



PEDIATRIA PREVENTIVA E SOCIALE



Domenica 28 Aprile, h 12.00-14.00

**VI SESSIONE
SARANNO FAMOSI**

PRESIDENTE: Gian Luigi Marseglia
MODERATORI: Pietro Falco, Emilio Iannotta,
Gaetano Moretta, Antonio Scialdone

Dipartimento della Donna, del Bambino e Chirurgia Generale e Specialistica

I livelli plasmatici di **MKRN3** nelle bambine con pubertà precoce centrale prima e durante la terapia bloccante

LUCI OMBRE ABBAGLI

Francesca Aiello, Anna Grandone, Caterina Luongo, Adalgisa Festa, Emanuele Miraglia del Giudice

Prevenzione

Nutrizione

Allergologia

Dermatologia

Gastroenterologia

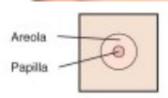
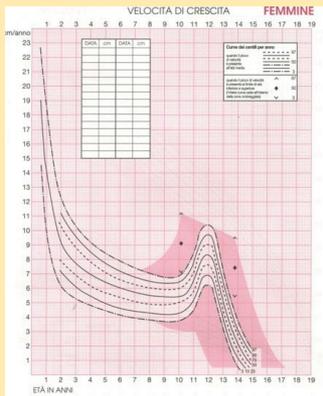


Che cos' é la pubertà precoce centrale?

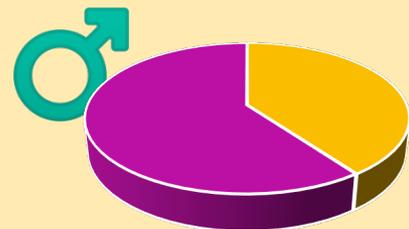
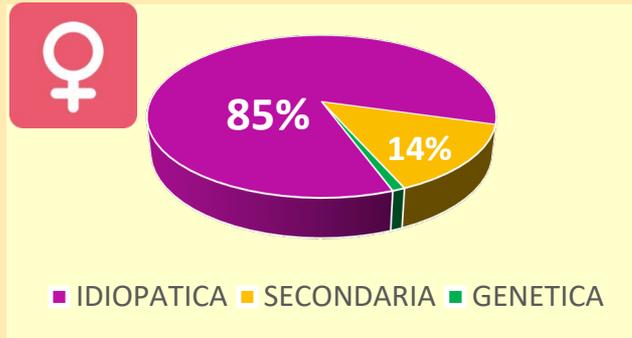
- ❑ Incidenza: 1/5.000-1/10.000 casi;
- ❑ F/M 3:1-23:1;

Si definisce pubertà precoce centrale (PPC) l'attivazione dell'asse ipofisi-gonadi prima degli 8 anni nella femmina, prima dei 9 anni nel maschio (codice di esenzione attribuito RC0040).

Pubertà precoce centrale PDTA 2017



CRITERI LABORATORISTICI: Test di stimolo al GnRH **POSITIVO** ($LH > 5 \text{ UI/L}$ ovvero $LH/FSH > 1$, cut-off ESPE-LWPES),



CRITERI CLINICI: Stadio di Tanner $\geq II$

CRITERI AUXOLOGICI: Peso, H, **VC** (patologica se passa al pt superiore in 6 mesi)



Nel **2013** identificato il gene ***MKRN3***,
causa monogenica più frequente di PPC familiare.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

