MARINA CUNHA SILVA PAZOLINI

**Avanços no diagnóstico genético da
puberdade precoce central**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latrônico
Xavier

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 14 de agosto de 2018.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Pazolini, Marina Cunha Silva

Avanços no diagnóstico genético da puberdade
precoce central / Marina Cunha Silva Pazolini. --
São Paulo, 2018.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Puberdade precoce 2.Puberdade
precoce central familiar 3.Sequenciamento completo
do genoma 4.Técnicas genéticas 5.Mutação com perda
de função 6.Gene DLK1

USP/FM/DBD-232/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

Esta pesquisa foi desenvolvida na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto temático 2013/03236-5 e da bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), cota institucional (demanda social).

Dedicatória

*Aos meus pais, **Celso e Helenice Silva**,
ao meu esposo, **Bruno Pazolini** e
ao meu filho, **Pedro Pazolini**.*

Agradecimentos

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Celso e Helenice, por tudo que fizeram por mim ao longo da minha vida me dando as ferramentas necessárias para chegar até aqui e por me apoiarem em todas as fases de minha vida. Ao meu esposo, Bruno, por seu companheirismo, estímulo e compreensão em todos os momentos. Ao meu filho Pedro, marca indelével do amor em minha vida. À minha irmã Amanda e ao meu cunhado Danilo, pelos conselhos, apoio e palavras incentivadoras.

À minha orientadora Dra. Ana Claudia Latrônico Xavier, por ter me guiado na construção desta pesquisa, com tanto comprometimento, estímulo e sabedoria, por ter sido uma mentora tão dedicada e solícita. Agradeço-lhe por todas as oportunidades que me proporcionou durante esse percurso, mostrando-me sempre a pesquisa com otimismo e entusiasmo. Sua atitude como pesquisadora é um exemplo muito inspirador que eu tive o privilégio como sua aluna de vivenciar durante essa pesquisa.

Ao Dr. Vinícius Nahime Brito, por todo apoio e contribuição durante o doutorado, sempre compartilhando seus conhecimentos com muita dedicação e carinho.

À Dra. Berenice Mendonça pelas sugestões pertinentes e por propiciar, com dedicação, disciplina e liderança, esse ambiente de excelência e qualidade em pesquisa no departamento de Endocrinologia que foi fundamental para o desenvolvimento da minha pesquisa.

À Luciana Montenegro por todo suporte oferecido durante minha imersão no mundo da biologia molecular, sua participação e ajuda foram fundamentais para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Monica França, à Miriam Nishi e à Mariana Funari, por me auxiliarem em questões de biologia molecular e no laboratório.

Ao grupo de pesquisa da puberdade, Daniele Bessa, Carolina Ramos, Priscila Sales e Delanie Macedo, pela convivência prazerosa e troca de experiências.

Aos amigos pós-graduandos de grupos de pesquisas afins, Lorena Lima, Marilena Nakaguma, João Madeira, Raiane Crespo, Edoarda Vasco, Lucas e Mirela Miranda, com os quais tive o prazer de compartilhar conhecimentos, experiências e congressos.

Às amigas Ana Luiza Panico, Camila Leite, Fernanda Chuva, Roberta Zani e Thays Araújo pela amizade, apoio e torcida. Ao amigo Bernardo Lopes pela ajuda nos momentos finais da tese.

Aos funcionários do departamento da Endocrinologia, do LIM 42, Rosangele, Nilda, Rubens, Roberta, Roseli, Rosana, Cida, Suelen, Cris, Cidinha, Fran pela disponibilidade e suporte sempre que precisei.

Ao Dr. Alexsander Augusto L. Jorge, Dr. Ivo Jorge P. Arnhold, Dra. Luciani Carvalho, Dra. Letícia Gontijo, Dra. Larissa Gomes pelos conhecimentos transmitido sobre genética, pelas discussões científicas e o saber compartilhados.

Aos nossos colaboradores nacionais, Prof. Sonir Antonini, Prof. Gil Guerra-Junior pela colaboração ao compartilhar seus pacientes, para que os estudos genéticos fossem realizados.

Aos nossos colaboradores internacionais Ursula Kaiser e Ana Paula Abreu, pela colaboração nos estudos genéticos dos nossos pacientes. E ao Andrew Dauber por todo seu empenho e brilhantismo nesta pesquisa, sua participação fundamental.

À toda minha família, avós, tios, primos, cunhados, sogros, por me apoiarem nos meus projetos pessoais e profissionais.

A todos nossos pacientes e familiares, que nos permitiram desenvolver essa pesquisa, pois sem suas colaborações esse estudo não se tornaria realidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

NORMALIZAÇÃO

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Epígrafe

*“Os que se encantam com a prática sem a ciência
são como os timoneiros que entram no navio sem
timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu
destino”.*

(Leonardo da Vinci)

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Desenvolvimento Puberal Normal	2
1.2	Puberdade Precoce	4
1.3	Puberdade Precoce Central	6
1.4	A Genética da Puberdade Precoce Central	8
1.5	O Mecanismo de Controle da Puberdade	15
1.6	A Região Imprintada do Cromossomo 14q32: novo <i>locus</i> da puberdade	16
1.7	Hipótese	18
2	OBJETIVOS.....	20
3	PACIENTES E MÉTODOS	22
3.1	Considerações Éticas.....	23
3.2	Pacientes	23
3.3	Avaliação Laboratorial.....	26
3.3.1	Avaliação Hormonal.....	26
3.3.2	Avaliação do DLK1 no Soro.....	28
3.3.3	Expressão de <i>Dlk1</i>	29
3.4	Avaliação Molecular	31
3.4.1	Extração do DNA Genômico de Leucócitos de Sangue Periférico.....	31
3.4.2	Sequenciamento Genômico Global	32
3.4.3	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	34
3.4.4	Sequenciamento Automático Direto (Sanger).....	35
3.4.5	Amplificação Dependente de Hibridização com Múltiplas Sondas para Análise do Número de Cópias (MLPA: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification).....	38

4	RESULTADOS.....	43
4.1	Pesquisa de Mutações no <i>MKRN3</i> em Novos Casos por Sequenciamento Automático (Sanger).....	44
4.2	Puberdade Precoce Central Familiar	46
4.2.1	Sequenciamento Genômico Global	48
4.2.1.1	Variante Identificada	48
4.2.1.2	Correlação Genótipo- Fenótipo da Família 1	52
4.2.1.3	Correlação das Características Clínicas da Síndrome de Temple com as das Pacientes com Deleção no Éxon 1 do Gene <i>DLK1</i>	55
4.2.2	Dosagem Sérica do <i>DLK1</i> nos Pacientes Afetados da Família 1	58
4.2.3	Expressão do <i>Dlk1</i> no Hipotálamo de Camundongos e Linhagens Celulares Derivadas de Neurônios de Kisspeptina	59
4.3	Sequenciamento Automático (Método de Sanger) do Gene <i>DLK1</i> do Grupo de Pacientes com PPC Familiar e Esporádica.....	61
4.3.1	Variante Frameshift c.810_810delT p.Val272Cysfs*14.....	61
4.3.2	Correlação Genótipo- Fenótipo da Família 2	62
4.3.3	Variante Frameshift c.479_479delC p.Pro160Leufs*50	63
4.3.4	Correlação Genótipo- Fenótipo da Família 3	64
4.3.5	Análise das Famílias 1, 2 e 3	67
4.3.6	Polimorfismos encontrados em toda casuística	69
4.4	Pesquisa de Variações no Número de Cópias no <i>locus</i> 14q32.2....	70
4.5	Pesquisa do Complexo Rearranjo no Gene <i>DLK1</i>	70
5	DISCUSSÃO.....	71
5.1	A Genética da Puberdade Precoce Central.....	72
5.2	Um Novo Gene Candidato Associado à PPC: Gene <i>DLK1</i>	74
5.3	Genótipo-Fenótipo dos Pacientes com Mutação no Gene <i>DLK1</i> ...	77
5.4	Papel do <i>DLK1</i> na Regulação da Puberdade.....	80
6	CONCLUSÕES.....	83
7	ANEXOS	86
8	REFERÊNCIAS	106
9	APÊNDICE.....	118

Listas

ABREVIATURAS

5'PHO	5' fosforilado
AHNAK2	Gene que codifica a proteína AHNAK2
AVC	Acidente vascular cerebral
AVPV	Núcleo periventricular anteroventral
CPP	Central precocious puberty
dbSNP	Banco de dado <i>database single nucleotide polymorphism</i>
DIO3	Gene <i>Deiodinase, Iodothyronine, Type II</i> que codifica a deodinase tipo3
DLK1	Gene que codifica a proteína Delta-Like1 Homolog
DMRs	Regiões diferencialmente metiladas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DP	Desvio-padrão de estatura
E2	Estradiol
EA	Estatura alvo
ECLIA	Ensaio eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
EXAC	Banco de dado <i>Exome Aggregation Consortium</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GABA	Neurotransmissor ácido gama-aminobutírico
GABA _(A)	Receptor do ácido gama-aminobutírico
GABRA1	Gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA _(A)
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas

<i>GTL2</i>	Gene <i>trap locus 2</i> que codifica RNA não traduzido
GWAS	Estudo de associação em genoma de larga escala ou completo
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
HCl	Ácido clorídrico
HhaI	Enzima de restrição
HEK293	Célula utilizada como controle negativo para expressão de <i>Dlk1</i>
IC	Idade cronológica
IE	Idade estatural
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IG-DMR	Região intergênica diferencialmente metilada
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
IMC	Índice de massa corporal
Indels	Alteração causada por inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos na sequência de DNA
IO	Idade óssea
<i>KISS1</i>	Gene que codifica a kisspeptina
<i>KISS1R</i>	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
<i>KTaR-1</i>	Linhagem celular imortalizada derivada do núcleo arqueado
<i>KTaV-3</i>	Linhagem celular imortalizada derivada do núcleo AVPV
<i>LEP</i>	Gene que codifica a leptina
<i>LEPR</i>	Gene que codifica o receptor da leptina
LH	Hormônio luteinizante
<i>LIN28B</i>	Gene que codifica a proteína <i>homolog B lin-28</i>
LOD score	<i>Logarithm (base 10) of odd</i> , teste utilizado na análise de estudos de ligação
LPO	<i>Left Probe Oligonucleotide</i>
MBH	Hipotálamo médio basal
<i>MEG</i>	Genes expressos pelo alelo materno
<i>MEG3</i>	Gene expresso pelo alelo materno 3 (não codifica proteína)
<i>MEG8</i>	Gene expresso pelo alelo materno 8 (não codifica proteína)
<i>MKRN3</i>	Gene que codifica a proteína <i>makorin ring finger 3</i>
mRNA	RNA mensageiro
MLPA	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

MS-MLPA	Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
NK3R	Receptor da neurocinina B
NKB	Neurocinina B
NPY	Neuropeptídeo Y
<i>NPYR1</i>	Gene que codifica o receptor tipo 1 do neuropeptídeo Y
<i>PEG</i>	Genes expressos pelo alelo paterno
Pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pomc	pró-opiomelanocortina
PP	Pelos pubianos
PPC	Puberdade precoce central
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RPO	Right Probe Oligonucleotide
<i>RTL1</i>	Gene que codifica a proteína Retrotransposon Gag 1
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Single nucleotide polymorphism, troca de um nucleotídeo por outro na sequência de DNA
SNP array	Single nucleotide polymorphism array
T	Testosterona
<i>Tac2</i>	Gene análogo do <i>TAC3</i> em camundongos
<i>TAC3</i>	Gene que codifica a Preprotaquicinina 3
<i>TAC3R</i>	Gene que codifica o receptor da Preprotaquicinina 3
TM	Transmembrana
TMB	Substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UPD	Dissomia uniparietal
UTR	Região não traduzida
WT	<i>wild-type</i>

FIGURAS

Figura 1 -	Mutações identificadas no <i>MKRN3</i> em casos de PPC.....	14
Figura 2 -	A região de genes imprintados no cromossomo 14q32.2	17
Figura 3 -	Fluxograma de investigação dos pacientes selecionados para este estudo	25
Figura 4 -	Representação esquemática do sequenciamento genômico (ILLUMINA).....	31
Figura 5 -	Esquema ilustrativo do procedimento de MLPA	40
Figura 6 -	Heredograma da Família 1 com estudos genéticos realizados.....	45
Figura 7 -	Complexo rearranjo genômico resultou na deleção do éxon 1 do <i>DLK1</i>	48
Figura 7A -	Imagens da análise do genoma pelo Integrative Genomics Viewer	48
Figura 7B -	Esquema do complexo rearranjo do <i>DLK1</i>	49
Figura 8 -	Heredograma da Família 1 com os resultados moleculares ...	51
Figura 9 -	Análise da segregação da deleção <i>DLK1</i> na Família 1.....	51
Figura 10 -	Foto das pacientes afetadas e dos membros não afetados da Família 1	54
Figura 11 -	Concentrações séricas de DLK1 nos controles e em cinco pacientes com PPC em razão do complexo rearranjo do <i>DLK1</i>	56
Figura 12 -	Expressão do RNAm do <i>Dlk1</i> no hipotálamo médio basal (MBH) de camundongos e em duas linhagens celulares que expressam kisspeptina (KTR-1 e KTR-3).....	58
Figura 13 -	Heredograma da Família 2 com mutação no gene <i>DLK1</i> identificada pelo sequenciamento automático pelo método de Sanger	61
Figura 14 -	Heredograma da Família 3 com mutação no gene <i>DLK1</i> identificada pelo sequenciamento automático pelo método de Sanger	63

Figura 15 -	Estrutura da proteína DLK1	73
Figura 16 -	Modelo proposto de diferenciação neural de neurônios SOX2-positivos na região ventricular hipotalâmica	79

TABELAS

Tabela 1 -	Etiologia da Puberdade Precoce Central	8
Tabela 2 -	Fatores permissivos e inibitórios no início da puberdade.....	16
Tabela 3 -	Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes	27
Tabela 4 -	Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes	27
Tabela 5 -	Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região codificadora do gene <i>MKRN3</i>	34
Tabela 6 -	Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região codificadora do gene <i>DLK1</i>	35
Tabela 7 -	Oligonucleotídeos usados para amplificação de rearranjo no gene <i>DLK1</i>	35
Tabela 8 -	Sondas customizadas usadas para amplificação e sequenciamento do gene <i>DLK1</i> pelo método de MLPA.....	38
Tabela 9 -	Caracterização clínica, laboratorial e molecular dos pacientes com PPC familiar causada por mutação no <i>MKRN3</i>	43
Tabela 10 -	Características clínicas e hormonais das pacientes afetadas da Família 1 na ocasião do diagnóstico e na visita mais recente	52
Tabela 11 -	Correlação das características clínicas e laboratoriais da síndrome de Temple com as das pacientes com deleção no éxon 1 do gene <i>DLK1</i>	55
Tabela 12 -	Características clínicas dos pacientes adultos com PPC em razão das novas mutações no gene <i>DLK1</i>	64
Tabela 13 -	Descrição de todos os polimorfismos encontrados no gene <i>DLK1</i> com a frequência alélica encontrada nos pacientes estudados e na reportada	67

Resumo

Pazolini MCS. *Avanços no diagnóstico genético da puberdade precoce central* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

Avanços recentes na etiologia da puberdade precoce foram obtidos a partir da análise do genoma por sequenciamento global. Mutações inativadoras do gene *MKRN3* representam uma causa importante de puberdade precoce central (PPC) familiar (33-46% dos casos). O objetivo do estudo foi a análise do DNA genômico de pacientes com PPC de origem familiar ou esporádica sem mutações deletérias no gene *MKRN3*. Foram selecionados 68 indivíduos com PPC (37 com a forma familiar e 31, aparentemente, esporádicos). O DNA genômico foi extraído do sangue periférico ou da saliva dos pacientes com PPC. A técnica de sequenciamento genômico em larga escala (ILLUMINA -Clonal Single Molecule Array Technology - CSMA) foi usada na busca de novos genes implicados com o desenvolvimento puberal prematuro em seis indivíduos, sendo três afetados e três não afetados, pertencentes a uma grande família brasileira com PPC (Família 1). Mutações em um gene candidato foram pesquisadas em 64 pacientes por sequenciamento automático direto (método de Sanger). Em um subgrupo de pacientes, foi realizada a técnica de MLPA com sondas customizadas na busca de deleções. Por sequenciamento genômico global, foi identificado um novo complexo rearranjo no gene *DLK1*, caracterizado por uma deleção de, aproximadamente, 14.000 pb na região 5' não traduzida (5'UTR), englobando o início do exon 1, associada a uma duplicação de uma região do intron 3 de 269 pb. O gene *DLK1* está localizado no braço longo do cromossomo 14 (14q32.2) e sofre imprinting materno. Este locus está associado à síndrome de Temple, uma doença complexa com múltiplas manifestações, incluindo puberdade precoce central em até 90% dos casos. Para investigar o efeito dessa deleção genômica, as concentrações séricas da proteína DLK1 pelo método ELISA foram medidas nas pacientes afetadas da Família 1. Valores indetectáveis de DLK1 foram encontrados nestas pacientes. O fenótipo das pacientes afetadas da Família 1 caracterizou-se por uma PPC típica, sem sinais sindrômicos (excluída a síndrome de Temple). Posteriormente, por meio do sequenciamento direto, duas novas mutações inativadoras no gene *DLK1* foram identificadas (p.Val272Cysfs*14 e p.Pro160Leufs*50) em duas famílias (Famílias 2 e 3) com PPC ou história de menarca precoce. O estudo de segregação nas Famílias 1 e 2 confirmou o padrão de herança autossômico dominante com penetrância completa e transmissão exclusiva pelo alelo paterno. A média de idade de início da puberdade nas pacientes afetadas do sexo feminino foi de 5,4 anos. A técnica de MLPA com sondas customizadas para o gene *DLK1* não encontrou outras deleções no subgrupo estudado. Em conclusão, foram identificadas três mutações inativadoras no gene *DLK1* associadas à PPC

familiar de origem paterna. O *DLK1* é o segundo gene imprintado associado a distúrbios puberais em humanos. Este achado sugere um papel dos genes imprintados no controle da puberdade. O mecanismo pelo qual esse gene afeta a puberdade ainda é desconhecido.

Descritores: puberdade precoce; puberdade precoce central familiar; sequenciamento completo do genoma; técnicas genéticas; mutação com perda de função; gene *DLK1*.

Abstract

Pazolini MCS. *Advances in the genetic diagnosis of central precocious puberty* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Recent advances in the etiology of precocious puberty were obtained from the whole-genome sequencing analysis. Inactivating mutations of the *MKRN3* gene represent a major cause of familial central precocious puberty (CPP) (33%- 46% of the cases). The objective of the study was to analyze the genomic DNA of patients with familial or sporadic CPP without deleterious mutations in the *MKRN3* gene. Sixty-eight individuals with CPP (37 with familial form and 31 apparently sporadic cases) were selected. The genomic DNA was extracted from the peripheral blood or saliva of patients with CPP. We used the whole-genomic sequencing technique (ILLUMINA - Clonal Single Molecule Array Technology – CSMA) searching for a new candidate genes implicated in premature pubertal development in 6 individuals, 3 affected and 3 non-affected, belonging to a large Brazilian family with CPP (Family 1). Mutations in one candidate gene were investigated in 64 patients through automatic sequencing (Sanger's method). In a subgroup of patients, MLPA using synthetic MLPA probes was performed to search for deletions. A new complex rearrangement in the *DLK1* gene characterized by a deletion of approximately 14.000pb in the 5' untranslated (5'UTR), encompassing the start of exon 1, associated with a duplication of a region of intron 3 of 269 bp was identified by whole-genomic sequencing. The *DLK1* gene is located on the long arm of chromosome 14 (14q32.2) and it is maternally imprinted gene. This *locus* is associated with Temple syndrome, a complex disorder with multiple alterations, including central precocious puberty in up to 90% of cases. To investigate the effect of this genomic deletion, a serum measurement of DLK1 protein using ELISA method was performed in the affected patients from Family 1. Undetectable serum DLK1 levels were found in these patients. The phenotype of affected patients from Family 1 was characterized by a typical CPP, without syndromic signs (excluding Temple syndrome). Posteriorly, two new inactivating mutations in the gene *DLK1* were identified (p.Val272Cysfs*14 and p.Pro160Leufs*50) through direct sequencing in two families (Families 2 and 3) with CPP or precocious menarche history. The segregation studies in Families 1 and 2 confirmed the pattern of dominant autosomal inheritance with complete penetrance and exclusive transmission by the paternal allele. The average age of puberty onset in the affected female patients was 5.4 years. The MLPA technique with synthetic MLPA probes for the *DLK1* gene did not find other deletions in the studied subgroup. In conclusion, we identified 3 paternally inherited inactivating mutations in the *DLK1* gene

associated with familial CPP. The *DLK1* is the second imprinted gene associated with pubertal disorders in humans. This finding suggests a role of the imprinted genes in puberty control. The mechanism through which this gene affects puberty is still unknown.

Descriptors: puberty, precocious; familial central precocious puberty; whole genome sequencing; genetic techniques; loss of function mutation; *DLK1* gene.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento Puberal Normal

A puberdade caracteriza-se por uma série de alterações endócrinas, físicas e psicológicas que resultam na maturação sexual e no desenvolvimento da capacidade reprodutiva do indivíduo ⁽¹⁻³⁾. A ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal marca o início da puberdade com o aumento da amplitude e frequência dos pulsos do hormônio secretor de gonadotrofina (GnRH) por neurônios hipotalâmicos após um período de relativa supressão hormonal durante a infância ⁽¹⁻³⁾.

No período pós-natal imediato, por volta de 6 a 8 semanas de idade, ocorre uma ativação inicial do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal conhecida como "minipuberdade", contudo sua relevância biológica é desconhecida ⁽⁴⁾. A minipuberdade é seguida por um período de supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal durante toda a infância ^(2, 4). Na puberdade, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é reativado, porém os mecanismos que controlam esta reativação do eixo ainda não estão totalmente conhecidos ^(5, 6). Atualmente, a hipótese mais aceita defende que o início da puberdade depende de um mecanismo central, marcado pelo aumento de estímulos excitatórios concomitante com a redução dos aferentes inibitórios sobre a secreção pulsátil de GnRH ⁽⁵⁻⁷⁾.

A puberdade resulta de uma complexa interação de fatores genéticos, reguladores endócrinos, moduladores neuronais, bem como de fatores ambientais e nutricionais que interagem entre si para determinar o início da puberdade ⁽⁷⁾. A idade média dos primeiros sinais de puberdade ocorre por volta de 10,5 anos em meninas, variando entre 8 e 12 anos ⁽⁸⁾. Nos meninos, a idade média de início puberal acontece em torno de 11,5 anos, variando entre 9 e 13 anos ⁽⁹⁾.

A idade de aparecimento da puberdade em meninas vem diminuindo em todo mundo ⁽¹⁰⁾. Um estudo evidenciou que meninas afro-americanas estão iniciando a puberdade mais jovens, entre 6 e 8 anos, em uma proporção maior que as caucasianas. Aos 7 anos de idade, 27% das afro-americanas e 7% das caucasianas já haviam iniciado a puberdade ⁽¹⁰⁾.

Semelhante ao que acontece com as meninas, a idade média de aparecimento dos caracteres sexuais secundários nos meninos foi entre 6 meses e 2 anos mais precoce que a constatada em estudos prévios, considerando o grupo étnico e racial ⁽⁹⁾. Além disso, os meninos afro-americanos também apresentaram desenvolvimento puberal mais precoce se comparados aos hispânicos e caucasianos, com significância estatística ⁽⁹⁾.

O início mais precoce da puberdade na população em geral foi atribuído à crescente prevalência de obesidade, mas ainda não está claro o suficiente se apenas isso é capaz de explicar essa tendência ⁽¹¹⁾. A leptina foi proposta como um dos hormônios responsáveis pelo início e progressão da puberdade, considerada como um fator permissivo para a atividade dos

pulsos de GnRH ⁽¹¹⁾. A leptina é produzida em grande parte nos adipócitos, e as concentrações séricas de leptina estão altamente correlacionadas com o conteúdo de gordura corporal ⁽¹¹⁾. Em meninas, as concentrações mais altas de leptina sérica foram associadas ao aumento da gordura corporal e ao início mais precoce da puberdade ⁽¹²⁾.

1.2 Puberdade Precoce

A puberdade precoce caracteriza-se pelo aparecimento de caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos em meninas e antes dos 9 anos em meninos, acompanhada do aumento da velocidade de crescimento e da elevação das concentrações de esteroides sexuais ^(1-3, 7). Outro critério adicional utilizado é a menarca antes dos 9 anos em meninas ⁽²⁾.

Define-se a puberdade precoce dependente de gonadotrofinas, ou puberdade precoce central (PPC), quando ocorre a ativação prematura do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal. Esta é caracterizada pelo aparecimento inicial de mamas (telarca) no sexo feminino e aumento do tamanho testicular no sexo masculino. Nestes pacientes, as características sexuais secundárias são apropriadas ao sexo da criança (isossexual) e sua progressão ocorre de forma semelhante à puberdade normal ^(1, 3, 12, 13).

