersmus, R., Oosterhuis, J. W., Setyawati, B. A., Faradz, S. M., Cools, M., et al. Tumor risk in disorders of sex development. *Sex Dev*, 4, 259-69.
33. Brown, J., & Warne, G. Practical management of the intersex infant. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 18, 3-23. (2005).