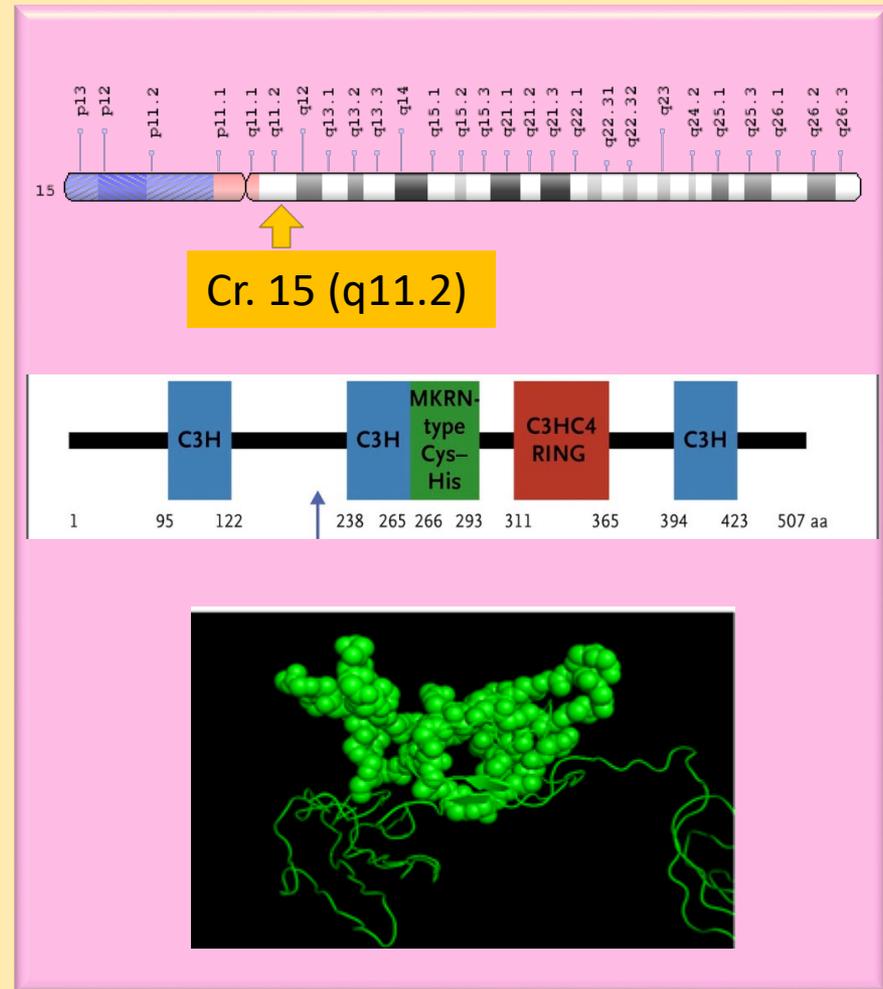
Central Precocious Puberty Caused by
Mutations in the Imprinted Gene *MKRN3*

Makorin ring finger protein 3

Codifica per una **Ubiquitina ligasi 3**, implicata
nella degradazione cellulare, il cui ruolo nella
pubertà non è del tutto chiarito.



GENE SOGGETTO A
IMPRINTING MATERNO!!!



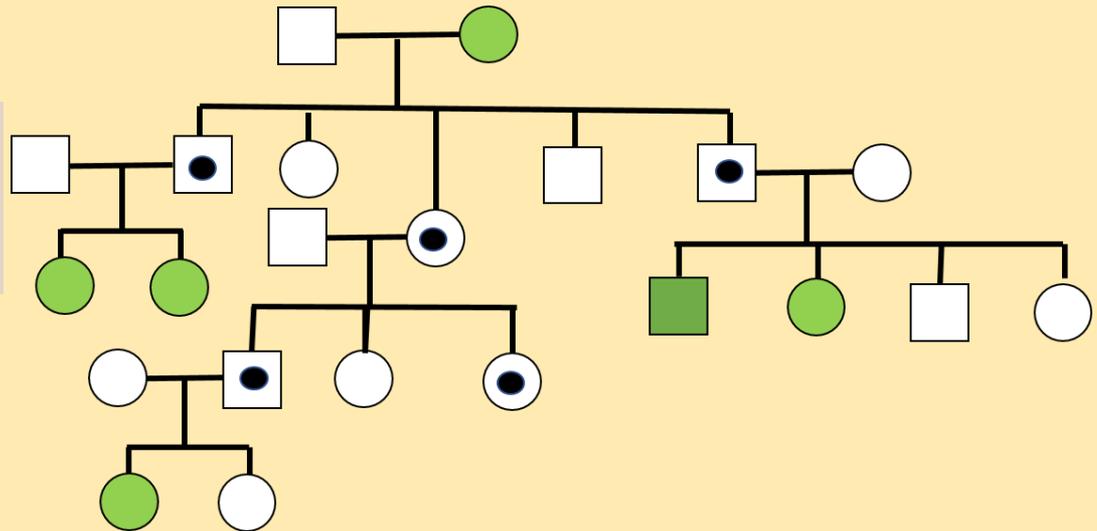
I livelli plasmatici di *MKRN3* nelle bambine con PPC prima e durante la terapia bloccante

