



## **Valutazione dell'attività follicolare ovarica con il dosaggio dell'Inibina B (IB) e dell'ormone Antimülleriano (AMH) nel telarca prematuro isolato e nella pubertà precoce vera**

Arianna Zaroli, Laura Losa, Francesca Marabotto, Mariangela Cisternino

*Clinica Pediatrica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia*

---

### ***Inibina B (IB) e ormone Antimülleriano (AMH) quali indicatori di attività follicolare ovarica***

L'Inibina B è una glicoproteina dimerica prodotta dalle cellule della granulosa dell'ovaio, in piccoli follicoli antrali sotto la stimolazione dell'FSH. L'ormone Antimülleriano (AMH) nella femmina è espresso anch'esso dalle cellule della granulosa e la sua azione è quella di modulare la crescita follicolare e di inibire il reclutamento dei follicoli non dominanti. Il dosaggio dell'AMH non è stato mai effettuato in bambine affette da pubertà precoce.

L'obiettivo del presente studio è quello di valutare la secrezione di IB e AMH in bambine affette da telarca prematuro isolato e da pubertà precoce vera. Sono state arruolate per questo un numero totale di 87 bambine con diagnosi di telarca prematuro isolato o di pubertà precoce vera sia prima che durante trattamento con Analoghi del GnRH; il dosaggio dell'IB ed AMH è stato effettuato in un gruppo di controllo costituito da 26 bambine di pari età, impuberi e non affette da patologia endocrina.

È stato possibile evidenziare un aumento dei valori ematici di IB nella maggior parte delle bambine con telarca prematuro isolato e con pubertà precoce vera prima del trattamento, mentre i valori di IB sono risultati simili a quelli del gruppo di controllo nelle bambine con pubertà precoce durante il trattamento con GnRH-A. I valori di IB hanno mostrato una correlazione significativa con i valori di FSH sia basali che dopo stimolazione con GnRH, a dimostrazione che la sua secrezione è sotto il controllo gonadotropinico.

I livelli sierici dell'ormone AMH nelle bambine con telarca prematuro isolato invece sono risultati significativamente inferiori sia a quelli delle bambine con pubertà precoce prima del trattamento ( $P=0.011$ ) che a quelli delle bambine durante terapia con GnRH-A ( $P=0.037$ ). Al contrario dell'IB, i valori di AMH non sembrano modificarsi durante trattamento con GnRH-A e non correlano con quelli di FSH e LH; i livelli di AMH inoltre correlano positivamente con i valori di estradiolo ( $r=0.24$ ,  $P=0.0264$ ), mettendo in evidenza la presenza di attività secretiva follicolare.

### ***Inhibin B (IB) and Anti-Müllerian hormone (AMH) as indicators of ovarian follicular activity***

Inhibin B is a dimeric glycoprotein secreted by the granulosa cells of the small antral follicles; it is produced when the FSH levels are high enough to recruit follicles and to induce their maturation. Anti-Müllerian hormone in girls is expressed by granulosa cells and it plays an important role in follicles development by inhibiting the recruitment of primordial follicles into the pool of growing ones. AMH dosage has never been performed in girls with central precocious puberty. The aim of this study is to determine IB and AMH levels in girls with premature thelarche and central precocious puberty. We collected blood samples from 87 girls with premature thelarche, central precocious puberty before and during treatment with GnRH Analogues. The control group consisted of 26 healthy prepubertal girls.

Inhibin B levels was higher in the majority of girls with premature thelarche and central precocious puberty before GnRH-A treatment; IB concentration was similar in girls with central precocious puberty during GnRH-A treatment and controls. Inhibin B was significantly correlated to FSH, showing that its secretion is under gonadotropins control. Serum AMH levels are significantly lower in girls with premature thelarche compared with girls with central precocious puberty before ( $P=0.011$ ) and during ( $P=0.037$ ) treatment with GnRH-A. Serum AMH concentrations are not modified by GnRH-A treatment and there is no correlation between AMH levels and FSH or LH; there is a significant ( $r=0.24$ ,  $P=0.0264$ ) positive correlation between AMH and estradiol levels, showing the presence of ovarian follicular activity.

---

## Introduzione

### *Pubertà*

La pubertà è un periodo di transizione tra l'infanzia e l'età adulta durante il quale compaiono e si definiscono i caratteri sessuali secondari e l'apparato riproduttivo raggiunge la completa maturazione fino all'acquisizione della fertilità. Anche se il processo di sviluppo dell'apparato riproduttivo rappresenta l'evento principale della pubertà, non bisogna trascurare che in questa fase della crescita hanno luogo complesse modificazioni somatiche e psichiche che permettono all'adolescente di acquisire l'aspetto fisico e le caratteristiche psichiche proprie dell'età adulta. La pubertà non è un evento che inizia de novo ma va piuttosto inquadrata come una fase dello sviluppo psicosomatico dell'individuo e del funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi. Anche in epoca prepuberale infatti il sistema ipotalamo-ipofisi-gonadi è potenzialmente in grado di funzionare ma si ritiene che esso sia sottoposto al controllo inibitorio di alcuni centri cerebrali che frenano il rilascio di GnRH. Nell'infanzia quantità assai ridotte di ormoni prodotti dalle gonadi sono in grado di inibire la secrezione di GnRH attraverso l'azione del centro tonico; con l'avvicinarsi della pubertà si verifica una riduzione dell'azione inibitoria degli ormoni gonadici a livello del centro tonico con conseguente aumento della liberazione di GnRH e delle gonadotropine FSH e LH. Inizialmente si assiste ad una secrezione pulsatile di LH principalmente nelle ore notturne seguita da picchi secretori di FSH e LH sempre più frequenti, presenti anche nelle ore diurne, che acquisiranno nel tempo un ritmo sempre più pulsatorio, proprio dell'età adulta. Ne consegue una stimolazione delle gonadi a produrre gli ormoni sessuali: testosterone nel testicolo ed estrogeni nelle ovaie con comparsa dei primi segni clinici di pubertà; nel maschio si ha inizialmente aumento del volume dei testicoli cui seguono l'ingrandimento dell'asta e dello scroto, pubarca, comparsa di pelo ascellare e di erezioni. Spesso si presenta acne. Nella femmina compaiono il telarca, l'estrogenizzazione vulvare associata a leucorrea e solo successivamente il pubarca e il pelo ascellare. All'ecografia pelvica si nota l'aspetto pubere dell'utero e delle ovaie: il primo aumenta di volume in toto, assumendo la tipica forma "a pera" per il prevalere del corpo sul collo; le ovaie, anch'esse ingrandite, presentano numerosi follicoli di dimensioni aumentate. Il processo di maturazione puberale avviene dunque in maniera sequenziale: nella pratica clinica si fa riferimento alla stadiazione proposta da Marshall e Tanner per la descrizione dello sviluppo puberale [1]. In entrambi i sessi la velocità di crescita aumenta bruscamente (si parla infatti di scatto o *spurt* puberale) che è il risultato di un'azione sinergica tra l'ormone della crescita (GH), somatomedine (IGF-1) e steroidi sessuali a livello delle cartilagini di coniugazione. Nelle ragazze la comparsa del telarca avviene nel 95% dei casi tra i 9 e i 12 anni; nei ragazzi l'aumento delle dimensioni testicolari si verifica nel 95% dei casi tra i 10 e i 13 anni. L'intervallo medio di tempo che intercorre tra il telarca e il menarca è di 2.3 anni; l'età media del menarca è di 12.8 anni. Nei maschi l'intervallo medio di tempo che intercorre tra l'aumento del volume testicolare e la completa maturazione della spermatogenesi è di 3 anni.

Si ritiene che l'avvio della pubertà sia condizionato da determinanti di varia natura: da un lato giocano un ruolo significativo i fattori genetici, come dimostrato dalla simile età di comparsa del menarca nell'ambito di famiglie, gruppi etnici e tra gemelli omozigoti; dall'altro non bisogna sottovalutare l'influenza di fattori ambientali quali le condizioni socio-economiche, lo stato di nutrizione e le condizioni igienico-sanitarie.

### ***Pubertà precoce***

Per pubertà precoce s'intende la comparsa di uno o più caratteri sessuali secondari prima degli otto anni nella femmina e prima dei nove anni nel maschio. Queste età di riferimento sono indicative e corrispondono a -2 DS (Deviazioni Standard) rispetto all'età media di inizio della pubertà nella popolazione generale. I limiti cronologici che definiscono la pubertà precoce sono attualmente oggetto di discussione. Infatti, negli ultimi decenni si è osservato un trend all'anticipo dello sviluppo puberale fisiologico, fenomeno che dovrebbe portare ad una ridefinizione dei suddetti limiti, per non considerare precoci delle pubertà fisiologiche [2]. Uno studio americano, condotto su un'ampia popolazione pediatrica, ha dimostrato un anticipo puberale di 1 anno per le bambine di razza Caucasica e di 2 anni per le bambine Afro-Americane, senza anticipazione consensuale dell'età del menarca [3]. Le cause dell'anticipo puberale non sono del tutto note, tuttavia il miglioramento delle condizioni economiche, l'aumentata prevalenza di obesità e la contaminazione ambientale sono probabilmente i fattori maggiormente in causa. Sulla base di questo lavoro la Società Americana di Endocrinologia Pediatrica ha proposto di abbassare i limiti di età che definiscono la pubertà precoce a 7 anni per le bambine bianche ed a 6 anni per quelle di colore [4]. Questa proposta è stata tuttavia contestata da altri studi americani e non è stata condivisa in Europa dove, pur riconoscendo il trend all'anticipo puberale, è stato dimostrato che questo anticipo non influenza sensibilmente i limiti che definiscono la pubertà precoce [2]. Si distinguono tre forme di pubertà precoce: la pubertà precoce gonadotropino-dipendente o centrale o vera (CPP), la pubertà precoce non gonadotropino-dipendente o pseudopubertà precoce e la pubertà precoce incompleta; tutte queste condizioni riconoscono cause diverse (Tabelle 1 e 2).

