



## **Pubertà precoce vera ed anomalie del sistema nervoso centrale: delezioni cromosomiche criptiche individuate mediante *array*-CGH**

Alexandra Madè, Francesca Marabotto, Michela Re, Paola Civallero,  
Chiara Visconti, Mariangela Cisternino

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

---

### ***L'analisi array-CGH nello studio di quattro casi di pubertà precoce centrale***

Descriviamo i casi di quattro bambine affette da pubertà precoce associata ad anomalie del sistema nervoso centrale, in cui è stata condotta un'indagine di genetica molecolare con tecnica *array*-CGH.

In una paziente è stata individuata una delezione distale *de novo* del braccio corto del cromosoma 9 [del(9)(p24.3-p23)], inquadrando il caso all'interno della sindrome 9p-, di cui fino ad ora sono stati descritti circa 100 casi [12], uno solo dei quali con pubertà precoce, descritto nel 1979 da SJ Funderburk et al [19]. A nostra conoscenza, quindi, questo sarebbe il secondo caso di pubertà precoce vera associata a delezione distale del braccio corto del cromosoma 9.

In altre due pazienti è stata riscontrata una delezione sul braccio corto del cromosoma 8: nel primo caso questa è localizzata a livello della regione 8p23.2 e determina la perdita di circa 67 Kb; nel secondo caso, invece, la delezione è molto più grande (9.5 Mb), localizzata in regione 8p23.3.1; tuttavia comprende interamente la delezione del caso precedente. In entrambi questi due casi la delezione comporta la perdita del gene CSMD1, noto per essere particolarmente espresso nell'embriogenesi, nell'ovaio ed in modo aberrante in alcuni tumori [13]. La nostra ipotesi è che la perdita di tale gene possa essere implicata, anche se non necessariamente in modo diretto, nell'insorgenza della pubertà precoce; ipotesi che appare assumere ancora più valore confrontando il dato con uno studio di Basinko *et al.* [21] che descrive un caso di pubertà ritardata associato, invece, alla duplicazione di CSMD1.

Nel quarto caso studiato è stata individuata una delezione a livello del cromosoma 8p22, che nel *Database of Genomic Variants* [16], risulta essere annoverata tra le varianti genetiche non patologiche e che, apparentemente, non sembra essere correlata con la patogenesi della pubertà precoce. Tuttavia, il dato deve essere valutato in modo critico, in quanto non è nota l'età di comparsa dei segni puberali e del menarca nel campione di popolazione utilizzato per la definizione delle varianti genomiche non patologiche. La conoscenza di questo dato potrebbe essere utile per poter eventualmente correlare l'età d'inizio della pubertà con varianti genomiche non considerate patologiche.

### ***Array-CGH analysis in the study of four cases affected by central precocious puberty***

We report four cases affected by central precocious puberty associated with central nervous system abnormalities, in which it has been carried on the array-CGH analysis.

In the first case a *de novo* distal deletion of the chromosome 9 short arm [del(9)(p24.3-p23)] was found, as in the cases affected by the 9p- syndrome. Up to now, about 100 cases of 9p- syndrome are reported [12], but only one of them manifested a precocious puberty [19]. To our knowledge, this is the second reported case of precocious puberty associated to 9p distal deletion.

In two patients a deletion of the chromosome 8 short arm was found: in the first case the deletion of about 67 Kb was localized in the region 8p23.2; in the latter case the deletion was localized in the region 8p23.3.1, this deletion was bigger (9,5MB) than the former and contains the deletion observed in the first case. In both the two cases the deletion determines the loss of the gene CSMD1, which is known to be particularly expressed in the ovary during the embryogenesis, and in some kind of cancer cells [13]. We hypothesized that the loss of CSMD1 can be involved in the pathogenesis of the precocious puberty, even if not directly; this hypothesis is supported by the description of a girl affected by delayed puberty associated to a duplication of CSMD1 [21].

In the fourth case a deletion of chromosome 8p22 was found, this deletion is cited in the *Database of Genomic Variants* [16] as a normal variant found in the general population and apparently it should not be related with the pathogenesis of precocious puberty. However, it is unknown the age at the onset of puberty of those cases of the general population carrying this deletion. This information would be useful to relate the age at the onset of puberty with genomic variants that are not considered pathological.

---

## Introduzione

La pubertà precoce è una condizione clinica caratterizzata dalla comparsa di uno o più caratteri sessuali secondari prima degli 8 anni nella bambina e prima dei 9 anni nel bambino.

La pubertà precoce vera (CPP) è determinata dalla prematura attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisogonadi ed in particolare dei neuroni ipotalamici che secernono GnRH in modo pulsatile, determinando un'aumentata secrezione pulsatile di gonadotropine, soprattutto LH, che stimolano le gonadi a produrre gli ormoni sessuali [1]. Nella maggior parte dei casi si tratta di forme idiopatiche [2], una minoranza riconosce un'origine neurogena. Nonostante il principale determinante la variabilità dello sviluppo puberale sia di tipo genetico [3] non sono ancora stati definiti con certezza i geni implicati nella precoce attivazione della secrezione di GnRH che è responsabile della CPP. A differenza delle forme di ipogonadismo ipogonadotropo e ritardo puberale, infatti, sono riportati in letteratura solo pochi casi di CPP in cui sia stato possibile riscontrare anomalie genetiche definite e tali casi presentavano sempre altre caratteristiche fenotipiche peculiari o facevano parte di quadri sindromici ben definiti [4-12].

L'analisi *array-CGH* consente lo studio simultaneo di centinaia o migliaia di *loci* discreti con una risoluzione molto superiore alla metodica citogenetica convenzionale. Appare chiaro, quindi, come questo tipo di diagnostica citogenetica molecolare sia di grande aiuto nell'identificazione di anomalie cromosomiche e nella caratterizzazione genotipica di pazienti con anomalie fenotipiche particolari.

## Scopo del lavoro

La CPP si può associare ad anomalie del sistema nervoso centrale (SNC), ma i meccanismi responsabili di questa associazione non sono noti. Solo per quanto riguarda le forme organiche, quali tumori o esiti di processi infiammatori, si ipotizza che la noxa patogena abbia distrutto i centri cerebrali che provocano l'attivazione dell'asse I-I-G. L'associazione tra la CPP e le altre anomalie del SNC, quali disturbi cognitivi ed epilessia, potrebbe invece riconoscere una causa genetica.

Le tecniche di genetica molecolare più innovative, quale la metodica *array* CGH, consentono oggi di caratterizzare dal punto di vista cromosomico i quadri clinici più complessi, altrimenti difficilmente inquadrabili, quali ritardi mentali non spiegati, sindromi epilettiche e sindrome autistica [13].

Lo scopo di questo studio è quello di ricercare anomalie cromosomiche criptiche mediante tecnica *array*-CGH in pazienti con pubertà precoce vera ed anomalie del sistema nervoso centrale (SNC).

## Materiali e metodi

In questo studio sono stati presi in esame quattro bambine affette da pubertà. I casi proposti sono stati scelti all'interno di una casistica più ampia di pubertà precoce per la contemporanea presenza in esse di segni di sviluppo puberale comparsi prima degli 8 anni ed anomalie del sistema nervoso centrale, o di tipo organico e riscontrate con indagini di *neuro-imaging*, o anomalie epilettiformi rilevate con registrazione EEG, o ancora difetti dello sviluppo psicomotorio e disturbi del linguaggio.