Cos' é l'imprinting materno??

Fenomeno di regolazione epigenetica che attraverso la metilazione degli istoni silenzia la trascrizione del solo allele di origine MATERNA, favorendo pertanto l'espressione del carattere codificato dall'allele PATERNO.

Si definisce imprinting paterno il fenomeno opposto.

I geni soggetti a imprinting sono ereditati secondo un modello **NON mendeliano**



Numerosi studi internazionali hanno evidenziato che differenti **mutazioni** loss-of-function **del gene MKRN3** determina una forma familiare di PPC a penetranza incompleta.



I livelli plasmatici di MKRN3 nelle bambine con PPC prima e durante la terapia bloccante

Clinical Study D Simon and others *MKRN3* mutations in central precocious puberty

Human Reproduction, Vol.29, No.12 pp. 2838–2843, 2014
Advanced Access publication on October 14, 2014 doi:10.1093/humrep/deu256

human reproduction **CASE REPORT** *Reproductive genetics*

Mutations in the maternally imprinted *MKRN3* are common in familial central precocious puberty

A novel *MKRN3* missense mutation causes central precocious puberty

CASE REPORT **Open Access**

A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the *makorin RING finger protein 3* gene

Anna Grandone, Grazia Cantelmi, Grazia Cirillo, Pierluigi Marzuillo*, Caterina Luongo, Emanuele Miraglia del Giudice and Laura Perrone

A. Singer⁵

Clinical Endocrinology (2016) 84, 80–84

ORIGINAL ARTICLE

In silico analysis of a novel *MKRN3* missense mutation causing familial central precocious puberty

Vasios Neocleous*, Christos Shammas*, Marie M. Phelant, Stella Nicolaou‡, Leonidas A. Phylakides, Nicos Skordis*^{§¶}

JCEM ONLINE

Advances in Genetics—Endocrine Research

Central Precocious Puberty That Appears to Be Sporadic Caused by Paternally Inherited Mutations in the Imprinted Gene Makorin Ring Finger 3

Delanie B. Macedo,* Ana Paula Abreu,* Ana Claudia S. Reis, Luciana R. Montenegro, Andrew Dauber, Daiane Beneduzzi, Priscilla Cukier, Leticia F. G. Silveira, Milena G. Teles, Rona S. Carroll, Gil Guerra Junior, Guilherme Guaragna Filho, Zoran Gucevi, Mo J. P. Arnhold, Margaret de Castro, Ayrton C. Moreira, Carlos Eduardo Martinelli Jr, Joel N. Hirschhorn, Berenice B. Mendonca, Vinicius N. Brito, Sonir R. Antonini, Ursula B. Kaiser.* and Ana Claudia Latronico*

Circulating MKRN3 Levels Decline Prior to Pubertal Onset and Through Puberty: A Longitudinal Study of Healthy Girls

Casper P. Hagen, Kaspar Sørensen, Mikkel G. Møritz, Trine Holm Johannsen, Kristian Almstrup, and Anders Juul