Além disso, a puberdade precoce pode ocorrer também como resultado da secreção de esteroides sexuais, independentemente da ativação do eixo gonadotrófico, denominada puberdade precoce independente de gonadotrofinas ou periférica. Nestes casos, a puberdade

pode ter padrão isossexual ou heterossexual, além da progressão desordenada dos caracteres sexuais secundários, podendo a menarca ser a primeira manifestação ^(1, 3).

As variantes do desenvolvimento puberal normal são caracterizadas pelo aparecimento isolado e prematuro dos caracteres sexuais secundários (telarca precoce, adrenarca precoce e menarca precoce) sem que haja a ativação prematura do eixo gonadotrófico ⁽¹³⁾. Apesar de, geralmente, representarem uma condição benigna e não progressiva, é recomendado o seguimento, para o diagnóstico diferencial com as formas completas e progressivas de puberdade precoce ⁽³⁾. De acordo com diferentes estudos, 13 a 20,5% das meninas com telarca precoce isolada podem evoluir para um quadro de precocidade sexual completa ⁽¹⁴⁾.

Estudos populacionais que observam as taxas de prevalência e a incidência de puberdade precoce descrevem valores significativamente diferentes, dependendo da população estudada. Em um estudo populacional dinamarquês que usou banco de dados de registros nacionais entre 1993 e 2001, a incidência de puberdade precoce foi de 20 por 10.000 meninas e menos de 5 por 10.000 meninos ⁽¹⁵⁾. O limite de idade de diagnóstico utilizado nesse estudo foi de 8 anos para meninas e 9 para meninos. Cerca de metade dos pacientes apresentavam PPC e os demais, telarca isolada ou adrenarca precoce ⁽¹⁵⁾. Em outro estudo de base populacional nos Estados Unidos da América, observou-se que aos 7 anos de idade 27% das afro-americanas e 7% das caucasianas já haviam iniciado a puberdade. Aos 8

anos, a telarca ou o desenvolvimento de pelos pubianos estava presente em 48% das meninas afro-americanas e 15% das meninas caucasianas ⁽¹⁰⁾.

Estudos evidenciaram um impacto na saúde dos pacientes com puberdade precoce. Foi demonstrada uma associação entre a menarca precoce e o aumento do risco de câncer de mama e de endométrio, bem como uma maior incidência de diabetes mellitus tipo 2 e obesidade na vida adulta desses pacientes ⁽¹⁶⁻¹⁹⁾. Além disso, a PPC está também correlacionada com maior incidência de alterações de conduta e comportamento em adolescentes ^(20, 21).

1.3 Puberdade Precoce Central

Nos casos de PPC, existe uma forte predominância do sexo feminino, chegando a ser 10 a 20 vezes mais frequente em meninas que em meninos). Em relação à etiologia da PPC, a forma idiopática, sem anormalidades no sistema nervoso central (SNC), é mais comum nas meninas, podendo chegar a 90% dos casos ⁽¹⁻³⁾. Nos meninos, entre 40% e 75% dos casos de PPC são decorrentes de causa orgânica, com anormalidades no SNC, enquanto que nas meninas esta prevalência fica entre 10% e 20%, sendo que a causa mais comum de PPC orgânica o hamartoma hipotalâmico ^(22, 23). Outras causas orgânicas associadas à PPC incluem: tumores, cisto aracnoide, defeitos de desenvolvimento cerebral, traumas, infecções e irradiação do SNC ⁽¹⁻³⁾.

Estudo recentes identificaram causas genéticas em casos de PPC anteriormente considerados idiopáticos. Mutações ativadoras no gene que codificam a kisspeptina e seu receptor (*KISS1* e *KISS1R*) e mutações inativadoras no gene *MKRN3* (gene que codifica a proteína *makorin ring finger 3*) estão associadas com a PPC detalhados a seguir ⁽¹⁾. Além disso, algumas alterações cromossômicas estão associadas com síndromes com fenótipo complexo que inclui a PPC ⁽¹⁾.

Observou-se que diversos desreguladores endócrinos apresentam propriedades semelhantes aos hormônios e influenciam a puberdade devido a seus efeitos estrogênicos, antiestrogênicos, androgênicos ou antiandrogênicos, ou por seus efeitos diretos no GnRH hipotalâmico ⁽²⁴⁾. A PPC pode ainda ser desencadeada pela exposição crônica prévia a esteroides sexuais, a qual resulta em uma prematura maturação hipotalâmica ⁽¹⁾ (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Etiologia da Puberdade Precoce Central adaptado de *Latronico et al.*, 2016 ⁽¹⁾

Sem anormalidades no SNC	
Idiopática	80 a 90% das meninas com PPC, 25 a 60% dos meninos com PPC
Congênitas	Genéticas
	Mutações ativadoras no gene <i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i>
	Mutações inativadoras no gene <i>MKRN3</i>
	Alterações cromossômicas
Adquiridas	Exposição precoce a esteróides sexuais PPC secundária Adoção internacional
Desreguladores endócrinos	
Com anormalidades no SNC	
Malformações congênitas	Hamartoma hipotalâmico
	Hidrocefalia
	Cisto aracnoide supraselar
	Glioma ou neurofibromatose tipo 1
	Esclerose tuberosa
	Displasia séptico-óptica
	Malformação de Chiari II e mielomeningocele
Adquiridas	Tumores: astrocitoma, epedimoma, pinealoma, glioma óptico, disgerminoma, meningioma, craniofaringioma.
	Pós-insulto: perinatal, infecção, trauma, radioterapia
	Doenças granulomatosas
	Paralisia cerebral

1.4 A Genética da Puberdade Precoce Central

A influência da genética no início da puberdade é evidenciada por diversos fatos, tais como: idade semelhante da menarca entre mães e filhas, ou entre membros de um mesmo grupo étnico, e maior concordância cronológica dos eventos puberais entre gêmeos monozigóticos se comparados aos dizigóticos ^(25, 26).

A PPC familiar é definida pela presença de história de PPC em mais de um membro de uma mesma família ⁽²⁷⁾. Em um grande estudo em que foram

analisadas 156 pacientes com PPC idiopática, constatou-se uma prevalência de 27,5% de casos familiares, evidenciando a importância dos fatores genéticos na patogênese da PPC ⁽²⁷⁾. Em outro estudo, *Durand et al.* ⁽²⁸⁾ avaliaram 154 pacientes de 139 famílias com PPC familiar e/ou puberdade antecipada (início da puberdade dos 8 - 10 anos nas meninas e dos 10 - 11 anos nos meninos). Neste estudo, encontrou-se 41,4% de casos familiares, a maior prevalência encontrada é, provavelmente, decorrente da inclusão dos indivíduos com puberdade antecipada no desenho do estudo ⁽²⁸⁾. A análise de segregação das famílias em ambos estudos sugeriu um modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo dependente ^(27, 28). Nos dois estudos, foi observada uma maior prevalência de PPC familiar de origem exclusivamente materna, variando entre 59,7% e 45,6%, enquanto que os casos de origem exclusivamente paterna variaram entre 21,7% e 1,4%, e os de origem tanto materna como paterna entre 8,6% e 10,7% ^(27, 28).

Na busca de causas genéticas para os casos de PPC idiopática diversos fatores foram estudados ao longo dos últimos anos, dentre eles, a kisspeptina e seu receptor. O sistema kisspetina-*KISS1R* tem um papel estimulador na secreção do GnRH hipotalâmico ⁽²⁹⁾. Em humanos, mutações inativadoras no *KISS1*, ou no *KISS1R* causam hipogonadismo hipogonadotrófico isolado sem alteração de olfato ^(30, 31).

A expressão de mRNA (RNA mensageiro) do *KISS1* no hipotálamo aumenta no período da transição puberal em primatas ⁽³²⁾. Desse modo, estes achados sugerem que a kisspeptina tem um papel-chave no

ressurgimento dos pulsos de GnRH necessários para início da puberdade⁽³²⁾. O sistema kisspeptina-*KISS1R* foi implicado, pela primeira vez, na patogênese da PPC em 2008, quando *Teles et al.*⁽³³⁾ descreveram uma mutação (p.Arg386Pro) em heterozigose no gene *KISS1R*, resultando em ativação não constitutiva do receptor, em uma menina brasileira com PPC. Outros polimorfismos foram encontrados no gene *KISS1R*, envolvendo crianças chinesas e uma menina coreana com PPC, porém apenas uma dessas alterações foi correlacionada positivamente com o fenótipo^(34, 35). Posteriormente, *Silveira et al.*⁽³⁶⁾ identificaram uma mutação ativadora (p.Pro74Ser) no gene *KISS1*, em heterozigose, em um menino com PPC. O estudo funcional dessa variante demonstrou maior resistência da kisspeptina à degradação *in vitro* e consequente aumento da biodisponibilidade dessa proteína, sugerindo uma correlação entre a variante encontrada e o fenótipo do paciente⁽³⁶⁾.

Outro sistema implicado na regulação do eixo reprodutivo é o sistema da neurocinina B (NKB). A neurocinina B é membro da família das taquicininas, que são peptídeos neurotransmissores excitatórios⁽³⁷⁾. Em humanos, a NKB e seu receptor (NK3R) são codificados pelos genes *TAC3* e *TACR3*, respectivamente^(37, 38). O papel do NKB no controle da secreção de gonadotrofinas e no início da puberdade foi demonstrado a partir da descrição de mutações inativadoras nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico normósmico isolado^(37, 38). No entanto, os mecanismos pelos quais esse sistema exerce seus efeitos no controle da função reprodutiva ainda não são bem conhecidos. Em 2010,

estudando o papel desses genes na PPC, *Tusset et al.* ⁽³⁹⁾ não conseguiram relacionar nenhuma variante encontrada como fator causal direto dos casos estudados de PPC.

Em relação a fatores inibitórios da secreção de GnRH, o neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) parece desempenhar um papel importante nestas vias inibitórias ⁽⁴⁰⁾. Em macacos Rhesus, a secreção de GABA no hipotálamo diminui ao longo da transição puberal, e a interrupção farmacológica da sinalização pelo receptor GABA_(A) induz a puberdade precoce ⁽⁴¹⁾. Em 2006, *Brito et al.* ⁽⁴²⁾ estudaram o gene *GABRA1* que codifica a subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA_(A) e não encontraram mutações ou polimorfismos associados aos casos de PPC.

O gene *NPYR1* que codifica o receptor para o neuropeptídeo Y (NPY) antagoniza os efeitos do GABA sobre os neurônios do GnRH ^(5, 43). Este antagonismo demonstrou desempenhar um papel no desenvolvimento da puberdade em macacos e roedores ⁽⁴³⁾. Contudo, sequenciamento do *NPYR1* em trinta e três pacientes com PPC não encontrou variantes patogênicas ⁽⁴⁴⁾.

Em 2009, diferentes estudos de associação do genoma relacionaram variantes no cromossomo 6q21, envolvendo o gene *LIN28B* (gene que codifica a proteína *homolg B lin-28*) ou próximo a seu *locus*, com a idade de início da menarca ⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾. Estes estudos despertaram o interesse pelo *LIN28B* em estudos do desenvolvimento puberal. Em 2010, *Silveira-Neto et al.* ⁽⁴⁸⁾ encontraram uma variante nova no *LIN28B* (p.His199Arg), em heterozigose,

em uma menina com PPC, mas o estudo funcional *in vitro* demonstrou que essa variante não alterou a função regulatória do gene.

Mais recentemente, o achado de mutações deletérias no gene *MKRN3* em 33% dos casos de puberdade precoce central de origem familiar estabeleceu de forma definitiva a importância do componente genético na fisiopatologia dessa condição ⁽⁴⁹⁾. O *MKRN3* é um gene de um único éxon, localizado no cromossomo 15q11, em uma região de *imprinting* relacionada à síndrome de Prader-Willi ⁽⁴⁹⁾. A herança da PPC familiar causada por mutação no *MKRN3* é autossômica dominante de transmissão paterna, uma vez que o alelo materno é silenciado ⁽⁴⁹⁾. O produto do gene *MKRN3* é uma proteína que participa da degradação de outras proteínas por processo de ubiquitinação, mas o mecanismo pelo qual sua inativação leva ao início da puberdade ainda não é conhecido ⁽⁵⁰⁾. Acredita-se que o *MKRN3* codifique um fator de transcrição com efeito inibitório na secreção de GnRH e sua inativação resulte na ativação prematura do eixo gonadotrófico ⁽⁵⁰⁾.

Estudos em camundongos avaliaram os valores de mRNA do *Mkrn3*, *Kiss1* e *Tac2* (gene análogo do *TAC3* em camundongos) no núcleo arqueado pelo método de PCR quantitativa ⁽⁴⁹⁾. Em ambos os sexos, os valores de mRNA do *Mkrn3* foram maiores em fases iniciais da vida, começando a declinar a partir do 15º dia, período de início da puberdade ⁽⁴⁹⁾. Esse declínio da expressão do *Mkrn3* correlacionou-se com as idades em que a expressão da *Kiss1* e *Tac2* aumentaram, anunciando o aparecimento da puberdade ⁽⁴⁹⁾. A expressão de *Mkrn3* permaneceu baixa até o 45º dia ⁽⁴⁹⁾.

Macedo et al. ⁽⁵¹⁾ identificaram novas mutações no *MKRN3* em pacientes com PPC aparentemente esporádicas, sem história familiar de PPC, sendo, após busca ativa, encontrados outros membros da família paterna acometidos. Além disso, observaram também que os pacientes com mutação no *MKRN3* desenvolveram um quadro de precocidade sexual típica, com idade de início dos caracteres sexuais por volta dos 6 anos de idade no sexo feminino, com características clínicas e laboratoriais semelhantes aos pacientes com PPC idiopática ⁽⁵¹⁾. Posteriormente, outros investigadores também descreveram mutações no *MKRN3* associadas a casos de PPC familiar ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Esses estudos contribuíram para expandir o espectro de mutações do *MKRN3* e fortalecer os achados iniciais (**Figura 1**).

Mais recentemente, *Simon et al.* ⁽⁵⁵⁾ estudaram mutações no gene *MKRN3* em 46 pacientes com PPC, sendo destes 28 com história familiar. Mutações no *MKRN3* foram identificadas em 13 dos 28 (46%) casos de PPC familiar e em um dos 28 casos de PPC esporádicas analisados. Nesses estudos, a proporção de meninas com mutações no *MKRN3* foi bem maior do que a de meninos. O fato pode ocorrer em razão dos casos masculinos de puberdade precoce serem ainda sub-diagnosticados ⁽⁵⁵⁾.

Bessa et al. ⁽⁵⁶⁾ avaliaram um grupo de 20 meninos com PPC idiopática e encontraram uma alta prevalência (40%) de mutações no *MKRN3* nesses pacientes, demonstrando que os meninos com PPC idiopática têm uma chance elevada de apresentar mutações no *MKRN3*. Tais pacientes apresentaram características clássicas de PPC, porém com a

idade de início da puberdade mais tardia (8,2 anos) quando comparado aos pacientes sem mutação no *MKRN3* (7,0 anos) ⁽⁵⁶⁾.

As mutações no *MKRN3* atingem tanto meninas como meninos, porém parecem atingir mais gravemente as meninas, que desenvolvem PPC em idade mais precoce ⁽⁵⁶⁾. O motivo desse dimorfismo de gênero ainda não está esclarecido ^(55, 56). Atualmente, as mutações no *MKRN3* representam a causa genética mais comum de PPC, sendo responsável por 33% a 46% dos casos familiares ^(49, 55).

Figura 1 - Mutações identificadas na proteína *MKRN3* em casos de PPC. Estrutura da proteína MKRN3 (3 - C3H em dedo de zinco, 1 - C3HC4 anel em dedo de zinco, e 1 região Cys-His). Os números correspondem às posições de aminoácidos na proteína MKRN3. 7 mutações frameshift (azul), 16 missenses (vermelho) e 3 nonsense (verde)

1.5 O Mecanismo de Controle da Puberdade

Os mecanismos neurais e moleculares específicos que desencadeiam a secreção de GnRH no início da puberdade permanecem um dos enigmas científicos ⁽⁵⁾. Estudos atuais na área da puberdade defendem a hipótese de que, durante o período pré-púbere, os neurônios secretores de GnRH sofrem uma inibição trans-sináptica persistente, sendo esse o mecanismo chave para regulação da puberdade em mamíferos ⁽⁵⁻⁷⁾. Quando esta inibição desaparece, a secreção de GnRH aumenta, o que leva ao aparecimento da puberdade ⁽⁵⁻⁷⁾. Nesse processo, a perda apenas dos estímulos inibitórios parece não ser suficiente para o surgimento da puberdade ⁽⁵⁻⁷⁾. É necessária também a presença de estímulos permissivos aos neurônios secretores de GnRH ⁽⁵⁻⁷⁾ (**Tabela 2**). Por fim, os neurônios da *kisspeptina*, localizados no núcleo arqueado do hipotálamo, a geram sinais excitatórios essenciais para o início da secreção pulsátil de GnRH em ambos os sexos ⁽⁵⁻⁷⁾.

Modificações epigenéticas no DNA também desempenham um papel importante nesse controle do início da puberdade. *Lomniczi et al.* ⁽⁵⁷⁾ demonstraram que a expressão do gene *Kiss1* é suprimida no núcleo arqueado do hipotálamo de camundongos antes da puberdade por um complexo proteico silenciador de transcrição chamado *polycomb*. Esta supressão é perdida por meio de sinais epigenéticos, incluindo mudanças na metilação do DNA e ganho de histonas marcadas ⁽⁵⁷⁾.

Tabela 2 - Fatores permissivos e inibitórios no início da puberdade, adaptado de *Leka-Emiri et al.* ⁽⁵⁾

Fatores permissivos	Fatores inibitórios
Genes	
<i>KISS1/KISS1R</i>	<i>MKRN3</i>
<i>NPY/NPYR1</i>	GABA/GABA _A
<i>LEP/LEPR</i>	<i>LIN28B</i>
<i>TAC3/TACR3</i>	Complexo <i>polycomb</i>
Fatores ambientais	
Massa gorda	Desnutrição
Desreguladores endócrinos	Desreguladores endócrinos
Restrição de crescimento intrauterino	Estresse, doenças crônicas, treino físico intenso

LEP: gene que codifica a leptina, *LEPR*: gene que codifica o receptor da leptina

1.6 A Região Imprintada do Cromossomo 14q32.2: um novo *locus* da puberdade

O *imprinting* genômico é um mecanismo de regulação da expressão gênica que permite apenas a expressão de um dos alelos parentais ⁽⁵⁸⁾. Ao contrário da maioria dos genes em que a expressão é bialélica, os genes que estão submetidos a este mecanismo têm expressão monoalélica; por definição, apenas um alelo está ativo (materno ou paterno), e o inativo está epigeneticamente marcado por modificação de histonas e/ou por metilação das citosinas ⁽⁵⁸⁾. A região de aglomerado de genes imprintados inclui genes com expressão materna ou paterna, e ambos os *imprintings* são necessários para o desenvolvimento normal ⁽⁵⁸⁾.

Sabe-se que cromossomo 14q32.2 é uma região com um aglomerado de genes imprintados que carrega alguns genes expressos apenas pelo

alelo paterno (PEGs), *DLK1*, *RTL1* e *DIO3* e outros apenas pelo alelo materno (MEGs), *GTL2/MEG3*, *RTL1as*, *MEG8* ^(59, 60). Há ainda regiões intragênicas diferencialmente metiladas *DLK1/MEG3* IG-DMR e *MEG3*-DMR que têm como função o controle dos centros de genes imprintados na placenta e no corpo, detalhado na **Figura 2** ^(59, 60). Essa região está associada à síndrome de Temple uma complexa síndrome que cursa com puberdade precoce central em 90% dos casos ^(59, 60).

Fonte: Adaptado de Ioannides et al., 2014 ⁽⁵⁹⁾.

Figura 2 - A região de genes imprintados no cromossomo 14q32.2. A figura ilustra a expressão de genes do alelo materno (superior em vermelho) e do alelo paterno (inferior em azul). Os genes *DLK1*, *RTL1* e *DIO3* são expressos apenas pelo alelo paterno; enquanto que as regiões não codificantes de RNAs (traços vermelhos) e os genes *GTL2/MEG3*, *MEG8* e *RTL1as* são expressos apenas pelo alelo materno. Duas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) são mostradas com metilação do alelo paterno, IG-DMR e o MEG3-DMR

Após a publicação do sequenciamento exômico das 15 famílias com PPC familiar que identificou cinco mutações inativadoras no *MKRN3*, o pesquisador David Haig que estuda a evolução humana, levantou a hipótese de que outros genes imprintados, além do *MKRN3*, pudessem estar envolvidos no controle da puberdade e em outros casos de PPC, dentre eles, genes localizados nessa região 14q32.2 associada à síndrome de Temple ⁽⁶¹⁾. Baseado nessa observação, os dados extraídos do sequenciamento exômico das famílias com PPC sem mutações identificadas

foram detalhadamente analisados nessa região. Os estudos de ligação sugeriram que genes na região 14q32.2 poderiam estar implicados com o desenvolvimento de PPC. O LOD score (*Logarithm of odd*, teste utilizado na análise de estudos de ligação) foi elevado, favorecendo a ligação da região com PPC ⁽⁶²⁾.

Adicionalmente, um estudo de associação em genoma de larga escala ou completo, do inglês *Genome-wide association study* (GWAS) realizado em 182.416 mulheres de origem europeia (extraídos de 57 estudos) evidenciou 123 variantes alélicas em 106 *loci* genômicos associados com a idade da menarca. Três destes *loci* estavam localizados em regiões de *imprinting*, incluindo o gene *MKRN3* e *DLK1* ⁽⁴⁶⁾.

A presença de uma síndrome genética nessa região de genes imprintados no cromossomo 14 levando à puberdade precoce e a correlação de idade da menarca das mulheres com polimorfismos no *DLK1* sugeriram que essa região possa estar relacionada com o controle do início da puberdade e justificar casos de PPC ainda sem causa genética determinada ⁽⁶²⁾.

1.7 Hipótese

Pacientes com PPC idiopática, de origem familiar ou esporádica, sem mutação no gene *MKRN3*, podem apresentar causas genéticas ainda não determinadas, que exerceriam também um papel na regulação do eixo reprodutivo e na determinação do início da puberdade humana.

Um novo gene candidato envolvido na patogênese da PPC poderá ser encontrado por meio da técnica de sequenciamento genômico em larga escala em uma grande família com PPC, onde não foram encontradas deleções, duplicações e substituições de nucleotídeos no sequenciamento exômico em estudo prévio ⁽⁴⁹⁾. Possivelmente, alterações em regiões regulatórias, fora de regiões exômicas, podem estar relacionadas com casos de PPC familiar ainda sem causa conhecida.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 - Análise clínica e genética de pacientes com PPC familiar e esporádica sem mutações no *MKRN3*:

2.1 A - Analisar potenciais anormalidades no genoma de uma família com PPC ainda sem causa genética conhecida por meio de sequenciamento genômico global;

2.1 B - Ampliar a análise do(s) gene(s) candidato(s) em um grupo de pacientes com PPC familiar e esporádica;

2.1 C - Correlacionar as novas variantes encontradas com o fenótipo dos pacientes com PPC;

3 PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Parecer nº 2.133.183). O consentimento Livre e Esclarecido, por escrito, foi obtido de todos os pais ou responsáveis e pacientes entre 6 e 10 anos (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, desenvolvido de acordo com sexo e faixa etária) (**Anexo A**).

3.2 Pacientes

O grupo de pacientes com PPC foi subdividido em dois: PPC forma familiar e PPC forma esporádica. Foram selecionadas famílias com PPC (37 pacientes de 31 famílias, 11 de herança materna, nove de herança paterna, seis com história de irmãos com PPC e cinco indeterminado) detalhados nos **anexos B e C** e 31 pacientes com PPC esporádica detalhados no **anexo C**. Os pacientes selecionados foram previamente rastreados para mutações no gene *MKRN3*, sendo incluídos no estudo apenas aqueles sem mutações inativadoras no gene *MKRN3*. Os pacientes com PPC familiar e esporádica foram selecionados dos Serviços de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP- SP), de casos enviados por

nossos colaboradores de Ribeirão Preto (HCFMUSP-RP, médico responsável Prof. Dr. Sonir Antonini), do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, médico responsável Prof. Dr. Gil Guerra Júnior), Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais-MG, além de casos vindos de Londres, Austrália, Turquia e Grécia.

Os critérios clínicos e laboratoriais considerados para inclusão dos pacientes com PPC no presente estudo foram: início dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos nas meninas e antes dos 9 anos nos meninos, concentrações de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH exógeno ou com análogo de GnRH *depot* (Lupron ®) em concentrações puberais, ressonância magnética (RM) do SNC sem anormalidades. A presença de mais de um membro da família com história de desenvolvimento sexual precoce caracterizou a forma familiar de PPC.