La diagnosi di pubertà precoce vera è stata posta per la comparsa di segni puberali prima degli 8 anni, associata ad aumento della velocità di crescita (>+1 deviazione standard) e ad avanzamento dell'età ossea (>1 anno rispetto all'età cronologica).

La valutazione diagnostica effettuata 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, basali e dopo stimolazione con GnRH, ed il dosaggio dell'estradiolo. Le bambine sono state sottoposte ad ecografia pelvica per la valutazione del volume e della morfologia dell'utero e delle ovaie.

Tutte le pazienti affette da pubertà precoce vera hanno eseguito una RMN dell'encefalo per la ricerca di un'eventuale causa neurogena: anomalie della regione ipotalamo-ipofisaria o dell'encefalo e tumori. A seconda dei casi è stata valutata la necessità di registrare un tracciato EEG, per la ricerca di anomalie epilettiformi. Le pazienti sono state sottoposte a valutazione neuropsichiatrica per definire meglio le caratteristiche del ritardo psicomotorio associato e per la scelta di opportune terapie logopediche e della psicomotricità.

L'altezza è stata misurata utilizzando lo stadiometro di Harpenden ed è stata espressa in deviazioni standard (SDS) in riferimento all'età cronologica.

L'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato come peso (Kg) diviso per il quadrato dell'altezza (m<sup>2</sup>).

Lo stadio puberale è stato valutato secondo la classificazione di Marshall e Tanner [14]. L'età ossea è stata determinata con il metodo di Greulich e Pyle [15].

I livelli sierici di FSH, LH ed estradiolo sono stati determinati con il metodo immunometrico in chemiluminescenza (Siemens Medical Solution Diagnostics, Milano, Italia).

L'ecografia pelvica è stata eseguita rispettando la tecnica convenzionale a vescica piena utilizzando 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) o multifollicolare (numero di follicoli >6 e/o diametro >4 mm).

L'analisi *whole genome array*-CGH è stata eseguita utilizzando la piattaforma 105K, con risoluzione media in condizioni ottimali di 60 Kb (kit 105 AGILENT); una variazione del numero di copie è definita da uno spostamento dal valore di normalità di almeno tre sonde consecutive, le cui posizioni di mappa si riferiscono al *Genome Assembly Mar. 2006*. Nei risultati non sono state considerate patologiche quelle delezioni e/o amplificazioni riportate come varianti genomiche nel *Database of Genomic Variants* [16]. Le analisi sono state eseguite utilizzando DNA femminile (NA15510) come DNA di confronto. L'analisi non è in grado di evidenziare riarrangiamenti cromosomici bilanciati, riarrangiamenti cromosomici sbilanciati nelle regioni pseudoautosomiche dei cromosomi X e Y, e riarrangiamenti cromosomici sbilanciati nelle regioni pericentromeriche. La qualità dell'esperimento (scarsa/buona/eccellente) è valutata in base al *QCmetric* (parametro di controllo della qualità) fornito dal *software* di analisi ed in base alla qualità del DNA.

## Risultati

### *Caso n°1*

Francesca R. è giunta alla nostra osservazione a 7 anni e 7 mesi per pubertà precoce, data la comparsa all'età di 7 anni di pubarca, axillarca, sudorazione acre e scatto di crescita e, successivamente, all'età di 7 anni e 4/12, di telarca. Nata da parto eutocico alla 40<sup>a</sup> settimana di età gestazionale dopo una gravidanza normodecorsa, con un peso alla nascita di 3350 g, una lunghezza di 50 cm ed una circonferenza cranica di 35 cm. Ha presentato ittero neonatale fisiologico che ha richiesto una giornata di fototerapia.

Anamnesi familiare negativa per pubertà precoce, endocrinopatie ed altre malattie degne di nota. Genitori non consanguinei.

Anamnesi personale: Francesca ha mostrato un ritardo dello sviluppo psicomotorio, ha cominciato a camminare all'età di 24 mesi ed è stata sempre seguita a scuola da un'insegnante di sostegno. Sono stati segnalati inoltre deficit di attenzione e concentrazione. Dall'età di 4 anni la bimba è sottoposta a sedute di psicoterapia e psicomotricità per comportamento inquadabile nell'ambito delle disarmonie infantili. All'età di 6 anni ha presentato un'ernia inguinale sinistra ed è stata sottoposta ad erniorrafia.

All'esame obiettivo la paziente ha mostrato le seguenti note dismorfiche e malformative: *facies* particolare con naso piccolo, filtro nasale lungo, bocca larga con labbra fini, lingua a carta geografica, mal posizionamento dei denti inferiori, palato ogivale, taglio degli occhi di tipo mongoloide, epicanto, sopracciglia inarcate, sinofrosi, bassa attaccatura dei capelli, bassa attaccatura dei padiglioni auricolari, brevità del IV metacarpo e metatarso, segni di decalcificazione ungueale (Tabella 1 e Figura 1). L'obiettività cardiaca ha evidenziato un soffio sistolico di 2/6 al *centrum* non sottoposto ad accertamenti perché ritenuto di tipo funzionale; negativa è risultata l'obiettività addominale e toracica.

Alla valutazione auxologica Francesca ha presentato i seguenti valori: altezza 128 cm (88° percentile, SDS +1.19), peso 28.3 kg (90° percentile), BMI 17.3 (SDS +1.35) e Indice Ponderale (IP) 107%. Stadi puberali secondo Tanner: B2, PH2, PA+---. Età ossea secondo Greulich and Pyle 9.5-10 anni, e quindi avanzata di circa 2 anni rispetto all'età anagrafica.

Per la comparsa precoce dei segni puberali, Francesca è stata sottoposta ad accertamenti endocrinologici e *follow-up*: il test di stimolo con GnRH eseguito all'età di 8 anni ha evidenziato valori nettamente elevati di gonadotropine (picco di LH 11.8 U/l e picco di FSH 25.6 U/l); l'ecografia pelvica ha mostrato un quadro compatibile con pubertà precoce con utero di dimensioni aumentate per l'età (diametri: longitudinale 43mm x trasversale 23mm x antero-posteriore 12 mm), rima endometriale non visibile, rapporto corpo-collo (COAP/CEAP) >1. È stata posta così diagnosi di pubertà precoce, inizialmente a lenta progressione, ma in seguito

diventata a decorso rapido, tanto da richiedere terapia soppressiva con analoghi del GnRH (3.75 mg ogni 28 giorni); questa terapia ha provocato una buona soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi ed arresto della pubertà. La terapia è poi stata sospesa all'età di 12 anni.

Francesca ha presentato il menarca a 13 anni e mezzo, i cicli sono stati successivamente irregolari con polimenorrea. A 14 anni e mezzo Francesca ritorna alla nostra osservazione per la fastidiosa comparsa di ipertrofia asimmetrica delle piccole labbra (a destra maggiore che a sinistra), per cui si è reso necessario un intervento chirurgico di exeresi e rimodellamento.

Altri esami ematochimici eseguiti hanno mostrato normale funzionalità epatica, renale e tiroidea, mentre sono risultati elevati i livelli ematici di prolattina (valore massimo 57.4 ng/ml).

La RMN cerebrale è risultata nella norma anche per quanto riguarda la regione ipotalamo-ipofisaria.