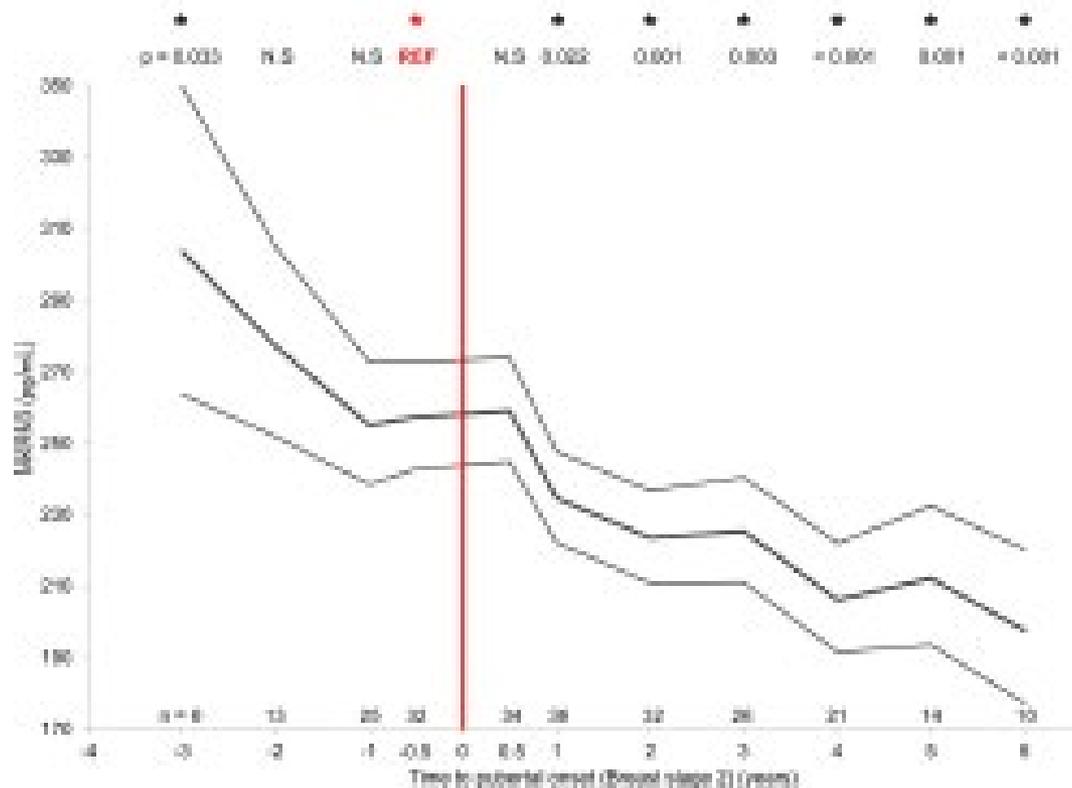


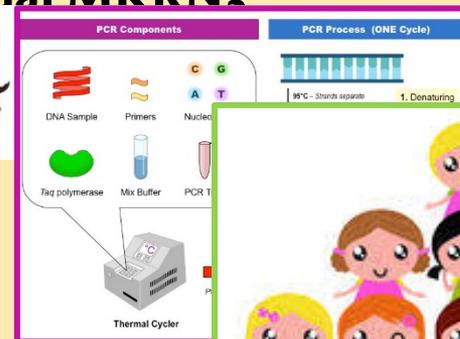
Figure 2. Component variant model of serum concentrations of MKRN3 according to time to pubertal onset based on all longitudinal data. Black lines indicate geometric means (95% confidence intervals). The number of girls contributing with measurements to the different time points is listed above the x-axis. P-values correspond to analyses comparing reference levels (the last prepubertal examination) with levels at different time points. MKRN3 declined from 3 years before pubertal onset to the last prepubertal examination ($P = .033$).