No presente estudo, a média da idade cronológica (IC) do início do aparecimento dos caracteres sexuais secundários nas meninas foi 6,2 anos, com mínima de 1 ano e máxima de 8 anos, e com desvio-padrão de 1,5 anos. A IC média da primeira consulta foi 7,8 anos, variando entre 2,8 e 10,2 anos, com desvio-padrão de 1,3 anos. O estágio de desenvolvimento mamário variou entre 2 e 5 e o estágio dos pelos pubianos, entre 1 e 5, de acordo com os critérios de Tanner e Marshall ^(63, 64). Os dois pacientes do sexo masculino apresentavam diâmetro testicular superior a 2,5 cm ou volume testicular maior que 4 mL ao diagnóstico. A idade óssea (IO) média foi 10,3 anos, variando entre 3,5 e 12 anos, com desvio-padrão de 1,7 anos,

conforme os critérios de Greulich e Pyle ⁽⁶⁵⁾. Os pacientes apresentavam em média um avanço de idade óssea de 2,5 anos em relação à idade cronológica. Os achados clínicos e hormonais dos 68 pacientes com PPC estão resumidos no **Anexo C**.

Figura 3 - Fluxograma de investigação dos pacientes selecionados para este estudo

3.3 Avaliação Laboratorial

3.3.1 Avaliação Hormonal

O diagnóstico laboratorial dos distúrbios do desenvolvimento puberal foi baseado nas dosagens das gonadotrofinas (LH e FSH) e dos esteróides sexuais (estradiol e testosterona). No estudo foram utilizados dois métodos de dosagens para as gonadotrofinas séricas: os ensaios imunofluorométrico (IFMA) (*Perkin Elmer, Wallac, Finlândia*) e eletroquimioluminométrico (ECLIA) (*Roche Diagnostics, Cobas e601 analyzer, Indianapolis, USA*).

O teste de estímulo com GnRH de ação curta foi realizado pela administração de 100 µg de gonadorelina intravenosa no tempo zero e coleta de sangue nos tempos -15, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. O teste de estímulo com GnRH de ação prolongada (*depot*) foi realizado pela administração de 3,75 mg acetato de leuprolide (Lupron®), intramuscular ou subcutâneo, no tempo zero e coleta de sangue após 2 horas. Os valores de referência dos esteroides sexuais e LH e FSH basais e após estímulo com GnRH ou análogos de GnRH *depot* estão descritos nos dados das **Tabelas 3 e 4**.

Para o diagnóstico de PPC foram consideradas concentrações puberais no sexo feminino: LH basal > 0,6 U/L ou após estímulo com GnRH > 6,9 U/L e estradiol > 13 pg/mL pelo método IFMA (ensaio imunofluorométrico) e LH basal > 0,2 U/L ou após estímulo com GnRH > 5 U/L e estradiol > 15 pg/mL pelo método ECLIA (ensaio

eletroquimioluminescência) ⁽²⁾. No sexo masculino, foram consideradas concentrações puberais: LH basal > 0,6 U/L ou após estímulo com GnRH > 9,6 U/L e testosterona > 14 ng/dL para o IFMA; LH basal > 0,2 U/L ou após estímulo com GnRH > 5 U/L e testosterona > 12 ng/dL pelo método ECLIA ⁽²⁾. Adicionalmente, LH > 10 U/L (IFMA) ou LH > 5,0 U/L (ECLIA), dosado 2 horas após administração da primeira ampola de acetato de leuprolida 3,75 mg via subcutânea, também foi considerado como resposta puberal para ambos os sexos ⁽²⁾.

Tabela 3 - Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes

	Testosterona ng/dL	LH basal U/L	LH pico* U/L	LH pico♦ U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 14	≤ 0,6	< 9,6	<10	IFMA
Pré-púberes	< 12	< 0,2	<5,0	<5,0	ECLIA

* após 100 µg de gonadorelina intravenoso; ♦ após 3,75 mg acetato de leuprolide intramuscular.

Tabela 4 - Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes

	Estradiol pg/mL	LH basal U/L	LH pico* U/L	LH pico♦ U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 13	≤ 0,6	< 6,9	<10	IFMA
Pré-púberes	< 15	<0,2	< 5,0	<5,0	ECLIA

* após 100 µg de gonadorelina intravenoso; ♦ após 3,75 mg acetato de leuprolide intramuscular.

3.3.2 Avaliação do DLK1 no Soro

As concentrações séricas do DLK1 foram realizadas usando um produto comercial (Immuno-Biological Laboratories –America; Minneapolis, MN referência IB99504) por meio do ensaio imunoenzimático (ELISA) e pelo método sanduíche ou de captura.

Um tubo separador de soro foi usado. As amostras coagularam à temperatura ambiente por 30 minutos antes de ser realizada a centrifugação por 20 minutos. O soro preparado foi armazenado em alíquotas $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para uso posterior.

Um anticorpo monoclonal específico para DLK1 foi pré-revestido na placa de microtitulação de 96 poços. Padrões e amostras foram pipetados nos poços para ligação ao anticorpo revestido. Depois da extensa lavagem para remover compostos não ligados, o DLK1 foi reconhecido pela adição de um anticorpo policlonal purificado específico para DLK1 (anticorpo de detecção). Após a remoção do excesso de anticorpo policlonal, o anti-IgG HRP conjugado com HRP foi adicionado. Em seguida, foi realizada uma lavagem final, a atividade da enzima peroxidase foi quantificada usando o substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB). A intensidade de cor da reação foi medida a 450 nm após acidificação, e correlacionou-se diretamente à concentração proporcional de DLK1 nas amostras. A faixa de detecção do ensaio variou de 0,469 ng/mL - 30 ng/mL.

3.3.3 Expressão do *Dlk1*

O RNA total foi coletado usando o mini kit RNeasy com tratamento com DNase isenta de RNase (Qiagen, Valencia, CA) de placas de 10 cm (n = 3 por grupo) de 293 células de rim humano embrionário (HEK) e duas linhagens celulares imortalizadas de camundongos adultos derivadas de neurônios de kisseptina do núcleo arqueado (KTA-R-1) e da região periventricular anteroventral (AVPV; KTA-V-3). O tecido hipotalâmico mediobasal, que inclui o núcleo arqueado, foi coletado no 12º dia pós-natal de camundongos C57/B6 machos do tipo selvagem (n = 3).

Um micrograma de RNA total de cada uma dessas fontes foi transcrito inversamente usando a transcrição reversa do iScript supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Uma PCR quantitativa em tempo real foi realizada utilizando um sistema ABI Prism 7000 de detecção (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando iQ SYBR Green Supermix (Laboratórios Bio-Rad).

Os primers foram projetados a partir da sequência de *Dlk1* de camundongos: NM_0100524; forward, 5'AGTGCGAAACCTGGGTGTC3', reverse, 5'GCCTCCTTGTTGAAAGTGGTCA 3'. As condições de PCR foram as seguintes: 50° C por 2 minutos, 95° C por 10 minutos, 95° C por 15 segundos, depois 60° C por 40 segundos por 40 ciclos, 95° C por 15 segundos, 60° C por 20 segundos e depois 95° C por 15 segundos.

Os resultados foram analisados utilizando o ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems). Os níveis de RNA mensageiro *Dlk1* (mRNA)

foram normalizados para os níveis de mRNA de *Rpl19* como controle interno. Os dados foram analisados utilizando o software estatístico Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Múltiplas comparações foram realizadas por análise de variância unidirecional seguida de teste de Turkey da diferença honestamente significativa (*honestly significant difference*). Todos os dados foram apresentados como a média mais ou menos erro padrão da média. Diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. O estudo foi realizado por colaboradores no Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts (Dra. Ursula B. Kaiser).

3.4 Avaliação Molecular

3.4.1 Extração de DNA Genômico de Leucócitos de Sangue Periférico

DNA genômico foi extraído de 12 mL de sangue periférico colhido em tubo com EDTA. O sangue foi incubado em solução para lise de glóbulos vermelhos (114 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos a 4°C. Após este período, a amostra foi centrifugada a 3.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o botão de células ressuspenso em solução tampão constituída de 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0 contendo 1% SDS e 0,2 mg/mL proteinase K e mantido durante a noite a 37°C. No dia seguinte, a amostra foi submetida a duas extrações com fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (25:24:1) e a uma extração com clorofórmio e álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com acetato de sódio 0,3 M em pH 7,0 e com dois volumes de etanol absoluto gelado. Posteriormente, o DNA foi lavado em etanol 70% por 5 minutos e ressuspenso em tampão de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria com luz ultravioleta (*Ultrospec III – Pharmacia Biotech, EUA*); o grau de pureza foi avaliado pela relação A260/280. A integridade do material foi verificada com eletroforese em gel de agarose 1% e visualização por transiluminação com luz ultravioleta após coloração com

solução de brometo de etídio. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

3.4.2 Sequenciamento Genômico Global

Nesse estudo, o sequenciamento genômico foi realizado no Broad Institute (Cambridge, MA) usando a tecnologia de clonagem molecular IlluminaHiSeq 2000 (IlluminaInc, San Diego, CA). Por esta técnica, o DNA genômico extraído de leucócitos de sangue periférico dos pacientes foi inicialmente fragmentado em tamanhos predeterminados e separados em fitas simples, por meio de enzimas polimerases. Em seguida, adaptadores com sequências de oligonucleotídeos conhecidas universalmente foram acrescentados às terminações dos fragmentos de DNA. Estes adaptadores são complementares aos primers de PCR e oligonucleotídeos imobilizados na matriz sólida para a amplificação do DNA. Durante cada ciclo de sequenciamento, a adição de quatro bases de nucleotídeos marcadas (citossina, adenina, timina e guanina) e enzimas à matriz seguida da estimulação com laser permitiu a leitura das bases complementares aos diversos fragmentos de DNA dispersos na matriz sólida. As sequências complementares obtidas foram alinhadas e comparadas com bancos de dados de referência (Human Genome version 19) usando o Burrows-Wheeler Aligner (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) para a detecção de variantes genéticas (**Figura 4**). Posteriormente, foram aplicados o Genome Analysis Toolkit (<http://broadinstitute.org/gatk>), o escore de qualidade de

recalibração de cada base e o realinhamento indel. Os polimorfismos e as variantes indel identificados foram genotipados, comparando todas as amostras simultaneamente usando o escore de qualidade de recalibração de cada variante. Para avaliação do efeito funcional das variantes, foi usado o SnpEff 2.0.5 (<http://snpeff.sourceforge.net/>).

Figura 4 - Representação esquemática do sequenciamento genômico (ILLUMINA). **A.** Extração do DNA de leucócitos do sangue periférico; **B.** Fragmentação do DNA e ligação à adaptadores específicos. Os adaptadores possuem sequência complementar aos primers dispostos na matriz; **C.** Lavagem dos fragmentos não codificadores; **D.** Amplificação dos éxons em ponte; **E.** Sequenciamento com tecnologia de alto rendimento; **F.** Comparação das leituras do paciente com a sequência referência.

3.4.3 Amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico dos pacientes selecionados (descrito em detalhes nos resultados) foi utilizado como substrato para a amplificação das regiões codificadoras dos genes *MKRN3* e *DLK1* e da região de rearranjo do *DLK1* modificada por uma grande deleção e duplicação do intron 3 (descrita em detalhes nos resultados), por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos (**Tabelas 5 a 7**). As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico (1 μ L de DNA), 100 μ M de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 1 μ L a 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,0 U de enzima *GoTaq DNA polymerase* (*Promega, Madison, WI, EUA*) e 5,0 μ L do tampão *5X Green Flexi Reaction Buffer* (*Promega, Madison, WI, EUA*), no éxon 1 do *DLK1* foi acrescentado 2,5 μ L de enhancer para cada reação e no éxon 3 do *DLK1* foi acrescentado betaína 2,0 μ L por 1 μ L de DNA. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *Veriti®96- Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e consistiu das seguintes etapas: 1) Região codificadora do gene *MKRN3* e - desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos; região codificadora do *DLK1* éxons 1, 2, 4, 5 e a região de rearranjo do *DLK1*- desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C

por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos; região codificadora do *DLK1* éxon 3 -desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos; 2) Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

3.4.4 Sequenciamento Automático Direto (Sanger)

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada a partir da comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos de um marcador de peso molecular de concentração conhecida em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à pré-purificação enzimática, utilizando-se o produto comercial *EXO-SAP*, contendo as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* e exonuclease I (*Affymetrix, USB Products, Cleveland, Ohio, EUA*). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o produto comercial *ABI Prism™ BigDye Terminator* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Para estas reações, foram usados também pares de oligonucleotídeos internos, tendo em vista o grande número de pares de bases nos fragmentos estudados (**Tabelas 5 a 7**). Os produtos destas reações foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3130xL automatic DNA sequencer* (*Applied Technologies, Foster City, CA*).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information (NCBI)*.

Tabela 5 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região codificadora do gene *MKRN3*

Oligonucleotídeos (PCR)	Oligonucleotídeos internos (sequenciamento)
1F:5' GCCTCAAGCCCATAAAGAAA 3'	1F GGGGAAGGAAAAAGAGATGC
3R:5' GGGAAAACAGGCAATAGCAG 3'	1R AGCCATCTGCTTCCTCTCAG
	Produto amplificado: 837 pares de base.
	2F GGCATTTGGACAAAGCAGATC
	2R CACTGGGAATGACCAATTCA
	Produto amplificado: 847 pares de base.
	3F CCAATTGCAACCATTCCTTC
	3R CACCATAATCCTAGGGGGAAA
	Produto amplificado: 684 pares de base.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região codificadora do gene *DLK1*

Oligonucleotídeos (PCR)
P1F: 5' GAGGGAACGTGTACCAAACG 3' P1R: 5' CTTAGGGCTAGGCGGGAC 3' Produto amplificado: 599 pares de base
P2F: 5' GGCTGTGTGGGCGAAGAC 3' R2R: 5' TGCAGCGTAGTGGCCAAG 3' Produto amplificado: 246 pares de base
P3F: 5' GGGTCCTTGGTTCCACAGAA 3' P3R: 5' GGAGACTGGGAGGAGGTGG 3' Produto amplificado: 300 pares de base
P4F: 5' CTTACTCCAGACCCCACTCG 3' P4R: 5' CCAGGATGAGCGCTTACTTC 3' Produto amplificado: 379 pares de base
P5F: 5' CGCTCCCTCATTACCTGAT 3' P5R: 5' GCGTTCACCAGATTTGACAC 3' Produto amplificado: 1000 pares de base

Tabela 7 - Oligonucleotídeos usados para amplificação da região de rearranjo no gene *DLK1*

Oligonucleotídeos (PCR)
PF: 5' ATGGAGAGGTTTCATGCTGGG 3' PR: 5' CCTCGGACTCCCAAAGCAA 3' Produto amplificado: 269 pares de base

3.4.5 Amplificação Dependente de Hibridização com Múltiplas Sondas para Análise do Número de Cópias (MLPA: Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification)

Este método permite avaliar o número de cópias e metilação de um gene. Baseia-se na reação por PCR e permite a detecção semiquantitativa de alterações no DNA. Dois produtos específicos foram usados. Um produto comercial contendo sondas de MS-MLPA desenhadas e preparadas como descrito por *Schouten et al.* ⁽⁶⁶⁾; e um segundo produto com sondas customizadas desenhadas de acordo com o manual do MRC Holland de confecção de sondas e adicionadas ao kit comercial SALSA MLPA EK1 reagents kit P300 Human Reference-2 probemix para avaliação do número de cópias do *DLK1* ⁽⁶⁷⁾.

O produto comercial: SALSA MS-MLPA probemix ME032-A1 UPD7/UPD14, MRC Holland, Amsterdam, Netherlands, continha apenas sondas para os éxon 3 e 4 do *DLK1*. Por isso, sondas customizadas foram confeccionadas para cobrir todos os éxons do *DLK1* (1 a 5) e as regiões 5'UTR e 3'UTR (**Tabela 8**). O kit comercial contém seis sondas específicas para a região 6q24.2, 11 sondas específicas para o 7p12.1 e 7q32.2 regiões e 12 sondas específicas para a região 14q32.2, cobrindo os genes: *PLAGL1*, *GRB10*, *MEST*, *MEG3*, *RTL1*, *MIR380e* *DLK1* éxons 3 e 4. Treze destas sondas comerciais contêm sítio de reconhecimento para enzima *HhaI* e fornecem informações sobre o estado de metilação da sequência alvo, contudo nenhuma relacionada ao *DLK1*. Além da detecção de metilação

aberrante, todas as 29 sondas presentes darão informações sobre as alterações no número de cópias da amostra analisada. Além disso, 15 sondas de referência foram incluídas, que detectam genes localizados fora dos cromossomos 6, 7 e 14.

Tabela 8 - Sondas customizadas usadas para amplificação e sequenciamento do gene *DLK1* pelo método de MLPA

Região do <i>DLK1</i>	Sequência (5'-3')
LPO 5'UTR	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CTTTCCCCTCGCTGCGCGCCCGCGCCCCCTTTCGCGTCCGCAA
RPO 5'UTR	5' PHO CCAGAAGCCCAGTGCGGCGCCAGGAGCCGGACCCGCT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
LPO éxon 1	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CCTCCTGCGCGTCCTCTTGCTCCTGCTGGCTTTCGGCCACAGC
RPO éxon 1	5' PHO ACCTATGGTGAGTTCCCCGGCGGCCCGGCTCT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
LPO éxon 2	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CCTTGGCCTGGGGCCTGGTGGGGTGAATTGTATAACCTTTCTTGTAAC
RPO éxon 2	5' PHO TCAGGGGCTGAATGCTTCCCGGCCTGCAACCCCCAAAATGGATTCTGCT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
LPO éxon 3	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA GCAGGGTCCCCTTTGTGACCAGTGCGT
RPO éxon 3	5' PHO GACCTCTCCCGGCTGCCTTCACGGACTCTGTGGT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
LPO éxon 4	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CCCCGGGTACTCGGGAAAGGACTGCCAGAAA
RPO éxon 4	5' PHO AAGGACGGGCCCTGTGTGATCAACGGGTAAATATCCTTCT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
LPO éxon 5	GGGTTCCCTAAGGGTTGGA CCTGCAGCCGCCCGGTGACCAACTGC
RPO éxon 5	5' PHO GCCAGCAGCCCGTGCCAGAACGGGGGCAT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
LPO3'UTR	GGTTCCCTAAGGGTTGGA CACATGGTCCTCGTGAAACCGTTACGAGTGCTGTACATGACCACCCAC
RPO3'UTR	5' PHO TGTGCAAAGAGCTACGATTGCTTTCGTTTCGTTAATTCTCACACACT CTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

5'PHO: região 5' fosforilada, LPO: Left Probe Oligonucleotide, RPO: Right Probe Oligonucleotide.

O protocolo de MS-MLPA foi de 5 passos (**Figura 5**): 1) Denaturação de 20 ng de DNA genômico de cada paciente. 2) Reação de ligação e hidrólise- realizada no período noturno por 16h. 3) Reação de PCR. 4) Separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar no Sequenciador ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) usando o LIZ® size standard. 5) Análise dos resultados obtidos.

A análise dos dados do kit comercial foi efetuada usando o Coffalyser software (Life Technologies). Para compensar a diferença na eficiência do PCR de amostras individuais, a fração de cada pico foi normalizada pela divisão do valor de pico de cada sonda amplificada, pelo valor combinado de sondas de referência dentro da amostra.

A análise dos dados das sondas customizadas foi efetuada usando planilha de excel com fórmulas pré-estabelecidas. Para compensar a diferença na eficiência do PCR de amostras individuais, a fração de cada pico foi normalizada pela divisão do valor de pico de cada sonda amplificada, pelo valor combinado de sondas de referência P300 Human Reference-2 probemix colocadas dentro da amostra.

Uma redução relativa de 35%-50% no valor de pico (ou área) de uma amostra não digerida de uma sonda específica era indicativa de uma deleção heterozigótica da região correspondente do DNA genômico.

Fonte: Adaptado Shen *et al.*, 2009 ⁽⁶⁷⁾.

Figura 5 - Esquema ilustrativo do procedimento de MLPA. **1.** Denaturação e hibridização: a amostra de DNA é aquecida de forma que denatura, então o probemix é adicionado. Cada sonda consiste em duas partes: o LPO e RPO, que se hibridizam com o adjacente na região alvo do DNA. **2.** Ligação: LPOs e RPOs hibridizados são ligados para formar um sonda completa. **3.** Reação de PCR: durante a reação de PCR, apenas as sondas completas são amplificadas exponencialmente. **4.** Os produtos de amplificação são separados por eletroforese capilar, gerando picos

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Pesquisa de Mutações no *MKRN3* em Novos Casos por Sequenciamento Automático (Sanger)

Após os estudos iniciais do gene *MKRN3* em pacientes brasileiros com PPC ^(49, 51), novos casos de PPC familiar e esporádica foram encaminhados e estudados. O presente estudo indicou cinco novos casos de pacientes com mutações inativadoras do *MKRN3*, e, em três deles (dois de origem brasileira e uma argentina), a segregação familiar foi possível. Obteve-se acesso ao DNA apenas do índice da família de origem norueguesa com história de PPC de origem paterna. A paciente da família de origem turca tinha histórico de uma prima com desenvolvimento puberal precoce, sendo desconhecido se a mesma era de origem paterna ou materna. A prima do índice foi estudada, porém não apresentou mutações no gene *MKRN3*, nem houve acesso aos demais membros dessa família para estudo molecular (**Tabela 9**).

Três das cinco famílias apresentaram a mutação p.Ala162Glyfs*14, correspondendo a 60% dos casos estudados. Esta mutação caracteriza-se pela inserção de um C em uma região de poliC, descrita em estudo prévio, como uma região de *hotspot* ⁽⁵⁰⁾.

Tabela 9 - Caracterização clínica, laboratorial e molecular dos pacientes com PPC familiar causada por mutação no *MKRN3*

Paciente origem	Membros	Manifestação clínica inicial (idade em anos)	Diagnóstico			LH IU/L		FSH IU/L Basal	E2 pg/mL	T ng/dL	Mutação DNA	MKRN3 Proteína
			Idade Anos	Mamas/ Genitália Estádio Tanner	IO anos	Basal	Pós LHRH					
Noruega	Índice	Telarca (7,0)	7,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	475_476insC	Ala162Glyfs*14
Brasil	Índice	Telarca (5)	6	3	11	4,16	-	5,83	<10	-	475_476insC	Ala162Glyfs*14
	Pai										475_476insC	Ala162Glyfs*14
	Irmã										475_476insC	Ala162Glyfs*14
	Tia paterna										475_476insC	Ala162Glyfs*14
Argentina	Índice	Aumento testicular (8,5)	8,4	3	10	1,1	10,2	1,5	-	466	c.982C>T	Arg328Cys
	Irmão										c.982C>T	Arg328Cys
Brasil	Índice	Telarca (7,5)	7,8	3	7,8	1,2	-	4,8	43	-	c. A>G795	Ile265Me
	Pai										c. A>G795	Ile265Me
Turquia	Índice	Telarca (3,6)	3,6	2	6,9	1,7	27,69	5,2	26	-	475_476insC	Ala162Glyfs*14

IO: idade óssea; E2: estradiol; T: testosterona.

4.2 Puberdade Precoce Central Familiar

Dentre as 31 famílias sem mutação no gene *MKRN3* uma foi destacada, denominada como Família 1. Esta era de origem brasileira, caracterizada por quatro membros do sexo feminino com diagnóstico de PPC, seguidas no ambulatório do HCFMUSP e 1 membro (avó paterna) com histórico de menarca entre 9-10 anos. Esta família destacou-se por ter vários membros afetados em duas gerações, e também por ter duas pacientes afetadas, filhas do mesmo pai e de mães diferentes, sugerindo herança paterna. Além disso, o DNA de vários membros afetados (5 indivíduos) e não afetados (9 indivíduos) foi disponibilizado para os estudos genéticos. A mesma família foi submetida a diversas metodologias de estudos moleculares em trabalhos prévios, porém, sem identificação de uma causa genética para a PPC nos membros afetados. Inicialmente, foi realizado o sequenciamento exômico global, que revelou, por estudos de ligação, o envolvimento de uma região do cromossomo 14q nos pacientes com PPC. Em seguida, foram realizadas as técnicas de SNP array e MLPA com cobertura para o cromossomo 14. Alterações genéticas não foram identificadas nas pacientes afetadas. Por esse motivo, três membros afetados (III.1, III.2 e III.3) e três não afetados (II.4, II.5 e III.4) dessa família foram escolhidos para o estudo do sequenciamento genômico global (**Figura 6**).

Siglas: **e**: indivíduos submetidos ao sequenciamento exômico em estudo prévio, **s**: indivíduos submetidos ao SNP array em estudo prévio, **m**: indivíduos submetidos à análise de MLPA, e **g**: indivíduos selecionados para o sequenciamento genômico.

