MILENA GURGEL TELES BEZERRA

Estudo do gene *GPR54* nos distúrbios puberais centrais idiopáticos

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

Área de concentração: Endocrinologia
Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latronico

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra, Milena Gurgel Teles
Estudo do gene *GPR54* nos distúrbios puberais centrais idiopáticos / Milena Gurgel Teles Bezerra. -- São Paulo, 2008.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica.
Área de concentração: Endocrinologia.
Orientadora: Ana Claudia Latronico.

Descritores: 1.Receptores acoplados a proteína-G/genética 2.Puberdade tardia 3.Puberdade precoce/etiologia 4.Análise mutacional de DNA 5.Mutação

USP/FM/SBD-169/08

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com o apoio da FAPESP (processo 05/50146-5) e da CAPES (4482-05-0).

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu marido, João Evangelista Bezerra Neto, amor da minha vida, amigo e companheiro de todos os momentos.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho. Algumas menções especiais:

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico, minha orientadora, um exemplo admirável de competência profissional, como médica, pesquisadora e professora. Agradeço sua amizade, dedicação, incentivo, paciência, otimismo contagiante e alegria cativante que tornaram a realização dessa tese uma atividade extremamente prazerosa.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos profissionais e de vida. Pela incansável busca pela excelência, constante dedicação e impressionante capacidade de coordenação e organização. Obrigada por suas sugestões e conselhos enriquecedores.

Ao Dr. Vinicius Nahime Brito, pelo companheirismo, paciência, ensinamentos, incentivo e valiosa amizade.

Ao Prof. Dr. Ivo J. P. Arnhold, pelo apoio, incentivo, pelos comentários sempre pertinentes e inteligentes, e pelos ensinamentos de vida.

À Dra. Ana Elisa Correa Billerbeck, pelos preciosos ensinamentos sobre os fundamentos de biologia molecular, pela ajuda na bancada e principalmente pela amizade.

À Dra. Emilia Modolo Pinto, pelos ensinamentos na bancada, por seus prestativos ensinamentos na bancada e amizade.

À Dra. Ericka Barbosa Trabach, por sua excelência técnica, capacidade de trabalho, disponibilidade constante e, sobretudo, amizade e apoio incondicionais.

À Dra. Rocio Riatto Della Coletta, pelo apoio e incentivo constantes, cumplicidade e amizade.

Ao Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge, pela admirável dedicação à pesquisa e constante disponibilidade em ajudar e ensinar todos à sua volta.

À Dra. Elaine Costa, pelos ensinamentos no ambulatório de pacientes de hipogonadismo hipogonadotrófico.

Às Dras. Ursula Kaiser e Suzy Bianco pela importante colaboração na realização dos estudos funcionais desse trabalho.

A todos os funcionários do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, pela paciência com os pós-graduandos, ensinamentos, generosidade e dedicação; especialmente às secretárias Francinilda da Silva P. Oliveira (Nildinha), Ana Lúcia Farah, Cristiane Sandrini pela eficiência e auxílios constantes, e, ainda, Francisca Pereira, Maria Aparecida Medeiros, Cristina Rossi, Francineide Pereira Alves, Miriam Yumie Nishi, Alzira Sampaio e Gisele por toda a ajuda na bancada.

A todos os funcionários do Ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento.

Aos colegas pós-graduados: Sorahia Domenice, Maria Cândida Fragoso, Tânia Bachega, Regina Martin, Luciani Carvalho, Rafaela Vieira Correa, pela colaboração e cooperação.

Aos colegas pós-graduandos:

Letícia Silveira, Priscilla Cukier pela ajuda na organização da casuística de pacientes de puberdade precoce;

Ana Paula Abreu, pela ajuda na organização da casuística de pacientes de hipogonadismo hipogonadotrófico;

Antônio Lerário por compartilhar uma gama enorme de conhecimentos técnico-práticos;

Catarina Brasil D'Alva pela amizade e conselhos profissionais preciosos;

Karina Freitas, Márcia Helena Costa, Karina Berger, Madson Almeida, Frederico Marchisotti, Maria Edna, Débora Cabral, Larissa Gomes, Luciana Brito, Carolina Cani, Camila Gomes, Maíra, Luciana Montenegro, Maria Estela, Everlayny. Obrigada a todos os colegas do LIM-42 pelo convívio agradável e pela troca de experiências e dúvidas.

À FAPESP e à CAPES pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus pais José Telles e Francy Mary, e irmãos Guilherme, Germanno e Mirella, constantes fontes de amor, apoio e estímulo em minha vida.

Ao meu esposo maravilhoso, João Evangelista, por seu amor intenso, puro e sincero, por seu apoio, companheirismo e cumplicidade que me tornam uma pessoa completa, feliz e realizada.

Sumário

Lista de abreviaturas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Summary

1. Introdução 1
   1.1 Distúrbios puberais em humanos 3
   1.2 Distúrbios puberais e defeitos genéticos 6
   1.3 *GPR54* e HHIn 9
   1.4 Modelos murinos 12
   1.5 Caracterização do gene *GPR54* 13
   1.6 Ligante do GPR54 - kisspeptina 14
   1.7 Estudos *in vivo* do sistema kisspeptina-GPR54 15
   1.8 GPR54 e Puberdade Precoce 18

2. Objetivos 19

3. Métodos 21
   3.1 Casuística 22
   3.2 Avaliação hormonal 25
   3.3 Avaliação molecular 26
      3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos 26
      3.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR) 27
      3.3.3 Seqüenciamento automático 28
      3.3.4 Predição de mudança de sítio de *splicing* 28
      3.3.5 Digestão por enzima de restrição 28
      3.3.6 Ensaio de amplificação por ligação de múltiplas sondas (MPLA) 29

3.4 Estudos *in vitro* 30
3.4.1 Mutagênese sítio-dirigida 31
3.4.2 Estudos de sinalização do GPR54 31
3.4.3 Ensaio de fosfatidilinositol (IP) 31
3.4.4 Ensaio de ERK fosforilada 32
3.4.5 Ensaios de ligação ao receptor 33
3.4.6 Ensaios de Ligação ao Receptor ao Longo do Tempo 33

4. Resultados 35
4.1 Puberdade Precoce 36
4.1.1 Análise do DNA 36
4.1.2 Estudo Funcional da Mutação R386P 37
4.2 Hipogonadismo Hipogonadotrófico 39
4.2.1 Análise de DNA 39
4.2.2 Predição de *splicing* 40
4.2.3 Análise do gene *GPR54* pelo método MLPA 40
4.3 Retardo puberal 41

5. Discussão 43
5.1 Puberdade Precoce 45
5.2 Hipogonadismo Hipogonadotrófico e Retardo Puberal 48

6. Conclusões 51

7. Anexos 53

8. Referências 75

Apêndice

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

μg/kg	Microgramas por quiilograma
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Arg-Phe-NH_2	Arginina e fenilalanina com resíduo amida
Bmax	Capacidade máxima de ligação
BSA	Albumina séria bovina
CHO	Células derivadas de ovário de *hamster* chinês
COOH	Carboxiterminal
COS-7	Células de rim de macaco verde africano
cpm	Contagens por minuto
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAX1	Gene do fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita
DMEM	*Dulbecco's modified eagle medium*
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
E_2	Estradiol
EC_{50}	Concentração efetiva máxima
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERKs	Proteinoquinases reguladas por sinal extracelular
FGFR1	Gene que codifica o receptor do fator de crescimento de fibroblasto do tipo 1
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FSHR	Gene do receptor de FSH
FSHβ	Gene da subunidade *β* receptor de FSH
GABA	Ácido gama aminobutírico
GnRH	Decapeptídeo hipotalâmico liberador de gonadotrofinas
GnRH1	Gene que codifica o hormônio liberador de gonadotrofinas
GnRH-R	Receptor de GnRH