IL NOSTRO STUDIO

Ma qual e' il ruolo esercitato dal MKRN2

POPOLAZIONE TARGET:
Pazienti con **PPC** e assenza di
mutazioni del gene MKRN3

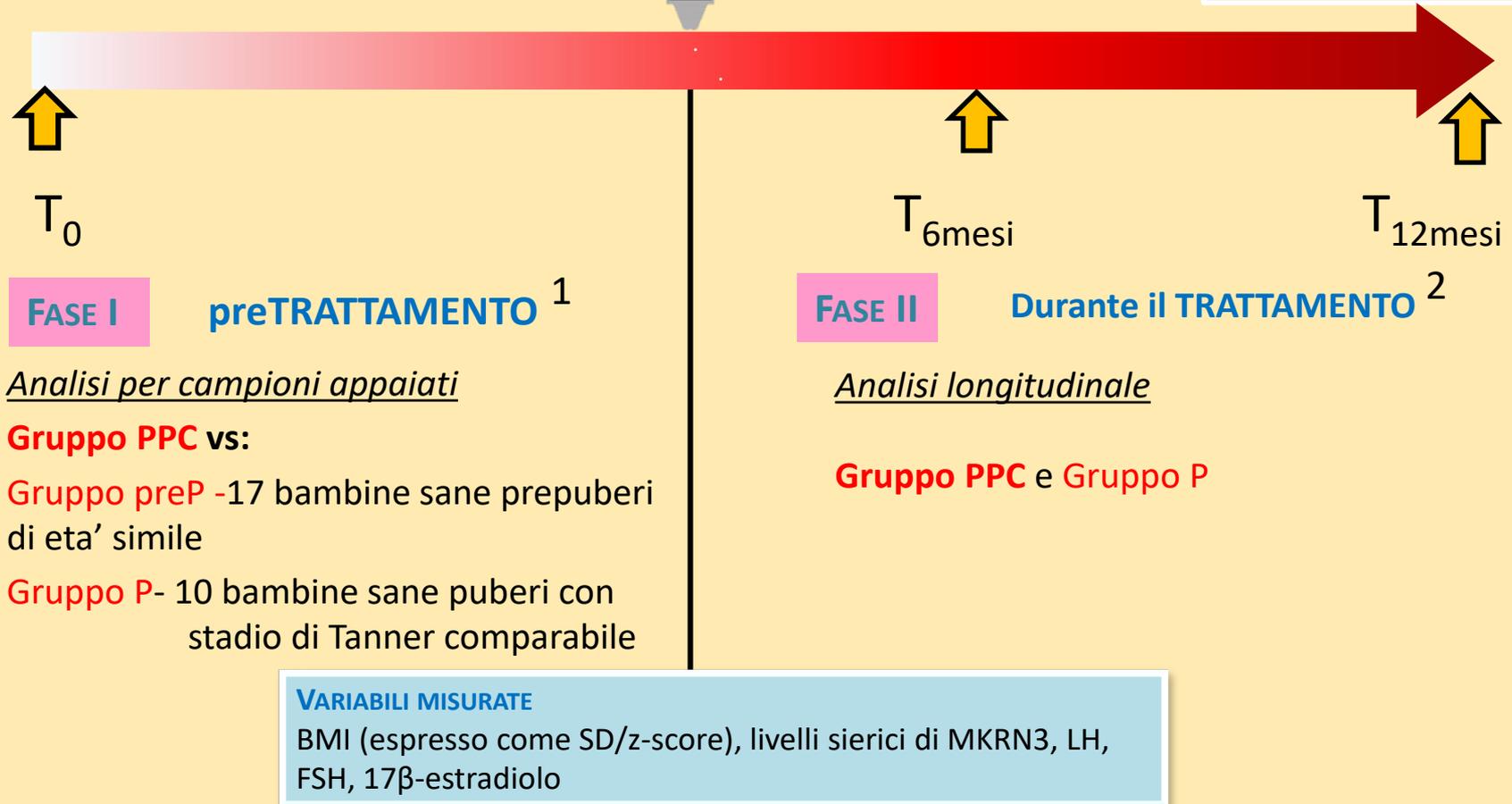
la pubertà
idiopatica?