### ***Pubertà precoce vera***

Analogamente a quanto avviene nella pubertà fisiologica, la CPP è provocata da un aumento della secrezione pulsatile di GnRH, cui consegue un'aumentata secrezione pulsatile di gonadotropine, in particolare di LH e la stimolazione dell'ovaio e del testicolo con produzione rispettivamente di estrogeni e testosterone [2]. La CPP è classificata in idiopatica, a carattere sporadico o spesso anche familiare, oppure neurogena, secondaria cioè ad alterazioni del sistema nervoso centrale. È stato recentemente dimostrato come le forme familiari costituiscano circa 1/3 delle forme idiopatiche; inoltre è stata ipotizzata una trasmissione autosomica dominante, a penetranza variabile sesso dipendente [5]. La CPP ha un'incidenza di 1:5000-1:10000; le forme familiari costituiscono 1/3 delle forme idiopatiche; la forma idiopatica è più frequente nelle femmine che nei maschi. Nelle femmine la pubertà precoce neurogena è più frequente nei primi anni di vita mentre quella idiopatica nella fascia di età compresa tra i sette e gli otto anni, età molto vicina all'epoca dello sviluppo puberale fisiologico [6]. A differenza delle femmine, nei maschi l'insorgenza della pubertà precoce è più uniformemente distribuita per età. In circa la metà dei maschi la pubertà precoce vera è secondaria ad alterazioni del SNC, per questo motivo è sempre indispensabile eseguire una RMN cerebrale in un maschio in cui sia stata posta diagnosi di pubertà precoce centrale. Tra i tumori, il primo in ordine di frequenza è l'amartoma del *tuber cinereum*, una piccola neoformazione benigna costituita da tessuto ipotalamico ectopico, responsabile di pubertà precoce e talvolta anche di crisi comiziali farmaco resistenti [7]. Vi sono soggetti a maggior rischio di sviluppare pubertà precoce; tra di essi i bambini immigrati e provenienti da paesi in via di sviluppo, sia gli adottati sia quelli giunti con la loro famiglia. Possibili cause sono le migliorate condi-

zioni ambientali (nutrizione, igiene ambientale), un migliore ambiente psico-affettivo e il possibile effetto degli *endocrine disruptors* a cui sono stati sottoposti i bimbi stessi o le loro mamme nei paesi di origine [8]. Vi sono poi soggetti con particolari affezioni del SNC in cui esiste un'augmentata frequenza di pubertà precoce (neurofibromatosi, mielomeningocele, idrocefalo) [7]. In questi casi, si ipotizza che le lesioni abbiano leso i centri cerebrali che esercitano azione di freno sul rilascio pulsatile di GnRH nell'infanzia e avviano quindi il processo che porta alla maturazione puberale.

### ***Pseudopubertà precoce***

Alla base di questa forma di pubertà precoce vi è una ipersecrezione di ormoni sessuali, androgeni o estrogeni, non dipendente dalla stimolazione gonadotropinica ipofisaria, ma dovuta all'attività endocrina primitiva delle gonadi o del surrene oppure a secrezione ectopica di gonadotropina corionica (HCG) da parte di tumori. Altra possibile causa di pseudopubertà precoce è l'assunzione di estrogeni o androgeni tramite farmaci o alimenti contaminati. In queste forme le gonadotropine sono basse perchè sopresse per l'azione di feed-back esercitata dagli steroidi. L'eccesso di ormoni provoca uno sviluppo puberale isosessuale o eterosessuale a seconda che i caratteri sessuali secondari siano in armonia o meno con il sesso genotipico: nelle forme eterosessuali si ha la comparsa di segni di virilizzazione nella femmina quali irsutismo e ipertrofia del clitoride, mentre nel maschio si evidenziano segni di femminilizzazione quali essenzialmente la ginecomastia. La pseudopubertà precoce isosessuale si distingue dalla pubertà precoce vera in quanto non viene rispettata la successione regolare delle tappe maturative, potranno comparire ad esempio flussi mestruali prima della completa maturazione dei caratteri sessuali secondari. L'iperproduzione di ormoni da parte delle gonadi può conseguire a tumori dell'ovaio e del testicolo, oppure a sindrome da autonomia testicolare (testotossicosi) e ovarica. Causa di autonomia gonadica comune ai due sessi è la sindrome di McCune-Albright. L'iperfunzione autonoma delle gonadi è provocata da un'alterazione del sistema dell'AMPC, a causa di una mutazione post-zigotica "attivante" del gene *GNAS1* che codifica per la subunità alfa della proteina Gs. Questa proteina stimola l'attività dell'adenilciclasi, cui consegue un'augmentata sintesi di AMPC. Essendo una mutazione post-zigotica, essa può essere variamente espressa in organi e tessuti, tra quelli endocrini oltre alle gonadi anche tiroide, surrene ed adenoipofisi con conseguente quadro di iperfunzione. La presentazione completa della s. di McCune-Albright è caratterizzata dalla triade: pubertà precoce per iperfunzione autonoma gonadica, fibrodisplasia poliostotica per attivazione degli osteoclasti e macchie cutanee caffè-latte per iperproliferazione dei melanociti. Nei 2/3 dei casi possono esserci solo due sintomi o addirittura uno; questo non esclude la possibilità di una trasformazione in sindrome completa anche a distanza di molto tempo. Nella femmina è caratteristica la presenza di cisti ovariche, singole o multiple, che possono ingrandirsi rapidamente e poi regredire, provocando fluttuazioni improvvise dei tassi ematici di estradiolo. Ne consegue un andamento puberale atipico, caratterizzato da periodi di rapida maturazione dei caratteri sessuali secondari con presenza di flussi mestruali alternati a periodi di regressione. La testotossicosi è una sindrome da autonomia testicolare nel maschio provocata da una mutazione attivante del recettore dell'LH. Ne consegue un'iperfunzione testicolare con ipersecrezione di testosterone responsabile delle manifestazioni cliniche. Questa sindrome viene trasmessa come carattere autosomico dominante, ma sono descritti anche casi sporadici. L'iperproduzione di ormoni surrenalici è invece sostanzialmente provocata dalla sindrome adreno-genitale (SAG) congenita o da tumori del surrene. La SAG congenita ha una trasmissione a carattere autosomico recessivo. Essa è provocata da difetti enzimatici della steroidogenesi surrenalica che porta alla formazione di cortisolo. La forma più frequente è dovuta al deficit di 21-idrossilasi. I bassi livelli di cortisolo determinano eccessiva produzione di ACTH e quindi stimolazione cronica del surrene con iperplasia della corteccia surrenalica ed aumentata produzione degli steroidi a monte del difetto enzimatico, che vengono dirottati verso la produzione di androgeni. La forma classica si manifesta già alla nascita con ambiguità

genitale nella femmina e virilizzazione nel maschio con o senza perdita salina. La forma non classica, detta anche *late-onset*, si manifesta tardivamente con un quadro di pseudopubertà precoce [2]. I tumori surrenalici sono di solito virilizzanti, secernono androgeni e pertanto provocano virilizzazione sia nel maschio che nella femmina. Più raramente producono anche estrogeni e provocano ginecomastia nel maschio.

### **Forme incomplete di pubertà precoce**

Per molto tempo le forme incomplete di pubertà precoce, telarca prematuro isolato, pubarca prematuro isolato e menarca prematuro isolato, sono state considerate condizioni parafisiologiche poiché prive di evolutività. Numerosi studi hanno però dimostrato come questo non sia completamente vero.

Il telarca prematuro isolato si presenta nel primo-secondo anno di vita e scompare spontaneamente entro e non oltre il terzo anno di vita; la causa più frequente è un aumento della secrezione di FSH con iperstimolazione dei follicoli ovarici e conseguente aumento degli estrogeni che stimolano la ghiandola mammaria. Nel 14-18% dei casi è stata tuttavia osservata una franca progressione verso la pubertà precoce vera [9-10]. Vi sono poi forme incomplete di pubertà precoce che mostrano quadri clinici intermedi tra il telarca prematuro isolato e la pubertà precoce, essendo caratterizzati da un andamento atipico del telarca, di solito fluttuante, cui si può associare aumento della velocità di crescita e di maturazione scheletrica. Queste forme vengono raggruppate sotto la denominazione di *thelarche variant* o *exaggerated thelarche*. Sono secondarie ad una generica disregolazione ipofisaria ed ovarica. Può essere a volte presente aumento della secrezione pulsatile notturna delle gonadotropine, in altri casi invece la secrezione di tali ormoni risulta soppressa sia durante la notte che dopo test di stimolo con GnRH. Raramente queste forme evolvono in pubertà precoce completa. Di solito in questi casi si osserva un aumento della velocità di crescita e di maturazione scheletrica che invece sono manifestazioni tipiche della pubertà precoce vera.

Il pubarca prematuro isolato può essere o meno associato a peluria ascellare e sudorazione ghiandola apocrina senza altri caratteri sessuali secondari. Spesso può essere considerata la manifestazione clinica dell'adrenarca caratterizzato da aumentata secrezione di androgeni surrenalici, soprattutto DHEA e DHEAS, con valori che corrispondono a quelli di soggetti normali in fase puberale iniziale. Alla base del pubarca è stata anche suggerita un'aumentata sensibilità periferica agli androgeni. Il pubarca prematuro isolato può associarsi ad iperinsulinismo ed insulinoresistenza, specie in bambine obese, ed evolvere in una sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) in età adolescenziale ed adulta. Sempre in età adulta l'iperinsulinismo e l'iperandrogenismo saranno poi responsabili della sindrome metabolica, caratterizzata da ipertensione, dislipidemia, diabete tipo 2, obesità ed elevato rischio cardiovascolare [11].

Il menarca prematuro isolato è una rara condizione caratterizzata da perdite ematiche vaginali periodiche, in assenza di altri caratteri sessuali secondari. Il sanguinamento può manifestarsi già all'età di un anno e protrarsi per alcuni anni per poi cessare fino alla comparsa del menarca fisiologico. È una condizione benigna che non necessita di alcun trattamento e non pregiudica la fertilità futura.

### **Quadro clinico della pubertà precoce**

La sintomatologia della pubertà precoce si può limitare alla comparsa di uno solo dei caratteri sessuali secondari, il telarca nella femmina o il pubarca in entrambi i sessi, che può essere l'unico sintomo di una forma incompleta di pubertà precoce oppure l'esordio di un processo puberale che si completerà successivamente. La presenza invece di più segni di maturazione puberale orienta verso una forma di pubertà precoce vera o una pseudopubertà precoce. Nella pubertà precoce vera i segni di sviluppo puberale compaiono con sequenza analoga a quella della pubertà fisiologica, anche se con ritmo variabile, spesso accelerato, ma in alcuni casi rallentato o a carattere intermittente.

Nel maschio si può osservare inizialmente aumento del volume dei testicoli, cui seguono l'ingrandimento dell'asta e dello scroto, pubarca, comparsa di pelo ascellare e di erezioni ed eiaculazioni. Il volume testicolare ha notevole importanza diagnostica. Le gonadi sono entrambe aumentate di

volume nella pubertà precoce vera o nei rari casi di tumori HCG secernenti e nella testotossicosi. Nei tumori testicolari è aumentata la gonade in cui ha sede la neoplasia; nella pseudopubertà precoce da cause surrenaliche i testicoli sono di volume infantile, a meno che nell'ambito gonadico non sia presente tessuto surrenalico ectopico. Nella femmina si può osservare lo sviluppo mammario, l'estrogenizzazione vulvare e la leucorrea, cui seguono, più o meno ravvicinati, il pubarca ed il pelo ascellare. Sia nel maschio che nella femmina la comparsa dei caratteri sessuali si accompagna a brusco aumento della velocità di crescita e della maturazione scheletrica, quest'ultima responsabile dell'accelerazione dell'età ossea cui consegue una precoce saldatura epifisaria. La pseudopubertà precoce isosessuale è distinguibile dalla pubertà precoce vera poiché non viene rispettata la successione regolare delle tappe maturative; ad esempio, in una bambina con sindrome di McCune-Albright o con tumore dell'ovaio si può verificare la comparsa di flussi mestruali prima del telarca. Nelle forme eterosessuali, si ha nella femmina la comparsa di segni di virilizzazione, quali irsutismo, ipertrofia del clitoride, aumento delle masse muscolari e voce profonda, mentre nel maschio si evidenziano segni di femminilizzazione, quali essenzialmente la ginecomastia.