Figura 6 - Heredograma da Família 1 com estudos genéticos realizados. Os membros com PPC ou história de menarca precoce são representados pelo preenchimento das figuras em preto (I.1, III.1, III.2, III.3, III.7). Os diversos estudos genéticos foram destacados ao lado direito superior dos números em siglas

4.2.1 Sequenciamento Genômico Global

4.2.1.1 Variante Identificada

Foram identificados 3.838.185 SNPs, troca de um nucleotídeo por outro na sequência de DNA do inglês *single nucleotide polymorphism*, sendo 99.137 novos; e 709.114 indels (alteração causada por inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos), sendo 127.593 novos nos seis membros submetidos ao sequenciamento genômico global da Família 1. Critérios rigorosos foram usados como filtros para selecionar as variantes provavelmente causadoras do fenótipo de PPC. Em razão da raridade da PPC familiar, foram excluídas todas as variantes presentes em bancos de dados públicos (1.000 Genomas, EXAC, dbSNP). Também foram excluídas quaisquer variantes encontradas nos 37 bancos de dados de genomas brasileiros (EPIGENE-Brasil iniciativa Project 7).

A filtragem resultou em 87 variantes novas dentro da região de ligação encontrada em estudo prévio. Dessas, havia uma única variante não sinônima, um frameshift no gene *AHNAK2*. Esta variante não foi considerada patogênica, pois o gene *AHNAK2* possui mais de 130 variantes caracterizadas por perda de função no banco de dados EXAC (<http://exac.broadinstitute.org>) sem relação com doenças. Nenhuma das outras 86 variantes estava em regiões promotoras ou em sítios específicos de ligação de fatores de transcrição. A análise do número de cópias do cromossoma 14 a partir da posição 99.000.000 foi realizada, sendo

extraídos nove conjuntos de dados, variando de 268 Mb a 586 Mb em tamanho. A proporção das médias de profundidades de leitura de afetados e de não afetados foi então submetida ao programa computacional R versão 3.1.3. A inspeção visual sugeriu uma deleção de uma região no início do cromossomo 14 dos pacientes afetados, quando comparado aos não afetados. Os dados foram revisados com mais precisão usando o programa digital IGV (Integrative Genomics Viewer) versão 2.3.72 em todas as amostras, confirmando o achado (**Figura 7A-B**). A análise foi realizada por nosso colaborador americano Dr. Andrew Dauber (Cincinnati, EUA). Uma grande deleção de, aproximadamente, 14.000 pares de bases no início do gene *DLK1* foi identificada apenas nos indivíduos afetados e nos portadores assintomáticos. Oligonucleotídeos específicos foram confeccionados nas regiões adjacentes à grande deleção, visando à amplificação de um fragmento de tamanho reduzido apenas nos pacientes afetados pela deleção. Após a reação de PCR nesses pacientes, notou-se que o fragmento amplificado possuía, aproximadamente, 850 pb, embora o fragmento esperado fosse de 580pb. Após o sequenciamento desse produto de PCR, foi encontrada uma duplicação de 269 pb de uma região do íntron 3 desse gene na região da grande deleção, tornando esse achado um complexo rearranjo composto de uma grande deleção da região 5'UTR até início do éxon 1, associada a uma inserção de uma região do intron 3.

Figura 7 - Complexo rearranjo genômico que resultou na deleção do éxon 1 no *DLK1*

Figura 7A - Imagens da análise do genoma pelo *Integrative Genomics Viewer* da paciente III.2. Em cada painel, a faixa superior lista as coordenadas genômicas retratadas na tela. A seção do meio mostra o sequenciamento de cada indivíduo em barras cinza, com um histograma da cobertura de bases individuais. As leituras coloridas representam a sequência lida emparelhada com a sequência do indivíduo que não está localizada na distância esperada. Isto ocorre em razão do rearranjo/deleção genômica. **Painel superior esquerdo:** visão geral da região genômica incluindo *DLK1* e sua região à montante. A deleção heterozigótica é claramente visível, no meio do painel, tal como uma região de cobertura de sequenciamento reduzida. **Painel inferior esquerdo:** visão ampliada do início da deleção, demonstrando uma queda na cobertura do sequenciamento com uma abundância de leituras com pares a uma distância inesperada (em vermelho). **Painel superior direito:** visão ampliada da extremidade da deleção. **Painel inferior direito:** área de duplicação do intron 3 do *DLK1* mostrando o aumento da cobertura e abundância de leituras com pares a uma distância inesperada (em vermelha). As setas azuis em todos os painéis indicam as fronteiras da deleção e duplicação.

Figura 7B - Esquema do complexo rearranjo do *DLK1*. Blocos azuis representam os éxons de 1 a 5, o número de pares de base de cada éxon encontra-se abaixo dos blocos. Linha preta: região intergênica com o número de pares de base acima da linha preta. Linha amarela: região de duplicação, originalmente, pertencente a região intrônica 3-4 com 269 pares de base. Linha vermelha: região da grande deleção com 13.939 pares de base, na região 5' não traduzida, englobando o início do éxon 1.

4.2.1.2 Correlação Genótipo- Fenótipo Família 1

O complexo rearranjo do gene *DLK1* no cromossomo 14q foi identificado em cinco membros afetados da Família 1: no caso índice (III.3), em sua irmã por parte de pai (III.7), em suas duas primas paternas (III.1, III.2), e na avó paterna (I.1). Adicionalmente, o mesmo defeito foi encontrado no pai do caso índice (II.5) e em seu tio paterno (II.2), ambos carreadores assintomáticos (**Figura 8 e 9**). O indivíduo (II.5), pai do índice, e seu tio paterno (II.2) herdaram a mutação de sua mãe, mas não manifestaram o fenótipo de PPC por este gene ser expresso apenas pelo alelo paterno. O caso índice (III.3) apresentou história de telarca aos 5,0 anos e pubarca aos 6,0 anos, sua irmã (III.4) e seu irmão (III.5) não manifestaram PPC. Sua meia irmã paterna (III.7) apresentou telarca aos 5,9 anos e pubarca 6,0 anos. Suas duas primas paternas (III.1 e III.2) também apresentaram desenvolvimento puberal antes dos 8 anos. A pubarca foi evidenciada em apenas duas das quatro pacientes (III.1 e III.7). A média de idade de início puberal foi 5,2 anos nas meninas (variando entre 4,6 e 5,9 anos). Todas as quatro pacientes afetadas possuíam concentrações de LH basal e/ou após estímulo puberais e idade óssea avançada ao diagnóstico, exceto uma (III.1) (**Tabela 10**). A análise da segregação familiar foi realizada por meio de PCR com os oligonucleotídeos específicos para amplificar o fragmento, contendo o complexo rearranjo do gene *DLK1*. Todos os carreadores assintomáticos e afetados amplificaram um fragmento de, aproximadamente, 850 pb (580 pb esperado mais 269 pb da duplicação da região 3-4) (**Figura 9**).

Figura 8 - Heredograma da Família 1 com os resultados moleculares. Os membros afetados foram representados pelo preenchimento das figuras em preto (I.1, III.1, III.2, III.3, III.7). Os carreadores assintomáticos em razão ao *imprinting* materno foram marcados com um círculo preto (II.2 e II.5). Os membros pesquisados sem mutação forem identificados com WT: *wild-type*.

Figura 9 - Análise da segregação da deleção *DLK1* na Família 1. A figura mostra amplificação por PCR de um fragmento de 850 pb apenas nos indivíduos que apresentam a deleção do gene *DLK1*.

Tabela 10 - Características clínicas e hormonais das pacientes afetadas da Família 1 na ocasião do diagnóstico e na visita mais recente

	Paciente III.3	Paciente III.2	Paciente III.1	Paciente III.7
Manifestação Clínica (anos)	Telarca (5) Pubarca (6,0)	Telarca (5,0)	Telarca (4,6)	Telarca (5,9) Pubarca (6,0)
Idade da 1ª visita (anos)	6,7	8,0	6,4	6,9
Altura cm (DP)	129,5 (2,5)	136,3 (1,2)	125,5 (1,7)	127,5 (1,6)
IMC Kg/m ² (percentil)	17,9 (87%)	19,5 (95%)	16,8 (83%)	17,3 (78%)
Desenvolvimento mamário (Tanner estágio)	4	4	3	4
Pelos Pubianos (Tanner estágio)	2	1	1	3
Idade óssea (anos)	11	11	7	10,6
Basal e pós estímulo LH (UI/L) ‡	1,9/31,5	1,7/26,9	<0,6/11,4	1,6/23,5
Estradiol (pg/ml) °	53,3	34,9	<13	29

Visita Recente

Idade (anos)	22	21	18	16
Duração do tratamento de aGnRH (anos)	4,2	3,0	4,2	3,6
Peso (Kg)	72,3	55,5	78	55,9
Estatura alvo cm (DP)	166 (0,6)	158,5 (-0,6)	158,5 (-0,6)	166,5 (0,7)
Altura (cm)	156 (-1,0)	159,7 (-0,4)	159,3 (-0,5)	160,5 (-0,3)
IMC (kg/m ²)	29,7	22	30,8	21,9
Idade da menarca (anos)	12	12	12	10,8
LH/FSH basal (UI/L) ‡	3,3/5,1	2,9/2,5	5,5/7,0	0,2/0,6
Estradiol (pg/mL) °	83	170,1	<15	26,5

‡ Imunofluorométrico; ° Quimioluminescência; Abreviaturas: IMC: Índice de Massa Corporal; DP: desvio-padrão.

4.2.1.3 Correlação das Características Clínicas da Síndrome de Temple com as das Pacientes com Deleção no Éxon 1 do Gene *DLK1*

A síndrome de Temple é decorrente de anormalidades no cromossomo 14q32, onde o *DLK1* se localiza ^(59, 60). As características clínicas desta síndrome foram avaliadas nas quatro pacientes com deleção do *DLK1* (**Tabela 11**). A puberdade precoce central típica foi o único fenótipo em comum encontrado em todas as pacientes. Os retardos de crescimento pré e pós-natal foram excluídos, considerando o peso e comprimento normais na ocasião do nascimento e a altura das pacientes na infância. Além disso, três delas atingiram a altura final normal (para a faixa de altura alvo parental) após tratamento com análogos de GnRH.

Outras características clínicas clássicas da síndrome de Temple, tais como, distúrbios alimentares, dismorfismo facial, macrocefalia relativa, mãos e pés pequenos e anormalidades neurológicas também foram excluídas nessas pacientes com PPC, sugerindo um quadro de PPC não-sindrômica nessa família (**Figura 10**). No entanto, o sobrepeso ou a obesidade, presente na síndrome de Temple, foi diagnosticado em três pacientes no momento do diagnóstico inicial e em duas na vida adulta. Além disso, alterações metabólicas foram evidenciadas na paciente III.1 (obesidade grau I e HbA1c alterada) e III.3 (sobrepeso), bem como em sua avó paterna (sobrepeso e diabetes mellitus tipo 2 aos 57 anos). Todas elas apresentaram aumento de percentual de gordura corporal por bioimpedância

elétrica (InBody770), com predomínio da gordura abdominal visceral (**Tabela 11**).

Figura 10 - Foto das pacientes afetadas e dos membros não afetados da Família 1. Imagem das faces, mãos e dos pés das pacientes afetadas à esquerda e de dois membros não afetados à direita. As fotos foram autorizadas por todos os indivíduos e seus responsáveis

Tabela 11 - Correlação das características clínicas e laboratoriais da síndrome de Temple com as das pacientes com deleção no éxon 1 do gene *DLK1*

Características Clínicas	Síndrome de Temple (frequência %)	Paciente III.3	Paciente III.2	Paciente III.1	Paciente III.7
Idade gestacional e via de nascimento	Parto prematuro (30%)	~40 semanas vaginal	39 semanas vaginal	39 semanas vaginal	39 semanas vaginal
Comprimento ao nascimento cm (DP)	Retardo do crescimento intrauterino (75%)	ND	51 (0,2)	53 (1,2)	48 (-1,5)
Peso ao nascimento kg (DP)	Baixo peso ao nascer (87%)	~3,0 (-1,0)	3,9 (1,3)	3,2 (-0,4)	3,7 (0,8)
Comportamento alimentar	Problemas alimentares (43%)	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações	Sem alterações
Características faciais	Dismorfismo facial	Não detectado	Não detectado	Não detectado	Não detectado
Perímetro cefálico* cm	Relativa macrocefalia (56%)	55,5 ('50%)	54,5 ('50%)	54,5 ('50%)	56,5 ('50%)
Mãos (Dedo x Palmas) **cm	Mãos pequenas (87%)	8,2 x 11,3	7,5 x 11	7,5 x 11	7,8 x 11,2
	Clinodactilia (31%)	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Pés	Alterações em pés	Polidactilia	4º metaterço curto	-	-
Tamanho do sapato	Pés pequenos (96%)	36	35	34	35
Características neurológicas	Hipotonia (93%) Retardo no desenvolvimento motor (83%) Atraso na fala (59%), Retardo mental (39%)	-	-	-	-
Desenvolvimento puberal	Puberdade precoce (86%)	+	+	+	+
Alterações metabólicas	Maturity-onset diabetes of the young (raro) Diabetes tipo 2 de início precoce	Acantose nigricans	-	Acantose nigricans Pré diabetes	-
Colesterol total e LDL (mg/dL)	Hipercolesterolemia (10%)	182/141	122/47	196/135	171/114
Índice de Massa Corporal (kg/m ²)	Sobrepeso e obesidade	29,2	21,8	33,1	22,2
Circunferência abdominal (cm) e massa gorda (%)	Obesidade truncal	94 43,6	69,5 35,4	94,5 50,4	69 34,2

* Perímetro cefálico medido na última visita. ** Dedo: dedo médio, Palmas: comprimento da mão (72). Símbolos -: não detectado alterações, +: presente. Valores normais de colesterol total < 200 mg/dL e LDL < 140 mg/dL. Porcentagem normal de massa gorda por bioimpedância: 18-28.

4.2.2 Dosagem Sérica do *DLK1* nos Pacientes Afetados da Família 1

Para investigar o efeito da deleção genômica do gene *DLK1*, as concentrações séricas da proteína codificada por esse gene foram medidas nas quatro pacientes afetadas, bem como na avó paterna, também afetada, e comparadas com oito controles, incluindo quatro indivíduos pré-púberes e quatro púberes que relataram início do desenvolvimento puberal normal. Os valores séricos da proteína DLK1 variaram entre 1,9 e 20 ng/mL no grupo controle. Em contraste, todas as cinco pacientes afetadas tiveram concentrações indetectáveis de DLK1 ($< 0,4$ ng / mL), sugerindo que a deleção genômica resultou em completa falta de produção de DLK1 nesses indivíduos (**Figura 11**).

Figura 11 - Concentrações séricas de DLK1 nos controles e em cinco pacientes com PPC em razão do complexo rearranjo do gene *DLK1*. As pacientes afetadas tiveram valores indetectáveis de DLK1 no soro (abaixo do limite do ensaio de detecção de 0,4 ng / ml). método ELISA; kit: IBL-America, Minneapolis, MN

4.2.3 Expressão do *Dlk1* no Hipotálamo de Camundongos e Linhagens Celulares de Camundongos Derivadas de Neurônios de Kisspeptina

A expressão do gene *Dlk1* no hipotálamo médio basal (MBH) de camundongos machos no período juvenil foi analisada. O hipotálamo médio basal engloba o núcleo arqueado hipotalâmico, área com uma grande população de neurônios de kisspeptina, considerada região chave para o controle da secreção de GnRH ⁽⁷⁾. Além disso, foi medida a expressão de *Dlk1* em duas linhagens celulares imortalizadas de camundongos, KTaR-1 e KTaV-3, derivadas de neurônios de kisspeptina dos núcleos arqueados e periventricular anteroventral (AVPV), respectivamente ⁽⁶⁸⁾. O núcleo AVPV mostrou abrigar uma segunda grande população de neurônios de kisspeptina, implicados com o pico ovulatório de LH ⁽⁶⁹⁾. A expressão de *Dlk1* foi detectada no hipotálamo MBH de camundongos e em ambas as linhagens celulares com valores significativamente maiores de expressão do que nas células HEK293, controles negativos ($P < 0,05$), nas quais nenhuma expressão de mRNA de *Dlk1* foi observada (**Figura 12**). Os valores de expressão foram significativamente maiores no MBH do que nas linhagens celulares ($P < 0,05$). Houve uma tendência para maior expressão em células KTaV-3 em comparação com as células KTaR-1, porém, sem significância estatística ($P: 0,072$).

Em conjunto, estes dados forneceram evidências adicionais de que o *DLK1* pode desempenhar um papel na regulação do início puberal, possivelmente influenciando a sinalização da kisspeptina.

Figura 12 - Expressão do RNAm do *Dlk1* no hipotálamo médio basal (MBH) de camundongos e em duas linhagens celulares que expressam kisspeptina (KTaR-1 e KTaV-3). Os valores de RNAm de *Dlk1* foram medidos por PCR quantitativa em tempo real. Células HEK293 foram usadas como controle negativo. Os resultados são apresentados como média $\pm$ erro padrão para cada amostra ($n = 3$). As letras diferentes (a, b, c) são significativamente diferentes uma das outras (teste de diferença significativa de Tukey, $P < 0,05$). Especificamente, os níveis de expressão nas células HEK293 são significativamente diferentes das células KTaR-1 e KTaV-3, que também são significativamente diferentes do MBH. Não há diferença significativa entre o KTaR-1 e o KTaV-3. KTaR-1 é uma linhagem celular imortalizada derivada do núcleo arqueado; KTaV-3 é uma linhagem celular imortalizada derivada do núcleo AVPV

4.3 Sequenciamento Automático (Método de Sanger) do Gene *DLK1* do Grupo de Pacientes com PPC Familiar e Esporádica

A identificação do *DLK1* como um novo gene relacionado à PPC familiar, por meio de sequenciamento genômico global, despertou o interesse em buscar novas mutações em pacientes com PPC. Trinta e três indivíduos de 30 famílias com PPC (31 meninas e dois meninos) e trinta e um casos aparentemente esporádicos de PPC foram estudados na busca de mutações de pontos no gene *DLK1*. No grupo de PPC familiar, duas variantes gênicas patogênicas foram encontradas no estudo. No grupo de PPC aparentemente esporádica não foram encontradas variantes patogênicas no gene *DLK1*.

4.3.1 Variante Frameshift c.810_810delT p.Val272Cysfs*14

A mutação frameshift em heterozigose no éxon 5 do *DLK1* **c.810_810delT p.Val272Cysfs*14** foi identificada em dois membros (caso índice III.2 e seu filho IV.1) de uma família inglesa com história de PPC (Família 2, **Figura 13**). A deleção de uma citosina na posição 810 do *DLK1* resultou em uma mutação frameshift no aminoácido 272, levando a um códon de parada prematura 14 aminoácidos à frente da deleção.

4.3.2 Correlação genótipo-fenótipo Família 2

O caso índice (III.2) apresentou PPC iniciada por volta dos 5 anos. A paciente foi tratada com medicação oral (não especificada a medicação) até por volta dos 11 anos, com história de menarca logo após a suspensão do tratamento. Apesar do tratamento, ela apresenta baixa estatura, com altura final de 146,2 cm (DP: -2,7). Seu DNA e de seu filho foram enviados a nosso serviço para investigação genética, em razão da preocupação da paciente quanto a possibilidade de seu filho também desenvolver puberdade precoce. O filho do caso índice (IV.1), portador da mutação, tem 7 anos de idade, sem problemas de saúde e sem sinais de puberdade até o momento. O irmão do caso índice (III.3) também apresentou PPC com início entre 5 e 6 anos, fez tratamento com análogos de GnRH (spray nasal) e também apresenta baixa estatura com altura final de 147,3cm (DP: -4,0). O pai do caso índice (II.5) refere PPC sem tratamento, medindo 150cm (DP: -3,6). Duas tias paternas do caso índice (II.3 e II.4) referiram história de menarca entre 8 e 9 anos, medindo 144,8cm (DP: -2,9) e 142,2cm (DP: -3,3) respectivamente (**Tabela 12**). O DNA dos demais membros da família não foi disponibilizado para análise molecular. Todavia, a história de puberdade precoce nos indivíduos II.3, II.4, II.5, III.7 sugere que sejam afetados e que herdaram a mutação do lado paterno. O filho do caso índice (IV.1) não desenvolveu PPC, sendo, portanto, um carreador assintomático. A família apresenta um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância completa e transmissão

exclusiva pelo alelo paterno, como esperado para gene *DLK1*, que sofre *imprinting* materno.

Figura 13 - Heredograma da Família 2 com mutação no gene *DLK1* identificada pelo sequenciamento direto pelo método de Sanger. O caso índice está indicado pela seta. NM significa alelo não mutado, círculo sexo feminino, quadrado sexo masculino, símbolo cheio membro afetado, símbolo com X falecimento e símbolo com ponto no interior carreador assintomático. Abaixo do número de identificação a altura dos indivíduos em cm e o cálculo do desvio padrão de estatura entre parênteses. O asterisco * indica os indivíduos que foram estudados por sequenciamento direto

4.3.3 Variante Frameshift c.479_479delC p.Pro160Leufs*50

A mutação frameshift em heterozigose no éxon 5 do gene *DLK1* c.479_479delC p.P160Lfs*50 foi identificada em uma paciente (III.4) com PPC pertencente a uma família brasileira (Família 3, **Figura 14**). A deleção de uma citosina na posição 479 do *DLK1* resultou em uma mutação

frameshift no aminoácido 160, levando a um códon de parada prematura 50 aminoácidos à frente da deleção.

4.3.4 Correlação Genótipo-Fenótipo Família 3

O caso índice (III.4) foi avaliado no ambulatório do Hospital das Clínicas da FMUSP na idade adulta (19,6 anos), devido a um microadenoma hipofisário. A paciente tinha história de telarca aos 6 anos, LH basal de 1,8 UI/L e após estímulo com GnRH de 11,5 UI/L. A ressonância magnética de SNC excluiu lesões anatômicas na região hipotalâmica, mas evidenciou um microadenoma hipofisário. Apesar do diagnóstico de PPC, a paciente não foi tratada no serviço de origem e apresentou menarca aos 6,6 anos. Nos últimos anos, referiu ciclos menstruais regulares. Os exames laboratoriais bioquímicos, hormonais e US pélvico mais recentes não evidenciaram alterações. A altura final da paciente foi de 145,5 cm (DP:-2,7) com magreza extrema IMC:13 kg/m². O DNA dos demais membros da família não foi disponibilizado para análise molecular. A tia paterna do caso índice (II.2) referiu telarca aos 7 anos e menarca aos 9 anos, sem nenhuma investigação ou tratamento na ocasião. Atualmente com 56 anos, apresentou altura final de 140 cm (DP: -3,7), tem obesidade grau II (IMC: 37,7 kg/m²), hipercolesterolemia e intolerância à glicose de início recente. O pai do caso índice (II.3) não recorda o período de início de sua puberdade; no entanto, tem baixa estatura 150 cm (DP: -3,7) sugerindo também uma possível PPC não tratada (**Tabela 12**). Atualmente, com 54 anos, tem IMC: 24,4 kg/m² e

refere dislipidemia em tratamento. O irmão do caso índice (III.5) apresentou desenvolvimento puberal normal com altura final de 168 cm (DP: -1,0).

Figura 14 - Heredograma da Família 3 com mutação no gene *DLK1* identificada no sequenciamento direto pelo método de Sanger. O caso índice está indicado pela seta. NM significa alelo não mutado, círculo sexo feminino, quadrado sexo masculino, símbolo cheio membro afetado, símbolo com X falecimento. Abaixo do número de identificação, a altura dos indivíduos em cm e o cálculo de desvio padrão de estatura entre parênteses. O asterisco * indica que o indivíduo que foi estudado por sequenciamento direto

Tabela 12 - Características clínicas dos pacientes adultos com PPC em razão das novas mutações no gene *DLK1*

Família origem	Parentesco do índice (Membro)	Sexo	Idade (anos)	Manifestação clínica inicial (idade em anos)	Tratamento	Altura (cm) (DP)	IMC (kg/m ²)	Características adicionais	Mutação DNA	<i>DLK1</i> Proteína
Família 2 Inglaterra	Filho (IV.2)	M	7	Carreador assintomático			ND		810_810delT	Val272Cysfs*14
	Índice (III.6)	F	33	Telarca (5 a 6) Menarca (11)*	Medicação oral	146,2 (-2,7)	ND	Baixa estatura	810_810delT	Val272Cysfs*14
	Irmão (III.7)	M	36	Voz grave (9)	Medicação spray – aGnRH	147,3 (-4,0)	ND	Baixa estatura	ND	ND
	Pai (II.5)	M	ND	Sinais puberais (5)		150 (-3,6)	ND	Baixa estatura DM tipo 2, AVC	ND	ND
	Tia paterna (II.3)	F	ND	Menarca (8 a 9)		144,8 (-2,9)	ND	Baixa estatura Síndrome dos ovários policísticos	ND	ND
	Tia paterna (II.4)	F	ND	Menarca (8 a 9)		142,2 (-3,3)	ND	Baixa estatura	ND	ND
Família 3 Brasil	Índice (III.6)	F	19,6	Telarca (6) Menarca (6,6)	Não	145,5 (-2,7)	13	Baixo peso Cisto ovariano, microadenoma hipofisário	479_479delC	Pro160Leufs*50
	Pai (II.3)	M	54	Não recorda Baixa estatura	Não	150 (-3,7)	24,4	Baixa estatura, hipercolesterolemia	ND	ND
	Tia paterna (II.2)	F	56	Telarca (7) Menarca (9)	Não	140 (-3,7)	37,7	Baixa estatura, obesidade, hipercolesterolemia, artrose, intolerância a glicose	ND	ND

IMC: índice de massa corpórea, F: feminino, M: masculino, ND: não disponível, DP: desvio padrão de estatura, * após tratamento, DM: diabetes mellitus, AVC: acidente vascular cerebral.

