

Protocollo per lo studio dei polimorfismi sul gene ER-ALFA e sull'enzima CYP metabolizzante gli steroidi nella pubertà precoce.

possiamo esaminare sia campioni di sangue fresco, se ci pervengono entro 24 ore dal prelievo, sia leucociti isolati secondo la procedura che ti allego e congelati a -70.

CRITERI DI INCLUSIONE:

- GRUPPO 1: soggetti con pubertà precoce : Femmine con comparsa di segni di sviluppo sessuale prima degli 8 anni, maschi con comparsa degli stessi prima dei 9 anni;

Rx mano e polso sx: età ossea avanzata;

Ecografia pelvica:

utero rapporto corpo/collo >1, con diametro longitudinale > 4,5 cm e diametro trasverso = 1,6-3 cm;
ovaie con volume = 4-4,6 cm³.

M orchidometro: Volume testicolare > 3 mL

LH/FSH > 1 dopo stimolo con LHRH.

- GRUPPO 2: casi controllo.

ANALISI DEI POLIMORFISMI GENICI:

Vengono prelevati 6 cc di sangue ed aggiunta 1 gtt di eparina.

IL DNA viene estratto da leucociti di sangue periferico (PBL isolati mediante gradiente di Ficoll-Hypaque) mediante tampone di lisi (SALTING OUT PROCEDURE) costituito da TRIS, NaCl ed EDTA, quindi viene aggiunto SDS (sodio dodecilsolfato) e proteinasi K, ed infine separato tramite etanolo al 100% e mantenuto in tampone TE (TRIS+ EDTA).

L'indagine dei polimorfismi del gene CYP, CYP-17, CYP1B1, CYP1A2 verrà eseguita presso i nostri laboratori.

Il ritiro dei campioni di leucociti isolati possono essere conservati a – 70 fino al momento della spedizione. I campioni di sangue fresco non possono essere conservati, ma devono essere processati entro 24 ore.

Studio dei polimorfismi sul gene ER α e sull'enzima CYP metabolizzante gli steroidi nella pubertà precoce

G. Farello, L. Biordi *, K. Pellegrino, F. Ciarrocchi *, E. Alesse *, M. Duse.

Clinica Pediatrica - Facoltà di Medicina e Chirurgia – L'Aquila

* Patologia Generale – Facoltà di Medicina e Chirurgia – L'Aquila

Introduzione : Recenti evidenze in letteratura hanno dimostrato una associazione positiva tra l'età del menarca e una variazione del geni per i recettori estrogenici in donne adulte.

Noi abbiamo studiato in 14 bambine affette da pubertà precoce i polimorfismi dei seguenti geni : ER-alfa (estrogen-receptor alfa) e il CYP1B1.

Materiali e metodi Genotipizzazione : sono stati analizzati campioni di sangue provenienti da 14 adolescenti di sesso femminile. E' stata eseguita la genotipizzazione per evidenziare polimorfismi sul gene ER α e sull'enzima CYP metabolizzante gli steroidi (CYP17, CYP1B1 e CYP1A2). IL DNA e' stato estratto da leucociti di sangue periferico (PBL) usando procedure standard. L'indagine dei geni di interesse prevedeva l'amplificazione dei campioni con tecnica PCR con l'utilizzo di primers specifici e la successiva analisi mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

Gene ER α : sono stati utilizzati i seguenti primers; 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3'(forward) and 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA- 3' (reverse); l'amplicone ottenuto contiene parte dell' introne 1 e dell'esone 2 del gene ER α dove sono localizzati i polimorfismi dei siti di restrizione XbaI e Pvu II. I prodotti di PCR sono stati digeriti a 37° C con 2 unita' of XbaI (New England BioLabs) per 12 ore e con 2 unita' di PvuII per 2 ore. I polimorfismi del gene CYP sono stati analizzati usando i primers per: CYP-17-(Fw, 5'-CAT TCG CAC CTC TGG AGT C- 3'; Rev, 5'- GGC TCT TGG GGT ACT TG-3'); i prodotti di PCR sono stati digeriti con l'enzima di restrizione Msp-A1 per 12 ore a 37°C. CYP1B1 and CYP1A2 sono stati amplificati con i primers: Fw, 5'- TCA CTT GCT TTT CTC TCT CC-3'; Rev, 5'- AAT TTC AGC TTG CCT CTT G-3'(for CYP1B1) e - Fw, 5'- CAA CCC TGC CAA TCT CAA GCA C- 3'- Rev,5'- AGA AGC TCT GTG GCC GAG AAG G-3' (per CYP1A2). Gli ampliconi ottenuti sono stati trattati con l'enzima di restrizione Eco57I per 12 ore a 37°C. Dopo il trattamento con gli enzimi i campioni sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3% .

Risultati

Polimorfismi del gene ER α :

genotipi PvuII: 6 su 14 sono risultati eterozigoti; 2 su 14 sono risultati omozigoti.

Genotipi XbaI: 5 su 14 sono risultati eterozigoti ; 1 su 14 e' risultato omozigote.

Polimorfismi del gene CYP:

CYP1B1, genotipi Msp-A1 : 2 su 14 sono risultati eterozigoti; 4 su 14 sono risultati omozigoti.

CYP1B1, genotipi Eco57I ;tutti i campioni sono risultati eterozigoti.

Conclusioni: L'elevata positività di tali polimorfismi nella nostra – seppur limitata – casistica dimostra che le descritte varianti geniche sono un fattore importante nella genesi della pubertà precoce. E' comunque necessario aumentare la numerosità della casistica oltre che prevedere nello studio un gruppo di controllo prima di giungere a conclusioni definitive