### ***Iter diagnostico***

La strategia diagnostica della pubertà precoce si articola in diversi livelli. Le indagini di primo livello permettono abitualmente di riconoscere i vari tipi di pubertà precoce: le forme incomplete, la pubertà precoce vera e la pseudopubertà precoce. Successivamente si effettuano le indagini che permettono di risalire all'eziologia della pubertà precoce. L'esame clinico comprende la valutazione dello stadio di sviluppo puberale mediante confronto con gli standard di Tanner [1]. Nel maschio la lunghezza del pene ed il volume gonadico, quest'ultimo misurato con orchidometro di Prader, vengono confrontati con gli appositi percentili di normalità. Nella femmina si ricercheranno i segni di estrogenizzazione: la presenza di succulenza e leucorrea a livello vulvare, l'iperpigmentazione areolare mammaria della linea alba e delle piccole labbra. La valutazione auxologica consiste nella misura del peso e dell'altezza e nel calcolo della velocità di crescita, i dati ottenuti vengono confrontati con gli appositi percentili di normalità. Si cercheranno inoltre altri segni di stimolazione ormonale, quali cute seborroica ed acneica, aumento della peluria, sudorazione ghiandola apocrina, aumento delle masse muscolari. Il riscontro di macchie caffè-latte potrà indirizzare verso la sindrome di McCune-Albright o la neurofibromatosi. Un'attenta palpazione addominale permetterà talora di rilevare la presenza di masse ovariche o surrenaliche. La valutazione dell'età ossea, utilizzando l'Atlante di Greulich e Pyle [12] e l'ecografia pelvica nella femmina sono i primi due accertamenti strumentali da eseguire, che ci suggeriranno poi l'esecuzione dei dosaggi ormonali. Uno sviluppo puberale precoce si accompagna sempre ad un'accelerazione dell'età ossea (uguale o superiore a 2 DS rispetto all'età cronologica). Le caratteristiche dell'ecografia pelvica che indirizzano verso una pubertà precoce sono rappresentate dall'aumento delle dimensioni dell'utero con diametro longitudinale >4 cm, con dimensioni del corpo che prevalgono su quelle del collo (rapporto COAP/CEAP >1) e con diametro trasversale >1 cm, dalla presenza di endometrio visualizzabile, da un volume ovarico >2 cc e dalla presenza a livello ovarico di più di 6 follicoli, con diametro >4 mm [7]. L'indagine diagnostica ormonale dirimente è il test di stimolo con GnRH per il dosaggio di FSH e LH. Risposte normali di gonadotropine al test o un aumento di FSH orientano verso il telarca prematuro isolato, livelli aumentati di LH (picco >7UI/L, rapporto FSH/LH <1) verso la pubertà precoce centrale, mentre bassi livelli di ambedue sono il reperto tipico delle pubertà precoce periferica. Nel sospetto di patologia surrenalica vanno eseguiti i dosaggi degli ormoni surrenalici sia basali che dopo stimolazione con ACTH. Data la possibile insorgenza di pubertà precoce secondaria ad ipotiroidismo, può anche essere necessario il dosaggio degli ormoni tiroidei e del TSH. Per quel che riguarda gli esami di secondo livello, nella pubertà precoce vera sono necessari l'esame del fondo dell'occhio, la campimetria, l'EEG e la RMN cerebrale. Nella

pseudopubertà precoce il riscontro di livelli elevati degli androgeni surrenalici richiede l'esecuzione del test di stimolo con ACTH e del test di frenaggio con desametasone.

Nel sospetto di una massa ovarica o surrenalica, peraltro già quasi sempre evidenziata con l'ecografia, si renderà necessaria l'esecuzione della TC e/o RMN addominale. Nel sospetto di tumore HCG secernente, questo deve essere ricercato a livello cerebrale, mediastinico, epatico e gonadico. In presenza di un telarca prematuro, l'orientamento iniziale è fornito dall'età cronologica. Al di sotto dei 2 anni, per la verosimile possibilità di un telarca prematuro isolato è sufficiente l'esecuzione di un'ecografia pelvica, diversamente si suggerisce di effettuare valutazione dell'età ossea ed ecografia pelvica. La normalità di questi esami orienta per un telarca prematuro isolato e quindi si rendono necessari controlli periodici per valutarne l'evoluitività. Se vi sono segni di stimolazione estrogenica all'ecografia pelvica ed età ossea accelerata, si può sospettare una pubertà precoce e proseguire con un test di stimolo al GnRH. Allo stesso modo si proseguirà con gli accertamenti qualora il telarca nel corso dei controlli evidenziasse una progressione. In presenza di pubarca prematuro nella femmina, il primo esame da richiedere è una radiografia della mano. Se l'età ossea è normale si può pensare ad un pubarca prematuro isolato e sottoporre la bimba a controlli periodici per valutarne l'evoluitività. Se, al contrario, vi è un'accelerazione dell'età ossea si dovranno dosare gli androgeni (DHEA, DHEA-S, 17OH-P, Androstenedione). In caso di normalità o di modesta elevazione del DHEA-S, con valori corrispondenti a quelli di soggetti puberi, è molto probabile che si tratti di un pubarca prematuro o di un adrenarca fisiologico, condizione che a volte può comportare un'accelerazione dell'età ossea; se i livelli ematici degli androgeni sono elevati ci si orienta verso una pseudopubertà precoce (tumore virilizzante ovarico o surrenalico, SAG o s. di Cushing) che richiede prosecuzione degli accertamenti. In caso di comparsa di altri segni puberali, quali il telarca nella femmina, è necessario proseguire gli accertamenti. Nel maschio con pubarca prematuro, bisogna valutare con orchidometria il volume testicolare. Se questo è aumentato (>4 ml), ci si orienterà verso una pubertà precoce vera e gli accertamenti andranno orientati in tal senso. Se non vi è aumento del volume testicolare, occorre valutare l'età ossea ed i livelli degli androgeni surrenalici. Un'accelerazione dell'età ossea e una elevazione degli androgeni depongono per una pseudopubertà precoce (SAG ad esempio), in caso contrario è verosimile che si tratti di un pubarca prematuro che necessita tuttavia di controlli periodici. Quando la sintomatologia è caratterizzata dalla comparsa di più caratteri sessuali, è verosimile che si tratti di una pubertà precoce completa; sarà pertanto possibile distinguere la pubertà precoce vera dalla pseudopubertà precoce con il test di stimolo con GnRH. Nelle femmine con pubertà precoce vera, l'elevazione dell'LH si associa ad utero ingrandito e ovaie anch'esse aumentate di volume e con numerosi follicoli. Nella pseudopubertà precoce, alla ridotta o assente secrezione delle gonadotropine corrisponde la presenza di utero pubere per forma e dimensioni, mentre a carico delle ovaie può esserci una massa (cisti o tumore), oppure un aumento di volume con aspetto multicistico.

### ***Trattamento della pubertà precoce***

Il trattamento della pubertà precoce si prefigge di arrestare lo sviluppo dei caratteri sessuali secondari e l'accelerata maturazione scheletrica, per evitare da un lato il disagio psicologico provocato dalle modificazioni somatiche e, dall'altro, per evitare la precoce saldatura epifisiaria che è responsabile della bassa statura in età adulta. L'indicazione al trattamento con gli analoghi del GnRH è la pubertà precoce vera a decorso rapidamente progressivo, caratterizzata cioè dal repentino passaggio da uno stadio puberale a quello successivo, dal notevole incremento della velocità di crescita e di maturazione scheletrica e dalla riduzione della previsione di statura definitiva (<150 cm). Il trattamento con analoghi trova inoltre indicazione qualora la pubertà precoce sia responsabile di disturbi di ordine psicologico e psicosociale che possono compromettere la qualità di vita dei pazienti e provocare disturbi emotivi e del comportamento rilevabili anche nell'età successive [13]. A partire dagli anni ottanta sono

stati utilizzati a tal fine alcuni analoghi sintetici del GnRH. Si tratta di farmaci che grazie alla sostituzione di uno o più aminoacidi del GnRH naturale sono molto più potenti di quest'ultimo essendo più affini al recettore ipofisario e più resistenti alla degradazione da parte degli enzimi proteolitici. Legandosi al recettore ipofisario possono esplicare due azioni differenti: se somministrati in maniera pulsatile, stimolano la secrezione ipofisaria di FSH ed LH. La loro somministrazione continua invece provoca, dopo un'iniziale transitoria iperstimolazione, un blocco della secrezione ipofisaria di gonadotropine, con un meccanismo di desensibilizzazione, che consiste nella riduzione del numero di recettori dell'LH, per un fenomeno di down-regulation, e per un alterato metabolismo del recettore stesso. Ne consegue anomala e ridotta biosintesi delle gonadotropine, per alterazione dei meccanismi di trascrizione, traduzione, assemblaggio delle subunità e glicosilazione [14]. Un'esposizione continua al farmaco è dunque fondamentale per un'efficace soppressione della pubertà. Si ottiene così l'inattivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e l'arresto dello sviluppo puberale. Gli analoghi più frequentemente usati per il trattamento della pubertà precoce vera sono la triptorelina (Decapeptyl® o Gonapeptyl® fiale 3.75 mg) e la leuprorelina (Enantone® fiale 3.75 mg) da praticare ogni quattro settimane; si tratta di formulazioni *depot* che consentono un rilascio costante del farmaco nel periodo compreso tra le somministrazioni determinando una soppressione costante della secrezione di gonadotropine e di steroidi gonadici; tali formulazioni assicurano una migliore *compliance* migliorando così l'azione del farmaco sull'arresto puberale. La dose è di 60 µg/Kg per via intramuscolare; in pratica si è soliti utilizzare una fiala da 3.75 mg/iniezione in soggetti di peso >20 Kg, e mezza fiala in quelli con peso <20 Kg. Nelle prime settimane di trattamento, per controbilanciare la fase iniziale di iperstimolazione indotta dagli analoghi, alcuni autori preferiscono associare un antiandrogeno periferico, il ciproterone acetato, per via orale. L'inibizione dello sviluppo puberale indotto dagli analoghi dal GnRH è totalmente reversibile; la secrezione di gonadotropine e di ormoni gonadici si ristabilisce in meno di tre mesi dalla sospensione della terapia, i caratteri sessuali progrediscono e nelle femmine il menarca compare mediamente dopo circa un anno [2]. Per il trattamento delle forme da autonomia ovarica o testicolare, quali la sindrome di McCune-Albright e la testotossicosi, vengono impiegati farmaci antiandrogeni e inibitori della steroidogenesi. Nel maschio sono risultati efficaci il medrossiprogesterone acetato, che inibisce la steroidogenesi testicolare ed il ketoconazolo acetato, farmaco antifungino che sopprime la sintesi degli androgeni sia a livello testicolare che surrenalico. Nelle femmine con sindrome di McCune-Albright sono stati impiegati con scarso successo, sia per quanto riguarda la formazione di cisti ovariche che l'eccessiva maturazione scheletrica, il ciproterone acetato, il medrossiprogesterone acetato ed il testolattone. Nei casi a rapida evoluzione e/o con presenza di cisti ovariche voluminose si rende necessaria la cistectomia ovarica o l'ovariectomia per via laparoscopica. Recentemente sono stati riportati risultati incoraggianti con la somministrazione di anastrozolo (inibitore non steroideo dell'aromatasi) [15] e di tamoxifene (antagonista dei recettori estrogenici) [16], ma il loro impiego è per ora limitato a protocolli sperimentali. Nei rari casi di pseudopubertà precoce da neoplasia a livello gonadico o surrenalico, la terapia è chirurgica seguita da eventuale terapia radiante e chemioterapia in relazione al tipo di tumore.