GPR54	Receptor acoplado à proteína G - 54
gpr54 -/-	*knockout* do gene *gpr54* murino
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfônico
HESX1	Gene *homeobox* da bolsa de Rathke
HHIn	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IFMA	Imunofluorométrico
IgG	Imunoglobulina G
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IO	Idade óssea
IP	Fosfatidilinositol
IP_3	Trifosfato de inositol
KAL1	Gene que codifica a proteína de matriz anosmina
Kd	Constante de dissociação
KiSS1	Gene que codifica a kisspeptina
LH	Hormônio luteinizante
LH	Gene da subunidade *β* receptor de LH
LHR	Gene do receptor de LH
LHX3	Gene *homeobox* LIM 3
MAPquinases	Proteinases ativadas por mitogênese
MgSO4	Sulfato de magnésio
MLPA	Ensaio de amplificação por ligação de múltiplas sondas
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NELF	Fator nasal embriônico do hormônio liberador de LH
NH_2	Aminoterminal
NPY	Neuropeptídeo Y
pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PC1	Gene da enzina pró-convertase 1

pERK	Proteinoquinase regulada por sinal extracelular fosforilada
PIP_2	Difosfato de inositol
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PPDG	Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas
PPIG	Puberdade precoce independente de gonadotrofinas
PROK2	Proquineticina- 2
PROKR2	Receptor da proquineticina- 2
PROP1	Gene profeta do fator de transcrição específico da pituitária 1 (Pit1)
ptn	Proteína
RCCP	Retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento
Rho	Rodopsinas
RIE	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm:	RNA mensageiro
RNM	Ressonância nuclear magnética
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SF1	Gene do fator esteroidogênico 1
SNC	Sistema nervoso central
TE	Tampão tris e EDTA
TGF β	Fator de crescimento de fibroblastos β
TGFα	Fator de crescimento de fibroblastos α
Tris-HCl	Trisaminometano hidrocloreto
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
Vmax	Velocidade máxima
WT	Selvagem

Lista de figuras

Lista de figuras

Figura 1 - Esquema representativo do gene do receptor *GPR54* humano. 65

Figura 2 - Modelo da estrutura de um receptor acoplado à proteína G.....66

Figura 3 - Seqüência de nucleotídeos do gene *GPR54* selvagem e mutante (R386P).....67

Figura 4 - Representação da seqüência de aminoácidos do receptor GPR54. 68

Figura 5 - Ensaio de deslocamento de ligação.. 69

Figura 6 - Produção de IP após estímulo com kisspeptina em células transfectadas com o GPR54 selvagem ou mutante R386P. 70

Figura 7 - Fosforilação de ERK ao longo do tempo em células transfectadas com GPR54 selvagem ou mutante R386P. 71

Figura 8 - Estudo de ligação ao receptor ao longo do tempo. 72

Figura 9 - Seqüência do intron 2 e exon 3 do *GPR54* selvagem e com a mutação *indel*.....73

Figura 10 - Representação esquemática dos exons 2 e 3 do gene *GPR54*. 74

Lista de tabelas

Lista de tabelas

Tabela 1- Causas de hipogonadismo hipogonadotrófico 54

Tabela 2- Doenças monogênicas do eixo reprodutivo 55

Tabela 3- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com PPDG idiopática.....56

Tabela 4- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com HH idiopático.....59

Tabela 5- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com RCCP 61

Tabela 6- Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos 63

Tabela 7- Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e RIE em pré-púberes e adultos. 63

Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cinco exons do gene *GPR54*.....64

Tabela 9 - Características clínicas e hormonais de três pacientes com HHIn, e mutações do gene *GPR54*.....64

Resumo

Teles,MG. *Estudo do gene GPR54 nos distúrbios puberais centrais idiopáticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 84p.

O complexo de sinalização kisspeptina-GPR54 é um regulador chave para ativação dos neurônios de GnRH e do eixo reprodutivo. Mutações inativadoras no *GPR54* foram identificadas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico normósmico isolado (HHIn). A partir desse achado, hipotetizamos que mutações ativadoras no GPR54 resultariam na liberação prematura de GnRH e, conseqüentemente, no aparecimento de puberdade precoce, dependente de gonadotrofinas (PPDG). No presente estudo, investigamos a presença de mutações ativadoras e/ou polimorfismos em pacientes com PPDG, assim como a presença de mutações inativadoras e/ou polimorfismos em pacientes HHIn ou retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento puberal (RCCP). Cento e catorze pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos foram selecionados, sendo 53 com PPDG, 33 com HHIn e 28 com RCCP. Cento e cinqüenta controles brasileiros que relatavam desenvolvimento puberal normal foram estudados. A região codificadora do *GPR54* de todos os pacientes foi amplificada utilizando-se oligonucleotídeos intrônicos específicos, seguida de purificação enzimática e seqüenciamento automático. No grupo de puberdade precoce, identificamos uma nova variante em heterozigose no exon 5 do *GPR54*, que se caracterizou pela troca do aminoácido arginina por prolina na posição 386 (R386P) do receptor. Esta substituição foi encontrada em uma menina adotada com PPDG e estava ausente nos controles normais. Estudos *in vitro* demonstraram que as quantidades de fosfatidil-inositol (IP) e o grau de fosforilação da quinase regulada por sinal extracelular (pERK) em condições basais não foram significativamente diferentes entre as células transfectadas com o receptor selvagem ou com o receptor contendo a mutação R386P, indicando que não havia ativação constitutiva do receptor. No entanto, estudos por tempos mais prolongados demonstraram que a quantidade de IP e o grau de pERK permaneceram significativamente mais altos nas células transfectadas com o receptor mutante quando comparadas ao selvagem, indicando ativação da sinalização intracelular, porém por um mecanismo não-constitutivo. No grupo de hipogonadismo, duas novas variantes foram identificadas em três pacientes. Uma mutação do tipo inserção/deleção (*indel*) em homozigoze no sítio aceptor de *splicing* no intron 2 (IVS2-4_-2delGCAinsACCGGCT) do GPR54 foi identificada em dois irmãos com HHIn. Uma troca em heterozigose, E252Q, foi identificada em um paciente com HHIn esporádico. As duas alterações estavam ausentes no grupo controle. Polimorfismos foram encontrados nos pacientes com RCCP. Em conclusão, descrevemos a primeira mutação ativadora do GPR54 associada ao fenótipo de PPDG. Descrevemos uma nova mutação inativadora em sítio de *splicing* em pacientes com HHIn, entretanto mutações inativadoras do GPR54 são uma causa rara de HHIn.