4.3.5 Análise das Famílias 1, 2 e 3

A caracterização clínica e hormonal da PPC foi possível em cinco pacientes (quatro da Família 1 e uma da Família 3). Nestas pacientes ocorreu uma típica ativação prematura do eixo reprodutivo, incluindo sinais de precocidade sexual, como desenvolvimento das mamas, crescimento linear acelerado, idade óssea avançada, níveis púberes de LH basal e/ou após estímulo (previamente descrito). A média de idade do início puberal de todas as pacientes afetadas (quatro da Família 1, uma da Família 2 e uma da Família 3) foi 5,4 anos (variando entre 4,5 e 6,0 anos). O DNA de outros membros das Famílias 2 e 3 não foi disponibilizado para estudo molecular, sendo o diagnóstico de PPC presumido pelo relato de idade do aparecimento dos caracteres sexuais secundários, idade da menarca e/ou baixa estatura na vida adulta. A caracterização fenotípica minuciosa também não foi possível nos pacientes pertencentes às Famílias 2 e 3, por serem casos acompanhados em serviços externos, não podendo ser afastadas características sindrômicas associadas à síndrome de Temple nesses indivíduos. Baixa estatura foi evidenciada em todos os membros afetados das Famílias 2 e 3. Na Família 3, nenhum dos membros afetados recebeu tratamento para PPC, podendo justificar o comprometimento da altura final desses pacientes. Na Família 2, o caso índice recebeu tratamento com comprimido oral e seu irmão afetado com spray nasal, não sendo reportado se houve ou não bloqueio puberal adequado, o controle puberal inadequado poderia justificar o comprometimento da altura final nos casos. As pacientes

da Família 1, acompanhadas em nosso serviço, receberam tratamento com análogos de GnRH, com bloqueio puberal adequado e nenhuma apresentou baixa estatura na idade adulta.

4.3.6 Polimorfismos encontrados em toda casuística

Treze variantes polimórficas foram encontradas no gene *DLK1* no grupo de pacientes com PPC familiar e esporádica estudados pelo sequenciamento automático direto pelo método de Sanger. Os polimorfismos foram previamente descritos pelo <https://www.ensembl.org>. A frequência alélica reportada e a frequência alélica observada em nossa casuística estão detalhadas nos dados da **Tabela 13**.

Tabela 13 - Descrição de todos os polimorfismos encontrados no gene *DLK1* com a frequência alélica encontrada nos pacientes estudados e na reportada

<i>DLK1</i>	Posição	Proteína	Frequência alélica observado	*Frequência alélica reportada
rs28362569	c.-371_-370insC (intron)	-	0,15	0,50
rs114490877	c.67+51T>G (intron)	-	0,15	0,12
rs754825900	c.192T>G	p.Leu64=	0,03	<0,01
rs34686110	c.218A>T	p.Gln73Leu	0,02	0,09
rs6575799	c.301G>A	p.Gly101Arg	1	0,03
rs77235285	c.404+89C>T (intron)	-	0,07	0,17
rs17577779	c.405-41T>C (intron)	-	0,64	0,50
rs116078181	c.433G>T	p.Val145Leu	0,03	0,12
rs1802710	c.564T>C	p.Ile188=	0,64	0,50
rs2295660	c.699T>C	p.Cys233=	0,03	0,08
rs1058009	c.779G>A	p.Ser260Asn	0,10	0,16
rs35339877	c.840G>A	p.Pro280=	0,03	0,21
rs115349979	c.919G>C	p.Asp380His	0,02	0,09

*Frequência alélica reportada está disponível no [ensembl.org](https://www.ensembl.org)

4.4 Pesquisa de Variações no Número de Cópias no *locus* 14q32.2

No universo dos 31 pacientes com PPC esporádica e dos 33 com PPC familiar, 14 pacientes foram selecionados para o estudo de número de cópias com sondas customizadas para o gene *DLK1* (do éxon 1 ao 5 e regiões 5'UTR e 3'UTR), não sendo encontradas deleções no gene *DLK1* para esses casos específicos. Tais pacientes estão discriminados no **anexo C**.

O estudo de número de cópias do *locus* 14q32.2 com o kit comercial (SALSA MS-MLPA probemix ME032-A1 UPD7/UPD14) foi realizado em 15 de 64 pacientes. Nenhuma alteração no número de cópias dos éxons 3 e 4 do gene *DLK1* foi encontrada nos casos analisados. Estes pacientes estão discriminados no **anexo C**.

4.5 Pesquisa do Complexo Rearranjo do Gene *DLK1*

Dos 31 pacientes com PPC esporádica e 33 pacientes com PPC familiar, 12 foram selecionados para investigação da presença do mesmo complexo rearranjo no *DLK1* identificado nos quatro membros da Família 1. Tais pacientes estão discriminados no **Anexo C**. Foi realizada uma reação de PCR com primers específicos para amplificar apenas a região onde se verifica o complexo rearranjo. Nenhum dos pacientes selecionados apresentou amplificação, sendo, portanto, afastado nesse subgrupo o mesmo rearranjo encontrado na Família 1.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 A Genética da Puberdade Precoce Central

Nos últimos anos, a influência de fatores genéticos na regulação do início da puberdade ganhou papel de destaque. Estudos demonstram que não apenas os fatores ambientais, socioculturais e metabólicos, mas também os genéticos exercem grande influência no início da puberdade, e são causa de PPC familiar e também estão presentes nos casos de PPC aparentemente esporádicos ^(7, 49, 51).

Em 2013, os avanços nas técnicas de sequenciamento genômico tornaram possível o emprego de novas metodologias, como o sequenciamento exômico global, para identificar variantes genéticas relacionadas à PPC ⁽⁴⁹⁾. O sequenciamento exômico possibilitou a identificação de mutações inativadoras em um gene específico, o *MKRN3*, em cinco de 15 famílias estudadas ⁽⁴⁹⁾. Este gene até então não era relacionado ao controle da puberdade.

No presente estudo, foram empregadas novas abordagens metodológicas na investigação de casos de PPC familiar ainda sem causa genética determinada. Enquanto o sequenciamento exômico global avalia apenas a sequência da região codificadora, o sequenciamento completo do genoma (*whole-genome sequencing*) é capaz de sequenciar regiões promotoras dos genes, regiões não traduzidas próximas aos éxons (UTRs) e

regiões intrônicas envolvidas na expressão gênica ⁽⁷⁰⁾. No presente estudo, foi selecionada uma grande família brasileira com PPC, com herança de origem paterna, para realização do sequenciamento genômico global, visando identificar variantes genéticas não identificadas por meio de outras metodologias moleculares, no caso o sequenciamento exômico, o SNP array e o MLPA. Uma dificuldade destas técnicas é a identificação de um grande número de variantes genéticas, que precisam ser avaliadas para determinar sua associação positiva ou negativa com o fenótipo ⁽⁷⁰⁾.

O presente estudo foi focado na região cromossômica 14q32.2, pelas seguintes razões: primeiramente, porque esta é uma região de genes imprintados que compartilha características semelhantes com a região de genes imprintados do cromossomo 15, onde se localiza o gene *MKRN3* ⁽⁵⁹⁾. Em segundo lugar, a dissomia uniparental materna do cromossomo 14 ou deleções paternas dessa região resulta na síndrome de Temple, uma complexa síndrome que inclui PPC em até 90% dos casos ⁽⁶⁰⁾. Em terceiro lugar, resultados prévios de estudo de ligação com dados do sequenciamento exômico dessa família sugeriram essa região do cromossomo do 14 como de potencial *locus* (dado não publicado). Em quarto lugar, um grande estudo de associação genômica (GWAS) com a idade da menarca identificou duas variantes comuns dentro da região 14q32.2. Especificamente, uma destas variantes foi encontrada no gene *DLK1*, tornando-o um forte gene candidato ⁽⁴⁶⁾.

O presente estudo identificou um complexo rearranjo do gene *DLK1* (uma deleção de, aproximadamente, 14.000 pares de base na região 5'UTR

até o início do éxon 1 e uma duplicação de uma região do intron 3 com 269 pares de base) em todas as cinco pacientes afetadas e também nos carreadores assintomáticos da Família 1. O estudo de segregação familiar realizado em 14 membros dessa família revelou um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância completa e transmissão apenas pelo alelo paterno, de acordo com o fenômeno de *imprinting* materno esperado para este gene.

Na análise dos demais casos PPC familiar e esporádica, pelo sequenciamento automático direto por meio do método de Sanger, foram encontradas mais duas famílias com mutações deletérias no éxon 5 do *DLK1*, Famílias 2 e 3. Apesar de não ter havido acesso aos DNAs dos membros da Família 3 para a realização da segregação, o diagnóstico presuntivo de PPC foi realizado baseado nos dados clínicos dessa família. Ambas as famílias revelaram também um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância completa e transmissão apenas pelo alelo paterno.

5.2 Um Novo Gene Candidato Associado à PPC: Gene *DLK1*

O gene Delta-Like 1 Homolog (*DLK1*), também conhecido como fator pré-adipogênico 1, codifica uma glicoproteína de 383 aminoácidos contendo um domínio extracelular com uma extremidade amino-terminal (N-terminal) seguido de seis domínios semelhantes ao fator de crescimento epidérmico (EGF), um domínio justamembrana sensível à protease, um domínio

transmembrana, uma pequena porção citoplasmática com uma extremidade carboxi-terminal (C-terminal) ⁽⁷¹⁾ (**Figura 15**).

Fonte: Adaptado de *Shin et al.*, 2014 ⁽⁷¹⁾.

Sigla TM: transmembrana

Figura 15 - Estrutura da proteína DLK1. A extremidade amino-terminal, domínio extracelular com 6 domínios semelhantes ao fator de crescimento epidermal, um domínio transmembrana e a porção citoplasmática com a extremidade carboxi-terminal. Formas ovais brancas: domínios semelhantes à EGF de 1 a 6, retangular cinza: domínio justamembrana sensível à protease e retangular preta: domínio transmembrana.

A proteína DLK1 atua na via Delta-Notch de sinalização que é composta por quatro receptores (Notch 1,2,3,4) e cinco ligantes (Delta-like 1,3,4 e Jagged1,2), todos eles proteínas transmembranas ⁽⁷²⁾. A interação do ligante presente na superfície de uma célula com o receptor presente na superfície da célula vizinha conduz à ocorrência de uma série de eventos proteolíticos do receptor Notch nos espaços intercelulares, perimembranar e intracelular ^(72, 73). Estes eventos proteolíticos resultam na libertação do domínio intracelular de Notch, que é translocado para o núcleo, onde interage com fatores de transcrição acessórios e induz a expressão de um

conjunto de genes alvo ^(72, 73). O DLK1 é um ligante não canônico, este difere dos outros ligantes da via Notch pela perda de uma repetição EGF conservada chamada de domínio DSL (Delta, Serrate e LAG2), que está presente na região N-terminal dos ligantes canônico ^(72, 74). Sabe-se que o DLK1 desempenha um papel na inibição da diferenciação de pré adipócitos em adipócitos ^(74, 75). A forma solúvel do DLK1 é gerada pela clivagem do domínio extracelular. Estudos *in vitro* mostraram claramente o efeito inibitório da grande forma solúvel, mas não da forma de membrana ⁽⁷⁶⁾.

Em humanos, o DLK1 é amplamente expresso nos tecido embrionários, mas, no período pós natal, sua expressão é maior nas glândulas suprarrenais, hipófise e tecido ovariano ⁽⁷⁴⁾. Uma função neuroendócrina vem sendo sugerida ao DLK1 em razão da evidência de sua expressão em vários núcleos hipotalâmicos, bem como em linhagens celulares derivadas de neurônios da kisspeptina ⁽⁷⁷⁾. A perda de função do DLK1 afeta sua expressão na hipófise, mas até o momento não se sabe o mecanismo exato que liga a função do DLK1 ao desenvolvimento puberal.

Em modelos de camundongos *knockout* para o *Dlk1*, foi observado aumento da mortalidade neonatal ⁽⁷⁸⁾. Nos camundongos sobreviventes, houve uma redução do crescimento, anormalidades esqueléticas, aumento da adiposidade, concentrações elevadas de colesterol e triglicerídeos. Não foram informados detalhes sobre o período puberal desses camundongos ⁽⁷⁸⁾.

As novas variantes do *DLK1* p.Pro160Leufs * 50 e p.Val271Cysfs * 14, descritas no presente estudo, foram localizadas no éxon 5 do *DLK1*, no

domínio extracelular. Os domínios semelhantes ao EGF são cruciais para numerosas ligações proteína-proteína. A variante p.Pro160Leufs * 50 está localizada no quarto domínio semelhante ao EGF, uma região conservada envolvida na ligação do cálcio. A variante p.Val271Cysfs * 14 está localizada no domínio extracelular, mas fora dos domínios EGF.

As mutações no gene *DLK1* parecem ser mais raras que as no gene *MKRN3*. Um estudo publicado recentemente estudou os genes *MKRN3*, *DLK1* e *KCNK9* em 60 meninas com PPC idiopática, sendo 23 casos familiares ⁽⁷⁹⁾. Foram encontradas três mutações no gene *MKRN3*, duas familiares (8,7% dos casos familiares) e uma esporádica (2,8% dos casos esporádicos). Na literatura, mutações no *MKRN3* respondem por até 46% dos casos de PPC familiar ⁽⁵⁵⁾. Não foram encontradas variantes raras nos genes *DLK1* e *KCNK9* ⁽⁷⁹⁾. Até o momento, as mutações no *DLK1* foram verificadas em 9,6% dos casos familiares estudados e em nenhum caso de PPC esporádica.

5.3 Genótipo-Fenótipo dos Pacientes com Mutações no Gene *DLK1*

O *DLK1* é um gene imprintado expresso pelo alelo paterno, localizado no braço longo do cromossomo 14, em um *locus* associado à síndrome de Temple. Essa condição foi inicialmente descrita em 1991 ⁽⁶⁰⁾. É sobretudo caracterizada por retardo do crescimento pré- e pós-natal, distúrbios alimentares no início da vida, hipotonia muscular, obesidade truncal e puberdade precoce ⁽⁶⁰⁾. A falta de malformações congênicas específicas,

assim como de métodos para seu rastreio, torna esta síndrome subdiagnosticada na prática clínica ⁽⁸⁰⁾. Os pacientes com esta síndrome apresentam características clínicas que se sobrepõem com a síndrome de Prader Willi e a síndrome de Silver Russel, sendo estes os principais diagnósticos diferenciais da síndrome de Temple ^(59, 60, 80).

A principal causa da síndrome de Temple é a dissomia uniparietal materna do cromossomo 14 (78%-72%), mas pode também ser decorrente de microdeleções na região de cluster dos genes imprintados do cromossomo 14q32.2 (11,8%-9%) ou decorrentes de epimutações que geram defeitos de *imprinting* como hipometilação de regiões específicas (9,8%-19%), levando a perda de expressão de genes paternos dessa região. Dentre os principais genes envolvidos estão o *RTL1* e *DLK1* ^(59, 60, 80).

Na correlação fenótipo-genótipo dos casos de síndrome de Temple, a perda de expressão do gene *DLK1* foi associada à maior parte dos fenótipos dessa síndrome, incluindo retardo de crescimento, características semelhantes à síndrome de Prader Willi / Silver Russel na infância e puberdade precoce ⁽⁸⁰⁾. Adicionalmente, como o *DLK1* funciona como um regulador negativo da adipogênese, acredita-se que sua perda de expressão também possa estar envolvida nas alterações metabólicas, tais como obesidade, dislipidemia, e diabetes tipo 2, encontradas em alguns pacientes com síndrome de Temple ⁽⁸⁰⁾.

No presente estudo, as pacientes afetadas da Família 1, portadoras do complexo rearranjo do *DLK1*, apresentaram apenas puberdade precoce

central não sindrômica. Nas pacientes das Famílias 2 e 3, não foi possível afastar características sindrômicas associadas à síndrome de Temple,

Apesar de se acreditar que a perda de expressão do gene *DLK1* possa estar envolvida nas alterações metabólicas (obesidade, dislipidemia, diabetes mellitus tipo 2) encontradas nos pacientes com síndrome de Temple ⁽⁸⁰⁾, nos pacientes com mutações no *DLK1* essa associação não pode ser feita. Houve grande heterogeneidade em relação às alterações metabólicas dos membros afetados nas famílias com PPC e com mutações do *DLK1*. Na Família 1, todas pacientes afetadas apresentaram aumento da distribuição de gordura visceral avaliada pela bioimpedância, porém duas pacientes apresentaram peso normal, uma paciente era obesa e outra apresentava sobrepeso, condições frequentes na população em geral. Além disso, a paciente índice da Família 3 apresentava baixo peso sem alterações metabólicas, enquanto sua tia paterna referiu dislipidemia, pré-diabetes e obesidade grau II. Na Família 2, foi reportado diabetes mellitus tipo 2 com uso de insulina e acidente vascular cerebral no pai afetado do caso índice. Estes achados clínicos e bioquímicos preliminares sugerem uma grande heterogeneidade fenotípica do quadro metabólico dos pacientes com mutações inativadoras no gene *DLK1*.

A baixa estatura, presente na síndrome de Temple, foi encontrada em todas as pacientes afetadas das Famílias 2 e 3. Todavia, não foi possível correlacionar a significativa baixa estatura destas pacientes com as mutações inativadoras no *DLK1*. Os membros afetados da Família 3 não foram tratados para PPC, e os pacientes da Família 2 que foram tratados,

não se tem documentado se houve o bloqueio puberal adequado. Estudos prévios com pacientes com PPC não tratados mostram uma perda estatural significativa, por volta de 10 cm em meninas e 20 cm em meninos ^(21, 81). Além disso, as pacientes da Família 1 foram tratadas com bloqueio puberal adequado e não apresentaram baixa estatura na idade adulta. Até o momento, não se pode concluir que a baixa estatura das pacientes das Famílias 2 e 3 seja puramente decorrente do não tratamento da PPC ou se estão também relacionadas às mutações inativadoras do *DLK1*.

Nossos resultados indicam que a deficiência de *DLK1* responde pelo fenótipo de PPC, mas não tem aparentemente papel nas outras características presentes na síndrome de Temple, como foi observado nas pacientes da Família 1. Contudo, não se pode concluir o mesmo para as Famílias 2 e 3, por não ter sido feita a caracterização fenotípica minuciosa.

A grande heterogeneidade das alterações metabólicas e baixa estatura nos pacientes com mutações inativadoras do *DLK1* podem ser decorrentes de uma expressividade variável para essas variáveis analisadas.

A idade média de início da puberdade das pacientes com mutações no *DLK1* no presente estudo foi 5,4 anos, e nos pacientes com mutações no *MKRN3* a idade média foi 6 anos ⁽⁵¹⁾.

5.4 Papel do *DLK1* na Regulação da Puberdade

O domínio intracelular DLK1 vem sendo reconhecido como um regulador negativo da sinalização do Notch por alterar o complexo transcricional da via Notch1-RBP-jk ⁽⁸²⁾. Recentemente, foi demonstrado que o Rbpj-k mediado pela via de sinalização Notch é fundamental para o desenvolvimento dos neurônios da kisspeptina no núcleo arqueado de camundongos e para a subsequente expressão do *Kiss1* ⁽⁸³⁾. A sinalização Notch exerce um efeito repressor da diferenciação de neurônios SOX2 para outras linhagens celulares (**Figura 16**) ⁽⁸³⁾. Uma hipótese é que a perda de função do *DLK1* poderia levar a um aumento de sinalização da via Notch, resultando em uma diferenciação prematura de neurônios da kisspeptina e, conseqüentemente, resultando na puberdade precoce.

Fonte: Biehl et al, 2015 ⁽⁸³⁾.

Figura 16 - Modelo proposto de diferenciação neural de neurônios SOX2-positivos na região ventricular hipotalâmica. Estudos anteriores têm sugerido que quase todos os tipos de células encontrados no núcleo

arqueado provêm de progenitores SOX2 da zona ventricular hipotalâmica. Muitas dessas células irão se diferenciar em células progenitoras imaturas que expressam (*Pomc*) *pró-opiomelanocortin* células (*Pomc* Prog) e, então, podem amadurecer em, pelo menos, três outros subtipos neurais NPY, *Pomc* e *Kiss1*. Enquanto um subconjunto de neurônios *Kiss1* parece surgir de uma linhagem *Pomc*, a outra parte parece ser originada de outro grupo de células progenitoras (*Kiss1* Prog).

Outro mecanismo possível de regulação da puberdade poderia estar relacionado com a comunicação entre as regiões de genes imprintados. Estudos recentes indicaram a existência de uma complexa rede de comunicação regulatória entre as regiões de genes imprintados dos cromossomos 15 e 14 ⁽⁸⁴⁾. O gene *IPW*, presente no cromossomo 15q11.2-q13, expresso pelo alelo paterno, produz um RNA não codificante que tem efeitos inibitórios na expressão de vários genes imprintados do domínio *DLK1-DIO3* no 14q32.2, expressos apenas pelo alelo materno ⁽⁸⁴⁾.

Os achados genéticos atuais encontrados nos casos de puberdade precoce localizam-se nas regiões imprintadas do cromossomo 15q11.2, no gene *MKRN3* e do cromossomo 14q32.2, no gene *DLK1*. Um melhor entendimento do mecanismo de comunicação dessas redes de genes imprintados pode auxiliar na melhor compreensão dos mecanismos de controle puberal.

O *DLK1* é o segundo gene imprintado relacionado a distúrbios puberais, sendo o primeiro o *MKRN3*. Estes achados sugerem um importante papel do *imprinting* genômico na regulação do início da puberdade humana.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1) Mutações inativadoras no gene *DLK1* representam uma nova causa genética para a puberdade precoce central familiar, respondendo por 9,6% dos casos estudados;
- 2) Uma grande deleção do *locus* 14q32.2, envolvendo a região 5'UTR e o éxon 1 do gene *DLK1* foi identificada em uma família brasileira com puberdade precoce central, por meio de estudo de ligação e sequenciamento genômico de larga escala;
- 3) Duas mutações do tipo **frameshift** no éxon 5 do gene *DLK1* foram encontradas em duas famílias com puberdade precoce central por meio do sequenciamento automático (Sanger);
- 4) Na Família 1, o fenótipo das pacientes afetadas caracterizou-se por uma puberdade precoce central típica, sem sinais síndrômicos (afastada a síndrome de Temple);
- 5) A média de idade de início da puberdade causada por mutações do *DLK1* foi 5,4 anos;
- 6) A análise de segregação familiar demonstrou um padrão de herança autossômica dominante, com penetrância completa e transmissão apenas pelo alelo paterno nas Famílias 1 e 2;

- 7) O *DLK1* é o segundo gene imprintado relacionado aos distúrbios puberais. Estes achados sugerem o papel do *imprinting* genômico na regulação do início da puberdade humana; e
- 8) O *DLK1* parece desempenhar um papel inibitório via sinalização Notch no controle do início da puberdade, mas o mecanismo preciso pelo qual as mutações do *DLK1* levam ao fenótipo de PPC permanece ainda indeterminado.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

ANEXO A - Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE.....
CEP:..... TELEFONE:DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº..... APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE:DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO
GENÉTICO DE PACIENTES PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR: Dra Marina Cunha Silva

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 141463

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ Disciplina
de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DA PESQUISA
PARTICIPANTES DE PESQUISA DE 6 A 10 ANOS COMPLETOS (SEXO
MASCULINO)
CONFIDENCIAL

O médico irá perguntar se você quer participar de uma pesquisa que pode ajudar a entender a causa de você ter desenvolvido aumento dos testículos (“bolinhas”) e/ou “pelinhos” antes dos seus colegas e outros meninos da sua idade. Seus pais já foram informados sobre isso.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Seu médico irá examinar você.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Você precisará colher exames de sangue com uma agulha pequenininha na veia de seu braço (ou mão). Isso pode deixar uma manchinha roxa pequena e pinicar um pouco. Você vai sentir apenas o desconforto da picadinha da agulha, mas isso vai ser bem rápido.