### ***Inibina B (IB) e ormone Antimülleriano (AMH) quali indicatori dell'attività follicolare ovarica***

L'Inibina è un ormone di natura glicoproteica, presente nel siero in forma di eterodimero; è costituita da due subunità: la subunità  $\alpha$  può legare attraverso ponti disolfuro la subunità  $\beta A$  formando così l'Inibina A; il suo legame con la subunità  $\beta B$  permette la formazione dell'Inibina B [17]. I livelli sierici di questi due ormoni variano considerevolmente in rapporto ai cambiamenti che si verificano nell'attività ovarica dovuti alla progressione della pubertà e all'instaurarsi del ciclo mestruale nella donna. L'inibina A è un ormone specifico per le ovaie essendo prodotto principalmente dal corpo luteo. Nelle bambine in stadio BI di Tanner i livelli sono talmente bassi da non permetterne il dosaggio;



la produzione di Inibina A aumenta progressivamente con l'avanzare della pubertà per raggiungere i valori più alti nella fase luteale del ciclo mestruale. Livelli di Inibina A maggiori di 7 pg/ml (valore limite di identificazione) indicano che l'avvio della pubertà è avvenuto (alta specificità); tuttavia valori inferiori a questo lo non escludono (bassa sensibilità) [17].

L'Inibina B è un ormone prodotto a livello ovarico dalle cellule della granulosa presenti nei piccoli follicoli antrali in risposta alla stimolazione gonadotropinica. I livelli di Inibina B subiscono un aumento repentino intorno all'età di 3 mesi per poi rientrare; questa variazione riflette un'attivazione temporanea dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi che verifica sia nei maschi che nelle femmine e che viene chiamata *minipuberty* [18]. Successivamente diventano molto bassi o quasi non dosabili nelle bambine prepuberi; aumentano improvvisamente nelle prime fasi dello sviluppo puberale e tendono ad abbassarsi nuovamente con l'avvicinarsi del completamento della maturazione puberale (Figura 1). Questi cambiamenti sono riconducibili al fatto che durante le prime fasi di stimolazione ovarica, un consistente numero di follicoli viene reclutato per iniziare la maturazione; solo una parte di questi raggiungerà fasi di sviluppo successive, una parte andrà incontro al processo di atresia. I valori medi di Inibina B dosati nelle ragazze in stadio BIII di Tanner raggiungono livelli più alti rispetto a quelli registrati nelle donne adulte come ad indicare che durante questa fase si verifica una intensa attivazione dei follicoli ovarici [17]. Sebbene la secrezione di Inibina B cominci molto prima dell'instaurarsi di cicli ovulatori, è necessario che i follicoli stimolati raggiungano la fase preantrale per permettere l'elevazione dei livelli sierici dell'ormone [19]. La diminuzione dei valori medi di Inibina B osservati a partire dallo stadio BIII di Tanner in poi e il contemporaneo aumento dei valori di Inibina A suggeriscono che i cicli progressivamente diventano ovulatori, assumendo l'andamento tipico dell'età adulta. L'inibina B è infatti principalmente secreta durante la fase follicolare del ciclo mestruale e l'Inibina A prevale nella fase luteale [17]. Nelle bambine che presentano uno sviluppo puberale precoce di origine centrale è possibile osservare nella maggior parte dei casi valori di Inibina B più alti rispetto a quanto ci si aspetterebbe per l'età; tuttavia i livelli di Inibina B in alcuni casi restano nel range di normalità in relazione ai valori di FSH [19]. A seguito della somministrazione di GnRH agonisti i livelli di Inibina B calano drasticamente per la soppressione dell'FSH [17], dimostrando una dipendenza tra la secrezione di FSH e la produzione di Inibina B.

L'ormone Antimülleriano (AMH) è una glicoproteina dimerica che appartiene alla superfamiglia del transforming growth factor  $\beta$ ; il gene che lo codifica è stato mappato sul braccio corto del cromosoma 19 [20]. Nel maschio viene prodotto dalle cellule del Sertoli immature e nella femmina dalle cellule della granulosa nell'ovaio. La principale funzione biologica dell'AMH è favorire l'involuzione dei dotti del Müller durante l'embriogenesi maschile [21].

Il pattern di espressione di AMH è influenzato dall'età e dal sesso: nel testicolo fetale la produzione dell'ormone inizia ad essere evidenziabile con tecniche di immunoistochimica in campioni di tessuto ottenuto alla 10.5 settimana di gestazione, quando i primi gruppi di cellule del Sertoli circondano le cellule germinali e le gonadi iniziano il processo di differenziazione in testicoli. In campioni precedenti la ricerca da risultati negativi. Durante tutto lo sviluppo fetale e l'infanzia è possibile dimostrare la produzione di AMH in concentrazioni crescenti. In campioni ottenuti da testicoli prelevati da ragazzi in fase peripuberale, nel momento in cui i primi spermatoцитi possono essere evidenziati, l'espressione di AMH subisce un marcato decremento; tale decremento è riscontrabile anche in quei campioni privi di cellule germinali a causa di pregressi trattamenti citotossici, a dimostrazione del fatto che l'espressione di AMH è soppressa anche in assenza di spermatogenesi. Nei ragazzi di età maggiore di 14 anni l'espressione di AMH diminuisce progressivamente tanto che in età adulta non può più essere determinato [22]. L'inibizione della produzione di AMH che si verifica alla pubertà è dovuta alla produzione di androgeni, in particolare al ruolo svolto dal testosterone [20]: i livelli sierici dei due ormoni sono inversamente correlabili [23].

Il dosaggio di questo ormone in età pediatrica ha finalità diagnostiche: è utile per individuare la presenza di tessuto testicolare e per valutarne la funzionalità nel periodo prepuberale: la sua presenza può infatti essere d'aiuto nel differenziare i casi di criptorchidismo bilaterale dall'anorchia e nel distinguere uno pseudoermafroditismo femminile non adrenergico dallo pseudoermafroditismo vero [20]. Inoltre i soggetti con pubertà precoce mostrano livelli di AMH più bassi rispetto ai controlli di pari età e i ragazzi con ritardo puberale invece hanno livelli più alti dei coetanei [24].

A livello ovarico la produzione di AMH inizia a partire dalla 36 settimana di gestazione nelle cellule della granulosa dei follicoli preantrali; l'espressione di questo ormone inizia quindi alla fine della vita fetale e non dopo la nascita come precedentemente riportato [22]. A differenza di quanto avviene nel maschio però i livelli di AMH nelle femmine sono bassissimi alla nascita e subiscono solo un lieve aumento durante l'infanzia, tanto che in molti soggetti di sesso femminile prepuberi l'AMH spesso non è dosabile; nel maschio invece i valori aumentano considerevolmente nel primo anno di vita e raggiungono i livelli più alti in fase prepubere [25]. Solo le cellule della granulosa appartenenti a follicoli secondari, terziari o nello stadio preantrale mostrano con tecniche di immunoistochimica la capacità di produrre l'AMH mentre le cellule della granulosa in follicoli luteali o atresici ne sono prive. In particolare i livelli più alti di espressione di AMH si riscontrano nei follicoli antrali con diametro <4 mm; l'espressione di AMH gradualmente si riduce con l'aumentare delle dimensioni del follicolo [26]. L'AMH regola due fasi critiche dello sviluppo follicolare: è implicato nei meccanismi di reclutamento dei follicoli primordiali attraverso un effetto paracrino e nella selezione del follicolo dominante. In particolare inibisce il passaggio di un pool di follicoli dalla fase primordiale a quella di follicolo primario e diminuisce la sensibilità dei follicoli in maturazione agli stimoli mediati dall'FSH. Questi risultati emergono da studi condotti su topi resi incapaci di produrre l'AMH attraverso la tecnica del knock-out: la mancanza di AMH non influisce sulla fertilità a breve termine ma induce una marcata perdita di follicoli primordiali che avviene precocemente rispetto al gruppo di controllo; questa diminuzione è associata all'aumentato reclutamento di follicoli primordiali che ad ogni ciclo passano dallo stato quiescente a quello in maturazione ed è dimostrata dal fatto che nelle ovaie dei topi AMH-KO è possibile riscontrare un maggior numero di follicoli in fase preantrale rispetto al gruppo dei controlli. L'assenza o la riduzione della produzione di AMH porta ad un esaurimento precoce del pool di follicoli primordiali, con conseguente anticipo nella cessazione dell'ovulazione. L'AMH inoltre inibisce la maturazione dei follicoli mediata dall'FSH, prendendo così parte al processo di selezione del follicolo dominante: una bassa espressione di AMH permette al follicolo di rispondere alla stimolazione indotta dall'FSH e di raggiungere le fasi maturative successive fino all'ovulazione [27]. L'ormone AMH interviene dunque nella fase di reclutamento sia iniziale che ciclico dei follicoli: a partire dallo stadio primario in poi tutti i follicoli chiamati a maturazione esprimono l'AMH, bloccando così il reclutamento di ulteriori follicoli dal pool primordiale; i follicoli che raggiungono delle dimensioni maggiori di 6-8 mm perdono la capacità di produrre l'AMH e per questo saranno più sensibili all'azione stimolante dell'FSH e diventeranno follicoli dominanti [26]. Nelle donne adulte il dosaggio di AMH può essere usato come marker per l'invecchiamento ovarico [26, 28] e come marker per valutare la risposta ovarica nelle pazienti che si sottopongono a stimolazione ormonale per effettuare la fecondazione in vitro [29]. Inoltre nelle pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico (PCOS) i valori medi di AMH sono più alti rispetto ai controlli; ecograficamente è possibile evidenziare una prevalenza di follicoli di piccole dimensioni in grado di produrre l'AMH e che vanno incontro ad un arresto maturativo dovuto alla riduzione della sensibilità del follicolo all'azione dell'FSH mediata dall'AMH stesso [30]. La progressione verso fasi di sviluppo successive risulta bloccata; l'ovulazione non avviene con ciclicità e di conseguenza si verificano periodi di oligo-amenorrea secondaria [31].