Descritores: 1.Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas 2.Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado 3.Retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento 4.Receptor GPR54 5.Mutações ativadoras 6.Mutações inativadoras

Summary

Teles MG *GPR54 gene analysis in patients with idiopathic central pubertal disorders* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 84p

The kisspeptin-GPR54 signaling complex is a gatekeeper of pubertal activation of GnRH neurons and of the reproductive axis. Inactivating mutations in the GPR54 receptor were identified in patients with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism (nIHH). Based on this observation, we hypothesized that gain-of-function mutations of the human GPR54 receptor might be associated with premature activation of GnRH release, leading to gonadotropin-dependent precocious puberty (GDPP). In the present study, we investigated the presence of *GPR54* activating mutations or polymorphisms in patients with GDPP and inactivating mutations or polymorphisms in patients with nIHH or constitucional delay of puberty (CDP). A hundred fourteen patients were selected; 53 with GDPP, 33 with nIHH and 28 with CDP. A hundred and fifty Brazilian controls who reported normal pubertal development were also studied. The entire coding region of *GPR54* of all patients was amplified using specific intronic oligonucleotides followed by enzymatic purification and automated sequencing. We have identified a novel variant in heterozygous state in exon 5 of *GPR54*, R386P, in an adopted girl with GDPP. This substitution was absent in all controls. Basal inositol phosphate (IP) and phosphorilated extracellular signal–regulated kinase (pERK) levels in cells transfected with WT or R386P GPR54 were not significantly different indicating that there was not a constitutive activation of the receptor. However, studies performed in more prolonged times demonstrated that the IP and the pERK levels were significantly higher in cells transfected with the mutant receptor when compared to the wild type, indicating that the signaling pathway was still activated although by a non-constitutive mechanism. In the nIHH cohort, we have identified two novel variants in three patients. The first variant was an insertion/deletion (*indel*) in homozygous state within the constitutive acceptor splice site of intron 2 of *GPR54* (IVS2-4_-2delGCAinsACCGGCT) identified in two male siblings with nIHH. The second variant was the change E252Q in heterozygous state in a patient with sporadic nIHH. Both alterations were absent in the control population. We have found only polymorphisms in patients with CDP. In conclusion, we have described the first activating mutation in *GPR54* associated with the GDPP phenotype. We have also described a novel splice site inactivating mutation in patients with nIHH however, inactivating mutations of *GPR54* represent a rare cause of nIHH.

Descriptors: 1.Gonadotropin-dependent precocious puberty 2.Normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism 3.Constitutional delay of puberty 4.GPR54 receptor 5.Activating mutations 6.Inactivating mutations

1. Introdução

A puberdade compreende o período de transição entre a infância e a vida adulta quando são desenvolvidos os caracteres sexuais secundários e ocorre a aquisição das funções reprodutivas[1]. O início da puberdade ocorre a partir do aumento da amplitude da secreção pulsátil do decapeptídeo hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este representa o primeiro passo conhecido do processo de ativação seqüencial do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O aumento dos pulsos de GnRH leva à liberação das gonadotrofinas hipofisárias, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) que, por sua vez, estimulam ovários e testículos, induzindo a secreção dos esteróides sexuais gonadais e a produção de gametas maduros[2].

Os princípios da secreção pulsátil do GnRH, assim como o seu papel fundamental no início da puberdade foram bem estabelecidos nas últimas duas décadas[3, 4]. A secreção do GnRH é proeminente no lactente sendo seguida de um período de relativa quiescência durante toda a infância[1]. A reemergência dos pulsos do GnRH ocorre no final da infância e coincide com o início da puberdade. No entanto, a regulação de sua secreção e seu comportamento durante os diferentes estágios da vida são fenômenos ainda não completamente elucidados.

A secreção de GnRH hipotalâmico é coordenada por uma rede neuronal complexa, constituída de neurônios estimulatórios e/ou inibitórios e pela ativação recíproca de mecanismos de comunicação glia-neurônio[4-6].

Os principais neurotransmissores e neuromoduladores inibitórios são os opióides endógenos, o ácido gama aminobutírico (GABA), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a melatonina. Destacam-se como principais neurotransmissores excitatórios: glutamato, norepinefrina, dopamina, serotonina e mais recentemente a kisspeptina, juntamente com o seu receptor, GPR54[4, 7]. Ao neuropeptídeo Y (NPY) são atribuídas tanto uma atividade excitatória quanto inibitória sobre a secreção de GnRH[8]. As células da glia e os fatores de crescimento, tais como fator de crescimento de fibroblastos (TGFα e β), fator de crescimento epidermal (EGF), citoquinas e interleucinas (IL-1 e IL-6), estão também implicados no complexo mecanismo regulatório da secreção de GnRH[5, 6]. A leptina, hormônio secretado principalmente pelos adipócitos, tem sido implicada no início da puberdade humana[9]. No entanto, evidências obtidas a partir dos estudos em modelos animais e em humanos apontam para um papel permissivo deste hormônio no eixo reprodutivo. A leptina atua como mediadora do tônus excitatório de GnRH, e não como desencadeadora do processo puberal[9].

1.1 Distúrbios puberais em humanos

A idade de início puberal varia amplamente e segue uma distribuição normal ou gaussiana[1]. Considera-se que o início do processo puberal é normal quando o aparecimento dos caracteres sexuais secundários ocorre entre 8 e 13 anos nas meninas, e entre 9 e 14 anos nos meninos[1, 10].

Classicamente, a puberdade é considerada precoce quando se inicia antes dos 8 anos nas meninas e dos 9 anos nos meninos. Em contraposição, o atraso puberal é caracterizado pela ausência dos caracteres sexuais secundários a partir dos 13 anos nas meninas e 14 anos nos meninos[1, 2].

A puberdade precoce pode ser classificada quanto à sua origem em dois grupos. Denomina-se puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG), ou central quando o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários é conseqüência da ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal; e puberdade precoce independente de gonadotrofinas (PPIG), ou periférica quando o seu aparecimento é uma conseqüência da produção autônoma dos esteróides sexuais, principalmente pelas gônadas ou adrenais.

A incidência estimada da PPDG é de 1:10.000 – 1:5.000[10, 11]. A PPDG é considerada idiopática quando o exame de imagem do sistema nervoso central (SNC), preferencialmente a ressonância nuclear magnética (RNM), afasta causas orgânicas de ativação do eixo gonadotrófico. Nos casos de PPDG idiopática, a incidência descrita é de até dez casos em meninas para cada caso em meninos[10]. No sexo masculino, as anormalidades neurológicas são responsáveis por 2/3 dos casos de puberdade precoce central, sendo que os tumores do SNC representam o fator etiológico na metade dos pacientes com esse diagnóstico[12].

O atraso puberal pode ser dividido em três subtipos: retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento, caracterizado pelo início tardio da puberdade normal ou pela atenuação de sua progressão,

sendo esta a causa mais comum de atraso puberal; hipogonadismo hipogonadotrófico, caracterizado pela diminuição da síntese e da secreção das gonadotrofinas e hipogonadismo hipergonadotrófico, definido pela disfunção gonadal primária, com conseqüente aumento da secreção de gonadotrofinas[2].

O retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento (RCCP) é considerado variação normal e ocorre quando indivíduos saudáveis entram espontaneamente na puberdade após os 13 anos para as meninas e após os 14 anos para os meninos[13, 14]. Classicamente, os pacientes apresentam baixa estatura, atraso do desenvolvimento sexual e estirão puberal tardio e atenuado. Os pacientes apresentam boa saúde e bom padrão nutricional, porém crescem mais lentamente desde a infância. É mais comum nos meninos[15].