L'EEG ha mostrato la presenza di parossismi focali dell'emisfero destro.

Il kariogramma è risultato femminile normale (46 XX), l'analisi delle metafasi di linfociti del sangue periferico mediante FISH, con sonde subtelomeriche ha mostrato una delezione terminale del braccio corto del cromosoma 9 del(9p)(pVYS234B-). Entrambi i genitori hanno cariotipo normale, si tratta quindi di una delezione *de novo*. L'array-CGH dell'intero genoma della paziente ha confermato la presenza di una delezione a livello 9p23-p24.3 di 11Mb.

### **Caso n°2**

Giada C. è giunta alla nostra osservazione all'età di 7 anni e 5 mesi per pubertà precoce, data la comparsa all'età di circa 7 anni di pubarca, axillarca, telarca e scatto di crescita. La bimba è nata da parto con taglio cesareo alla 38<sup>a</sup> settimana di gestazione per presentazione podalica, dopo una gravidanza caratterizzata da minaccia d'aborto alla 33<sup>a</sup> settimana, ed assunzione materna di farmaci anti-ipertensivi ed N-butilbromuro di joscina; alla nascita presentava un peso di 3050 g. Giada ha mostrato un buon adattamento all'ambiente extrauterino, non ha riportato sofferenza respiratoria, né ittero.

Anamnesi familiare negativa per pubertà precoce, endocrinopatie ed altre malattie degne di nota. Non consanguineità dei genitori. Segnalata la presenza nello zio e nella nonna materna di miopatia scapolo-omerale.

Nell'anamnesi personale veniva segnalata la presenza di piede cavo bilaterale, risoltosi al termine dei primi due anni di vita, e di bocca stirata come da paresi di natura indeterminata (probabile ipoplasia del muscolo *depressor oris*). La bambina ha mostrato un ritardo dell'acquisizione delle tappe dello sviluppo psicomotorio: acquisizione della posizione seduta a 9 mesi, della stazione eretta con appoggio bimanuale a circa un anno, e del cammino autonomo a circa 20 mesi. Anche le tappe dello sviluppo del linguaggio sono state acquisite con notevole ritardo: le prime parole sono state pronunciate a 3 anni di vita, per tale motivo, al momento dell'inserimento alla scuola materna, veniva impostata terapia logopedica associata a terapia della psicomotricità. Giada ha frequentato la scuola elementare e la scuola media affiancata da un'insegnante di sostegno. All'età di 6 anni la piccola è stata sottoposta ad intervento di adenoidectomia. Giada è stata sottoposta ad alcuni accertamenti di tipo genetico presso l'Ospedale Regina Margherita di Torino: ricerca della mutazione e pre-mutazione FraX, FISH con sonda per la regione coinvolta nella sindrome di De George/velocardiofaciale, analisi del DNA per la sindrome di Prader-Willi, tutti risultati negativi. In tale sede veniva inoltre esclusa una patologia neuromuscolare.

All'esame obiettivo la paziente ha mostrato le seguenti caratteristiche cliniche: basso impianto delle orecchie, palato ogivale, valgismo delle ginocchia, anomalie della pigmentazione cutanea con alcune macchie ipopigmentate al tronco, *acanthosis nigricans* in regione nucale ed ascellare, adipe sottocutaneo abbondantemente rappresentato, capo mobile, normoconformato, strabismo convergente dell'occhio destro e miopia, presenza di nistagmo a tratti sul piano orizzontale,

asimmetria della rima buccale con stiramento verso destra come da ipoplasia monolaterale del muscolo *depressor oris* (Tabella 2); negativa è risultata l'obiettività cardiaca, toracica e addominale. Alla valutazione auxologica Giada ha presentato i seguenti valori: altezza 143 cm (99° percentile, SDS +2.67), peso 46.7 kg (>97° percentile), BMI 22.8 (SDS +4.74) e Indice Ponderale (IP) 129%. Stadi puberali secondo Tanner: B2, PH3, PA++-. Età ossea secondo Greulich and Pyle: 12 anni, e quindi avanzata di circa 4 anni e 6 mesi rispetto all'età cronologica.

Per la comparsa precoce dei segni puberali, Giada è stata sottoposta ad accertamenti endocrinologici e *follow-up*: il test di stimolo con GnRH, eseguito all'età di 7 anni e 5 mesi, ha evidenziato valori di gonadotropine di tipo pubere (picco di LH 16.1 mU/ml, picco di FSH 6.5 mU/ml); l'ecografia pelvica ha mostrato un quadro compatibile con pubertà precoce con utero di dimensioni aumentate per l'età (diametri: longitudinale 50 mm x trasversale 0.8 mm x antero-posteriore 13.9 mm), rima endometriale non visibile, rapporto corpo/collo (COAP/CEAP) >1, ovaio destro con volume di 0.5 ml ed ovaio sinistro di 3.31 ml con aspetto disomogeneo e follicoli presenti. Pertanto è stata posta diagnosi di pubertà precoce gonadotropine-dipendente ed è stata intrapresa terapia soppressiva con analoghi del GnRH (3.75 mg ogni 28 giorni), che ha provocato una buona soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisogonadi ed arresto della pubertà. La terapia è poi stata sospesa all'età di 11 anni e 5 mesi.

Giada ha presentato il menarca a 12 anni e 8/12, con successiva irregolarità dei cicli mestruali caratterizzati da polimenorrea nei primi due anni.

Altri esami ematochimici eseguiti nel corso degli anni hanno mostrato normale funzionalità epatica, renale e tiroidea; il test di stimolo con Synacten®, ha mostrato normali valori di 17-OHP, permettendo di escludere una sindrome adreno-genitale (SAG), ed un valore di DHEAS superiore alla norma (1.6 mcg/ml), da considerarsi compatibile con adrenarca prematuro.

La RMN cerebrale è risultata nella norma per quanto riguarda l'ipotalamo e l'ipofisi, mentre veniva segnalata, come reperto collaterale, una discreta dilatazione degli spazi perivascolari a livello delle corone raggiate ed in particolare una focale dilatazione di aspetto cistico a livello del polo temporale di sinistra.

L'EEG dopo privazione di sonno ha mostrato anomalie epilettiformi in concomitanza delle quali sono stati segnalati piccoli movimenti distali degli arti inferiori. Sulla base di questo riscontro è stata intrapresa terapia con oxcarbazepina.

Il kariogramma è risultato femminile normale (46 XX); l'analisi delle metafasi di linfociti del sangue periferico mediante FISH con sonde subtelomeriche specifiche per i terminali dei cromosomi 6, 12, 13 e 18q (kit Vysis) non ha mostrato riarrangiamenti telomerici criptici a livello di tali regioni. L'*array*-CGH dell'intero genoma della paziente ha mostrato la presenza di una delezione a livello 8p23.2 di circa 67 Kb.

### **Caso n°3**

Giada M. è giunta alla nostra osservazione all'età di 8 anni e 6 mesi per una valutazione endocrinologica in merito alla comparsa, circa 6 mesi prima, di pubarca, telarca, accelerazione della velocità di crescita, acne e seborrea. Nata con parto eutocico alla 40<sup>a</sup> settimana di gestazione da una gravidanza decorsa con minaccia d'aborto fino al quinto mese e coliche renali, Giada ha presentato un peso alla nascita di 3060g, una lunghezza di 50 cm ed ha mostrato un buon adattamento all'ambiente extrauterino.