## **Obiettivo dello studio**

L'inibina B è prodotta dalle cellule della granulosa dell'ovaio, in piccoli follicoli antrali sotto la stimolazione dell' FSH. L'inibina B ha un'importante funzione paracrina in quanto stimola la sintesi di androgeni da parte delle cellule teicali dell'ovaio e quindi la sintesi di estradiolo. L'inibina B quindi è un marker non solo della crescita follicolare e della proliferazione delle cellule della granulosa ma anche indirettamente della produzione di estradiolo da parte di queste.

L'ormone Antimülleriano (AMH) è una glicoproteina dimerica, nelle donne è espresso dalle cellule della granulosa e la sua azione è quella di modulare la crescita follicolare e di inibire il reclutamento dei follicoli non dominanti. L'AMH continua ad essere secreto dai follicoli sino a quando questi non raggiungono le dimensioni e lo stadio di differenziazione per cui possono essere reclutati come follicoli dominanti dall'azione dell' FSH ipofisario. I livelli di AMH nella femmina sono molto bassi alla nascita [22] e mostrano un lieve incremento solo dopo la pubertà [32]. Il dosaggio dell'AMH nella donna si è rivelato utile come marker di disfunzione ovarica in pazienti affette da sindrome dell'ovaio policistico (PCOS). I suoi valori ematici sono elevati in questa patologia e si pensa che questo ormone giochi un ruolo nella patogenesi dell'anovulazione PCOS-correlata, oppure che la sua elevazione possa riflettere una maggiore ed evidente riduzione dello sviluppo follicolare e della funzione delle cellule della granulosa. Non sono stati finora condotti studi sui valori dell'AMH nella pubertà precoce. Si vuole valutare la secrezione di IB e AMH in bambine affette da telarca prematuro isolato e da pubertà precoce vera allo scopo di evidenziare la presenza in queste pazienti di attività secretiva delle cellule della granulosa dei follicoli ovarici. Possibili differenze nei livelli di questi due ormoni potrebbero agevolare la diagnosi differenziale tra queste due condizioni. Studiare se una possibile elevazione di IB e AMH nel telarca prematuro isolato possa avere un valore predittivo per lo sviluppo di una pubertà precoce vera. Si vuole inoltre valutare l'influenza della terapia con Analoghi del GnRH (GnRH-A) sull'attività follicolare di pazienti con pubertà precoce vera sottoposte a tale trattamento.

## **Pazienti e metodi**

Sono state arruolate in questo studio un numero totale di 87 bambine con diagnosi di telarca prematuro isolato o di pubertà precoce vera suddivise in 3 gruppi. Il primo gruppo (Gruppo A) è costituito da 25 bambine affette da telarca prematuro isolato di età compresa tra 1.2 e 7.8 anni ( $3.2 \pm 2.2$  DS). Il secondo gruppo (Gruppo B) da 30 bambine con pubertà precoce vera di età compresa tra 1.4 e 9.1 anni ( $7.4 \pm 2.0$ ) indagate al momento della diagnosi e prima di essere sottoposte a trattamento con analoghi del GnRH (GnRH-A), il terzo gruppo (Gruppo C) da 32 bambine con pubertà precoce vera diagnosticata prima degli 8 anni ed in trattamento con Analoghi del GnRH da almeno 6 mesi, l'età al momento dello studio è compresa tra 5.9 e 12.4 anni ( $9.9 \pm 1.5$ ). La diagnosi di telarca prematuro isolato è stata posta in presenza di sviluppo mammario non progressivo, in assenza di altri segni puberali, di accelerazione della velocità di crescita e di avanzamento dell'età ossea. La diagnosi di pubertà precoce vera è stata posta in presenza di progressione dello sviluppo mammario con o senza la presenza di altri segni puberali, aumento della velocità di crescita ( $> +1$ SDS) ed avanzamento dell'età ossea ( $>1$  anno rispetto all'età cronologica). Sono state escluse dallo studio le pazienti con pubertà precoce non gonadotropino-dipendente da causa ovarica o surrenalica. Tutte le pazienti sono state sottoposte a valutazione diagnostica che comprende: l'esame obiettivo generale, la misura dell'altezza e del peso, il calcolo dell'indice di massa corporea (BMI), la velocità di crescita, la valutazione dello stadio puberale, la determinazione dell'età ossea, il dosaggio delle gonadotropine FSH ed LH sia basali che dopo sti-

molazione con GnRH, dell'estradiolo, dell'Inibina B (IB) e dell'ormone Antimülleriano (AMH). Tutte le bambine sono state sottoposte ad ecografia pelvica per la valutazione del volume e della morfologia dell'utero e delle ovaie. Il dosaggio dell'IB ed AMH è stato effettuato in un gruppo di controllo costituito da 26 bambine di pari età, impuberi e non affette da patologia endocrina. Tutte le pazienti affette da pubertà precoce vera hanno eseguito una RMN dell'encefalo inclusa la regione ipofisiaria. Non sono state rilevate anomalie a carico di questa regione. L'altezza è stata misurata utilizzando lo stadio-metro di Harpenden. L'altezza e la velocità di crescita sono state espresse in deviazioni standard (SDS) per l'età cronologica. Lo stadio puberale è stato valutato secondo la classificazione di Marshall e Tanner. In caso di sviluppo mammario asimmetrico, la paziente è stata considerata come appartenente allo stadio clinico più alto. L'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come peso (kg) diviso per il quadrato dell'altezza (m) e l' SDS-BMI è stata calcolata con il metodo di Cacciari *et al.* L'età ossea è stata determinata con il metodo di Greulich e Pyle. I livelli sierici di FSH, LH, E2 sono stati determinati con il metodo immunometrico in chemiluminescenza (Siemens Medical Solution Diagnostics, Milano, Italia). Il dosaggio dell'IB e dell'AMH è stato effettuato con metodo immunoenzimatico: Elisa per IB e metodo immunologico sandwich in due fasi per AMH (Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas e Immunotech A Beckman Coulter Company, Marsiglia), rispettivamente). L'ecografia pelvica è stata eseguita rispettando la tecnica convenzionale a vescica piena usando un ecografo Aloka Prosound SSD 5500 (Aloka, Tokio, Giappone) con un trasduttore convesso da 3.5 a 5 MHz. Sono stati calcolati il volume dell'utero e delle ovaie usando la formula dell'ellissoide ( $V=D1 \times D2 \times D3 \times 0.523$ , dove D1 rappresenta il maggior diametro longitudinale, D2 il maggior diametro antero-posteriore e D3 il maggior diametro trasverso); è stata valutata inoltre la presenza di rima endometriale e di follicoli misurabili. L'aspetto ovarico è stato classificato come omogeneo (senza follicoli misurabili), paucifollicolare (numero di follicoli <6 e diametro <4 mm) e multifollicolare (numero di follicoli >6 e/o diametro >4 mm).

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il test di Shapiro-Wilk per valutare la distribuzione normale delle variabili quantitative. Per riassumere le variabili che presentavano una distribuzione di tipo normale sono stati utilizzati i valori medi e la DS; in caso contrario è stata utilizzata la mediana e l'intervallo Interquartile. Sono stati utilizzati i test parametrici o non parametrici per comparare le variabili quantitative; per le variabili qualitative sono stati applicati il test del chi-quadro o il test esatto di Fisher. Un valore  $P < 0.05$  è stato considerato statisticamente significativo. Tutti i test erano a due code. L'analisi dei dati è stata effettuata con il pacchetto statistico STATA (versione 9; Stata Corporation, College Station, 2008, Texas, USA).

## Risultati

I dati clinici delle bambine con telarca prematuro isolato (Gruppo A), con pubertà precoce pre-trattamento (Gruppo B) e con pubertà precoce durante terapia con GnRH-A (Gruppo C) sono illustrati nella Tabella 3. Le bambine con telarca prematuro isolato e con pubertà precoce pre-trattamento mostrano valori di IB superiori a quelli dei controlli di pari età e delle bambine con pubertà precoce in terapia con GnRH-A (Figure 2 e 3). Tuttavia non vi è significatività tra i vari gruppi per l'ampia dispersione dei valori in tutti i soggetti esaminati compreso i controlli (Tabella 4). I valori di AMH mostrano un comportamento diverso dall'IB: nel gruppo del telarca prematuro isolato questi sono risultati significativamente inferiori sia a quelli delle bambine con pubertà precoce prima del trattamento ( $P=0.011$ ) che a quelli delle bambine durante terapia con GnRH-A e ai controlli ( $P=0.037$ ). (Figure 4 e 5; Tabella 4). Le bambine con pubertà precoce del Gruppo B e C mostrano valori medi di AMH

indistinguibili dai valori del gruppo di controllo. Anche per l'AMH si è osservata un'ampia distribuzione dei valori, tuttavia nelle bambine con pubertà precoce i valori tendono ad essere decisamente più elevati in un numero maggiore di casi.

Se si considerano i casi con valori di IB e AMH >75° quartile (IB >104.78 pg/ml e AMH >5.4 ng/ml) si evidenzia che nel gruppo di pazienti con pubertà precoce vi è un numero significativamente più alto di pazienti con valori di AMH >75° quartile rispetto al gruppo del telarca prematuro isolato (P= 0.04) (Tabella 5). Per quanto riguarda invece i valori di IB, il numero maggiore di casi con valori >75° quartile è nel gruppo delle bambine con telarca prematuro isolato e con pubertà precoce pre-trattamento nonostante non vi sia differenza significativa tra questi gruppi, i controlli e le bambine in trattamento (Tabella 5).

Le caratteristiche ecografiche e le dimensioni dell'utero e delle ovaie sono riportate nella Tabella 4. L'esame ecografico della pelvi ha evidenziato un volume delle ovaie significativamente (P=0.0001) più elevato nelle bambine con pubertà precoce pre-trattamento rispetto a quello delle bimbe con telarca prematuro e con pubertà precoce in trattamento. Nessuna correlazione è stata infine trovata tra IB, AMH e volume delle ovaie. Non sono emerse differenze significative tra l'aspetto strutturale delle ovaie, (struttura omogenea e presenza di aspetto paucifollicolare o multifollicolare) tra i 3 gruppi. Tuttavia, prendendo in esame solo due dei tre aspetti delle ovaie e cioè quello omogeneo e quello paucifollicolare, si è riscontrata una differenza solo modestamente significativa (P=0.044) per quanto riguarda l'aspetto paucifollicolare che risulta presente in un numero maggiore di bambine con pubertà precoce pre-trattamento limitatamente però all'ovaio sinistro, mentre non vi è significatività per quanto riguarda l'ovaio destro. I valori di IB ed AMH sono stati messi a confronto con l'aspetto morfologico dell'ovaio delle bambine dei 3 gruppi (Tabella 6). I valori di IB sono risultati più elevati ma in modo non significativo nelle bambine con aspetto multifollicolare, mentre non vi è differenza dei valori tra aspetto paucifollicolare ed omogeneo. I valori di AMH risultano invece significativamente più elevati sia nelle bambine con aspetto ovarico paucifollicolare che in quelle con aspetto multifollicolare (a destra P=0.0314; a sinistra P=0.0495) rispetto a quelle con aspetto omogeneo: i valori dell'AMH mediamente si collocano al 75° quartile della distribuzione totale dei valori di AMH. Al contrario in presenza di aspetto omogeneo dell'ovaio, i valori di AMH sono più bassi e mediamente si collocano al disotto della mediana della distribuzione totale dei valori. I valori di IB e di AMH non hanno mostrato correlazioni significative con l'età delle pazienti, con l'altezza, con il BMI e con l'accelerazione dell'età ossea.