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

Se você concordar com o estudo, o médico irá utilizar o seu sangue para fazer pesquisas e descobrir a causa de você ter desenvolvido aumento dos testículos (“bolinhas”) e/ou “pelinhos” antes do tempo. Esse estudo poderá também ajudar outras crianças com o mesmo problema.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

VOCÊ NÃO PRECISA ACEITAR O QUE SEU MÉDICO ESTÁ OFERECENDO.

Um grupo de pessoas chamado Comitê de Ética aprovou esse estudo e vai conferir tudo que vão fazer durante o estudo para garantir que tudo seja feito com muito cuidado e que seu médico tome conta de você.

Caso você tenha qualquer dúvida, seu médico está pronto para lhe ouvir e responder o que quiser saber. Você decide se vai participar ou não e sua decisão será respeitada.

Caso você queira participar, escreva seu nome aqui:

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

- Você pode procurar seu médico ou alguém da equipe da Unidade de Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). Av. Dr Éneas Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo, Brasil. CEP: 05403-000. Telefone: (11) 2661-7512.

- Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - Prédio da Administração - Telefone: 2661-7585 - e-mail cappesq.adm@hc.fm.usp.br. Horário de funcionamento: das 7:00 as 17:00h.

Assinatura do representante legal Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE:DDD(.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO:..... Nº..... APTO:
BAIRRO:..... CIDADE:.....
CEP:..... TELEFONE:DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO
GENÉTICO DE PACIENTES PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR: Dra Marina Cunha Silva

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 141463

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ Disciplina
de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

CONFIDENCIAL

**INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DA PESQUISA
PARTICIPANTES DE PESQUISA DE 6 A 10 ANOS COMPLETOS (SEXO
FEMININO)**

CONFIDENCIAL

O médico irá perguntar se você quer participar de uma pesquisa que pode ajudar a entender a causa de você ter desenvolvido “peitinho” e/ou “pelinho” antes das suas colegas e outras meninas da sua idade. Seus pais já foram informados sobre isso.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Seu médico irá examinar você.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Você precisará colher exames de sangue com uma agulha pequenininha na veia de seu braço (ou mão). Isso pode deixar uma manchinha roxa pequena e pinicar um pouco. Você vai sentir apenas o desconforto da picadinha da agulha, mas isso vai ser bem rápido.

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

Se você concordar com o estudo, o médico irá utilizar o seu sangue para fazer pesquisas e descobrir a causa de você ter desenvolvido “peitinho” e/ou “pelinho” antes do tempo. Esse estudo poderá também ajudar outras crianças com o mesmo problema.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

VOCÊ NÃO PRECISA ACEITAR O QUE SEU MÉDICO ESTÁ OFERECENDO.

Um grupo de pessoas chamado Comitê de Ética aprovou esse estudo e vai conferir tudo que vão fazer durante o estudo para garantir que tudo seja feito com muito cuidado e que seu médico tome conta de você.

Caso você tenha qualquer dúvida, seu médico está pronto para lhe ouvir e responder o que quiser saber. Você decide se vai participar ou não e sua decisão será respeitada.

Caso você queira participar, escreva seu nome aqui:

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

- Você pode procurar seu médico ou alguém da equipe da Unidade de Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). Av. Dr Éneas Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo, Brasil. CEP: 05403-000. Telefone: (11) 2661-7512.

- Você pode procurar também o comitê que aprova as pesquisas em Comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - Prédio da Administração - Telefone: 2661-7585 - e-mail cappesq.adm@hc.fm.usp.br. Horário de funcionamento: das 7:00 as 17:00h.

Assinatura do representante legal Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo Data / /

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL
LEGAL**

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:.....

BAIRRO:..... CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE:DDD(.....).

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.).....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº..... APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....).

DADOS SOBRE A PESQUISA

**1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO
GENÉTICO DE PACIENTES PUBERDADE PRECOCE CENTRAL
IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR : Dra Marina Cunha Silva

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 141463

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ Disciplina de
Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 anos

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável.....

Rubrica do pesquisador.....

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

Você está sendo convidado a participar deste estudo que tem como objetivo tentar esclarecer a causa de você ter desenvolvido mamas e/ou pelos pubianos (se for menina), aumento dos testículos, barba e/ou pelos pubianos (se for menino) antes do tempo (ou seja, antes dos 8 anos nas meninas e antes dos 9 anos nos meninos). Quando este quadro ocorre é dito que a puberdade está se iniciando precocemente (puberdade precoce). Essas alterações quando não tratadas adequadamente podem interferir com a função reprodutiva, estatura final e comportamento psicológico. Algumas poucas alterações em genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) foram identificadas como causa desta doença. Entretanto, suspeita-se que outros genes, ainda desconhecidos, possam também participar como causa. Por favor, leia este termo e pergunte ao seu médico qualquer dúvida que você tiver. A decisão de participar neste estudo é sua.

Você será acompanhado em consultas e vai realizar os exames de rotina necessários ao seu tratamento, nenhum deles é experimental. Este estudo implica na coleta adicional de 3 tubos pequenos de sangue ($\pm$ 12 mL) através de uma picada na veia do antebraço com agulha estéril e descartável para a obtenção do material genético (DNA). Essa coleta será realizada por um profissional treinado e devidamente habilitado para sua realização. Não é preciso estar em jejum e não é necessária a ingestão de nenhum medicamento para a coleta de sangue. Os riscos e desconfortos desses procedimentos serão mínimos. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em menos de 7 (sete) dias. Este estudo também inclui a coleta de informações contidas no seu prontuário hospitalar (ou registro médico).

Este estudo pode não trazer benefícios diretos para você, mas o seu resultado pode ajudar outros pacientes e seus familiares a terem um diagnóstico mais precoce. Uma melhor compreensão das causas da puberdade precoce pode também conduzir ao desenvolvimento de novos tratamentos no futuro.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. No entanto, este estudo assegura ao participante de pesquisa e ao seu acompanhante (quando necessário) o ressarcimento de despesas, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames.

Você tem acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas em qualquer fase do estudo. A principal investigadora é a Dra. Ana Claudia Latronico que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho 255, 2º. Andar, Bloco 6, Telefone(s) (0xx11-2661.7512). Esse estudo foi revisado e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa. Os comitês de Ética são órgãos oficiais e independentes que asseguram que seus direitos sejam respeitados.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 - 5º andar - Prédio da Administração - Telefone: 2661-7585 - e-mail cappesq.adm@hc.fm.usp.br. Horário de funcionamento: das 7:00 as 17:00h.

Você, ou seu representante legal, podem retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado pelo pesquisador a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

O seu material genético (DNA) poderá ser armazenado para futuras pesquisas, pois com o surgimento de novas tecnologias poderemos continuar estudando o seu caso e descobrir a causa genética da sua doença. No entanto, para realização de uma nova pesquisa com o seu material genético, você será obrigatoriamente contactado e, se você desejar participar, um novo termo de consentimento livre e esclarecido será necessário, bem como será realizada uma nova análise por meio do sistema de Comissão de Ética em Pesquisa (CEP). O tempo de armazenamento do material será de acordo com o cronograma da pesquisa (2 anos), sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

Informamos também que este termo de consentimento será elaborado em duas vias igualmente válidas, assinadas e rubricadas em todas as suas páginas, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo **"AVANÇOS NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DE PACIENTES PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA."**

Fui bem orientado pela Dra. Ana Claudia Latronico e a Dra. Marina Cunha Silva e declaro a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concorde voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do participante/ representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Pesquisador responsável

Data / /

ANEXO B. Relação das famílias, membros afetados e padrão de herança

Família Nº Nº dos pacientes no anexo C	Herança Membros afetados
Família 1 Pacientes 1,2,3,4	Paterna Primas paternas, meia irmã paterna e avó paterna
Família 2 Paciente 1 Londres	Paterna Pai, tias paternas e irmão
Família 3 Paciente 5	Paterna Pai, tia paterna
Família 4 Paciente 6	Paterna Tia paterna
Família 5 Paciente 7	Paterna Prima paterna
Família 6 Paciente 8	Paterna Prima paterna
Família 7 Paciente 9	Paterna Tia paterna
Família 8 Paciente 3 Grécia	Paterna Pai
Família 9 Paciente 1 Austrália	Paterna Pai
Família 10 Paciente 10	Materna Mãe e avó materna
Família 11 Paciente 11	Materna Mãe
Família 12 Paciente 12	Materna Mãe e irmã
Família 13 Paciente 13	Materna Mãe e irmã gêmea dizigótica
Família 14 Paciente 14	Materna Prima paterna
Família 15 Paciente 15	Materna Mãe e irmã
Família 16 Paciente 16	Materna Tia materna
Família 17 Paciente 17	Materna Mãe, meia irmã materna e tia materna

continua

ANEXO B. Relação das famílias, membros selecionados e padrão de herança (conclusão)

Família Nº Nº dos pacientes no anexo C	Herança Membros afetados
Família 18 Paciente 1 Grécia	Materna ND
Família 19 Paciente 2 Grécia	Materna ND
Família 20 Paciente 4 Grécia	Materna ND
Família 21 Paciente 18	Irmã
Família 22 Paciente 19	Irmã
Família 23 Pacientes 20, 21	Irmã
Família 24 Paciente 22	Irmã
Família 25 Paciente 23	Irmão
Família 26 Paciente 1, 2 ,3 Turquia	Irmãs
Família 27 Paciente 24	Indeterminado ND
Família 28 Paciente 25	Indeterminado ND
Família 29 Paciente 41 USP RP	Indeterminado ND
Família 30 Paciente 53 USP RP	Indeterminado ND
Família 31 Paciente 61 USP RP	Indeterminado ND

ND: não disponível.

ANEXO C (1-6) - Dados clínicos e hormonais dos pacientes com PPC provenientes de diferentes centros

C 1 - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (HCFMUSP- SP)

Paciente (Família n)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/ pênis [#]	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH	LH 2h pós lupron
1 (F1)	F	5,8	6,7	129,5	11	9	2,46	30	4	2	166	1,9	6,2	53,3	NA	31,5	ND
2 (F1)	F	5	8	136,3	11	10	1,96	36,2	4	1	158,5	1,7	3,9	34,6	NA	26,5	34,1
3 (F1)	F	4,5	6,4	125,5	7	8	1,71	26,5	3	1	158,5	<0,6	1,8	<13	NA	11,4	ND
4 (F1)	F	5,9	6,9	127,2	10,5	8,3	1,6	28	4	3	166,5	1,6	4,7	29	NA	ND	23,5
5 (F3) ‡	F	6	ND	ND	8	ND	ND	ND	4	4	146,5	1,8	6,4	41,6	NA	11,5	ND
6 (F4) ‡*	F	3	6,5	136	8,8	10	3,96	30,4	4	3	169,5	<0,6	3,7	<13	NA	9,8	ND
7 (F5)	F	6,5	10,2	151	12	12,7	2,1	42,2	4	4	163,5	2,6	2,4	92	NA	ND	ND
8 (F6)	F	6	7,6	144	10	11,2	3,7	32	4	4	157,5	2,07*	4,5	14,6	NA	ND	36,2
9 (F7) °	F	5	5,3	119	7	7	2,25	25,5	3	2	159,5	2,9	5,7	34	NA	ND	30
10 (F10) ‡*	F	5,5	8,1	132	11	9	1,21	28,2	3	4	160,5	1	1,9	17,4	NA	ND	8,8
11 (F11) ‡	F	6	8,5	141	10	10,8	2,24	30	4	3	158,2	<0,6	3	<13	NA	24	ND
12 (F12)	F	3	7,5	133,3	11,5	9,5	2	33,3	2	2	160,5	0,8	5,4	33	NA	4,1	8,6
13 (F13)*	F	1,8	8	136,5	10	10	2	29,2	4	1	164	0,1	2	<13	NA	6,9	4,6
14 (F14)*	F	7,7	8,2	133,2	11	9,4	1,26	28,6	3	3	166,5	<0,6	4,2	31	NA	ND	17,6
15 (F15)	F	5,5	6,2	125	8	8	1,8	24,6	2	1	162	ND	ND	ND	NA	ND	ND
16 (F16) ‡	F	6,9	7	126,5	11	8,5	1,7	41,4	4	3	158,5	0,2	2,8	<15	NA	ND	5,2
17 (F17)	M	8	9,4	149,5	11,7	12,3	2,96	40,9	3	1	176	5,3	8,5	ND	NA	ND	ND
18 (F21) ‡*	F	7,5	10,2	135,7	11	9	-0,1	37	4	5	153	4,2	ND	NA	98,8	ND	ND
19 (F22)*	F	7,3	8	148,5	11	11,8	2	42,2	3	3	171,5	1,5	2,7	<13	NA	ND	45,8
20 (F23)	F	7,1	8	130	8,8	9	0,86	40,8	3	1	160	3,6	6,3	45,7	NA	ND	ND
21 (F23)	F	7,5	8,6	136	11	10	1,39	40,7	3	4	160	2,7	4,5	46	NA	ND	ND
22 (F24)*	F	6,1	6,2	119	9,8			22,3	2	1	164,5	0,69	1,75	20	NA	ND	ND
23 (F25) ‡	F	6	7,5	129,5	8,8	8,8	1,3	30,8	3	1	157,3	1,2	3,9	15	NA	27,6	ND
24 (F27)	F	6	9	146	11	11,5	2,56	38	3	3	153	3,9	6,2	38	NA	ND	ND
25 (F28)	F	7,6	8,4	138	10	10,3	1,73	31,2	3	3	170	1,1	5,2	49	NA	ND	ND
26 ‡	F	5,8	9,66	134	12	9,7	0,08	38,5	4	3	153,5	<0,6	1,7	<13	NA	ND	13,2
27 ‡	F	6,5	8,08	136,8	12	10	2,05	33,6	3	3	159	<0,6	3	45	NA	7,5	31
28 °	F	7	8	136	12	10	1,9	35	4	3	157,5	1,2	4,1	20,5	NA	ND	50,4

continua

C 1 - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo (HCFMUSP- SP) **(conclusão)**

Paciente (Família n)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/ pênis [#]	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH	LH 2h pós lupron
29 °	F	7	8,9	135,3	11	9,8	0,78	29	3	4	155,5	<0,6	2	40	NA	8	ND
30 °	F	6	9,8	129	11	8,8	-1	27	4	3	147	0,8	3,5	22,2	NA	ND	ND
31 °	F	7,5	8,5	141,8	12	10,8	2,38	42	3	3	adotiva	1,1	5,6	35	NA	ND	10,3
32 ‡ °	F	6	8,25	142,6	12	11	2,7	36,5	3	3	174,5	2,1	1,2	15	NA	ND	ND
33 ‡ °	F	5	9,1	143,2	12	11,1	1,92	39,6	3	3	170,5	0,9	4,1	22	NA	ND	27,8
34 ‡	F	6	7,5	129	11	8,5	0,32	28,6	3	2	149	<0,6	<1,0	14,4	NA	3,3	4,4
35	F	7,9	7,9	139,3	11	10,5		42,2	3	1	160,5	<0,6	2,8	22	NA	20,4	8,3
36	F	6	7,9	137,5	11	10,2	2,3	27,8	2	3	161	<0,6	1,4	<13	NA	11,3	ND
37	F	7,2	7,9	138,5	11	10,3	2,52	41	3	3	166,5	1,2	3,4	35,2	NA	ND	ND
38	F	6,5	6,9	125,6	7,8	8,1	1,15	26,8	4	3	160,5	0,7	4,2	34,6	NA	6,9	15
39	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	ND	36,2
40 ‡*	F	7,4	8,9	125,8	8,8	8,1	-0,6	23	4	4	152,5	0,4	3,6	18	NA	15,3	13
41 °	F	8	9,9	145	12	11,3	1,8	48	4	4	163	2,8	6,1	17	NA	ND	ND
42 °	F	6	9	133	11	9,3	0,4	35,5	4	3	158	ND	ND	24	NA	6,5	ND
43	F	6,7	7,8	133	12	9,5	1,75	37,3	3	3	ND	1	5,8	50	NA	5	18
44 °	F	1	2,8	94	3,5	3,2	ND	13	3	1	ND	0,2	6,9	15	NA	9,1	ND
45	F	3	4,9	126,6	8,3	7,8	3,72	25	3	3	160	5,8	8,8	ND	NA	ND	ND
46*	F	7,5	8,5	135	10	9,7	1,22	27,8	4	1	164,5	0,4	4,4	32,5	NA	ND	ND
47 °*	F	7	7,6	125,5	9		0,58	25	2	1	174	0,13	0,85	0,99	NA	9,3	ND
48 ‡	F	7	8	128,2	12	8,7	0,71	41,1	5	4	161	6,6	5,6	17	NA	ND	ND
49 °	F	7,5	8,9	147	11	12	2,57	40,7	3	3	168,5	1,8	6,4	49	NA	13,7	ND
50*	F	6,6	7,3	133,2	9,5	9,5	2,18	33,8	4	2	155,6	0,1		<13	NA	16,9	ND

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatual; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estágio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível; NA: não aplicável. Exames realizados por IFMA ou ECLIA.
‡Pacientes que realizaram MLPA customizado. *Pacientes que realizaram MLPA kit comercial. ° Pacientes rastreados para o complexo rearranjo do *DLK1*.

C 2 - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto (HCFMUSP- RP)

Paciente (Família nº)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP (E)	peso (kg)	Mamas/ pênis#	PP	EA (cm)	LH (mU/mL)	FSH (mU/mL)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
2	F	7,9	8,1	ND	10	ND	0,5	ND	2	3	ND	1	4,2	<20	NA	26,3
26	F	6	7,5	ND	8,8	ND	ND	ND	4	1	ND	ND	3,4	ND	NA	17,2
31	F	7,3	7,4	ND	8,8	ND	2,1	ND	3	3	ND	0,1	1	108	NA	5,6
32	F	7,5	8	ND	8,8	ND	0,9	ND	3	3	ND	ND	4,9	41,2	NA	23,8
41 (F29)	F	6	7,1	ND	ND	ND	0,9	ND	3	1	ND	0,2	4,4	42,9	NA	6,9
53 (F30)	F	5,5	7,2	ND	8,8	ND	-0,5	ND	3	1	ND	0,3	5,6	29,6	NA	13
58	F	6	7,9	ND	ND	ND	2,3	ND	4	3	ND	3,4	10	80	NA	
61 (F31)	F	7,5	8,5	ND	11	ND	0,6	ND	3	2	ND	0,6	7,5	<20	NA	10

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatural; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estágio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível; NA: não aplicável. Exames realizados por IFMA ou ECLIA.

C 3 - University of Athens Medical School (Grécia)

Paciente (Família nº)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/ pênis#	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
1 (F18)*	F	7,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND	NA	ND
2 (F19)*	F	7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND	NA	ND
3 (F8)*	M	8,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4 (F20)*	F	8,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND	NA	ND
5	F	7,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4	1	ND	ND	ND	ND	NA	ND

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatural; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estágio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível; NA: não aplicável. *Pacientes que realizaram MLPA kit comercial.

C 4- Turquia

Paciente (Família nº)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/ pênis [#]	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
1 (F26)	F	7,2	9,3	135	12	9,8	0,66	40	4	1	ND	3,3	4,58	39	NA	ND
2 (F26)	F	7,0	7,0	135,5	12	9,9	2,48	35	4	2	ND	2,43	4,79	38	NA	ND
3 (F26)	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NA	ND

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatural; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estágio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível, NA: não aplicável.

C 5- Austrália

Paciente (Família nº)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/ pênis [#]	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
1 (F9)	F	2,0	9,3	ND	12	ND	ND	ND	4	1	ND	3,3	4,58	39	NA	ND

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatural; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estágio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível, NA: não aplicável. Exames realizados por IFMA ou ECLIA.

C 6- Londres

Paciente (Família nº)	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/ pênis [#]	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
1 (F2) ‡	F	5,0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND	ND	ND	NA	ND

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatural; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estágio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível, NA: não aplicável. Exames realizados por IFMA ou ECLIA.

‡Pacientes que realizaram MLPA.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(3):265-74.
2. Macedo DB, Cukier P, Mendonca BB, Latronico AC, Brito VN. [Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):108-17.
3. Carel JC, Léger J. Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(22):2366-77.
4. Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(2):73-80.
5. Leka-Emiri S, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *J Endocrinol Invest*. 2017;40(8):789-802.
6. Ojeda SR, Lomniczi A. Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(2):67-9.
7. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(3):254-64.
8. Biro FM, Greenspan LC, Galvez MP, Pinney SM, Teitelbaum S, Windham GC, et al. Onset of breast development in a longitudinal cohort. *Pediatrics*. 2013;132(6):1019-27.

9. Herman-Giddens ME, Steffes J, Harris D, Slora E, Hussey M, Dowshen SA, et al. Secondary sexual characteristics in boys: data from the Pediatric Research in Office Settings Network. *Pediatrics*. 2012;130(5): e1058-68.
10. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GG, 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(4):505-12.
11. Roemmich JN, Rogol AD. Role of leptin during childhood growth and development. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 1999;28(4):749-64, viii.
12. Matkovic V, Ilich JZ, Skugor M, Badenhop NE, Goel P, Clairmont A, et al. Leptin is inversely related to age at menarche in human females. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(10):3239-45.
13. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonça BB. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(1):18-31.
14. Pasquino AM, Pucarelli I, Passeri F, Segni M, Mancini MA, Municchi G. Progression of premature thelarche to central precocious puberty. *J Pediatr*. 1995;126(1):11-4.
15. Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. *Pediatrics*. 2005;116(6):1323-8.
16. Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, et al. Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(12):4953-60.

17. Lakshman R, Forouhi N, Luben R, Bingham S, Khaw K, Wareham N, et al. Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: results from the EPIC-Norfolk cohort study. *Diabetologia*. 2008;51(5):781-6.
18. Widén E, Silventoinen K, Sovio U, Ripatti S, Cousminer DL, Hartikainen AL, et al. Pubertal timing and growth influences cardiometabolic risk factors in adult males and females. *Diabetes Care*. 2012;35(4):850-6.
19. Velie EM, Nechuta S, Osuch JR. Lifetime reproductive and anthropometric risk factors for breast cancer in postmenopausal women. *Breast Dis*. 2005;24:17-35.
20. Golub MS, Collman GW, Foster PM, Kimmel CA, Rajpert-De Meyts E, Reiter EO, et al. Public health implications of altered puberty timing. *Pediatrics*. 2008;121 Suppl 3:S218-30.
21. Carel JC, Eugster EA, Rogol A, Ghizzoni L, Palmert MR, Antoniazzi F, et al. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. *Pediatrics*. 2009;123(4):e752-62.
22. De Sanctis V, Corrias A, Rizzo V, Bertelloni S, Urso L, Galluzzi F, et al. Etiology of central precocious puberty in males: the results of the Italian Study Group for Physiopathology of Puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2000;13 Suppl 1:687-93.
23. Mogensen SS, Aksglaede L, Mouritsen A, Sørensen K, Main KM, Gideon P, et al. Pathological and incidental findings on brain MRI in a single-center study of 229 consecutive girls with early or precocious puberty. *PLoS One*. 2012;7(1):e29829.
24. Mouritsen A, Aksglaede L, Sørensen K, Mogensen SS, Leffers H, Main KM, et al. Hypothesis: exposure to endocrine-disrupting chemicals may interfere with timing of puberty. *Int J Androl*. 2010;33(2):346-59.

25. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev.* 2003;24(5):668-93.
26. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2364-8.
27. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1794-800.
28. Durand A, Bashamboo A, McElreavey K, Brauner R. Familial early puberty: presentation and inheritance pattern in 139 families. *BMC Endocr Disord.* 2016;16(1):50.
29. Seminara SB, Crowley WF. Kisspeptin and GPR54: discovery of a novel pathway in reproduction. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):727-31.
30. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10972-6.
31. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2012;366(7):629-35.
32. Shahab M, Mastronardi C, Seminara SB, Crowley WF, Ojeda SR, Plant TM. Increased hypothalamic GPR54 signaling: a potential mechanism for initiation of puberty in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(6):2129-34.

33. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(7):709-15.
34. Luan X, Yu H, Wei X, Zhou Y, Wang W, Li P, et al. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. *Neuroendocrinology*. 2007;86(2):77-83.
35. Ko JM, Lee HS, Hwang JS. KISS1 gene analysis in Korean girls with central precocious puberty: a polymorphism, p.P110T, suggested to exert a protective effect. *Endocr J*. 2010;57(8):701-9.
36. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2276-80.
37. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*. 2009;41(3):354-8.
38. Lippincott MF, True C, Seminara SB. Use of genetic models of idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism in mice and men to understand the mechanisms of disease. *Exp Physiol*. 2013;98(11):1522-7.
39. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(9):646-52.