L'anamnesi familiare è risultata negativa per pubertà precoce; genitori non consanguinei. Viene segnalata familiarità per sindrome dell'ovaio policistico (madre e zia materna affette); si evidenzia inoltre la presenza di disturbo specifico dell'apprendimento (dislessia) nel padre e nel fratello della probanda.

In anamnesi personale viene segnalato, un ritardo psicomotorio di grado lieve associato ad un disturbo del linguaggio, con EEG nella norma. Giada ha presentato un telarca prematuro all'età di 2 anni, regredito poi spontaneamente a 4 anni.

All'esame obiettivo la paziente ha mostrato le seguenti caratteristiche cliniche: buone condizioni generali, macchia caffè-latte a margini irregolari (2 cm x 1cm) al dorso del piede destro, peluria al labbro superiore, acne sulla fronte (Tabella 3); obiettività cardiaca, toracica e addominale nella norma. Alla valutazione auxologica Giada ha presentato i seguenti valori: altezza 131 cm (71°percentile, SDS +0.56), peso 30.7 kg (75°-90°percentile), BMI 17.9 (SDS +1.39) e Indice Ponderale (IP) 110%. Stadi puberali secondo Tanner: B2, PH2, PA assente. Età ossea secondo Greulich and Pyle avanzata di circa 6 mesi rispetto all'età cronologica.

Altri esami ematochimici eseguiti hanno mostrato normale funzionalità epatica, renale e tiroidea.

L'ecografia pelvica ha visualizzato utero ed ovaie di forma e dimensioni adeguate per l'età.

La paziente è stata quindi persa al *follow-up* e non sono state possibili ulteriori indagini per inquadrare meglio e monitorare lo sviluppo puberale della piccola.

L'analisi di genetica molecolare *array-CGH* ha mostrato una delezione sul braccio corto del cromosoma 8 [del(8)(p23.3-p23.1)] di circa 9.5 Mb. Tale delezione non è presente nei genitori di Giada, pertanto è da considerarsi *de novo*.

#### **Caso n°4**

Denisa è giunta alla nostra osservazione a 7anni e un mese per valutazione in merito a pubertà precoce, data la comparsa all'età di 6 anni e 6 mesi di telarca. La bimba è nata in Romania, da gravidanza caratterizzata fin da subito da dolori addominali ricorrenti e perdite ematiche. Nata da parto eutocico al settimo mese di gestazione, viene riferita dalla madre una probabile sofferenza perinatale, di cui però non si ha documentazione medica. Denisa, presentando un ritardo di crescita intrauterino (IUGR), con un peso alla nascita di 950 g (percentile <3° per età gestazionale), è stata ricoverata presso il reparto di Patologia Neonatale per circa tre mesi.

Anamnesi familiare negativa per pubertà precoce e per patologie endocrinologiche, neurologiche ed autoimmunitarie; la madre ha riferito difficoltà nel portare a termine le gravidanze, con una storia di due aborti spontanei. Non riferita consanguineità dei genitori.

Anamnesi personale: Denisa ha mostrato un ritardo dello sviluppo psicomotorio, la deambulazione autonoma è stata raggiunta a 24 mesi con impaccio, le prime parole sono state pronunciate a 24 mesi; al momento di una valutazione neuropsichiatrica eseguita all'età di 7 anni e 4/12 la bambina non aveva ancora acquisito le abilità di lettura, scrittura e calcolo previste per la sua età.

All'esame obiettivo la paziente ha mostrato reperti di normalità; è stata segnalata la presenza di un'unica macchia caffè-latte di circa 1 cm in regione lombare; non erano presenti note dismorfiche di rilievo (Tabella 4 e Figura 2).

Alla valutazione auxologica Denisa ha presentato i seguenti valori: altezza 117.8 cm (35° percentile, SDS -0.40), peso 25.5 kg (75°-90°percentile), BMI 18.4 (SDS +2.25) e Indice Ponderale (IP) 116%. Stadi puberali secondo Tanner: B3, PH1, PA assente. Età ossea secondo Greulich and Pyle avanzata rispetto all'età cronologica di circa 10 mesi.

Per la comparsa precoce dei segni puberali, Denisa è stata sottoposta ad accertamenti endocrinologici e *follow-up*: il test di stimolo con GnRH, eseguito all'età di 7 anni e 4 mesi, ha evidenziato valori elevati di gonadotropine (picco di LH 14.4 mU/l e picco di FSH 11.5 mU/l); l'ecografia pelvica ha mostrato un utero di dimensioni aumentate per l'età (diametro longitudinale 51 mm, diametro trasverso 11 mm e AP 23 mm), visibile la rima endometriale di 3 mm, con volume dell'ovaio destro di 3.27 ml e volume dell'ovaio sinistro di 1.66 ml, entrambi con presenza di follicoli, il maggiore dei quali con un diametro di 5 mm. È stato pertanto evidenziato un quadro di pubertà precoce gonadotropino-dipendente che ha reso necessaria terapia soppressiva con analoghi del GnRH (3.75 mg ogni 28 giorni), la quale ha determinato una buona soppressione dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi con arresto della pubertà.

Altri esami ematochimici hanno mostrato normale funzionalità epatica e renale; sono risultati, invece, elevati i livelli ematici di TSH, con ormoni tiroidei nei limiti della norma, come da ipotiroidismo subclinico. Per tale motivo è stato effettuato il dosaggio degli anticorpi anti tiroide: gli anti-TG sono risultati negativi, mentre il dosaggio degli anti-TPO ha mostrato una modesta e transitoria positività. L'ecografia tiroidea ha mostrato parametri morfo-strutturali nei limiti della norma.

La RMN cerebrale ha mostrato un quadro di leucomalacia periventricolare, con regolare conformazione della regione ipotalamo-ipofisaria. In seguito alla comparsa di crisi comiziali, è stato registrato un EEG in stato di veglia, che ha mostrato anomalie a tipo punta e punta lenta in regione temporale destra, con sporadiche *bouffées* di punta onda e onda puntuta a proiezione diffusa; pertanto è stata posta diagnosi di epilessia parziale sintomatica ed è stata intrapresa terapia con acido valproico. L'indagine di genetica molecolare *array*-CGH ha mostrato una delezione del braccio corto del cromosoma 8 [del(8)(p22)] di circa 60 Kb. Tale delezione è classificata tra le varianti genomiche presenti nel *Database of Genomic Variants*.

## Discussione

### *Caso n°1 (del9p24.3-23)*

Il caso di Francesca R. è stato chiarito dall'indagine di genetica molecolare *array*-CGH che ha mostrato la presenza di una delezione distale *de novo* del braccio corto del cromosoma 9 [del(9)(p24.3-p23)] (Figura 3); pertanto è possibile classificarlo come appartenente alla sindrome 9p-. In letteratura sono stati fino ad ora descritti circa 100 casi di sindrome 9p- [12]. La maggior parte di questi presenta la delezione del cromosoma 9p a livello di 9p21 [17], tuttavia le principali caratteristiche cliniche sono indipendenti dalla lunghezza della delezione [18].