CAMPIONE STUDIATO:
Gruppo PPC, 17 bambine con
PPC, MKRN3 wilde-type e RMN
normale.

OBIETTIVO:
Valutare le fluttuazioni dei livelli
plasmatici dell' MKRN3
prima e durante il trattamento

Materiali e Metodi



I campioni di sangue, raccolti alle h 8.00 a.m. → centrifugati e conservati a -20 → processati dallo stesso laboratorio

- MKRN3 quantificato con il kit **Human MKRN3 ELISA** (MyBioSource, San Diego, CA, USA)
- FSH e LH con saggio immunometrico (DELFI, Wallac, Inc.)
- Estradiolo con saggio radioimmunologico (CisBio International)

RISULTATI 1- FASE I

	Gruppo preP	P-value (preP vs PPC)	Gruppo PPC	P-value (P vs PPC)	Gruppo P	
N	17		17		10	
Eta'	7±1.5 (2-8)	n.s.	6.3±2.1 (2-8.2)	<0.0001	11.7±1.2 (9.6-14)	△
BMI media SD ±SD	-0.02 ±1.3	0.5	0.2±0.8	0.5	0.5±1.2	△
MKRN3 (pg/mL)	1012.6 (932.0-1230)	0.005	673.5 (561.5-996.7)	n.s.	782.6 (677.7-1032.8)	★
LH basale (UI/L)	0.2 (0.1-0.3)	0.0004	0.7 (0.4-1.6)	n.s.	0.8 (0.7-1)	★
FSH basale (UI/L)	1.9 (1.5-2.4)	0.001	4.9 (4.0_5.2)	n.s.	4.9 (3-5.7)	★
17βestradiolo	5 (5.0-9.3)	0.002	17.4 (11.7-31.4)	n.s.	14.2 (12.6-19.9)	★

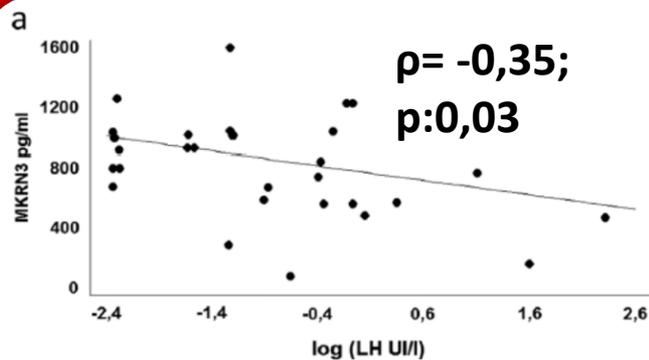
△ Statistica Anova

★ **Kruskal Wallis test:** individua una differenza statisticamente significative tra 2 gruppi , in caso di variabili continue distribuite NON normalmente.

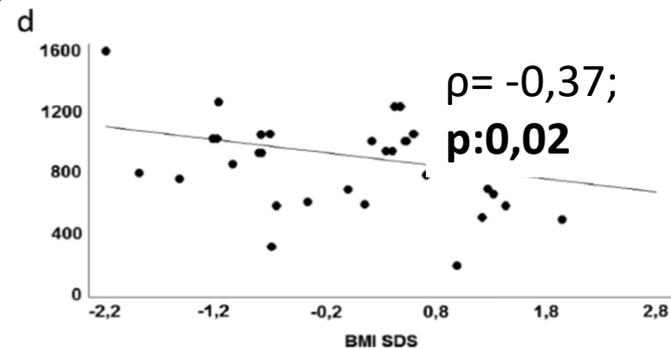
● **Mann-Whitney test:** per l'analisi contemporanea di variabili continue tra i 3 gruppi

I livelli plasmatici di MKRN3 nelle ba...
...one con PPC prima e durante la terapia bloccante