O hipogonadismo hipogonadotrófico caracteriza-se pela deficiência da secreção de GnRH a partir dos neurônios hipotalâmicos ou pela deficiência da secreção hipofisária de LH e FSH[16]. Essa forma de hipogonadismo apresenta várias causas orgânicas (Tabela 1), podendo a deficiência de gonadotrofinas ser combinada ou isolada. Na ausência de condições patológicas associadas ao hipogonadismo transitório e de lesões orgânicas centrais, esta condição é denominada idiopática. O diagnóstico diferencial entre hipogonadismo hipogonadotrófico isolado idiopático e RCCP pode ser difícil pois, em ambas as situações, ocorre superposição de achados clínicos e laboratoriais[2]. Por isso, o seguimento clínico e laboratorial prolongado é necessário para a apropriada distinção dessas duas condições.

1.2 Distúrbios puberais e defeitos genéticos

O início da puberdade humana está relacionado a fatores ambientais, socioculturais, étnicos e econômicos[1]. É notável que a variação etária do início da puberdade segue um padrão familiar, sugerindo a influência de fatores genéticos[1, 17]. A idade da menarca semelhante entre mães e filhas, a concordância do desenvolvimento puberal entre gêmeos monozigóticos quando comparados a dizigóticos são aspectos que reforçam esse fato[1]. No início de 2004, *de Vries e cols.*[18] estudaram retrospectivamente um grande número de crianças israelenses com puberdade precoce central. De 453 pacientes estudados, 156 apresentavam a forma idiopática de PPDG. Destas, 147 eram do sexo feminino e 9 do sexo masculino. Quarenta e três crianças (27%) preenchiam os critérios para puberdade precoce familial[18]. Após análise de segregação dessas famílias, foi possível estabelecer um padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta e sexo-dependente[18]. Portanto, fatores genéticos parecem ter um papel importante no início da puberdade.

Na última década, diversos fatores, incluindo receptores hormonais, proteínas de matriz, neurotransmissores, fatores de transcrição, foram estudados e anormalidades gênicas foram identificadas em condições de precocidade e de atraso puberal[19-21]. Essas descobertas propiciaram um grande avanço na compreensão da fisiologia e da fisiopatologia do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal nesta importante fase de transição da vida, além de contribuírem positivamente para a prática clínica da medicina reprodutiva.

Inúmeras mutações inativadoras em genes que interferem no eixo gonadotrófico foram relacionadas ao hipogonadismo hipogonadotrófico (Tabela 2)[22-29]. O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado é caracterizado por valores baixos de esteróides sexuais na presença de valores normais ou baixos de LH e FSH, na ausência de outras deficiências hipofisárias[30]. É uma condição causada pela secreção ou ação deficiente do decapeptídeo hipotalâmico GnRH. Pode ocorrer associado a alterações olfatórias quando é denominado síndrome de Kallmann ou com olfato normal, nesse caso também chamado de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico (HHIn).

A síndrome de Kallmann é a forma mais comum de hipogonadismo hipogonadotrófico, ocorrendo em 1/10.000 indivíduos do sexo masculino e 1/50.000 indivíduos do sexo feminino[31]. Mutações inativadoras nos genes *KAL1*[22, 23]foram relacionadas à síndrome de Kallmann de herança ligada ao X e autossômica dominante, respectivamente[22, 23]. O gene *KAL1* codifica a proteína de matriz anosmina e o *FGFR1* codifica o receptor do fator de crescimento de fibroblasto do tipo 1. Esses dois fatores são essenciais para a adequada migração dos neurônios de GnRH para o hipotálamo. Mais recentemente, mutações no receptor da proquineticina- 2 (PROKR2) e seu ligante (PROK2) foram relacionadas à síndrome de Kallmann[25].

As primeiras mutações inativadoras relacionadas ao HHIn foram descritas no gene do receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas, *GnRH-R*[26] e, mais recentemente, no gene do receptor acoplado à proteína G, *GPR54*[28, 29]. Mutações inativadoras nos receptores FGFR1 e PROKR2 também foram descritas nos pacientes com HHIn[27]. Mutações inativadoras

nos genes que codificam as subunidades beta das gonadotrofinas também constituem uma causa rara de HHIn[32, 33].

Contrastando com as mutações inativadoras descritas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, mutações ativadoras relacionadas à puberdade precoce foram descritas em pacientes com PPIG. Mutações ativadoras do receptor de LH promovem aumento da secreção de testosterona pelos testículos e causam puberdade precoce limitada ao sexo masculino familial, também conhecida como testotoxicose[34-36]. Mutações ativadoras também são responsáveis pelo fenótipo de PPIG na síndrome de McCune-Albright, que se caracteriza pela presença de mutações somáticas pós-zigóticas na subunidade α da proteína G em diversos tecidos, inclusive gônadas, e levam ao quadro de hiperfunção hormonal, manchas café-com-leite e displasia fibrosa óssea[20]. Essas duas patologias têm em comum o fato de que o receptor de LH e a subunidade alfa adquirem a capacidade de ativar o sinal intracelular mesmo na ausência do ligante, condição chamada de ativação constitutiva.

A identificação de genes envolvidos no controle do início da puberdade representa uma etapa importante na compreensão dos mecanismos que estão envolvidos no início da puberdade humana[1, 4]. Entretanto, até o momento não se tem conhecimento sobre alterações estruturais em genes que afetam o eixo gonadotrófico causando PPDG.

Um novo receptor, GPR54, e seu ligante, kisspeptina, são considerados elementos-chave para o controle da secreção de GnRH e para o início da puberdade. Mutações gênicas que causam ativação desse sistema representam uma possibilidade para explicar o fenótipo de PPDG.

1.3 *GPR54* e HHIn

Em 2003, dois grupos independentes descreveram as primeiras mutações inativadoras no *GPR54*[28, 29]. Por meio da metodologia de análise de ligação, duas famílias com HHIn e alto grau de consangüinidade foram estudadas. Inicialmente, mutações no gene do receptor GnRH foram excluídas. A utilização de mais de 300 marcadores polimórficos para o genoma mostrou que um único marcador encontrava-se em homozigose em todos os afetados, permitindo a identificação de um novo *locus* na região do braço curto do cromossomo 19[28, 29]. De Roux e cols.[28, 29], após seqüenciamento de vários genes candidatos desta região, identificaram uma macrodeleção de 155 pares de base (pb), em homozigose, localizada na transição do intron 4 com o exon 5 do gene *GPR54*[28]. Esta deleção removeu o sítio de *splicing*, e resultou em uma proteína truncada a partir do aminoácido 247. Todos os afetados desta família francesa foram homozigotos para a deleção de 155 pb, contrastando com os membros não afetados que não apresentaram a deleção ou possuíam apenas um alelo afetado. No segundo estudo, realizado por *Seminara e cols*.[29], seis membros de uma grande família árabe apresentavam uma mutação *missense* em homozigose no exon 3 do gene *GPR54*. A troca do nucleotídeo timina na posição 1143 por uma citosina resultou na substituição do aminoácido leucina por uma serina na posição 148 (L148S) na segunda alça intracelular da proteína. Essa alteração esteve ausente em 130 controles normais. Nesse mesmo estudo, duas novas mutações em heterozigose (R331X e

X399R) foram identificadas em um paciente negro americano, portador de HHIn esporádico. A avaliação hormonal desse paciente mostrou concentrações baixas de LH medidas por um período de 24 horas, porém com resposta puberal após tratamento crônico com GnRH exógeno[29]. O modelo funcional de transfecção do receptor GPR54 em células COS-7 incluiu as três distintas linhagens mutantes (L148S, R331X e X399R) e demonstrou diminuição da resposta de fosfatidilinositol (IP) nas células que continham receptores mutados. Estes achados demonstraram pela primeira vez que o HHIn pode ser causado por mutações inativadoras do receptor GPR54. Evidenciaram ainda, a importância deste receptor na regulação do processo puberal e conseqüentemente na fisiologia do eixo gonadotrófico.