40. Kasuya E, Nyberg CL, Mogi K, Terasawa E. A role of gamma-amino butyric acid (GABA) and glutamate in control of puberty in female rhesus monkeys: effect of an antisense oligodeoxynucleotide for GAD67 messenger ribonucleic acid and MK801 on luteinizing hormone-releasing hormone release. *Endocrinology*. 1999;140(2):705-12.
41. Keen KL, Burich AJ, Mitsushima D, Kasuya E, Terasawa E. Effects of pulsatile infusion of the GABA(A) receptor blocker bicuculline on the onset of puberty in female rhesus monkeys. *Endocrinology*. 1999;140(11):5257-66.
42. Brito VN, Mendonca BB, Guilhoto LM, Freitas KC, Arnhold IJ, Latronico AC. Allelic variants of the gamma-aminobutyric acid-A receptor alpha1-subunit gene (GABRA1) are not associated with idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty in girls with and without electroencephalographic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2432-6.
43. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*. 2001;22(1):111-51.
44. Freitas KC, Ryan G, Brito VN, Tao YX, Costa EM, Mendonca BB, et al. Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2007;87(3):627-34.
45. Sulem P, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Holm H, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, et al. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. *Nat Genet*. 2009;41(6):734-8.
46. Perry JR, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature*. 2014;514(7520):92-7.

47. Ong KK, Elks CE, Li S, Zhao JH, Luan J, Andersen LB, et al. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. *Nat Genet.* 2009;41(6):729-33.
48. Silveira-Neto AP, Leal LF, Emerman AB, Henderson KD, Piskounova E, Henderson BE, et al. Absence of functional LIN28B mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr.* 2012;78(3):144-50.
49. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med.* 2013;368(26):2467-75.
50. Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. *J Mol Endocrinol.* 2015;54(3):R131-9.
51. Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, et al. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):E1097-103.
52. de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod.* 2014;29(12):2838-43.
53. Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):E647-51.

54. Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(2):122-6.
55. Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, et al. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(1):1-8.
56. Bessa DS, Macedo DB, Brito VN, França MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, et al. High Frequency of MKRN3 Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic. *Neuroendocrinology*. 2017;105(1):17-25.
57. Lomniczi A, Wright H, Ojeda SR. Epigenetic regulation of female puberty. *Front Neuroendocrinol*. 2015;36:90-107.
58. Lalande M. Parental imprinting and human disease. *Annu Rev Genet*. 1996;30:173-95.
59. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet*. 2014;51(8):495-501.
60. Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet*. 1991;28(8):511-4.
61. Haig D. Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu Rev Genet*. 2004;38:553-85.
62. Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally Inherited DLK1 Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1557-67.

63. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291-303.
64. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13-23.
65. Pyle SI, Waterhouse AM, Greulich WW. Attributes of the radiographic standard of reference for the National Health Examination Survey. *Am J Phys Anthropol*. 1971;35(3):331-7.
66. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwiijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
67. Shen Y, Wu BL. Designing a simple multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assay for rapid detection of copy number variants in the genome. *J Genet Genomics*. 2009;36(4):257-65.
68. Jacobs DC, Veitch RE, Chappell PE. Evaluation of Immortalized AVPV- and Arcuate-Specific Neuronal Kisspeptin Cell Lines to Elucidate Potential Mechanisms of Estrogen Responsiveness and Temporal Gene Expression in Females. *Endocrinology*. 2016;157(9):3410-9.
69. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, et al. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 2007;53(2):367-78.
70. Carlson CS, Eberle MA, Kruglyak L, Nickerson DA. Mapping complex disease loci in whole-genome association studies. *Nature*. 2004;429(6990):446-52.

71. Shin S, Suh Y, Zerby HN, Lee K. Membrane-bound delta-like 1 homolog (Dlk1) promotes while soluble Dlk1 inhibits myogenesis in C2C12 cells. *FEBS Lett.* 2014;588(7):1100-8.
72. Borggreffe T, Oswald F. The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(10):1631-46.
73. Thurston G, Noguera-Troise I, Yancopoulos GD. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(5):327-31.
74. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell.* 1993;73(4):725-34.
75. Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V. dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem.* 1993;268(6):3817-20.
76. Mei B, Zhao L, Chen L, Sul HS. Only the large soluble form of preadipocyte factor-1 (Pref-1), but not the small soluble and membrane forms, inhibits adipocyte differentiation: role of alternative splicing. *Biochem J.* 2002;364(Pt 1):137-44.
77. Villanueva C, Jacquier S, de Roux N. DLK1 is a somato-dendritic protein expressed in hypothalamic arginine-vasopressin and oxytocin neurons. *PLoS One.* 2012;7(4):e36134.
78. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, et al. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol.* 2002;22(15):5585-92.

79. Grandone A, Capristo C, Cirillo G, Sasso M, Umano GR, Mariani M, et al. Molecular Screening of MKRN3, DLK1, and KCNK9 Genes in Girls with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr*. 2017;88(3-4):194-200.
80. Kagami M, Nagasaki K, Kosaki R, Horikawa R, Naiki Y, Saitoh S, et al. Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. *Genet Med*. 2017;19(12):1356-66.
81. Carel JC, Lahlou N, Roger M, Chaussain JL. Precocious puberty and statural growth. *Hum Reprod Update*. 2004;10(2):135-47.
82. Jung J, Mo JS, Kim MY, Ann EJ, Yoon JH, Park HS. Regulation of Notch1 signaling by Delta-like ligand 1 intracellular domain through physical interaction. *Mol Cells*. 2011;32(2):161-5.
83. Biehl MJ, Raetzman LT. Rbpj- κ mediated Notch signaling plays a critical role in development of hypothalamic Kisspeptin neurons. *Dev Biol*. 2015;406(2):235-46.
84. Stelzer Y, Sagi I, Yanuka O, Eiges R, Benvenisty N. The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*. 2014;46(6):551-7.

9 APÊNDICE

Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, Montenegro LR, Andrew M, Birby A, Weirauch MT, Labilloy G, Bessa DS, Carroll RS, Jacobs DC, Chappell PE, Mendonça BB, Haig D, Kaiser UB, Latronico AC. Paternally inherited *DLK1* deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1557-1567.

CLINICAL RESEARCH ARTICLE

Paternally Inherited *DLK1* Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty

Andrew Dauber,¹ Marina Cunha-Silva,⁴ Delanie B. Macedo,⁴ Vinicius N. Brito,⁴ Ana Paula Abreu,⁵ Stephanie A. Roberts,⁶ Luciana R. Montenegro,⁴ Melissa Andrew,¹ Andrew Kirby,⁷ Matthew T. Weirauch,² Guillaume Labilloy,³ Danielle S. Bessa,⁴ Rona S. Carroll,⁵ Dakota C. Jacobs,⁸ Patrick E. Chappell,⁸ Berenice B. Mendonça,⁴ David Haig,⁹ Ursula B. Kaiser,⁵ and Ana Claudia Latronico⁴

¹Cincinnati Center for Growth Disorders, Division of Endocrinology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229; ²Center for Autoimmune Genomics and Etiology, Division of Biomedical Informatics and Division of Developmental Biology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229; ³Division of Biomedical Informatics, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio 45229; ⁴Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 01246-093, Brazil; ⁵Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115; ⁶Division of Endocrinology, Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts 02115; ⁷Analytic and Translational Genetics Unit, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114; ⁸Department of Biological Sciences, College of Veterinary Medicine, Oregon State University, Corvallis, Oregon 97331; and ⁹Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, Massachusetts 02138

Context: Central precocious puberty (CPP) results from premature activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. Few genetic causes of CPP have been identified, with the most common being mutations in the paternally expressed imprinted gene *MKRN3*.

Objective: To identify the genetic etiology of CPP in a large multigenerational family.

Design: Linkage analysis followed by whole-genome sequencing was performed in a family with five female members with nonsyndromic CPP. Detailed phenotyping was performed at the time of initial diagnosis and long-term follow-up, and circulating levels of Delta-like 1 homolog (*DLK1*) were measured in affected individuals. Expression of *DLK1* was measured in mouse hypothalamus and in kisspeptin-secreting neuronal cell lines *in vitro*.

Setting: Endocrine clinic of an academic medical center.

Patients: Patients with familial CPP were studied.

Results: A complex defect of *DLK1* (~14-kb deletion and 269-bp duplication) was identified in this family. This deletion included the 5' untranslated region and the first exon of *DLK1*, including the translational start site. Only family members who inherited the defect from their father have precocious puberty, consistent with the known imprinting of *DLK1*. The patients did not demonstrate additional features of the imprinted disorder Temple syndrome except for increased fat mass. Serum *DLK1* levels were undetectable in all affected individuals. *DLK1* was expressed in mouse hypothalamus and in kisspeptin neuron-derived cell lines.

Conclusion: We identified a genomic defect in *DLK1* associated with isolated familial CPP. *MKRN3* and *DLK1* are both paternally expressed imprinted genes. These findings suggest a role of genomic imprinting in regulating the timing of human puberty. (*J Clin Endocrinol Metab* 102: 1557–1567, 2017)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in USA

Copyright © 2017 Endocrine Society

Received 11 November 2016. Accepted 20 January 2017.

First Published Online 27 January 2017

Abbreviations: AVPV, anteroventral periventricular; CPP, central precocious puberty; *DLK1*, Delta-like 1 homolog; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; HEK, human embryonic kidney; LH, luteinizing hormone; MBH, mediobasal hypothalamus; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification; mRNA, messenger RNA; PCR, polymerase chain reaction; SD, standard deviation; SNP, single nucleotide polymorphism.

Pubertal development is an essential biological process marking the transition from childhood to adulthood and ultimately resulting in the ability of an individual to reproduce. In humans, puberty is initiated through activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, marked by an increase in pulsatile gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release leading to pituitary secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone. Notably, early activation of the reproductive axis results in central precocious puberty (CPP), marked by thelarche prior to age 8 years in girls or testicular enlargement prior to 9 years in boys. CPP is an abnormal pediatric condition that can be attributable to cerebral congenital malformations, acquired insults, or genetic alterations (1, 2).

Activating mutations in *KISS1* and *KISS1R* have been reported in association with CPP, but mutations of these genes are very rare in sporadic cases of CPP (3, 4). In 2013, we described the first human mutations in *MKRN3*, a paternally expressed imprinted gene, in a cohort of families with CPP (5). Whole-exome sequencing revealed loss-of-function mutations in *MKRN3* in five of 15 families with CPP. The mutations were inherited from the father in all 15 affected individuals, consistent with the maternal imprinting of *MKRN3*. Other loss-of-function mutations of *MKRN3* have since been reported in familial CPP (6–9). The current frequency of *MKRN3* mutations in familial CPP is up to 46% (10). *MKRN3* encodes makorin RING-finger protein 3, a protein with domains implicated in E3 ubiquitin ligase and RNA binding activity.

The important role of *MKRN3* in human puberty initiation was reinforced by large genome-wide studies involving women of European descent from 57 studies (11). In this comprehensive study, menarche signals were found for paternal inheritance at the imprinted *MKRN3* and Delta-like 1 homolog (*DLK1*) loci (11). *DLK1*, also known as preadipocyte factor 1, is a transmembrane

protein containing epidermal growth factor–like repeats in its extracellular domain (12). It is a noncanonical ligand in the Delta–Notch signaling pathway and plays a role in inhibiting adipocyte differentiation (12, 13). *DLK1* is widely expressed in embryonic tissue, but, in humans, postnatal expression is highest in adrenal, pituitary, and ovarian tissue (<http://www.gtexportal.org/home/gene/DLK1>). A neuroendocrine function of *DLK1* was suggested by evidence of postnatal *DLK1* expression in several hypothalamic nuclei (14). Loss of *DLK1* has been shown to affect pituitary hormone content (15), but currently there is no definitive mechanistic link between *DLK1* function and pubertal development. In this study, we describe a novel genomic defect characterized by a deletion of the first exon of *DLK1* in a family with CPP.

Case Report

We report an Afro-descendant Brazilian family in which four female members (two sisters and two paternal half-sisters) had progressive CPP (Fig. 1). Their paternal grandmother reported her age of menarche as 9 to 10 years and is presumed to have had CPP, as this timing is 2 standard deviations (SD) below the average age of menarche (16, 17). Biochemical investigations were not performed on the grandmother when she was a child. In the four affected girls, breast development occurred at age 4.6 to 5.9 years, accompanied by growth acceleration (>6 cm/y) and advanced bone age (Table 1). Precocious pubarche was also observed in two of them. The hormonal profile confirmed early activation of the central axis, as demonstrated by their pubertal LH levels under basal conditions (>0.6 U/L) and after GnRH stimulation (>6.9 U/L for girls). All of them had normal findings on magnetic resonance imaging of the hypothalamic–pituitary region, excluding potential hypothalamic lesions. Pelvic ultrasound scans demonstrated increased uterine and ovarian volumes, consistent with CPP. They

Figure 1. Pedigree of family 1. Affected individuals are filled in black. All affected individuals carry the *DLK1* mutation. Unaffected carriers, due to the imprinted pattern of inheritance, are marked with a black dot (II.2 and II.5). Individuals whose DNA was tested and did not carry the deletion are marked with the letters WT (wild-type). All wild-type individuals had normal pubertal timing. Individuals marked by empty symbols (II.2, II.6, II.7) were not tested. An “x” denotes that the subject underwent exome sequencing; a “g” denotes that the subject underwent whole-genome sequencing; and an “s” denotes that the subject underwent genome-wide SNP microarray genotyping; and an “m” denotes that the subject underwent regional MLPA analysis.

Table 1. Clinical and Hormonal Features of Affected Girls With Familial CPP Associated With Deletion of Exon 1 of *DLK1* at Initial Diagnosis and Last Visit

	Patient III.3	Patient III.2	Patient III.1	Patient III.7
Initial diagnosis				
Clinical manifestation, y	Thelarche (5.5) Pubarche (6.0)	Thelarche (5.0)	Thelarche (4.6)	Thelarche (5.9) Pubarche (6.0)
Age at first visit, y	6.7	8.0	6.4	6.9
Height, cm (SD)	129.5 (2.5)	136.3 (1.2)	125.5 (1.7)	127.5 (1.6)
BMI, kg/m ² (percentile)	17.9 (87%)	19.5 (95%)	16.8 (83%)	17.3 (78%)
Breast development (Tanner stage)	4	4	3	4
Pubic hair (Tanner stage)	2	1	1	3
Bone age, y	11	11	7	10.6
Basal and stimulated LH levels, U/L ^a	1.9/31.5	1.7/26.9	<0.6/11.4	1.6/23.5
Estradiol, pg/mL ^b	53.3	34.9	<13	29
Last visit				
Age, y	22	21	18	16
Duration of GnRHa treatment, y	4.2	3.0	4.2	3.6
Weight, kg	71.6	55.5	84	56.1
Target height, cm (SD)	166 (0.6)	158.5 (−0.6)	158.5 (−0.6)	166.5 (0.7)
Height, cm	156.5	159.7	159.3	160.5
BMI, kg/m ²	29.2	22	33.1	22.1
Age of menarche, y	12	12	12	10.8
Basal LH/FSH, U/L ^a	3.3/5.1	2.9/2.5	5.5/7.0	0.2/0.6
Estradiol, pg/mL ^b	83	170.1	<15	26.5

Breast and pubic hair Tanner stage and bone age were assessed at the time of first visit.

Abbreviations: BMI: body mass index; FSH, follicle-stimulating hormone.

^aImmunofluorometric assay.

^bFluoroimmunoassay.

were treated with long-acting GnRH agonists with adequate clinical and hormonal control. Interestingly, the children's fathers had normal pubertal timing, suggesting either incomplete penetrance or an imprinted disorder, similar to *MKRN3* affected families (5). Additional clinical details at the time of initial diagnosis and long-term follow-up are presented in Table 1 and in the Supplemental Data (Supplemental Clinical Histories and Supplemental Table 1).

Materials and Methods

The research protocol was approved by the Ethics Committee of São Paulo University. Written informed consent was obtained from all participants.

Linkage analysis

Linkage analysis was performed using data extracted from six individuals who previously underwent exome sequencing (Fig. 1). To model the potentially imprinted disorder, an autosomal dominant pattern of inheritance was used and the fathers of the affected subjects were marked as obligate carriers. Details of the linkage analysis can be found in the Supplemental Methods.

Multiplex ligation-dependent probe amplification analysis

Four affected subjects underwent methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis using SALSA MS-MLPA probemix ME032-A1 UPD7/UPD14 (MRC-Holland). The ME032-A1 probemix contains probes for

the genes *PLAGL1*, *GRB10*, *MEST*, *DLK1*, *MEG3*, *RTL1*, and *MIR380*. Two probes for exons 3 and 4 of the *DLK1* were used for copy number variation analysis. These probes were not located in imprinted regions and did not generate information on the methylation status of *DLK1*. Coffalyser was used for analysis using the standard.

Whole-genome sequencing

Whole-genome sequencing of six individuals from this family was performed at the Broad Institute. All samples had >30-fold mean coverage across the genome. Variants were called using the Genome Analysis Toolkit following best practices as implemented at the Broad Institute. All coordinates are given in the Genome Reference Consortium build 37. Each sample had an average of 3,838,185 single nucleotide polymorphism (SNPs; 99,137 novel) and 709,114 indels (127,593 novel). The 1000 control genomes included samples sequenced on the same platform at the Broad Institute for other indications. The Brazilian genomes were obtained from EPIGEN-Brasil Initiative (<https://epigen.grude.ufmg.br>). For the copy number analysis, raw bam files of four affected and five unaffected individuals (including three additional control genomes from a separate family) were sorted and indexed using Samtools version 1.3. The end of chromosome 14 from position 99,000,000 was extracted. The average read depth was computed on nonsliding windows of 1000 bases as a computationally efficient data reduction approach. The ratio of averages of read depths of affected over nonaffected sequences was then plotted using R version 3.1.3.

Polymerase chain reaction analysis of deletion

Polymerase chain reaction (PCR) primers were designed that spanned the deletion. The forward primer was located at

chromosome 14:101179960–101179979 and the reverse primer at chromosome 14:101194449–101194468. This should result in a predicted product size of 14,509 bases. The primers used included: forward, 5'-ATGGAGAGGTTCATGCTGGG-3', reverse, 5'-CCTCGGACTCCAAAAGCAA-3'.

DLK1 serum measurements

Serum DLK1 levels were measured in all affected family members and controls using a soluble DLK1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA; IBL-America, Minneapolis, MN) per the manufacturer's instructions. Per the manufacturer's data, the ELISA is specific for measurement of DLK1 and recovers an average of 92% of DLK1 when serum samples are spiked with known concentrations of human DLK1. DLK1 levels range in human, healthy control serum from 0.4 to >2.5 ng/mL. The lower limit of detection for the assay is ~0.4 ng/mL with a mean intra-assay variability of 5% and mean interassay variability of 8.1%. This assay has not been validated in a large control population. Using two different ELISAs, mean DLK1 serum levels were found to be 0.69 ± 0.036 and 1.39 ± 1.37 ng/mL in 114 and 30 healthy controls, respectively (18, 19).

DLK1 expression

Total RNA was harvested using the RNeasy mini kit with RNase-free DNase treatment (Qiagen, Valencia, CA) from 10-cm plates ($n = 3$ per group) of human embryonic kidney (HEK)293 cells and two immortalized mouse cell lines derived from the arcuate (KTA-R-1) and anteroventral periventricular (AVPV; KTA-V-3) nuclei of adult Kiss1-green fluorescent protein female mice (20). Mediobasal hypothalamic tissue, which includes the arcuate nucleus, was collected from juvenile (postnatal day 12) wild-type C57/B6 male mice ($n = 3$).

One microgram of total RNA from each of these sources was reverse transcribed using iScript reverse transcription supermix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Real-time quantitative PCR was performed using an ABI Prism 7000 detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). The primers were designed from the mouse *Dlk1* sequence (NM_0100524; forward, 5'-AGTGCAGAAACCTGGGTGTC-3', reverse, 5'-GCCTCCTGTGTGAAAGTGGTCA-3'). PCR conditions were as follows: 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes, 95°C for 15 seconds then 60°C for 40 seconds for 40 cycles, 95°C for 15 seconds, 60°C for 20 seconds then 95°C for 15 seconds. Results were analyzed using ABI Prism 7000 SDS software (Applied Biosystems). Levels of *Dlk1* messenger RNA (mRNA) were normalized to *Rpl19* mRNA levels as an internal control. Data were analyzed using Prism statistical software (GraphPad Software, San Diego, CA). Multiple comparisons were analyzed by one-way analysis of variance followed by a Tukey honest significant difference test. All data are presented as the mean $\pm$ standard error of the mean. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Identification of a DLK1 rearrangement

As part of a prior study (5), six members from this family (Fig. 1) underwent exome sequencing. No novel

nonsynonymous variants were found to segregate with the CPP phenotype in this family. Using the common SNPs identified within the exome data, we reduced the search space via linkage analysis, defining those regions of the genome segregating perfectly with disease status. As expected, because the maximum logarithm of odds score achievable in the analyzed individuals is 1.8 (Supplemental Methods), discovered chromosome segments covered roughly $10^{-1.8}$ of the genome (Supplemental Table 2), and these segments defined our target for the mutation search. Interestingly, these segments did not include the genomic region containing *MKRN3*, which excluded that gene as causative in this family. Of the five identified regions, we were particularly interested in the linkage region at chromosome 14q32 for a number of reasons. First, it harbors a cluster of imprinted genes. None of the other linkage regions is known to contain any imprinted genes. Second, maternal uniparental disomy of chromosome 14 or paternal deletions of this region result in Temple syndrome, a complex syndrome that includes CPP (21). Third, a large genome-wide association study of age of menarche identified two variants within this locus that influence timing of menarche but only when inherited from the father (11). Specifically, one of these variants was found to correlate with expression of the imprinted gene *DLK1* in adipose tissue, making *DLK1* a leading candidate to explain this association. Taken together, all of these data suggest that there exists a paternally expressed imprinted gene in this region that affects pubertal timing.

Genome-wide SNP genotyping was performed using the Infinium CytoSNP-850K BeadChip platform in two affected individuals to assess for rare copy number variants in this region, but none was detected. Additionally, a specific regional MLPA kit (MRC-Holland) that includes 12 probes within the 14q32.2 region was performed in four affected individuals and did not detect any copy number variants or aberrant DNA methylation. We then performed whole-genome sequencing in six individuals from this family and focused the analysis on the region of linkage on 14q32. Owing to the rarity of familial CPP, we filtered out all variants present in any public database (1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium, dbSNP) or in ~1000 control genomes sequenced on the same platform. We also excluded any variants found in 37 Brazilian genomes (EPIGENE-Brasil Initiative project) (22). This resulted in 87 novel variants within the region of linkage. Of these, there was a single nonsynonymous variant, a novel frameshift in *AHNAK2*. This variant was not thought to be pathogenic, as this is a highly mutable gene with >130 loss-of-function variants reported in the Exome Aggregation Consortium database (<http://exac.broadinstitute.org>). None of the 86 noncoding variants

Figure 2. Complex genomic rearrangement resulting in deletion of exon 1 of *DLK1*. (a) Screenshot of *DLK1* region from the University of California Santa Cruz Genome Browser including two RefSeq *DLK1* transcripts in dark blue. The region of the genomic deletion is highlighted in red, and the region of the duplication is highlighted in blue. The location of the PCR primers used to amplify the sequence of the deletion (c and d) are indicated by green arrows. (b) Screenshots from the Integrative Genomics Viewer of whole-genome data from subject III.2. In each panel, the top track lists the genomic coordinates shown on the screen. The middle section shows individual sequencing reads as gray bars with a histogram of individual base coverage above the reads. The colored reads represent individual paired-end sequence reads whose paired read is not located at the expected distance. This occurs due to the deletion/genomic rearrangement. Top left panel: overview of genomic region including *DLK1* and its upstream region. The heterozygous deletion is clearly visible in the middle of the panel as a region of decreased sequencing coverage. The location of the *DLK1* gene is noted at the bottom of this panel. Bottom left panel: zoomed-in view of the beginning of the deletion demonstrating a precipitous drop in sequencing coverage along with an abundance of reads with pairs at an unexpected distance. Top right panel: zoomed-in view of the end of the deletion. Bottom right panel: area of duplication in intron 3 of *DLK1* showing increased coverage and abundance of reads with pairs at an unexpected distance. Blue arrows in all panels indicate the boundaries of the deletion or duplication. (c) PCR products demonstrating segregation of the deletion in the family. PCR primers span the deletion, and only individuals with the deletion demonstrate a PCR product of ~850 bp. Subjects II.1, II.8, and III.5 were also tested and do not carry the deletion (data not shown). (d) Sanger sequencing of the PCR products in a subject with the complex genomic rearrangement. The sequence from intron 3 has been

was found within a well-defined gene promoter region or within a known or predicted puberty-related transcription factor binding site.