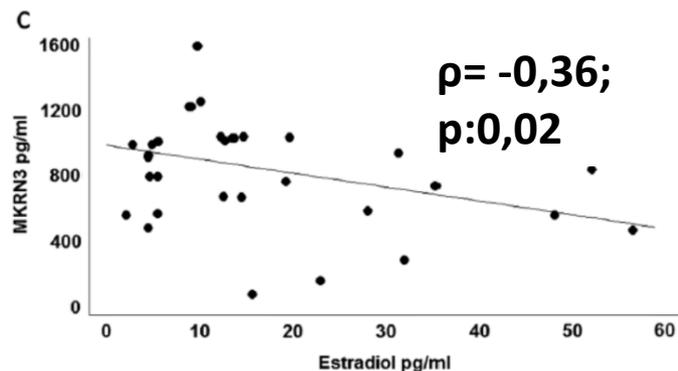
RISULTATI 2- FASE I



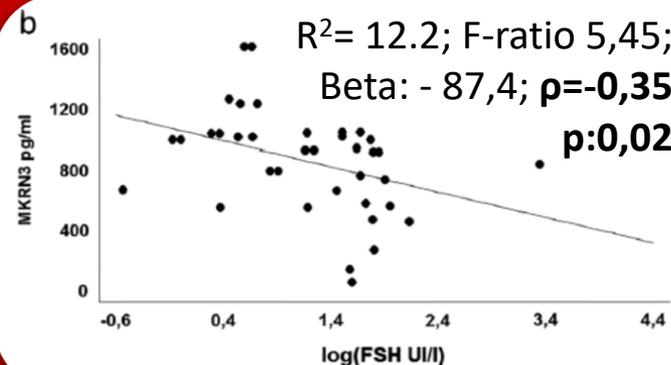
A. I valori di MKRN3 correlano negativamente con i valori di LH, espressi in scala logaritmica



B. I valori di MKRN3 correlano negativamente con i valori di FSH, espressi in scala logaritmica



C. I valori di MKRN3 correlano negativamente con i valori di estradiolo.



D. I valori di MKRN3 correlano le SD del BMI

RISULTATI 4- FASE II

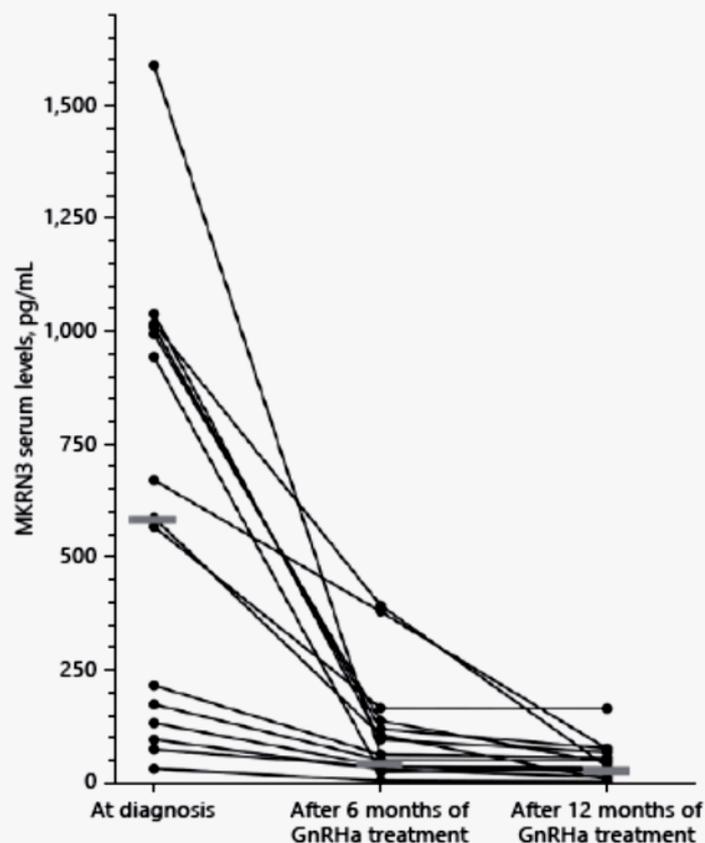


Fig. 1. The MKRN3 serum levels at diagnosis and after 6 and 12 months of GnRH α treatment are shown. The grey lines represent medians.