Il caso qui descritto presenta molte caratteristiche in comune con la sindrome 9p- (Tabella 1), in particolare filtro nasale lungo, taglio degli occhi di tipo mongoloide, epicanto, sopracciglia inarcate, palato ogivale, orecchie a basso impianto, ritardo mentale moderato, ritardo dello sviluppo psico-motorio, ed ernia inguinale, ma non presenta, come gli altri casi di sindrome 9p- descritti, trigonocefalia e sella nasale piatta. La presenza di un soffio sistolico di 2/6 farebbe sospettare la presenza di anomalie cardiache, anch'esse facenti parte del quadro classico di sindrome 9p-, tuttavia Francesca non è mai stata sottoposta ad indagini eco-cardiografiche che potessero confermare il dato. Inoltre, la paziente presenta alcune caratteristiche non tipiche della sindrome 9p- come le anomalie ossee (brevità del quarto metacarpo e metatarso), la lingua a carta geografica, la bocca larga con labbra sottili e malposizionamento dentario, il basso impianto dei capelli, la sinofrosi ed i segni di decalcificazione ungueale.

Per quanto riguarda la pubertà precoce, a nostra conoscenza si tratta del secondo caso descritto in letteratura di pubertà precoce vera associata a delezione distale del braccio corto del cromosoma 9. Il primo caso fu quello di un maschio descritto nel 1979 da SJ Funderburk *et al.* [19]. Il ragazzo descritto, portatore della del(9)(p22->pter) *de novo*, presentava oltre alle caratteristiche peculiari della sindrome 9p- anche pubertà precoce ed esadattilia. L'eventuale riscontro di pubertà precoce non è stato riportato in altri casi di sindrome 9p- che, vista l'età, dovrebbero già essere andati incontro a sviluppo puberale fisiologico.

La comparsa di pubertà precoce insorta all'età di 7 anni e 10 mesi è stata descritta in una bambina, anch'essa portatrice di una delezione del braccio corto del cromosoma 9, ma a livello più prossimale (9p12->9p13.3), da Eshel *et al.* [12]. La piccola presentava le seguenti caratteristiche cliniche: ritardo di sviluppo psicomotorio di grado medio, dismorfie facciali, ambiguità dei genitali, microcefalia, cranio sinostosi, assenza parziale del corpo calloso, bassa statura, basso peso alla nascita, disturbo da deficit di attenzione ed iperattività (ADHD) e pubertà precoce vera [12].



Anomalie dei genitali esterni come ipoplasia delle grandi labbra e piccole labbra prominenti [19] sono stati descritti in alcune pazienti con sindrome 9p-. Un'ipertrofia ed asimmetria delle piccole labbra che ha richiesto la correzione chirurgica è comparsa tardivamente, all'età di 14 anni, anche nella nostra paziente, in concomitanza con la fisiologica stimolazione da parte degli estrogeni, al termine della terapia soppressiva con analoghi del Gn-RH per la pubertà precoce.

### **Casi n°2 e 3 (del 8p23.2, del 8p23.3-23.1)**

Le caratteristiche cliniche di Giada C. (caso n°2) sono riassunte in tabella 2.

L'analisi *array*-CGH dell'intero genoma della paziente ha mostrato la presenza di una delezione a livello 8p23.2 di circa 67 Kb (Figura 4). Dal momento che non è mai stato descritto in letteratura nessun caso di delezione di tale regione cromosomica, non è possibile un confronto fenotipico con altri pazienti genotipicamente simili. Tale delezione comporta la perdita di una parte del gene CSMD1 (*CUB and Sushi multiple domains 1*). Il gene CSMD1 è uno dei più grandi geni di tutto il genoma umano, costituito da 32 esoni, di cui 30 codificanti, che risulta essere particolarmente espresso a livello di alcuni tessuti fetali come fegato, encefalo, midollo spinale e ovaio. Esso codifica per una serie di proteine regolatrici che esplicano la loro funzione interagendo con un elevato numero di altre proteine, tra cui BCL-6, un fattore di repressione della trascrizione espresso nei linfociti B che risulta essere ipermutato o traslocato, ad esempio, in alcuni linfomi. Mutazioni somatiche del gene CSMD1 sono state riscontrate in molti tumori umani, tra cui i tumori squamocellulari della testa e del collo, i carcinomi colo-rettali ed i cistoadenocarcinomi ovarici [20]. Nel nostro caso la delezione riscontrata comprende una piccola sequenza codificante all'interno di una più grande regione non codificante del gene CSMD1.

Nel caso n°3 l'analisi di genetica molecolare *array*-CGH ha mostrato una delezione presente sempre sul braccio corto del cromosoma 8 [del(8)(p23.3-p23.1)] di circa 9.5 Mb, quindi molto più grande della precedente, ma che risulta tuttavia contenerla completamente.

Le caratteristiche cliniche del caso n°3 sono riassunte in tabella 3.

La mappa della regione deleta nel caso n°3 è riportata in figura 5.

La delezione riscontrata in quest'ultimo caso comprende numerosi geni tra cui, di nuovo, il gene CSMD1. In questo caso tale gene è stato completamente perso.

Non vi sono in letteratura altri casi con questa delezione che presentino pubertà precoce, mentre recentemente è stato descritto da Basinko *et al.* [21] il caso di una bambina con una duplicazione cromosomica 8p22-8p23.2, che presentava malformazioni cardiache congenite, difficoltà di linguaggio e pubertà ritardata. La duplicazione della regione cromosomica in questo caso determinava la presenza di una doppia dose del gene CSMD1, che, invece, risulta essere deleta nei nostri casi di pubertà precoce. I dati finora osservati indicherebbero CSMD1 quale possibile gene implicato nella regolazione del *timing* puberale. Questo dato farebbe ipotizzare, inoltre, che anche mutazioni *loss of function* del gene CSMD1, determinino un'anticipazione dello sviluppo puberale. Premesso che in letteratura non sono stati descritti casi con queste caratteristiche, tale ipotesi andrà confermata o meno quando saranno conosciute in modo dettagliato le basi molecolari dell'attività del trascritto di CSMD1. Oltre che il gene CSMD1, in particolare nel caso n°3, la regione cromosomica deleta contiene un gran numero di altri geni che potrebbero avere un ruolo più o meno importante nella determinazione del quadro clinico; tuttavia, l'esiguità di studi di genetica molecolare in pazienti con pubertà precoce vera, descritti in letteratura, non permette di tracciare delle correlazioni precise. Senz'altro il dato rimane interessante e può essere utile come spunto per ulteriori studi che prendano in esame una casistica più ampia

#### **Caso n°4 (del8p22)**

Lo studio con *array*-CGH del caso di Denisa ha mostrato la presenza di una delezione sul braccio corto del cromosoma 8 in regione 22 di circa 60 Kb, che viene classificata nel *Database of Genomic Variants* [16] come variante genomica benigna (Figura 6). Non è noto se la delezione osservata nella nostra paziente sia *de novo* o ereditaria, dal momento che non è stata eseguita nessuna analisi genetica nei genitori. Tale delezione risulta essere abbastanza diffusa nella popolazione generale e non sembra rivestire significato patologico, ad eccezione che per un modesto aumento dell'incidenza di patologie autoimmunitarie nei soggetti portatori. La variante genetica riscontrata determina la delezione del gene *MSR1* codificante per il recettore *scavenger* dei macrofagi, una proteina che, oltre a svolgere funzione recettoriale per le LDL, sembra intervenire in numerosi processi cellulari, non tutti noti; infatti non è conosciuta la base molecolare dell'associazione con l'aumentata predisposizione a sviluppare patologie autoimmuni riscontrata clinicamente [16].