Após a primeira descrição, novas mutações foram descritas no gene *GPR54*, envolvendo o fenótipo de HHIn. Em 2005, *Sample RK e cols.*[37] estudaram os genes do receptor *GPR54* e de seu ligante, *KiSS1*, em 30 pacientes com hipogonadismo hipogonadotófico ou retardo puberal. Um paciente com hipogonadismo hipogonadotrófico de origem afro-caribenha e turca apresentou duas novas mutações do tipo *missense* em estado de heterozigose composta. Estas mutações caracterizaram-se pela troca de uma cisteína por arginina na posição 223 (C223R) na quinta hélice transmembrana, e pela substituição de uma arginina por leucina (R297L) na terceira alça extracelular do receptor GPR54. Estudos *in vitro* do receptor com a mutação C223R demonstraram uma diminuição de 80% da capacidade de sinalização. No entanto, estudos funcionais da sinalização intracelular do receptor com a mutação R297L demonstraram apenas leve comprometimento de sua função. Apenas polimorfismos no gene *KiSS1* foram encontrados

neste estudo[37]. Ainda em 2005, *Lanfranco e cols.*[38] descreveram uma nova mutação do tipo *frameshift* em heterozigose, 1001_1002insC. A inserção ocorreu no sétimo segmento transmembrana do receptor e resultou em um acréscimo de vários resíduos de prolina hidrofóbicos, conferindo um alongamento de 43 aminoácidos na porção intracelular da proteína[38]. No final de 2006, *Tenenbaum-Rakover, Y e cols.*[39] descreveram uma nova mutação do tipo *missense* em homozigose, L102P, em duas famílias consangüíneas de ascedência árabe, não relacionadas. A variante foi resultado da troca de uma timina por citocina na posição 305 do exon 2 do *GPR54*. Estudos funcionais *in vitro* avaliaram o acúmulo de IP e comprovaram uma diminuição completa de sua geração[39]. Os indivíduos com a mutação L102P apresentaram uma resposta variável ao teste de estímulo agudo com GnRH. Um dos membros afetados foi acompanhado por aproximadamente dez anos, o que possibilitou melhor caracterização da resposta ao teste de estímulo agudo com GnRH ao longo do tempo. As concentrações de LH e FSH após o estímulo elevaram-se progressivamente durante o seguimento chegando a concentrações quase puberais por volta dos 21 anos de idade. Esse achado sugere que a mutação inativadora L102P levaria a um defeito do eixo gonadotrófico mais quantitativo do que qualitativo[39].

Até o presente momento foram descritas oito diferentes mutações inativadoras no *GPR54* em pacientes com HHIn, incluindo uma deleção[28], uma inserção[38] e cinco mutações do tipo *missense*[29, 39, 40], sendo todas em homozigose ou heterozigose composta, caracterizando o padrão de herança autossômica recessiva dessa condição.

1.4 Modelos murinos

Complementando o estudo do *GPR54* realizado em humanos, um modelo murino de *knockout* do gene *GPR54* foi realizado por *Seminara e cols*.[29]. Os camundongos *gpr54* -/- desenvolveram um fenótipo compatível com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado. Os camundongos machos *knockout* para *gpr54* possuíam testículos pequenos, hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, baixas concentrações de testosterona plasmática, espermatogênese comprometida e não apresentaram comportamento de monta. As fêmeas apresentaram abertura vaginal reduzida, valores baixos de estradiol, ausência de folículos e corpo lúteo nos ovários. Após acasalamento, as fêmeas não atingiram prenhez e não apresentaram evidências de ciclicidade estrogênica. Os camundongos de ambos os sexos apresentaram concentrações de LH e FSH mais baixas, quando comparadas aos camundongos selvagens. Estudos posteriores nesses animais demonstraram presença de resposta das gonadotrofinas ao GnRH exógeno, indicando integridade do receptor de GnRH hipofisário. Adicionalmente, análises histológicas do SNC desses animais revelaram que os neurônios de GnRH encontravam-se tópicos e possuíam quantidade normal de GnRH[29].

1.5 Caracterização do gene *GPR54*

O gene *GPR54* está localizado na porção telomérica da região 13.3 do braço curto do cromossomo 19, sendo constituído de cinco exons (Figura 1)[28]. O receptor codificado por este gene foi inicialmente descrito em 1999 por pesquisadores canadenses, como um receptor órfão acoplado à proteína G em cérebro de murinos[41]. A estratégia de clonagem foi "PCR degenerada", quando se utilizaram oligonucleotídeos para regiões altamente conservadas de um gene, como é o caso das regiões transmembranas 3 e 7 dos receptores acoplados à proteína G.[41] O receptor GPR54 de murinos possui 396 aminoácidos e apresenta aproximadamente 40% de homologia com receptores da família da galanina; no entanto, não apresenta afinidade de ligação com o neuropeptídeo galanina. Subseqüentemente, o receptor GPR54 humano foi clonado e chamado de AXOR12 ou hOT7T175[42, 43]. A maior expressão do *GPR54* humano foi detectada em tecidos como hipófise, hipotálamo, pâncreas e placenta[43]. A proteína codificada pelo *GPR54* em humanos possui 398 aminoácidos e pertence ao grupo dos receptores acoplados à proteína G, do tipo Gq da família da rodopsina. À semelhança de outros receptores desse grupo, possui sete hélices na porção transmembrana, um domínio aminoterminal, três alças extracelulares e três alças intracelulares e um domínio carboxiterminal (Figura 2).

1.6 Ligante do GPR54 - kisspeptina

Em 1996, por meio da metodologia de *Northern Blot*, pesquisadores americanos em Hershey, Pensilvânia, identificaram um novo gene cujo RNA mensageiro era altamente expresso apenas em melanomas que não possuíam a capacidade de metastizar.[44] O gene identificado no cromossomo 1 codificava um peptídeo de 145 aminoácidos e foi denominado *KiSS1*. Ele recebeu esse nome devido a sua habilidade de inibir metástase: "SS" significa "seqüência supressora" e ainda como uma homenagem ao produto mais conhecido da cidade onde foi identificado pela primeira vez, o chocolate KiSS, da Hershey®. Posteriormente, foi também descrita a capacidade da kisspeptina de inibir metástases de carcinoma de mama[45]. Deste modo, em suas primeiras descrições o gene *KiSS1* estava relacionado à biologia do câncer.