c) **NUOVO DATO!** I livelli di MKRN3 sono soppressi in maniera evidente e graduale in corso di trattamento:

dall'inizio della terapia a 6 mesi $\rightarrow \Delta: 74 \pm 15\%$
 $p=0,0007$

a 6 mesi a 1 anno di terapia $\rightarrow \Delta: 83,9 \pm 12,5\%$
 $p=0,003$

d) Tale differenza NON esprime la fisiologica riduzione dei livelli MKRN3 con l'avanzare della pubertà: essa è **significativamente MAGGIORE** di quella riscontrabile nei dosaggi seriati di soggetti in fase puberale

from puberty onset. During treatment, MKRN3 levels were significantly lower than in control girls (117.9 ± 119.47 vs. 825 ± 206 pg/mL, $p < 0.0001$).

MKRN3...raffronto tra l'analisi da noi condotta e i dati in letteratura-1

- ❑ I valori assoluti di MKRN3 da noi riscontrati sono piu' elevati di quelli evidenziati in altri studi. Tale discrepanza potrebbe esser spiegata dal differente tipo di campione analizzato (piccolo campione OMOGENEO di soggetti con PPC e gene wilde-type.

Il trend evidenziato, tuttavia, e' lo stesso , cio' suggerisce che sia LA RIDUZIONE dei livelli di MKRN3 piuttosto che il suo valore assoluto a coincidere con l'inizio della PPC.

- ❑ La riduzione di MKRN3 é **INDIPENDENTE dall'eta'** e coincide con l'inizio del period puberale, come dimostra la relazione inversa MKRN3-gonadotropine presente in tutti i gruppi.

MKRN3...raffronto tra l'analisi da noi condotta e i dati in letteratura-2

- ❑ La **correlazione inversa MKRN3-estrogeni** rende plausibile l'ipotesi che la **secrezione di MKRN3 sia controllata anche da fattori periferici** come il lieve incremento di E a livello ovarico.
- ❑ La correlazione inversa tra BMI-SD e MKRN3, per la prima volta riscontrata in tale studio suggerisce un **possibile ruolo di fattori nutrizionali e/o adipochine** (leptina?) **nella** regolazione della **secrezione di MKRN3**. Se tale ipotesi venisse verificata, si potrebbe spiegare il motivo della aumentata prevalenza di PPC nella popolazione con BMI elevato.
- ❑ I livelli di MKRN3 declinano dopo l'introduzione della terapia con GnRH indipendentemente dalla fisiologica riduzione che si riscontra con il procedere della pubertà a causa di un effetto soppressivo della terapia.



Take home message

1. E' probabile che nel complesso pathway di attivazione della puberta' il gene MKRN3 svolga un ruolo fondamentale di tipo regolatorio inibitorio.
2. I livelli plasmatici dell' MKRN3 delle bambine con PPC simulano quelli delle bambine in fase puberale e risultano essere inadeguatamente bassi.
3. L'espressione di MKRN3 e' a sua volta influenzata da altri fattori secondo relazioni del tipo non lineare (livelli di estrogeni, BMI, terapia).
4. Ulteriori studi longituinali eseguiti su campioni di maggiori dimenioni sono necessari per caratterizzare al meglio la sua espressione e funzione a livello ipotalamo-ipofisaria

Grazie per l'attenzione!



Un ringraziamento particolare alla prof. Anna Grandone, per avermi concesso una opportunita' anche se sono solo "del primo anno".