Nel nostro caso, Denisa non presenta alcuna sintomatologia che suggerisca la presenza di patologie su base autoimmunitaria, pertanto non sono stati eseguiti accertamenti di laboratorio in tal senso, ad eccezione del dosaggio degli anticorpi anti-tiroide che hanno evidenziato una modesta e transitoria positività degli anti-TPO in presenza di un ipotiroidismo subclinico.

L'anamnesi familiare è risultata negativa per patologie autoimmunitarie accertate; tuttavia, il riscontro di una storia di aborti ripetuti nella madre di Denisa sarebbe stato degno, a nostro avviso, di alcune indagini, quanto meno per escludere la possibile presenza di una sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi che, se dimostrata, avrebbe avvalorato l'ipotesi di una trasmissione ereditaria della variante genetica. In tabella 4 sono stati riassunti gli aspetti clinici del caso n°4.

Sulla base di quanto detto fino ad ora, sembra poco probabile che il quadro clinico di Denisa possa essere spiegato dall'anomalia genetica rilevata; in particolare i riscontri neuro-patologici sembrerebbero più semplicemente classificabili come esiti della presunta sofferenza perinatale descritta in anamnesi; neanche la pubertà precoce vera dovrebbe essere correlabile all'alterazione genetica rilevata. Tuttavia, non sono note informazioni riguardanti la pubertà e l'epoca del menarca nel campione di popolazione utilizzato come riferimento per la determinazione delle varianti genomiche. La conoscenza di questo dato sarebbe utile per poter tracciare delle correlazioni tra la tendenza all'anticipazione dell'età puberale nella popolazione generale e la prevalenza di varianti genetiche non patologiche, come quella rilevata nella nostra paziente.

#### **Conclusioni**

Obiettivo di questo studio è stata la ricerca di possibili alterazioni genetiche in soggetti con pubertà precoce vera ed anomalie del sistema nervoso centrale.

La tecnica *array*-GCH risulta essere particolarmente costosa, pertanto non applicabile a tutti i casi di pubertà precoce vera, ma razionalmente eseguibile soltanto nei casi più complessi e laddove siano presenti altre caratteristiche cliniche che possano rendere l'indagine più selettiva, come le anomalie del sistema nervoso centrale presenti nelle nostre pazienti.

I risultati ottenuti ci hanno permesso di evidenziare delezioni cromosomiche criptiche che possono contenere geni responsabili, oltre che delle anomalie del sistema nervoso centrale, anche della pubertà precoce. Tuttavia sono necessari ulteriori studi per poter approfondire queste evidenze.

Considerando i dati ottenuti, si può ipotizzare che la ricerca di delezioni cromosomiche criptiche, possa portare all'individuazione di un numero sempre maggiore di geni implicati, non solo nella pubertà precoce, ma anche nel fisiologico anticipo puberale che si è verificato negli ultimi decenni, riconoscendo quindi, oltre alle cause ambientali, anche cause genetiche. Poiché la ricerca andrà estesa a tutto il genoma, è necessaria, tuttavia, una scelta accurata dei pazienti da sottoporre all'indagine genetica con *array*-CGH, facendosi guidare da segni e sintomi ben precisi per i quali è facile presupporre un'origine genetica.

## Tabelle e figure

**Tabella 1. Caratteristiche cliniche presenti nella sindrome 9p- classica descritta da Alfi *et al.* nel 1973 [11] e nel caso n°1 con delezione 9p24.3-p23.**

Sindrome 9p- classica	Caso n° 1
<i>Ritardo mentale moderato</i>	Sì
<i>Ritardo di sviluppo psico-motorio</i>	Sì
<i>Filtro lungo</i>	Sì
<i>Palato ogivale</i>	Sì
<i>Orecchie a basso impianto</i>	Sì
<i>Anomalie cardiache</i>	(?)
<i>Ernia inguinale</i>	Sì
<i>Trigonocefalia</i>	No
<i>Sella nasale piatta</i>	No
<i>Taglio degli occhi di tipo mongoloide</i>	Sì
<i>Epicanto</i>	Sì
<i>Sopracciglia inarcate</i>	Sì
<i>Narici antiverse</i>	No
<i>Piccole labbra prominenti</i>	Sì
	Pubertà precoce vera
	Brevità del IV metacarpo e metatarso
	Bocca larga, labbra fini e malposizionamento
	Lingua a carta geografica
	Segni di decalcificazione ungueale
	Basso impianto dei capelli
	Sinofrosi

**Tabella 2. Aspetti clinici del caso n°2 con delezione 8p23.2.**

Obesità
Ritardo psico-motorio
Basso impianto delle orecchie
Palato ogivale
Valgismo delle ginocchia
Anomalie della pigmentazione cutanea
<i>Acanthosis nigricans</i> nucale ed ascellare
Asimmetria della rima buccale (ipoplasia muscolo <i>depressor oris</i> )
Strabismo convergente occhio destro e miopia
Epilessia
Pubertà precoce vera

**Tabella 3. Aspetti clinici del caso n°3 con delezione 8p23.3-p23.1.**

Obesità
Peluria al labbro superiore ed acne
Macchia caffè-latte al piede destro
Ritardo psicomotorio lieve
Disturbo del linguaggio
Pubertà precoce incompleta

**Tabella 4. Aspetti clinici del caso n°4 con delezione 8p22.**

Restrizione di crescita intrauterina (IUGR)
Ritardo psico-motorio
Leucomalacia periventricolare alla RMN
Epilessia parziale sintomatica
Macchia caffè-latte in regione lombare
Pubertà precoce vera