Os ligantes do receptor GPR54 foram descritos apenas em 2001, quase simultaneamente por três grupos independentes[42, 43, 46]. As kisspeptinas são provenientes do processamento proteolítico de um único produto inicial de 145 aminoácidos. O maior produto derivado do *KiSS1* é um peptídeo de 54 aminoácidos, predominantemente expresso na placenta[42]. Além disso, fragmentos menores chamados de kisspeptina-10, kisspeptina-13 e kisspeptina-14 que possuem 10, 13 e 14 aminoácidos, respectivamente, foram também identificados[46]. Do ponto de vista estrutural, todas as kisspeptinas possuem uma porção carboxiterminal em comum que contém a seqüência Arg-Phe-NH_2, sendo essa região a responsável pela afinidade de

ligação e ativação do GPR54[43, 46]. A ligação das kisspeptinas ao receptor GPR54 ativa o sinal intracelular por meio do recrutamento da proteína Gq, ativação da fosfolipase C e hidrólise de difosfato de inositol (PIP_2) seguida do acúmulo de trifosfato-inositol (IP_3), mobilização de cálcio, liberação de ácido araquidônico e fosforilação de proteinoquinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) e proteinases ativadas por mitogênese (MAPquinases)[46]. O tratamento com kisspeptina de células de rim de macaco verde africano (COS-7), transfectadas com GPR54, resulta em alterações morfológicas celulares, provavelmente por alteração e organização dos filamentos de actina[47]. Corroborando com esses achados, a kisspeptina-10 estimula a formação de fibras de estresse em células derivadas de ovário de *hamster* chinês (CHO) que expressam GPR54, provavelmente por meio da família das rodopsinas (Rho) de proteínas G[46].

Os camundongos *knockout* para o gene *kiss1* reproduzem o fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado à semelhança dos camundongos *knockout gpr54*[48].

1.7 Estudos *in vivo* do sistema kisspeptina-GPR54

Diversos estudos *in vivo* comprovaram a importância do sistema kisspeptina-GPR54 no controle da secreção do GnRH e no início da puberdade[7, 49-55]. O potente efeito estimulatório da kisspeptina-10 e da metastina foi demonstrado por meio do aumento da secreção de LH em

ratos e camundongos[49, 51-53]. Esses achados foram confirmados em outras espécies como ovinos, primatas e humanos[7, 55, 56]. Adicionalmente, a administração de kisspeptina por meio de diferentes vias de administração (intracerebral, intravenosa, intraperitoneal e subcutânea) foi capaz de liberar LH em ratos e camundongos pré-púberes e jovens[57, 58,51, 52, 59, 60]. Uma particularidade interessante revelada por esses estudos foi a sensibilidade do sistema gonadotrófico aos efeitos estimulatórios da kisspeptina. Quantidades de kisspeptina que variaram de 100 fentomol a 1 picomol administradas por via intracerebroventricular, e de 0,5 μg/kg por via periférica, foram suficientes para provocar liberações robustas de LH em ratos e macacos[49, 59, 61, 62]. Paralelamente, a liberação de FSH também foi estimulada pela kisspeptina, porém essa resposta foi um pouco mais tardia e exigiu doses maiores de kisspeptina (até 200 vezes) [59, 63]. Evidência concreta de que a ativação do GPR54 estimula diretamente a liberação do GnRH hipotalâmico foi demonstrada pelo aumento da quantidade de GnRH no líquido cerebroespinhal de ovelhas após infusão com kisspeptina[56]. A infusão intermitente de kisspeptina através de uma cânula cerebroventricular lateral em primatas machos agonádicos foi capaz de ocasionar uma grande liberação de GnRH, seguida de um aumento de LH[55]. Esta elevação foi abolida com a administração prévia de um antagonista do receptor de GnRH, indicando uma ação estimulatória direta da kisspeptina na liberação de GnRH[55]. A kisspeptina parece estimular a liberação de gonadotrofinas por ação apenas no GPR54, pois os camundongos *knockout* para *gpr54* não exibem aumento de gonadotrofinas após administração de kisspeptina[56].

A infusão contínua de kisspeptina-10 em primatas provocou aumento de LH nas primeiras 2 horas; porém, com a manutenção da infusão por 12 horas, as concentrações de LH decaíram a valores pré-tratamento[64]. Após 4 dias de infusão contínua de kisspeptina, a administração de GnRH foi capaz de estimular novamente a secreção de LH, sugerindo que ocorre dessensibilização do receptor GPR54 e não do receptor de GnRH[64].

Evidências adicionais da relevância fisiológica do sistema hipotalâmico GPR54/kisspeptina no controle das gonadotrofinas foram trazidas por estudos de expressão. A maioria dos neurônios de GnRH em diferentes espécies como ratos, camundongos, peixes e primatas expressam o receptor GPR54[64]. Além disso, a kisspeptina induziu a expressão de c-fos, um marcador da ativação neuronal, em 85% dos neurônios de GnRH[50]. Estudos de transcrição reversa demonstraram a presença de RNA mensageiro (RNAm) do *GPR54* em núcleo arqueado e eminência média, regiões importantes na regulação da secreção de GnRH[582]. Além disso, neurônios que contêm kisspeptina possuem projeções axonais para núcleos de neurônios de GnRH[65]. A habilidade da kisspeptina de estimular neurônios de GnRH foi ainda demonstrada por meio de estudos eletrofisiológicos realizados *in situ*[58]. Esse estudo mostrou uma resposta de despolarização em mais de 90% da população de neurônios em hipotálamo de camundongos adultos[58].

O aumento da expressão do RNAm dos genes *GPR54* e *KiSS1* coincide com o início da puberdade em ratos machos e fêmeas, sendo precedidos por quantidades baixas de RNAm no período pré-puberal[51]. Essa

observação foi também confirmada em primatas, no entanto, houve aumento da expressão do RNAm do *GPR54* e do *KiSS1* em fêmeas, mas em machos foi detectado aumento apenas no RNAm do gene *KiSS1*[66]. A realização de hibridização *in situ* em hipotálamo de camundongos gonadectomizados evidenciou expressão diferencial do RNAm do *KiSS1* em resposta a esteróides sexuais. No núcleo arqueado, a reposição de esteróides sexuais diminuiu a expressão do RNAm do *KiSS1*, enquanto que no núcleo anteroventral periventricular ocorreu um aumento no grau de sua expressão[67, 68]. Esse núcleo possui um papel importante na secreção de LH em resposta ao *feedback* positivo do estrógeno, o que aventa a possibilidade do envolvimento do sistema kisspeptina no pico pré-ovulatório de gonadotrofinas[69].

1.8 GPR54 e Puberdade Precoce

A sinalização do *GPR54* por meio de seu ligante kisspeptina no hipotálamo contribui para a reemergência dos pulsos de GnRH, sendo um regulador chave para a biologia do início da puberdade humana. Com bases nesses achados, nós hipotetizamos que mutações ativadoras do gene *GPR54* poderiam estar relacionadas com o fenótipo de PPDG idiopática. Adicionalmente, avaliamos pacientes com HHIn e RCCP com intuito de identificar novas mutações inativadoras e/ou polimorfismos no gene *GPR54*

2. Objetivos

2- OBJETIVOS

1. Identificar mutações ativadoras e/ou polimorfismos no gene *GPR54* em pacientes com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas idiopática.

2. Identificar mutações inativadoras e/ou polimorfismos no gene *GPR54* em pacientes com atraso puberal devido a hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico idiopático ou a retardo constitucional de crescimento e desenvolvimento puberal.

3. Correlacionar os achados moleculares ao fenótipo dos pacientes afetados e segregá-los entre os outros membros da família.

4. Realizar o estudo funcional das novas mutações do *GPR54* identificadas em pacientes com distúrbios puberais.

3. Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP/aprovação nº 020/05) e o consentimento informado formal foi concedido pelos pacientes ou responsáveis.