Per quanto riguarda invece il profilo ormonale, una correlazione positiva è stata trovata tra valori di AMH e di estradiolo (r=0.24, P=0.0264; Figura 7) ma non tra quelli di IB ed estradiolo. I livelli di IB correlano positivamente con i valori di LH (r=0.41, P=0.0391) ma non di FSH nelle bambine con telarca prematuro, mentre questi correlano negativamente con i valori di FSH sia basale che dopo test di stimolo con GnRH (r=-0.50, P=0.0049 e r= -0.42, P=0.0280 rispettivamente) in quelle con pubertà precoce vera pre-trattamento (Figura 6).

## Discussione

Pochi studi sono stati finora condotti sull'attività follicolare ovarica di bambine con pubertà precoce e con telarca prematuro isolato. Alcuni Autori hanno segnalato valori elevati di IB nelle bambine con pubertà precoce e con telarca prematuro isolato [34-35], i livelli di IB si ridurrebbero durante trattamento con Analoghi del GnRH che determina una soppressione gonadotropinica [34]. Il dosaggio dell'ormone AMH non è mai stato effettuato finora nella pubertà precoce vera e nel telarca prematuro isolato. Il risultati di questo studio hanno evidenziato nelle bambine con telarca prematuro isolato e con pubertà precoce vera valori di IB mediamente superiori a quelli dei controlli di pari sesso ed età.

Tuttavia è stata osservata un'ampia variabilità dei valori di IB in tutti i casi studiati, comprese le bimbe prepuberi prese di controllo. I valori elevati nelle bambine impuberi trova giustificazione nel fatto che la secrezione di IB riflette la presenza di sviluppo follicolare che, come noto, avviene fisiologicamente, seppur in minore misura, anche in età prepubere. D'altra parte i bassi valori evidenziati in alcuni casi con telarca prematuro isolato o con pubertà precoce possono esprimere un'assenza di sviluppo follicolare al momento del prelievo, mentre precedentemente poteva esserci stata una più intensa attività follicolare ovarica che aveva quindi determinato le manifestazioni cliniche. Non è stata rilevata alcuna differenza tra i livelli di IB delle bambine con pubertà precoce vera e di quelle con telarca prematuro isolato, quindi questo ormone non è di aiuto nella diagnosi differenziale di queste due condizioni. Le bambine con pubertà precoce in trattamento con GnRH-A mostrano valori di IB inferiori a quelle delle bambine pre-trattamento e non differenti da quelli dei controlli prepuberi. Questo dato è in accordo con quanto riportato da Sehested [34] che attribuisce la riduzione dell'IB al fatto che la terapia con Analoghi determina una soppressione gonadotropinica, quindi verrebbe meno la stimolazione dell'FSH sullo sviluppo follicolare. Che l'IB sia sotto il controllo dell'FSH è d'altra parte dimostrato dalla correlazione negativa trovata nel nostro studio tra i valori di IB e di FSH nelle bambine con pubertà precoce vera pre-trattamento. L'AMH ha mostrato un comportamento differente dall'IB. Nella pubertà precoce sia pre-trattamento che durante trattamento con GnRH-A i livelli di tale ormone sono mediamente simili a quelli dei controlli prepuberi di pari età, tuttavia un numero maggiore di casi presenta valori superiori alla norma. Nelle bambine con telarca prematuro isolato i valori di AMH sono risultati decisamente bassi. Quindi i valori di IB e di AMH, nonostante ambedue questi ormoni siano di produzione follicolare, non seguono lo stesso andamento e non risultano correlati tra loro. In particolare le bambine con telarca prematuro isolato hanno mostrato valori bassi di AMH ed elevati di IB. Altro dato di interesse è che l'AMH, a differenza dell'IB, non sembra essere influenzato dal trattamento con GnRH-A. Poiché durante terapia con Analoghi la produzione di FSH e di LH viene soppressa, si può ipotizzare che a differenza dell'IB, l'AMH almeno nelle bambine di questo studio con pubertà precoce, non sia gonadotropino-dipendente. D'altra parte non è stata trovata alcuna correlazione tra AMH ed i livelli di FSH ed LH sia basali che dopo stimolo con GnRH in nessun gruppo di pazienti, mentre è stata trovata una correlazione con l'estradiolo che testimonierebbe la presenza di attività follicolare. La correlazione negativa tra i livelli di IB e di LH riscontrata nel telarca prematuro isolato non è stata mai descritta finora. Questo dato potrebbe suggerire che alcuni casi di telarca prematuro isolato che fanno parte di questo studio potranno andare incontro nel tempo ad una pubertà precoce vera, possibilità questa già descritta da alcuni Autori [9]. Il *follow-up* di queste pazienti potrà confermare questa ipotesi. Studi precedenti ecografici hanno dimostrato che nelle bambine con telarca prematuro e con pubertà precoce vera vi sono frequentemente segni di maturazione ovarica con ovaie a struttura disomogenea e con aspetto microcistico [35-37]. Nel nostro studio l'esame ecografico ha evidenziato la presenza di un volume ovarico aumentato a struttura più frequentemente paucifollicolare nelle bambine con pubertà precoce vera rispetto a quelle con telarca prematuro isolato. In ambedue le condizioni vi sono bambine che presentano aspetto ovarico di tipo omogeneo ma che mostrano livelli elevati di IB, dato evidenziato in altri studi [35], non vi è quindi correlazione tra l'aspetto morfologico dell'ovaio e la secrezione di IB. L'AMH d'altra parte è più elevato in presenza di aspetto pauci- e multifollicolare mentre è basso in presenza di aspetto omogeneo. Per concludere i risultati di questo studio suggeriscono che i livelli ematici dell'IB e dell'AMH riflettono la presenza di attività ovarica e quindi sono di grande utilità nella diagnostica della pubertà precoce. I valori di AMH sembrano essere più specifici di quelli dell'IB, finora utilizzati, nell'evidenziare la presenza di maturazione follicolare. Il dosaggio di tale ormone quindi potrà entrare a far parte delle indagini diagnostiche necessarie nei disturbi dello sviluppo puberale ed affiancare utilmente l'esame morfologico delle ovaie condotto con l'ecografia. Lo studio ed il *follow-up* di un maggiore numero di casi potrà confermare o meno questa ipotesi.

## Tabelle e figure.

**Tabella 1. Principali cause di pubertà precoce gonadotropino-dipendente.**

<b>Idiopatica</b>	
<b>Neurogena</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumori del sistema nervoso centrale                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- amartoma del tuber cinereum</li> <li>- glioma del chiasma ottico</li> <li>- astrocitoma</li> <li>- ependimoma</li> <li>- craniofaringioma</li> <li>- pinealoma</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Altri disordini del sistema nervoso centrale                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- processi infiammatori</li> <li>- spina bifida, idrocefalo</li> <li>- neurofibromatosi di Recklinghausen</li> <li>- sclerosi tuberosa</li> <li>- traumi cranici</li> <li>- terapie radianti</li> </ul> </li> </ul>
<b>Hormonal overlapping</b>	
<b>Caduta dei livelli plasmatici di androgeni</b>	

**Tabella 2. Principali cause di pubertà precoce non gonadotropino-dipendente.**

<b>Femmine</b>	<b>Maschi</b>	<b>Femmine e maschi</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumori dell'ovaio                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- stromali</li> <li>- teca, granulosa</li> <li>- androblastoma</li> <li>- a cellule germinali</li> <li>- corio carcinoma</li> <li>- disgerminoma a cellule miste</li> <li>- gonadoblastoma</li> </ul> </li> <li>• Cisti follicolari autonome</li> <li>• Sindrome da autonomia ovarica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumori del testicolo                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- a cellule del Leydig</li> <li>- teratoma</li> <li>- gonadoblastoma</li> </ul> </li> <li>• Sindrome da autonomia testicolare o testo tossicosi</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tumori del surrene</li> <li>• Sindrome di McCune-Albright</li> <li>• SAG congenita</li> <li>• Androgeni o estrogeni esogeni</li> <li>• Secrezione ectopica di gonadotropine (HCG)</li> </ul>

**Tabella 3. Caratteristiche cliniche al momento dello studio delle bambine con telarca prematuro isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B) e con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C). I valori sono espressi come mediana e in parentesi l'intervallo 25°-75° interquartile (Abbreviazioni: BMI= *Body Mass Index*; SDS= *Score della Deviazione Standard*).**

	<b>GRUPPO A n° 25</b>	<b>GRUPPO B n° 30</b>	<b>GRUPPO C n° 32</b>
<b>Età alla comparsa del telarca (anni)</b>	1.2 (0.9-1.9)	7.2 (6.5-7.5)	7.1 (6.9-7.5)
<b>Età al momento dello studio (anni)</b>	2.2 (1.7-4.3)	8 (7.2-8.5)	10 (9.3-11.1)
<b>Altezza-SDS</b>	1.2 (0.4-1.6)	1.4 (-0.9-1.9)	1.5 (0.4-2.3)
<b>BMI-SDS</b>	-0.8 (-1.3-0.2)	0.6 (-0.0-2.1)	1.6 (-0.4-3.1)
<b>Età ossea (anni)</b>	2.2 (1.9-5.5)	9.7 (8.5-10.5)	11.5 (10.5-12.0)
<b>E.C./E.O.</b>	0.9 (0.8-1.1)	0.8 (0.8-0.9)	0.9 (0.8-1.0)
<b>Stadio di Tanner (n° bambine):</b>			
<i>B1</i>	0	0	3
<i>B2</i>	13	10	14
<i>B3</i>	12	14	11
<i>B4</i>	0	6	4

**Tabella 4.** Livelli ematici di Inibina B (IB), ormone Antimülleriano (AMH), Estradiolo, FSH ed LH sia basali (B) che di picco (P) dopo stimolazione con GnRH nelle bambine con telarca prematuro isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B), con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C) e nei controlli di pari età. I dati sono espressi come mediana e in parentesi l'intervallo 25°-75° interquartile (Abbreviazioni: \*)P=0.011 vs gruppo B; §)P=0.037 vs Gruppo C e vs controlli).