**Figura 1. Principali caratteristiche cliniche del caso n°1.**



**Figura 2. Volto e profilo del caso n°4: non sono evidenziabili note dismorfiche di rilievo.**

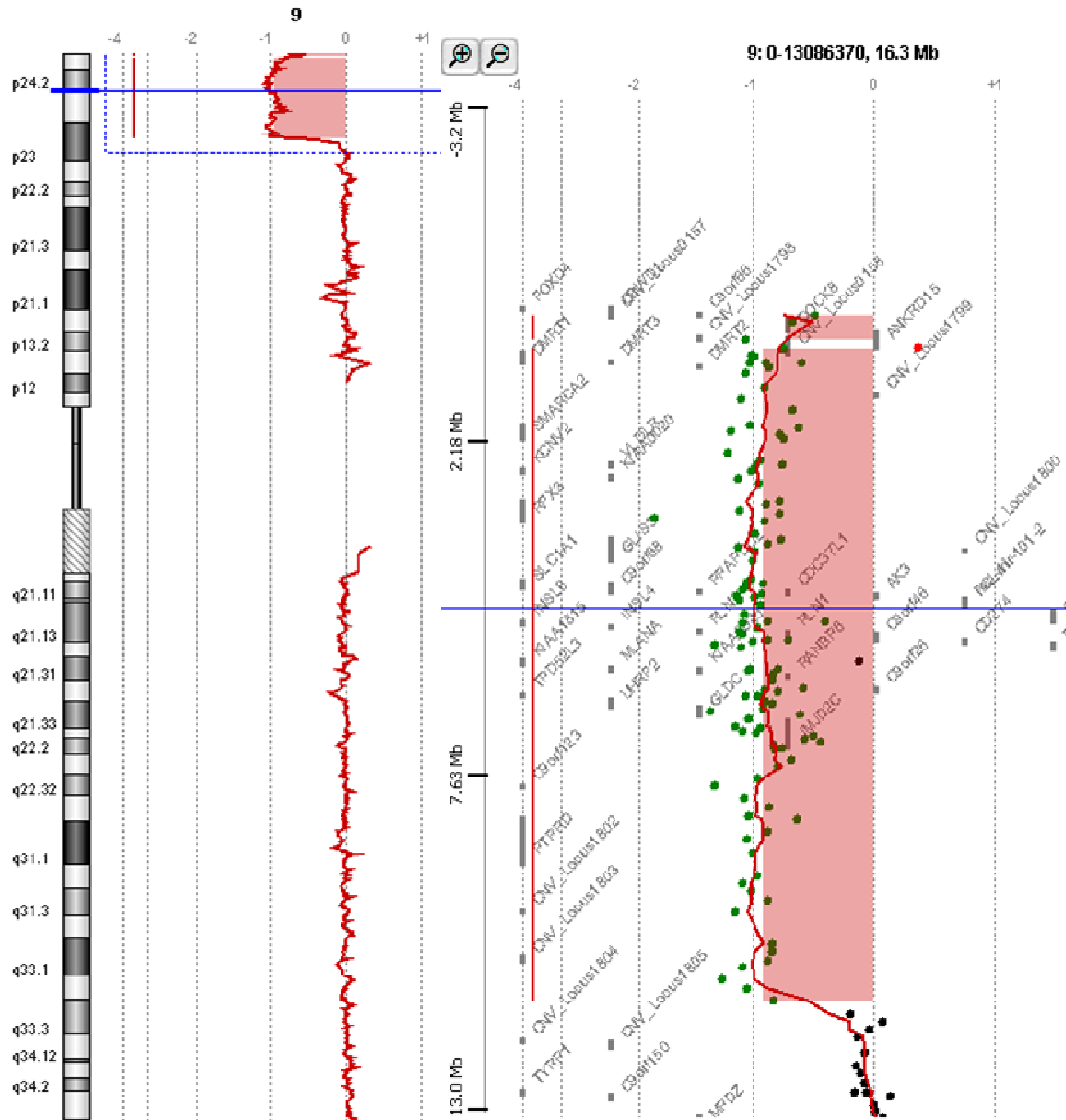


Figura 3. Visualizzazione della regione cromosomica deleta [del(9)(p24.3-p23)] nel caso n°1: viene qui mostrata la mappa del cromosoma 9 schematicamente suddiviso in bande e sottobande, la linea blu tratteggiata a sinistra mette in evidenza la regione cromosomica deleta, sulla destra è possibile osservare un ingrandimento di tale regione ed i rispettivi geni persi.

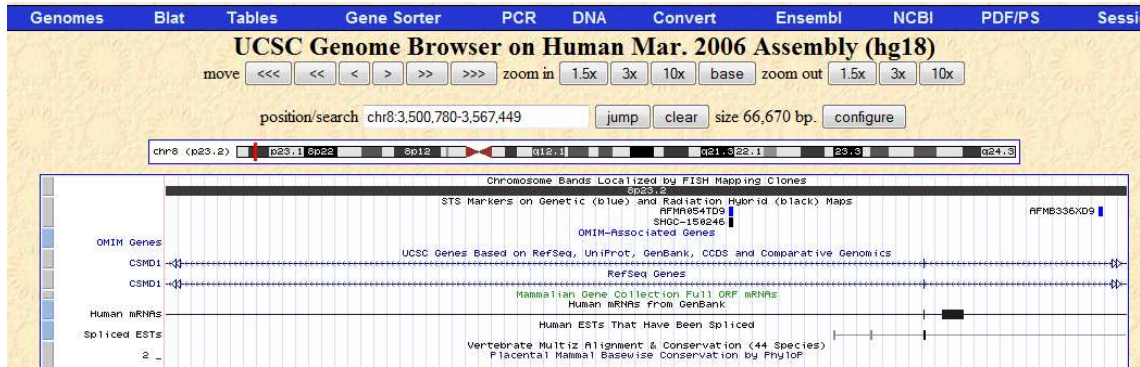


Figura 4. Visualizzazione della regione cromosomica deleta nel caso n°2: l'immagine mostra una schematizzazione del cromosoma 8 suddiviso in bande, su cui la barra rossa verticale indica la regione deleta riscontrata (del 8p23.2), questa regione è stata ingrandita nella parte inferiore della figura, in cui si apprezza la porzione del gene CSMD1 persa; il rettangolo nero corrisponde al trascritto mRNA codificato dalla regione deleta che risulta, quindi, mancante nella nostra paziente.