3.1 Casuística

Foram selecionados 114 pacientes portadores de distúrbios puberais centrais de causa indeterminada ou idiopáticos: 53 com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG), 33 com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado sem anosmia (HHIn) e 28 com retardo constitucional de crescimento e desenvolvimento puberal (RCCP). Todos os pacientes com puberdade precoce ou com retardo puberal foram selecionados no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Os pacientes hipogonádicos foram selecionados dos Serviços de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo em São Paulo ou Ribeirão Preto e do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Um grupo controle foi composto por 150 indivíduos adultos, de ambos os sexos, que não apresentaram anormalidades no desenvolvimento puberal.

Cinqüenta e três pacientes com PPDG foram estudados, sendo 51 do sexo feminino e 2 do sexo masculino. Os critérios clínicos e laboratoriais considerados para inclusão dos pacientes com PPDG no presente estudo foram: início dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos nas meninas e dos 9 anos nos meninos, concentrações de LH puberais em condição basal e/ou após estímulo com GnRH exógeno, ressonância nuclear magnética (RNM) do SNC sem anormalidades e resposta terapêutica satisfatória ao tratamento com análogos de GnRH *depot* (3,75 mg, via subcutânea a cada 28 dias).

Quarenta e um dos 53 pacientes (77,4%) apresentavam a forma esporádica e 12 pacientes (22,6%), pertencentes a sete famílias, apresentavam a forma familial de PPDG. Entre as pacientes do sexo feminino com PPDG, a média de idade cronológica de início da puberdade foi de 4,7 anos e variou de 0,33 a 7,5 anos. Segundo os critérios de Marshall e Tanner[70, 71], as pacientes apresentavam ao exame físico inicial mamas variando de M2 a M5 e pêlos pubianos variando de P1 a P5. A Tabela 3 resume os achados clínicos dos pacientes com PPDG. Os dois pacientes do sexo masculino estão identificados como casos 29 e 30 na Tabela 3.

No grupo de 33 pacientes com HHIn, 24 indivíduos eram do sexo masculino e 9 do sexo feminino. Os critérios clínicos e laboratoriais utilizados para a inclusão dos pacientes com HHIn foram: a falta de aparecimento de caracteres sexuais secundários após os 13 anos nas meninas e após os 14 anos nos meninos, concentrações séricas de LH diminuídas ou inapropriadamente normais em condição basal e/ou após teste de estímulo

com GnRH exógeno, concentrações baixas de esteróides sexuais para o sexo e idade, olfato normal e RNM do SNC sem evidências de anormalidades. Dos 33 pacientes estudados, apenas 7 tinham idade cronológica inferior aos 18 anos na ocasião do diagnóstico, porém foram acompanhados até a idade adulta, o que comprovou o diagnóstico de hipogonadismo permanente nesses casos.

Vinte e quatro pacientes dos 33 pacientes (72,8%) apresentavam a forma esporádica de HHIn e 9 (27,2%), de 8 famílias, apresentavam a forma familial. Todos os 24 pacientes do sexo masculino estudados apresentaram queixa de hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Diâmetro testicular reduzido para a idade cronológica foi evidenciado em todos os pacientes. Cinco pacientes (casos 1, 6, 12, 28 e 32) apresentavam criptorquidia. Ginecomastia foi observada em 7 pacientes (casos 1, 2, 6, 10, 12, 21 e 33). A média de idade cronológica da primeira consulta foi de 22,3 e variou de 14,3 a 34 anos. Entre as 9 pacientes do sexo feminino, a média de idade cronológica da primeira consulta foi de 20 anos e variou de 14 a 28 anos. Desenvolvimento mamário espontâneo, parcial ou completo esteve presente em 4 pacientes (casos 15, 18, 19 e 22). Os achados clínicos dos pacientes com HHIn estão sumarizados na Tabela 4.

No grupo de 28 pacientes com RCCP, 24 indivíduos eram do sexo masculino e 4 do sexo feminino. Os critérios clínicos de inclusão foram: o início espontâneo da puberdade após a idade de 13 anos nas meninas e 14 anos nos meninos[72], idade óssea atrasada em relação à idade cronológica e desenvolvimento normal da puberdade após o seu início. Onze pacientes

dos 30 estudados apresentavam história familiar de atraso puberal, sendo 7 meninos e 4 meninas. A média de idade cronológica do início da puberdade no sexo masculino foi de 15,1 anos e variou de 14 a 17,7 anos. Entre os cinco pacientes do sexo feminino a idade cronológica do início da puberdade variou de 13 a 14 anos. A Tabela 5 resume os achados clínicos dos pacientes com RCCP.

3.2 Avaliação hormonal

O diagnóstico laboratorial dos distúrbios puberais foi baseado nas dosagens das gonadotrofinas (LH e FSH), principalmente LH; e dos esteróides sexuais (estradiol e testosterona). No período do estudo foram utilizados dois métodos de dosagens para as gonadotrofinas séricas: o radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo (Wallac, Turku, Finlândia) ou o ensaio imunofluorométrico (IFMA) (Perkin Elmer, Wallac, Finlândia).

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. Os valores de esteróides sexuais e do LH basal e após estímulo com GnRH considerados normais, estão descritos nas Tabelas 6 e 7.

No diagnóstico de PPDG, foram considerados 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 para o IFMA[73]; $LH_{(delta)}$ após estímulo com

GnRH ≥ 15 U/L e estradiol ≥ 10 pg/mL para o RIE. No sexo masculino, foram considerados 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 [73]; LH $_{(delta)}$ após estímulo com GnRH ≥ 15 U/L e testosterona > 10 ng/dL para o RIE. Adicionalmente, LH>10 U/L, dosado 2 horas após administração da primeira ampola de acetato de leuprolide 3,75 mg via subcutânea, também foi considerado como diagnóstico de PPDG[74].

Valores de esteróides sexuais abaixo do limite normal associado a concentrações inapropriadamente normais ou baixas de LH, basal ou após estímulo com GnRH (Tabelas 6 e 7), na ausência de deficiências combinadas dos hormônios hipofisários, foram os critérios hormonais adotados para a determinação do diagnóstico de HHIn e atraso puberal.

Os dados hormonais dos pacientes com distúrbios puberais estão resumidos nas Tabelas 3, 4 e 5.

3.3 Avaliação molecular

3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

DNA genômico foi extraído de 15 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, o botão de células foi 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 2 volumes de etanol absoluto gelado. Posteriormente, o DNA foi lavado em etanol 70% por 5 minutos e ressuspenso em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

3.3.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação da região codificadora constituída de 1197 nucleotídeos do gene do receptor do *GPR54* utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 8). A reação de amplificação foi constituída por 0,2 μg de DNA genômico, 200 μmol/L de cada trifosfato de nucleosídeo, 1,5 Mm de MgSO4 e 2,5 U de *Platinum ®Taq PCRx DNA polimerase* (enzima para otimização da amplificação de regiões ricas em GC) diluída em seu tampão *10X PCRx Amplification Buffer* fornecido pelo fabricante (*Invitrogen Life Technologies*), em um volume final de 50 μL. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer, Cetus). Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados em luz ultravioleta.

3.3.3 Seqüenciamento automático

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. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o produto comercial *ABI Prism*^{TM} *BigDye Terminator* (Perkin Elmer, Foster City, CA) e concentrações variáveis de DNA (10 ng a 100 ng) foram utilizadas de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em seqüenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer* (Perkin Elmer, Foster City, CA).

3.3.4 Predição de mudança de sítio de *splicing*

A previsão dos potenciais sítios crípticos de *splicing* na ocorrência da perda do sítio constitutivo foi investigada por meio do *software* NetGene2 (http://genome.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/).