	GRUPPO A n° 25	GRUPPO B n° 30	GRUPPO C n° 32	CONTROLLI (n° 26)
<b>IB (pg/ml)</b>	69.5 (15.6-44.5)	46.3 (18.5-104.0)	27.8 (11.2-79.8)	28.3 (11.8-87.8)
<b>AMH (ng/ml)</b>	1.4*§ (1.0-3.9)	3.9 (1.6-5.6)	3.4 (1.3-10.2)	3.3 (2.2-4.9)
<b>Estradiolo (pg/ml)</b>	18.8 (14.8-28.8)	27.9 (17.3-40.0)	23.5 (19.8-31.9)	
<b>FSH-B (UI/L)</b>	2.5 (1.4-4.8)	3.2 (1.9-4.3)	1.0 (0.7-1.5)	
<b>FSH-P (UI/L)</b>	13.5 (9.9-14.1)	9.7 (8.0-12.9)	1.5 (0.8-2.4)	
<b>LH-B (UI/L)</b>	0.1 (0.1-0.1)	0.6 (0.4-1.5)	0.2 (0.1-0.4)	
<b>LH-P (UI/L)</b>	3.7 (1.4-4.8)	11.0 (5.0-21.0)	0.5 (0.3-0.9)	

**Tabella 5.** Valori di IB e AMH >75° quartile nelle bambine con telarca prematuro isolato (Gruppo A), con pubertà precoce vera (Gruppo B), con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (Gruppo C) e nei controlli di pari età. Valori superiori al 75° quartile: IB >104,78 pg/ml; AMH >5,4 ng/ml (Abbreviazioni: \*)P=0.04 vs il Gruppo B).

	IB		AMH	
	n° casi	%	n° casi	%
<b>GRUPPO A (n° 25)</b>	11	44	2	8*
<b>GRUPPO B (n° 30)</b>	7	23.3	9	30
<b>GRUPPO C (n° 32)</b>	5	15.6	12	37.5
<b>CONTROLLI (n° 26)</b>	5	19.2	5	19.2

**Tabella 6.** Caratteristiche ecografiche dell'utero e delle ovaie nelle bambine con telarca prematuro isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B) e con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C). I valori sono espressi come mediana (intervallo 25°-75° interquartile). (Abbreviazioni: \*)P=0.0001 vs Gruppo A e Gruppo C; §)P=0.044 vs Gruppo A e C (dx e sin) e vs Gruppo B (dx); omogeneo= senza follicoli misurabili; paucifollicolare= n° follicoli <6 e con diametro <4 mm; multi follicolare= n° follicoli >6 e diametro >4 mm).

	GRUPPO A (n° 25)	GRUPPO B (n° 30)	GRUPPO C (n° 32)
<b>UTERO (ml)</b>	2.1 (1.6-3.2)	5.6 (3.0-10.2)	3.8 (2.5-6.4)
<b>OVAIO (ml)</b>			
<i>Destro</i>	0.8 (0.5-1.4)	2.8* (1.7-3.7)	1.6 (1.1-2.6)
<i>Sinistro</i>	0.9 (0.6-1.1)	2.1* (1.5-3.6)	1.6 (1.1-2.2)
<b>ASPETTO OVARICO (n° casi)</b>			
<i>Omogeneo (dx/sin)</i>	20(33%)/20(32%)	18 (28.3%)/18(29%)	23 (38.3%)/24(38.7%)
<i>Paucifollicolare (dx/sin)</i>	2 (14.3%)/2 (14.3%)	8 (57.1%)/(64.3%)§	4 (28.6%)/3 (21.4%)
<i>Multifollicolare (dx/sin)</i>	1 (25%)/1 (25%)	2 (50%)/2 (50%)	1 (25%)/1 (25%)



Tabella 7. Valori ematici di IB e AMH in relazione all'aspetto strutturale delle ovaie. I valori sono espressi come mediana e in parentesi l'intervallo 25°-75° interquartile. (Abbreviazioni: \*)P=0.0495 vs 0; §)P=0.0314 vs 0; 0) omogeneo, senza follicoli misurabili; 1) paucifollicolare con n° follicoli <6 e con diametro <4 mm; 2) multifollicolare con n° follicoli >6 e con diametro >4mm).

	OVAIO DX			OVAIO SIN		
	0 (n° 60)	1 (n° 14)	2 (n° 5)	0 (n° 62)	1 (n° 15)	2 (n° 4)
<b>IB (pg/ml)</b>	48.0 (12.5-115.9)	30.5 (21.2-59.7)	130.63 (97.8-193.7)	48.0 (13.3-107.0)	46.7 (21.1-134.1)	63.0 (22.9-145.7)
<b>AMH (ng/ml)</b>	1.9 (1.1-4.8)	4.7 <sup>§</sup> (1.5-16.1)	5 <sup>§</sup> (4.56-5.9)	2.0 (1.2-5.4)	4.7* (3.8-5.9)	5.3* (4.7-24.2)

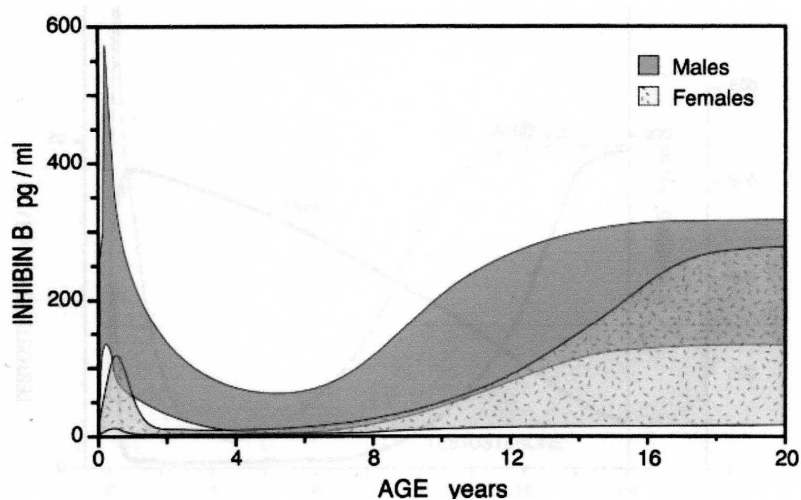


Figura 1. Livelli sierici di Inibina B dalla nascita all'adolescenza nei ragazzi (grigio scuro) e nelle ragazze (grigio chiaro). Le aree colorate indicano il range 5°-95° percentile [19].

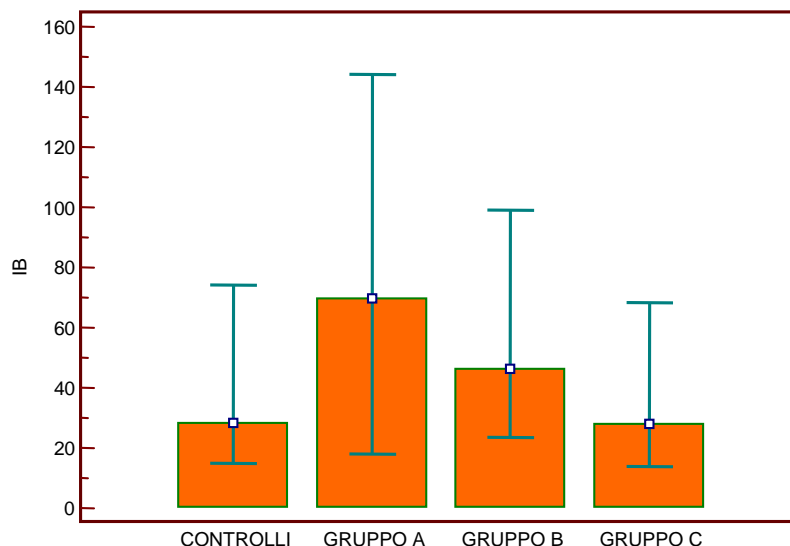


Figura 2. Valori di Inibina B (IB) espressi come mediana nelle bambine con telarca precoce isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B), con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C) e nei controlli di pari età. Barre di errore: intervallo di confidenza 95%.

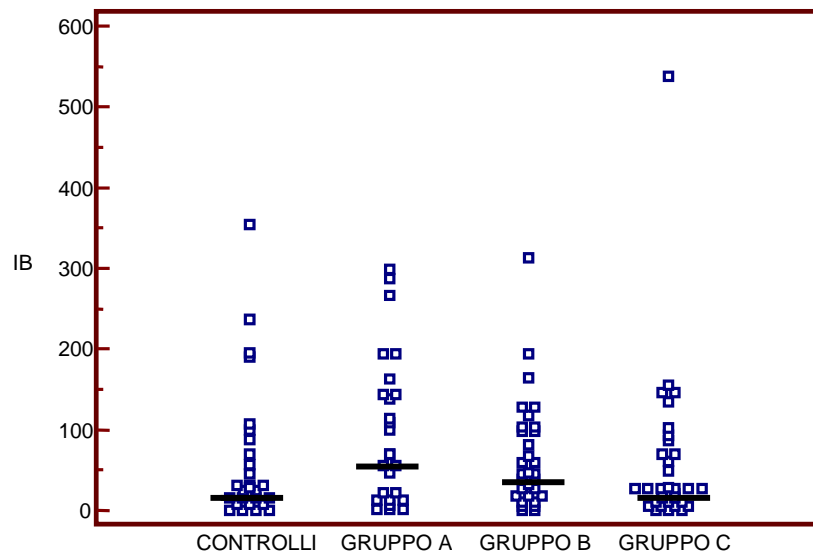


Figura 3. Valori di Inibina B espressi come mediana nelle bambine con telarca prematuro isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B), con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C) e nei controlli di pari età. La linea indica il 50° quartile.

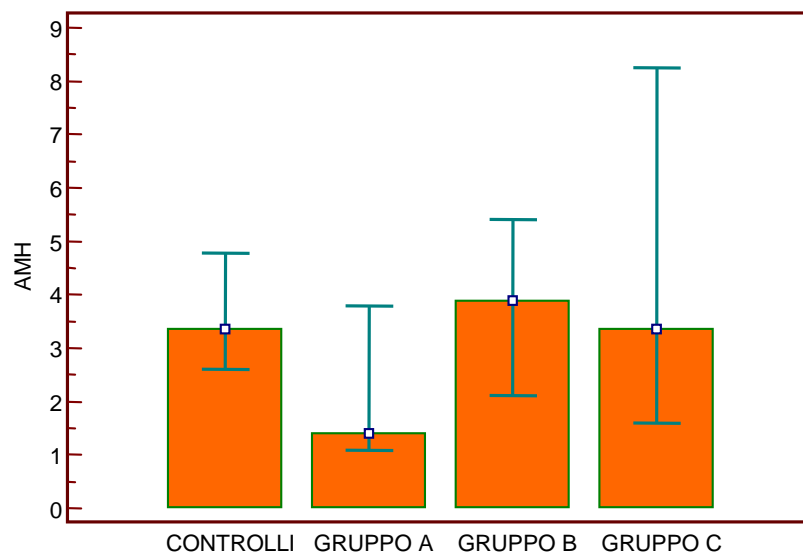


Figura 4. Valori di AMH espressi come mediana nelle bambine con telarca prematuro isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B), con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C) e nei controlli di pari età. Barre di errore: intervallo di confidenza 95%.