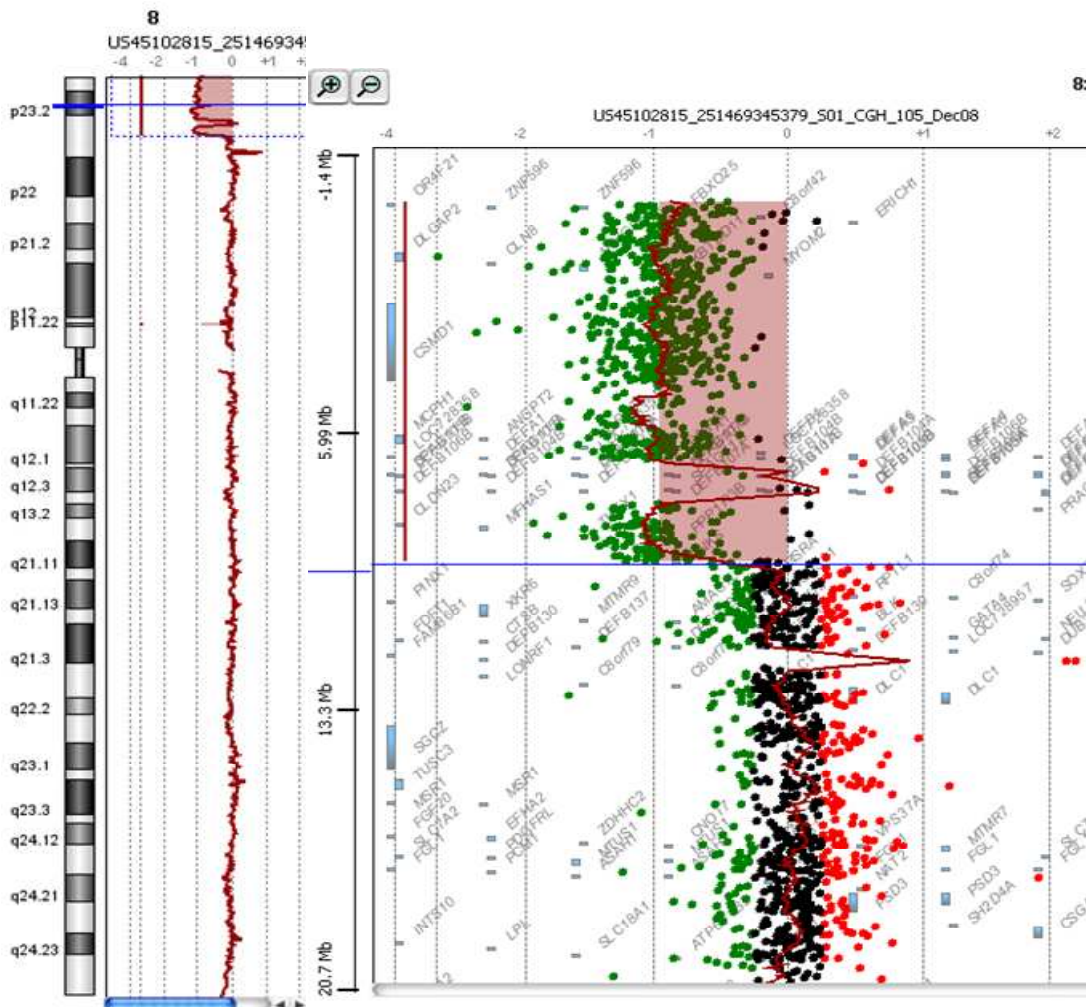
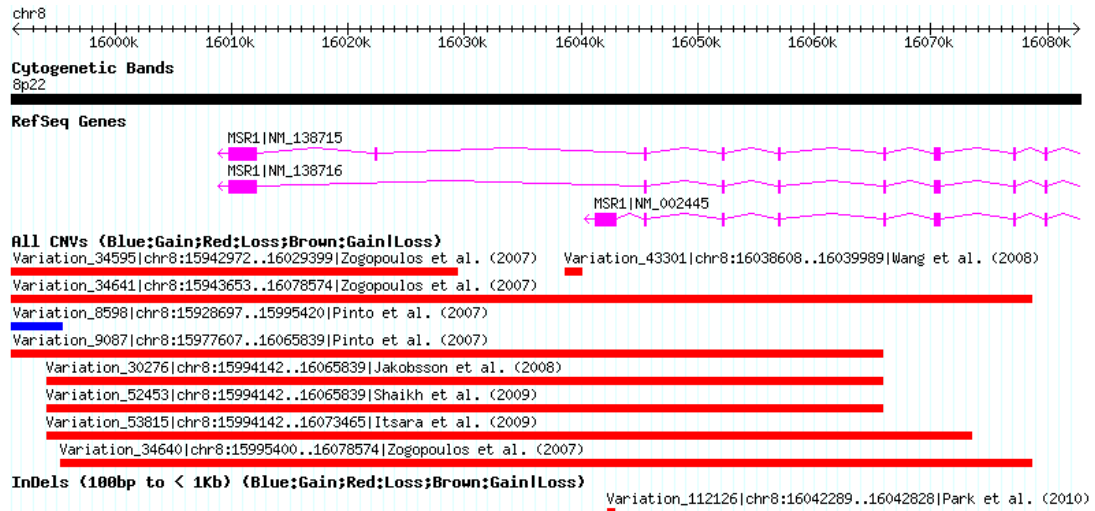


Figura 5. Del(8)(p23.3-p23.1) di circa 9.5 Mb riscontrata nel caso n°3: nella parte destra dell'immagine è schematizzato graficamente il cromosoma 8 suddiviso in bande e sottobande, la linea tratteggiata blu identifica la regione deleta nella nostra paziente, che è stata ingrandita nella parte destra della figura per poter visualizzare meglio i geni persi. Tra questi numerosi geni figura anche CSMD1.



**Figura 6. Visualizzazione della variante genomica rilevata nel caso n°4 (del 8p22): il cromosoma 8 è schematizzato con una linea (in alto) su cui sono riportate le coordinate espresse in Kb. Gli esoni e gli introni del gene MRS1 sono evidenziati in viola; nella parte inferiore della figura sono mostrati i casi descritti in letteratura relativi a tale variante genomica (le barre rosse e blu indicano la diversa lunghezza delle delezioni riscontrate nei vari studi) [16].**

## Bibliografia

1. Larizza D, Calcaterra V, Mondello T et al. La pubertà precoce: aspetti diagnostici e terapeutici. *L'Endocrinologo* 2005;6:121-129.
2. Parent AS, Teilmann G, Juul A et al. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocrine Reviews* 2003;24(5):668-693.
3. Herbison AE. Genetics of puberty. *Horm Res* 2007;68(suppl 5):75-79.
4. Karagüzel G, Akçürin S, Yakut S et al. An unusual case of chromosome 22q11 deletion syndrome with psychiatric disorder, hypoparathyroidism and precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:761-764.
5. Tomoki K. De-novo balanced translocation between 7q31 and 10p14 in a girl with central precocious puberty, moderate mental retardation, and severe speech impairment. *Clin Dysmorphol* 2008;17:31-34.
6. Lybaek A. An 8,9 Mb 19p13 duplication associated with precocious puberty and a sporadic 3,9 Mb 2q23.3q24.1 deletion containing NR4A2 in mentally retarded members of a family with an intrachromosomal 19p-into-19q between-arm insertion. *Eur J Hum Genet* 2009;17:904-910.
7. Saletti V, Canafoglia L, Cambiaso P et al. A CDKL5 mutated child with precocious puberty. *Am J Med Genet* 2009;149A(5):1046-1051.
8. Mutesa L, Hellin AC, Jamar M et al. Precocious puberty associated with partial trisomy 18q and monosomy 11q. *Genet Couns* 2007;18(2):201-207.
9. Buiting K. Clinical features of maternal uniparental disomy 14 in patients with an epimutation and a deletion of the imprinted DLK1/GTL2 gene cluster. *Hum Mutat* 2008;29(9):1141-1146.
10. Grosso S, Balestri P, Anichini C et al. Pubertal disorder in inv dup(15) syndrome. *Gynecol Endocrinol* 2001;15:165-169.
11. Alfi O, Donnell GN, Crandall BF et al. Deletion of the short arm of chromosome 9 (9p-): a new deletion syndrome. *Ann Genet* 1973;16:17-22.
12. Eshel G, Lahat E, Reish O et al. Neurodevelopmental and behavioral abnormalities associated with deletion of chromosome 9p. *J Child Neurol* 2002;17(1):50-51.
13. Stankiewicz P, Beaudet AL. Use of array-Cgh in the evaluation of dysmorfology, malformations, developmental delay, and idiopathic mental retardation. *Curr Opin Genet Dev* 2007;17:1-11.
14. Marshall WA, Tanner JM. Variations in patterns of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969;4:291.
15. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist, 2<sup>nd</sup> Ed. *Stanford University Press*, Stanford 1959.
16. <<<http://projects.tcag.ca/variation/>>>
17. Birth defects encyclopedia. *Blackwell Scientific*, Massachusetts 1990.
18. Huret JL, Leonard C, Forestier B et al. Eleven new cases of del(9p) and features from 80 cases. *Journal of Medical Genetics* 1988;25:741-749.
19. Funderburk SJ, Sparkes RS, Klisak I. The 9p- syndrome. *J Med Genet* 1979;16:75-79.



20. Kuo KT, Guan B, Feng Y et al. Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res* 2009;69(9):4036.
21. Basinko A, Douet-Guilbert N, Le Bris MJ et al. Molecular cytogenetic characterization of an 8p22-8p23.2 duplication derived from a maternal intrachromosomal insertion in a child with congenital heart malformation, delayed puberty and learning disabilities. *Am J Genet* 2008;146A:2950-2954.