To assess for potential copy number variants, we calculated the whole-genome sequencing read depth across the linkage region in bins of 1000 bases and compared the average read depth in affected vs unaffected individuals (including an additional three control genomes). Using this approach, we identified a novel ~14-kb heterozygous deletion that encompassed the entirety of the first exon of *DLK1*, including the translational start site [Fig. 2(a)]. *DLK1* is known to be an imprinted paternally expressed gene (23–25). No other known genes including noncoding RNAs are present within the deletion. Upon manual review of the whole-genome sequencing data, we were able to map the precise breakpoints of the deletion to chromosome 14: 101180303–101194231 [Fig. 2(b)]. This deletion was not present in any of ~300 control genomes. PCR amplification using primers designed to span the deletion demonstrated perfect segregation of the deletion with the phenotype (or obligate carrier status) within the family [Fig. 2(c)], including additional family members who were not included in the linkage or whole-genome study (Fig. 1). The probability of this deletion segregating perfectly with the phenotype in this family is 5×10^{-4} . Surprisingly, the PCR product was ~270 bases longer than predicted based on the length of the deletion. Sanger sequencing was performed, which demonstrated that a 269-nucleotide segment from intron 3 of *DLK1* had been duplicated and inserted between the ends of the genomic deletion (Fig. 2(d)). On further review of the whole-genome data, increased read depth is evident in the area of this intronic duplication [Fig. 2(b), bottom right panel]. The deletion and duplication were not evident on the prior SNP arrays, as their lengths were below the detection limit of that array, and even on retrospective analysis of the exome data a difference in read depth was not evident, presumably due to the variability in efficiency of exon capture. Additionally, the commercial regional MLPA kit only includes probes in exons 3 and 4 of *DLK1* as well as probes in additional downstream imprinted genes in the region, and thus could not detect the specific deletion or duplication found in this family. In summary, whole-genome sequencing revealed a novel complex chromosomal copy number variant resulting in deletion of the first exon of the imprinted gene *DLK1*

associated with CPP in this family. Segregation analysis of the *DLK1* rearrangement followed an imprinted pattern with complete penetrance on paternal transmission consistent with the pubertal phenotype data in this family.

Circulating *DLK1* levels

To investigate the effect of the genomic deletion on *DLK1* production, serum *DLK1* levels were measured in the four affected girls as well as in their affected grandmother and compared with eight controls, including four prepubertal individuals and four individuals who reported normal pubertal timing. *DLK1* serum levels ranged from 1.9 to 20 ng/mL in the control group. In contrast, all five affected individuals had undetectable *DLK1* levels (<0.4 ng/mL), supporting the notion that the genomic deletion leads to complete lack of *DLK1* production in these individuals (Fig. 3).

Dlk1 expression in the hypothalamus

It has been shown previously that *Dlk1* is expressed postnatally in the hypothalamus, in vasopressin and oxytocin neurons (14). The hypothalamus is a key locus for neuronal networks intimately involved in the neuroendocrine control of puberty, harboring GnRH neurons themselves as well as the upstream kisspeptin neurons, an essential component of the complex regulatory network that regulates GnRH secretion to control the timing of puberty onset (2). We measured *Dlk1* expression in the mediobasal hypothalamus (MBH) of juvenile wild-type male mice. The MBH encompasses the hypothalamic arcuate nucleus, a key site for the control of GnRH secretion and the locus of a major population of kisspeptin neurons in males and females. Furthermore, we measured *Dlk1* expression in two immortalized mouse cell lines, KTaR-1 and KTaV-3, derived from kisspeptin neurons in the arcuate and AVPV nuclei, respectively (20). The AVPV has been shown to harbor a second, sexually dimorphic population of kisspeptin neurons more abundant in females, implicated in mediating the ovulatory LH surge (26). *Dlk1* expression was detected in the mouse MBH and in both cell lines, with significantly higher ($P < 0.05$) levels of expression than in HEK293 cells, in which no *Dlk1* mRNA expression was observed (Fig. 4). Expression levels were significantly higher in the MBH than in the cell lines ($P < 0.05$). There was a trend toward higher expression in KTaV-3 cells compared with KTaR-1 cells, although this did not reach

Figure 2. (Continued). duplicated and inserted between the two ends of the large deletion. This results in a sequence that starts upstream of the deletion and then includes the whole duplicated region of intron 3 and concludes downstream of the deletion. The top panel's sequence begins upstream of the deletion and shows the breakpoint where the upstream region joins the beginning of the duplicated region from intron 3 of *DLK1*. The bottom panel's sequence starts with the end of the intron 3 duplicated region and joins to the region immediately downstream of the deletion in intron 1 of *DLK1*. All coordinates are given in the Genome Reference Consortium build 37.

Clinical features of patients with DLK1 rearrangement

DLK1 analysis in other families with CPP

The *DLK1* gene was analyzed in an additional 19 unrelated patients (18 girls and one boy) with idiopathic CPP. A family history of one or more affected relatives with precocious puberty was reported in 13 cases (Supplemental Table 3). Among these 19 patients, only two reported a history of CPP in their paternal relatives, whereas five were

Table 2. Clinical Features of Temple Syndrome and CPP Patients With Deletion of Exon 1 of *DLK1*

Clinical Features	Temple Syndrome (frequency %)	Patient III.3	Patient III.2	Patient III.1	Patient III.7
Gestational age and birth	Premature delivery (30%)	~40 wk vaginal	39 wk vaginal	39 wk vaginal	39 wk vaginal
Birth length, cm (SD)	Intrauterine growth retardation (75%)	Not available	51 (0.99)	53 (2.07)	48 (−0.62)
Birth weight, kg (SD)	Low birth weight (87%)	~3.0 kg (−0.52)	3.9 (1.37)	3.2 (−0.07)	3.7 (0.98)
Feeding behavior	Feeding problems (43%)	Normal	Normal	Normal	Normal
Facial characteristics	Facial dysmorphism	Not detected	Not detected	Not detected	Not detected
Head circumference, cm (percentile %) ^a	Relative macrocephaly (56%)	55.5 (50)	54.5 (25–50)	54.5 (25–50)	56.5 (50–75)
Hands (finger × palm), cm (percentile %) ^b	Small hands (87%)	8.2 × 11.3 (50)	7.5 × 11 (50)	7.5 × 11 (50)	7.8 × 11.2 (50)
Shoe size (US)	Small feet (96%)	Polydactyly 7.5	Short IV metatarsal 7.0	5.5	6.5
Neurologic features	Hypotonia (93%) Motor development delay (83%) Speech delay (59%), Mental retardation (39%)	Not present	Not present	Not present	Not present
Puberty development	Early onset puberty (86%)	+	+	+	+
Metabolic alterations	Maturity-onset diabetes of the young (rare) Early-onset type 2 diabetes	Acanthosis nigricans	—	Acanthosis nigricans Prediabetes	—
Total cholesterol	Hypercholesterolemia (10%)	182	122	196	171
Low-density lipoprotein		141	47	135	114
Triglycerides, mg/dL		84	39	100	66
Body mass index, kg/m ²	Overweight and obesity	Overweight	Normal weight	Obese	Normal weight
Abdominal	Truncal obesity	94	69.5	94.5	69
Circumference (cm) and fat mass (%)		43.6	35.4	50.5	34.2

Normal total cholesterol values are <200 mg/dL; normal low-density lipoprotein values are <100 mg/dL; high-density lipoprotein values are 160–189 mg/dL. Normal percentage of fat mass in bioelectrical impedance analysis is 18%–28%.

^aAdult head circumference was determined as in Nelhaus (37).

^bMiddle finger length and palm length were determined as in Feingold and Bossert (38).

reported in their maternal relatives and 12 were considered undetermined (six unknown family history and six with an affected sibling only). Loss-of-function mutations of *MKRN3* were previously excluded in all cases. Sanger sequencing of the five exons of the *DLK1* gene, including the 5' untranslated region, revealed only known polymorphisms in these 19 unrelated patients with familial CPP. An MLPA assay, containing probes for exons 3 and 4 of the *DLK1*, was also performed in 16 of these patients and no deletion was detected.

Discussion

Through a combination of linkage analysis and whole-genome sequencing, we have identified a complex genomic defect including a deletion of the first exon of *DLK1* in a family with CPP. The inheritance pattern follows that of a paternally expressed imprinted gene consistent with the known imprinting of *DLK1*. There have been no prior reports of monogenic defects in *DLK1* leading to isolated CPP.

Human *DLK1* is encoded by a paternally expressed gene located on the long arm of chromosome 14, within a

locus associated with Temple syndrome. This rare genetic condition is an imprinting disorder first described in 1991 (28) in a male with maternal uniparental disomy of chromosome 14. Since then, a total of 51 cases have been reported, most of whom have maternal uniparental disomy but a small number have paternal deletions including *DLK1* and its surrounding cluster of imprinted genes (*GTL2/MEG3*, *RTL1*, *MEG8*, and *DIO3*). Characteristic features of Temple syndrome include intrauterine growth retardation, postnatal short stature, truncal hypotonia, small hands, mild facial dysmorphisms, and precocious puberty (21). The female patients described in the present study did not demonstrate any of these features outside of the precocious puberty (Table 2) distinguishing them from patients with classic Temple syndrome. Our patients had a deletion of the first exon of *DLK1*, which would presumably lead to a complete loss of *DLK1*, supported by their undetectable serum *DLK1* levels. Attempts to delineate which genes within this region contribute to specific aspects of the Temple syndrome phenotype have not been definitive. A mouse knockout model of *Dlk1* deficiency

resulted in increased neonatal mortality and decreased growth and rib abnormalities in the surviving mice (29). Additionally, the knockout mice had increased adiposity and elevated levels of cholesterol and triglycerides, supporting the role of *Dlk1* in regulating adipocyte generation in mice. Details of pubertal timing were not reported but there was no apparent difference. Interestingly, although our patients do not demonstrate the growth failure seen in the knockout mice, all four patients had elevated fat mass based on bioelectrical impedance despite two of them being normal weight. Lipid levels were not grossly abnormal except in the one obese patient (patient III.1). Taken together with the known loss of *DLK1* expression in Temple syndrome as well as the knockout mouse model, our data suggest that loss of *DLK1* function is the cause of precocious puberty in patients with Temple syndrome and may be the cause of those patients' obesity but is not causal of any of the other Temple syndrome features.

Kagami *et al.* (30) reported a series of patients with deletions in the 14q.32 region, including two families in whom paternally transmitted deletions were found. In the first family, two individuals (one male and one female) inherited a 109-kb deletion encompassing *DLK1* and *MEG3*. These two individuals had modest short stature with adult heights of -2.9 and -2.2 SD. The female had early onset puberty with menarche at age 10 years 3 months, and pubertal timing was unknown in the male. This report further supports the notion that loss of *DLK1* expression leads to precocious puberty, as it was the only paternally expressed gene in their deleted region. The male subject was noted to be overweight, and both subjects had mild frontal bossing and small hands, in contrast to our patients. In the second family, a single female had a much larger 411-kb deletion involving multiple genes (*WDR25*, *BEGAIN*, *DLK1*, *MEG3*, *RTL1*, *RTL1as*, and *MEG8*). That patient had severe short stature with a height of -4.4 SD and a normal body mass index. She also had frontal bossing and small hands but was reported to have a normal age of menarche.

DLK1 is a noncanonical ligand in the Delta–Notch signaling pathway and plays a role in inhibiting adipocyte differentiation (12, 13). The connection between this known *DLK1* function and control of pubertal timing is currently unknown. As noted earlier, a neuroendocrine function of *DLK1* was suggested by evidence of postnatal *Dlk1* expression in several hypothalamic nuclei (14). Interestingly, Villanueva *et al.* (14) found that *Dlk1* expression increased progressively in mice postnatally, from postnatal day P6 to P20, correlating with increases in kisspeptin expression. This is in contrast to our previous findings with *Mkrm3* where expression decreased with pubertal onset, consistent with *MKRN3* acting as a

negative inhibitor of pubertal timing (5). Intriguingly, the *DLK1* intracellular domain has been shown to be a negative regulator of Notch signaling by disrupting the Notch1/RBP-Jk transcriptional complex (31). It was recently demonstrated that Rbpj-k-mediated Notch signaling is critical for kisspeptin neuronal development within the mouse arcuate nucleus and for subsequent *Kiss1* expression (32). Paradoxically, persistent Notch signaling during development also interfered with the development of kisspeptin and other arcuate neurons, suggesting a complex control mechanism in which Notch signaling must be properly titrated for formation of kisspeptin neurons. Our data confirm prior findings that *Dlk1* is expressed in the mouse MBH, which is essential for the neuroendocrine control of GnRH secretion and the timing of puberty onset, in large part through kisspeptin neurons. Furthermore, our data demonstrate *Dlk1* expression in cell lines derived from kisspeptin neurons in the arcuate and AVPV hypothalamic nuclei. Although it is premature to speculate on the mechanism by which loss-of-function mutations in *Dlk1* result in precocious puberty, these data, when taken together, suggest that it may involve regulation of kisspeptin neuron formation, maturation, and/or secretion of kisspeptin, likely involving the Notch signaling pathway. Interestingly, the opposing directions of regulation of *Mkrm3* and *Dlk1* expression prior to pubertal onset suggest that there may be competition or interactions between *MKRN3* and *DLK1* to control puberty onset. Indeed, this possibility is supported by a recent report that abnormalities of the Prader–Willi locus on chromosome 15 (which includes *MKRN3*) can modify the expression of genes of the *DLK1*-DIO3 locus on chromosome 14, supporting a complex *trans*-regulation between imprinted genes in these regions (33).

It is striking that potential loss-of-function mutations in two paternally expressed imprinted genes, *MKRN3* and *DLK1*, are associated with central precocious puberty. Moreover, common SNPs near both of these genes affect timing of menarche in the general population when paternally inherited (11). According to kinship theory (34), imprinted genes have evolved within an evolutionary context in which maternal alleles are silenced for genes that increase demands on an individual's mother. Therefore, it has been posited that maternally expressed genes should favor earlier puberty, thus reducing maternal demands, whereas paternally expressed imprinted genes delay puberty and thus prolong the maternally dependent stage of childhood (35, 36). The current findings that potential loss-of-function mutations in two paternally expressed imprinted genes result in CPP support this hypothesis.

In summary, using whole-genome sequencing, we have identified a complex chromosomal copy number variant

leading to deletion of the first exon of *DLK1* associated with CPP in a large Brazilian family. Loss of *DLK1* function is the likely cause of precocious puberty in individuals with the imprinting disorder Temple syndrome. This gene potentially represents the second paternally expressed imprinted gene in which loss-of-function mutations cause familial CPP, supporting a role for imprinted genes in regulating the timing of pubertal development.

Acknowledgments

The authors thank Michael Guo for assistance in the genome analysis, Mark Daly for insightful comments, Alexandre Pereira for providing the genomic Brazilian data (EPiGEN-Brazil Initiative), and Ana Krepsich for support on the SNPs array.

Address all correspondence and requests for reprints to: Ana Claudia Latronico, MD, PhD, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Endocrinologia e Metabolismo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7º andar, sala 7037 CEP: 05403-900, São Paulo, Brazil. Email: anacl@usp.br.

This work was supported by Grant K23HD07335 (to A.D.) and Grant R01HD082314 (to U.B.K.) from the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development of the National Institutes of Health; Grant 302849/2015-7 (to A.C.L.) from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; Grants 13/03236-5 (to A.C.L.) and 2013/06391-1 (to D.B.M.) from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; and by a grant from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (to M.C.). The Brazilian EPiGEN Project was supported by the Brazilian Ministry of Health and Ministry of Science and Technology.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(3):265–274.
- Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(3):254–264.
- Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico ACA. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(7):709–715.
- Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Bianco SD, Kuohung W, Xu S, Gryngarten M, Escobar ME, Arnhold IJ, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. Mutations of the *KISS1* gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(5):2276–2280.
- Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonça BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene *MKRN3*. *N Engl J Med*. 2013;368(26):2467–2475.
- Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantzis M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the *MKRN3* gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(4):E647–E651.
- Schreiner F, Gohlke B, Hann M, Korsch E, Woelfle J. *MKRN3* mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;82(2):122–126.
- Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LF, Teles MG, Carroll RS, Junior GG, Filho GG, Gucy Z, Arnhold IJ, de Castro M, Moreira AC, Martinelli CE, Jr, Hirschhorn JN, Mendonça BB, Brito VN, Antonini SR, Kaiser UB, Latronico AC. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene *makorin ring finger 3*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):E1097–E1103.
- de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel *MKRN3* missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod*. 2014;29(12):2838–2843.
- Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, Houang M, Jesuran Perelroizen M, de Filippo GP, Salerno M, Simonin G, Reynaud R, Carel JC, Léger J, de Roux N. Mutations in the maternally imprinted gene *MKRN3* are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(1):1–8.
- Perry JR, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, He C, Chasman DI, Esko T, Thorleifsson G, Albrecht E, Ang WQ, Corre T, Cousminer DL, Feenstra B, Franceschini N, Ganna A, Johnson AD, Kjellqvist S, Lunetta KL, McMahon G, Nolte IM, Paternoster L, Porcu E, Smith AV, Stolk L, Teumer A, Tšernikova N, Tikkanen E, Ulivi S, Wagner EK, Amin N, Bierut LJ, Byrne EM, Hottenga JJ, Koller DL, Mangino M, Pers TH, Yerges-Armstrong LM, Hua Zhao J, Andrusis IL, Anton-Culver H, Atsma F, Bandinelli S, Beckmann MW, Benitez J, Blomqvist C, Bojesen SE, Bolla MK, Bonanni B, Brauch H, Brenner H, Buring JE, Chang-Claude J, Chanock S, Chen J, Chenevix-Trench G, Collée JM, Couch FJ, Couper D, Coviello AD, Cox A, Czene K, D'adamo AP, Davey Smith G, De Vivo I, Demerath EW, Dennis J, Devilee P, Dieffenbach AK, Dunning AM, Eiriksdottir G, Eriksson JG, Fasching PA, Ferrucci L, Flesch-Janys D, Flyger H, Foroud T, Franke L, Garcia ME, García-Closas M, Geller F, de Geus EE, Giles GG, Gudbjartsson DF, Gudnason V, Guénel P, Guo S, Hall P, Hamann U, Haring R, Hartman CA, Heath AC, Hofman A, Hoening MJ, Hopper JL, Hu FB, Hunter DJ, Karasik D, Kiel DP, Knight JA, Kosma VM, Kotalik Z, Lai S, Lambrechts D, Lindblom A, Mägi R, Magnusson PK, Mannervik A, Martin NG, Masson G, McArdle PF, McArdle WL, Melbye M, Michailidou K, Mihailov E, Milani L, Milne RL, Nevanlinna H, Neven P, Nohr EA, Oldhinkel AJ, Oostra BA, Palotie A, Peacock M, Pedersen NL, Peterlongo P, Peto J, Pharoah PD, Postma DS, Pouta A, Pykäs K, Radice P, Ring S, Rivadeneira F, Robino A, Rose LM, Rudolph A, Salomaa V, Sanna S, Schlessinger D, Schmidt MK, Southey MC, Sovio U, Stampfer MJ, Stöckl D, Stortiolo AM, Timpson NJ, Tyrer J, Visser JA, Vollenweider P, Völzke H, Waechter G, Waldenberger M, Wallaschofski H, Wang Q, Willemsen G, Winqvist R, Wolfenbuttel BH, Wright MJ, Boomsma DI, Econs MJ, Khaw KT, Loos RJ, McCarthy MI, Montgomery GW, Rice JP, Streeten EA, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Alizadeh BZ, Bergmann S, Boerwinkle E, Boyd HA, Crisponi L, Gasparini P, Gieger C, Harris TB, Ingelsson E, Järvelin MR, Kraft P, Lawlor D, Metspalu A, Pennell CE, Ridker PM, Snieder H, Sørensen TI, Spector TD, Strachan DP, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Widen E, Zygmont M, Murray A, Easton DF, Stefansson K, Murabito JM, Ong KK; Australian Ovarian Cancer Study; GENICA Network; kConFab; Lifelines Cohort Study; InterAct Consortium; Early Growth Genetics (EGG) Consortium. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature*. 2014;514(7520):92–97.
- Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell*. 1993;73(4):725–734.
- Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V. *dlk*, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem*. 1993;268(6):3817–3820.

14. Villanueva C, Jacquier S, de Roux N. DLK1 is a somato-dendritic protein expressed in hypothalamic arginine-vasopressin and oxytocin neurons. *PLoS One*. 2012;7(4):e36134.
15. Cheung LY, Rizzotti K, Lovell-Badge R, Le Tissier PR. Pituitary phenotypes of mice lacking the notch signalling ligand delta-like 1 homologue. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(4):391–401.
16. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1794–1800.
17. Patsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56(2):129–148.
18. Li H, Cui ML, Chen TY, Xie HY, Cui Y, Tu H, Chen FH, Ge C, Li JJ. Serum DLK1 is a potential prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma. *Tumour Biol*. 2015;36(11):8399–8404.
19. Peng T, Zhou Y, Li J, Li J, Wan W, Jia Y. Detection of Delta-like 1 ligand for the diagnosis of tuberculous meningitis: an effective and rapid diagnostic method. *J Int Med Res*. 2014;42(3):728–736.
20. Jacobs DC, Veitch RE, Chappell PE. Evaluation of immortalized AVPV- and arcuate-specific neuronal kisspeptin cell lines to elucidate potential mechanisms of estrogen responsiveness and temporal gene expression in females. *Endocrinology*. 2016;157(9):3410–3419.
21. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJ, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. *J Med Genet*. 2014;51(8):495–501.
22. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhães WC, Horimoto AR, Horta BL, Moreira RG, Leal TP, Schiar MO, Soares-Souza GB, Rodrigues-Souares F, Araújo GS, Zamudio R, Sant Anna HP, Santos HC, Duarte NE, Fiaccone RL, Figueiredo CA, Silva TM, Costa GN, Beleza S, Berg DE, Cabrera L, Debortoli G, Duarte D, Ghirotto S, Gilman RH, Gonçalves VF, Marrero AR, Muniz YC, Weissensteiner H, Yeager M, Rodrigues LC, Barreto ML, Lima-Costa MF, Pereira AC, Rodrigues MR, Tarazona-Santos E; Brazilian EPIGEN Project Consortium. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(28):8696–8701.
23. Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan XJ, Tilghman SM. The *Dlk1* and *Gtl2* genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev*. 2000;14(16):1997–2002.
24. Takada S, Tevendale M, Baker J, Georgiades P, Campbell E, Freeman T, Johnson MH, Paulsen M, Ferguson-Smith AC. *Delta-like* and *Gtl2* are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr Biol*. 2000;10(18):1135–1138.
25. Wylie AA, Murphy SK, Orton TC, Jirtle RL. Novel imprinted DLK1/GTL2 domain on human chromosome 14 contains motifs that mimic those implicated in IGF2/H19 regulation. *Genome Res*. 2000;10(11):1711–1718.
26. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*. 2007;53(2):367–378.
27. Briggs TA, Lokulo-Sodipe K, Chandler KE, Mackay DJ, Temple IK. Temple syndrome as a result of isolated hypomethylation of the 14q32 imprinted DLK1/MEG3 region. *Am J Med Genet A*. 2016;170A(1):170–175.
28. Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet*. 1991;28(8):511–514.
29. Moon YS, Smas CM, Lee K, Villena JA, Kim KH, Yun EJ, Sul HS. Mice lacking paternally expressed Pref-1/Dlk1 display growth retardation and accelerated adiposity. *Mol Cell Biol*. 2002;22(15):5585–5592.
30. Kagami M, Sekita Y, Nishimura G, Irie M, Kato F, Okada M, Yamamori S, Kishimoto H, Nakayama M, Tanaka Y, Matsuoka K, Takahashi T, Noguchi M, Tanaka Y, Masumoto K, Utsunomiya T, Kouzan H, Komatsu Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kosaki K, Ferguson-Smith AC, Ishino F, Ogata T. Deletions and epimutations affecting the human 14q32.2 imprinted region in individuals with paternal and maternal upd(14)-like phenotypes. *Nat Genet*. 2008;40(2):237–242.
31. Jung J, Mo JS, Kim MY, Ann EJ, Yoon JH, Park HS. Regulation of Notch1 signaling by Delta-like ligand 1 intracellular domain through physical interaction. *Mol Cells*. 2011;32(2):161–165.
32. Biehl MJ, Raetzman LT. *Rbpj-κ* mediated Notch signaling plays a critical role in development of hypothalamic Kisspeptin neurons. *Dev Biol*. 2015;406(2):235–246.
33. Stelzer Y, Sagi I, Yanuka O, Eiges R, Benvenisty N. The noncoding RNA IPW regulates the imprinted DLK1-DIO3 locus in an induced pluripotent stem cell model of Prader-Willi syndrome. *Nat Genet*. 2014;46(6):551–557.
34. Haig D. Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu Rev Genet*. 2004;38:553–585.
35. Crespi B. The evolutionary biology of child health. *Proc Biol Sci*. 2011;278(1711):1441–1449.
36. Haig D. Colloquium papers: transfers and transitions: parent-offspring conflict, genomic imprinting, and the evolution of human life history. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010;107(Suppl 1):1731–1735.
37. Nellhaus G. Head circumference in children with idiopathic hypopituitarism. *Pediatrics*. 1968;42(1):210–211.
38. Feingold M, Bossert WH. Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1974;10(13):1–16.