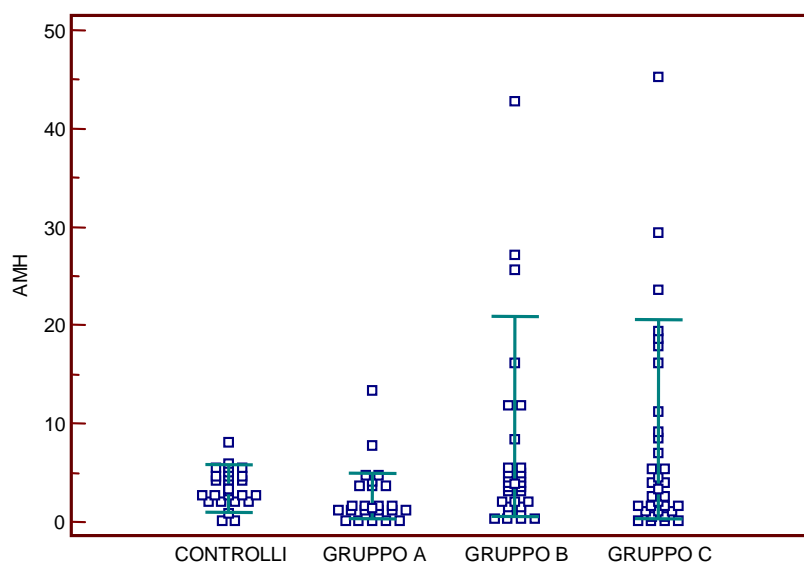


Figura 5. Valori di AMH espressi come mediana nelle bambine con telarca prematuro isolato (gruppo A), con pubertà precoce vera (gruppo B), con pubertà precoce vera in trattamento con GnRH-A (gruppo C) e nei controlli di pari età. Le barre di errore indicano il 10°-90° percentile.

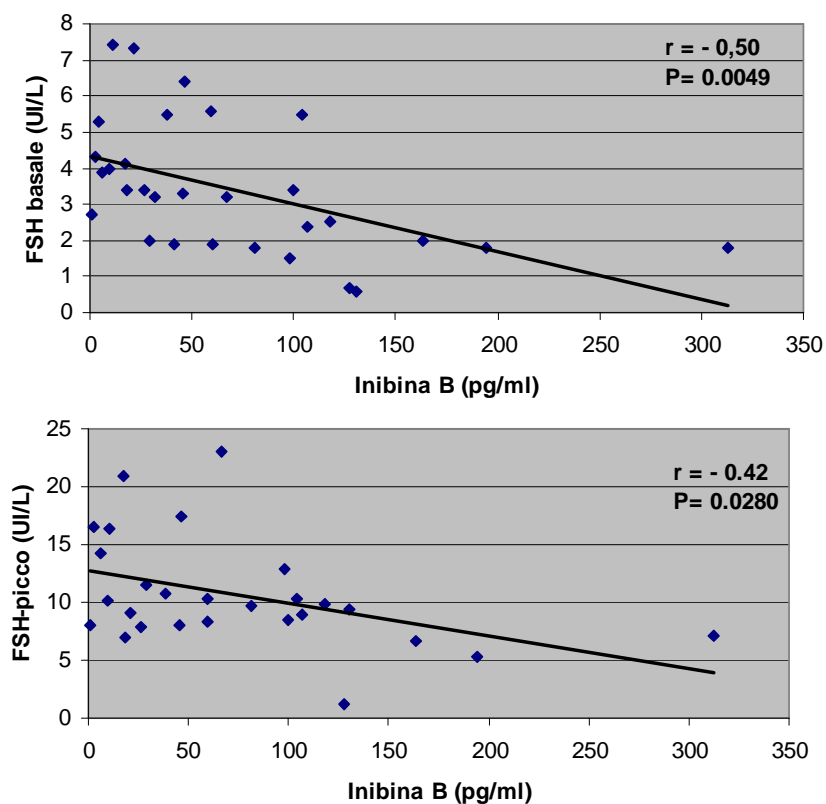
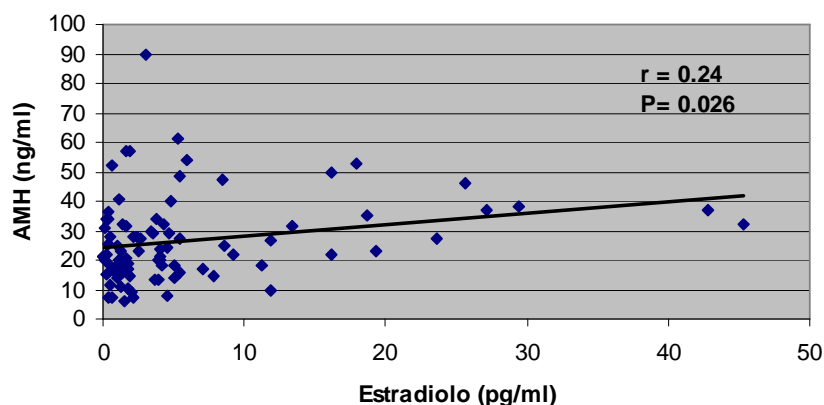


Figura 6. Correlazione IB e FSH sia basale (sopra) che picco dopo test di stimolo con GnRH (sotto) nelle bambine con pubertà precoce vera prima del trattamento (Gruppo B).



**Figura 7. Correlazione AMH e Estradiolo nelle bambine con telarca prematuro isolato e pubertà precoce vera sia prima che durante trattamento con analoghi del GnRH.**

### Bibliografia

1. Marshall WA, Tanner JM. Variations in patterns of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;44:291.
2. Larizza D, Calcaterra V, Mondello T et al. La pubertà precoce: aspetti diagnostici e terapeutici. *L'Endocrinologo* 2005;6:121-129.
3. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC et al. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. *Pediatrics* 1997;99:505.
4. Kaplowitz PB, Oberfield SE. Reexamination of the age limit for defining when puberty is precocious in girls in the United States: implications for evaluation and treatment. Drug and Therapeutics and Executive Committees of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. *Pediatrics* 1999;103:936.
5. De Vries L, Kauschansky A, Shohat M et al. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:1794.
6. Cisternino M, Arrigo T, Pasquino AM et al. Etiology and age incidence of precocious puberty in girls: a multicentric study. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000;13(suppl. 1):695.
7. Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;56:129.
8. Krstevska-Konstantinova M, Charlier C, Craen M et al. Sexual precocity after immigration from developing countries to Belgium: evidence of previous exposure to organochlorine pesticides. *Hum Reprod* 2001;6:102.
9. Pasquino AM, Pucarelli I, Passeri F et al. Progression of premature thelarche to central precocious puberty. *J Pediatr* 1995;126:131.
10. Volta C, Bernasconi S, Cisternino M et al. Isolated premature thelarche and thelarche variant: clinical and auxological follow-up of 119 girls. *J Endocrinol Invest* 1998;180:21.
11. Welt CK, Gudmundsson JA, Arason G et al. Characterizing discrete subsets of polycystic ovary syndrome as defined by the Rotterdam criteria: the impact of weight on phenotype and metabolic features. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(12):4842-4848.
12. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist, 2nd ed. *Stanford University Press*, Stanford 1959.
13. Heger S, Sippel WG, Partsch CJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue treatment for precocious puberty. *Endocr Dev* 2005;1:8-94.
14. Conn PM, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 2001;324:93-103.
15. Eugster EA, Rubin SD, Reiter EO et al. Tamoxifen treatment for precocious puberty in McCune-Albright syndrome: a multicenter trial. *J Pediatr* 2003;143:160.
16. Roth C, Freiberg C, Zappel H et al. Effective aromatase inhibition by anastrozole in a patient with gonadotropin-independent precocious puberty in McCune-Albright syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002;15:945.
17. Sehested A, Juul A., Andersson AM et al. Serum Inhibin A and Inhibin B in Healthy Prepubertal, Pubertal, and Adolescent Girls and Adult Women: Relation to Age, Stage of Puberty, Menstrual Cycle, Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, and Estradiol Levels. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(4):1634-1640.
18. Chellakooty M, Schmidt IM, Haavisto AM et al. Inhibin A, Inhibin B, Follicle-Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Estradiol, and Sex Hormone-Binding Globulin Levels in 473 Healthy Infant Girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(8):3515-3520.
19. Lahlou N, Roger M. Inhibin B in pubertal development and pubertal disorders. *Semin Reprod Med* 2004;22(3):165-75.
20. Andrea Prader Lecture 1992. Paediatric applications of Anti-Müllerian hormone research. *Horm Res* 1995;43:243-248.
21. Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 1947;36:271-315.
22. Rajpert-De Meys E, Jørgensen N, Graem N et al. Expression of Anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3836-3844.

23. Rey R, Lordereau-Richard I, Carel JC et al. Anti-mullerian hormone and testosterone serum levels are inversely during normal and precocious pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:1220-1226.
24. Baker ML and Hutson JM. Serum levels of mullerian inhibiting substance in boys throughout puberty and in the first two years of life. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;76:245-247.
25. Lee MM, Donahoe PK, Hasegawa T et al. Mullerian inhibiting substance in humans: normal levels from infancy to adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:571-576.
26. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implication for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;10(2):77-83.
27. Durlinger AL, Visser JA, Thrmmen AP. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. *Rep* 2002;124(5):601-609.
28. Alexandra LL, Durlinger, MJ, Gruijters GJ et al. Anti-Müllerian Hormone Inhibits Initiation of Primordial Follicle Growth in the Mouse Ovary. *Endocrinology* 2002;143(3):1076-1084.
29. Fanchin R, Schonäuer LM, Righini C et al. Serum anti-Müllerian hormone dynamics during controlled ovarian hyperstimulation. *Human Reproduction* 2003;18(2):328-332.
30. Pigny P, Merlen E, Robert Y et al. Elevated Serum Level of Anti-Mullerian Hormone in Patients with Polycystic Ovary Syndrome: Relationship to the Ovarian Follicle Excess and to the Follicular Arrest. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(12):5957-5962.
31. La Marca A, Pati M, Orvieto R et al. Serum Anti-Müllerian hormone levels in women with secondary amenorrhea. *Fertil Steril* 2006;85(5):1547-1549.
32. Burger HG, McLachlan RI, Bangah M et al. Serum Inhibin Concentrations Rise Throughout Normal Male and Female Puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(4):689-694.
33. Joop S, Laven E, Mulders, JA et al. Anti-Müllerian Hormone Serum Concentrations in Normoovulatory and Anovulatory Women of Reproductive Age. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(1):318-323.
34. Sehested A, Andersson AM, Müller J et al. Serum Inhibin A and Inhibin B in Central Precocious Puberty before and during Treatment with GnRH Agonists. *Horm Res* 2000;54:84-91.
35. Crofton PM, Evans NE, Wardhaugh B et al. Evidence for increased ovarian follicular activity in girls with premature thelarche. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62(2):205-209.
36. Buzi F, Pilotta A, Dordoni D et al. Pelvic ultrasonography in normal girls and in girls with pubertal precocità. *Acta Paediatr* 1998;87:1138-1145.
37. Macklon NS, Fauser BC. Aspects of Ovarian Follicle Development throughout Life. *Horm Res* 1999;52:161-170.