3.3.5 Digestão por enzima de restrição

Uma troca nucleotídea 1157G>C localizada no exon 5 do *GPR54* foi estudada no grupo controle pela técnica de digestão enzimática. A presença da base C gera um sítio de restrição para a enzima *Sma*I (New England Biolabs, Beverly, MA, USA). Portanto, na presença da base G, o fragmento

inicial de 769 pb não sofre digestão enquanto, na presença da base C, dois fragmentos (585 pb e 184 pb) são originados. A reação de digestão foi realizada utilizando 5 μL do produto de PCR do exon 5, 1,25 UI da enzima *SmaI* e o tampão da reação fornecido pelo fabricante por uma hora a 25°C. O produto da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e fotografado sob luz ultravioleta.

3.3.6 Ensaio de amplificação por ligação de múltiplas sondas (MPLA)

O ensaio MLPA é um método recentemente desenvolvido para quantificação relativa de cerca de 30-40 seqüências diferentes de DNA em apenas uma reação. Essa técnica tem sido utilizada com sucesso na detecção de deleções e duplicações em linhagens celulares de amostras tumorais[75]. O MLPA foi realizado em DNA genômico de todos os pacientes com HHIn, utilizando-se o produto comercial SALSA® MLPA® kit P133 Kallmann-2 (MRC Holland), que contém as sondas para os genes *FGFR1* (exons 1-3, 5, 6, 8, 10 ,11 ,13, 14 e 18), *GPR54* (exons 1 e 4), *GnRH1* (todos os 3 exons), *GnRHR* (todos os 3 exons) e *NELF* (exons 5, 11 e 15).

A reação de MLPA ocorreu a partir de uma amostra de 5 μL de DNA genômico (100 ng) desnaturado a 98°C durante 5 minutos. À temperatura de 25°C foram adicionados 3 μL da mistura de sondas para a hibridização por 16 horas a 60°C em termociclador *Gene Amp PCR System 2400* (Applied Biosystem, Foster City, California, USA). Em seguida, a temperatura foi reduzida para 54ºC, e então, adicionados 32 μL da mistura de Ligase-65. Foram incubados a 54ºC por 15 minutos e, em seguida a 98ºC por 5 minutos

(produto de ligação). Posteriormente, foram adicionados 30 µL da mistura de PCR e 10 µL do produto de ligação obtido na fase anterior. Os tubos foram colocados em termociclador a 60ºC e mantidos nessa temperatura enquanto foram adicionados 10 µL da mistura de Polimerase. Os produtos da amplificação foram detectados e quantificados por eletroforese capilar no seqüenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer , CA, USA), e analisados pelo programa de análise de fragmentos *GeneScan* (Applied Biosystems, Perkin-Elmer, CA, USA). Os dados foram submetidos à análise pelo programa *MCR Cofallyser* (MRC-Holland, Amsterdam, The Neatherlands), para determinação da relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controles.

3.4 Estudos *in vitro*

Os estudos funcionais foram desenvolvidos em colaboração com o laboratório da Doutora Ursula Kaiser, chefe da Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Hipertensão do Hospital Brigham and Women´s, Escola de Medicina de Harvard, em Boston, Estados Unidos.

3.4.1 Mutagênese sítio-dirigida

A geração de mutantes foi realizada em vetor de expressão de mamíferos pCMVsport 6, contendo a seqüência do *GPR54* selvagem (clone CS0DE005YC17, Invitrogen). As novas mutações no gene *GPR54* foram introduzidas neste vetor a partir da mutagênese sítio-dirigida com o produto comercial *QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, CA) e foram confirmadas por seqüenciamento direto.

3.4.2 Estudos de sinalização do GPR54

Células COS-7 foram transfectadas transitoriamente com o GPR54 selvagem, com os receptores mutantes construídos ou com o vetor vazio (pCMVsport 6), usando o produto comercial *GenePORTER Transfection Reagent* (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). As células foram mantidas em cultura com meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), em placas de seis poços. Em seguida, as células foram estimuladas com o decapeptídeo C-terminal (112-121) do ligante natural do GPR54, kisspeptina em diferentes doses e tempos para realização de ensaios de mensuração dos segundos mensageiros da sinalização do GPR54, fosfatidilinositol (IP) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK). [43, 46].

3.4.3 Ensaio de fosfatidilinositol (IP)

O meio de cultura das células COS-7 foi substituído por DMEM sem inositol, 24 horas antes do início do ensaio de IP. As células foram

incubadas a 37°C por duas horas e em seguida, 2 µCi/ml de mioinositol marcado com trício (myo-[2-3]-inositol, Perkin Elmer, Waltham, MA) foram adicionado às células, seguidos de 10 mM de cloreto de lítio após 15 minutos. Após incubação por 12 horas, a produção de IP foi estimulada pela adição de diferentes concentrações de kisspeptina (10^{-11} a 10^{-7} M) por tempos determinados. As células foram extraídas com ácido fórmico, os lisados foram neutralizados, centrifugados e tiveram seu conteúdo protéico quantificado. O sobrenadante de cada poço foi carregado em colunas de resina para troca de ânions (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA). As colunas foram lavadas com diferentes soluções e o IP total foi eluído. Um líquido de cintilação foi adicionado ao eluato; a radiação foi quantificada e corrigida pelo conteúdo protéico. O ensaio foi realizado com amostras em triplicata.

3.4.4 Ensaio de ERK fosforilada

As células COS-7 foram estimuladas com a dose de 10^{-9} M de kisspeptina em tempos determinados, 24 horas após a transfecção. Em seguida, as células foram lisadas com tampão específico na presença de 0,1 mg/ml fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 1 mM ortovanadato de sódio. Os lisados de células foram sonicados por 20 segundos no gelo e centrifugados por 10 minutos a 12.000 g a 4°C. Dez microgramas (µg) da proteína sobrenadante de cada amostra foi separada por eletroforese com gel de poliacrilamida, transferida para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada por 12 horas com anticorpo IgG anti-pERK de rato (1:5.000; SC-7383, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) seguida de

incubação com anticorpo IgG de carneiro (1:5000; SC-2060, Santa Cruz Biotechnology). Bandas imunorreativas foram detectadas por meio de reagente quimioiluminescente (Perkin Elmer) e as bandas de ERK fosforiladas foram normalizadas com ERK total mensurada na mesma membrana.

3.4.5 Ensaios de ligação ao receptor

Quarenta e oito horas após a transfecção, as células COS-7 foram incubadas com kisspeptina radioativa (100.000 cpm de ^{125}I-kisspeptin-10, Perkin Elmer) na presença de 10^{-10} a 10^{-5} M de kisspeptina não marcada em DMEM contendo 10 mM HEPES e 1% BSA por 20 min, em temperatura ambiente. As células foram lavadas seis vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS), contendo 0,5% de BSA e, em seguida, lisadas com 0,2 M de NaOH e 0,5% de BSA. Os lisados celulares foram coletados e a radioatividade foi medida em um contador gama. A constante de dissociação (Kd) e a capacidade máxima de ligação (Bmax) foram calculadas, baseadas na análise de regressão não-linear da análise da competição de ligação, utilizando-se o *software Prism 3.0 GraphPad* (San Diego, CA).

3.4.6 Ensaios de Ligação ao Receptor ao Longo do Tempo

Quarenta e oito horas após a transfecção, as células COS-7 foram incubadas com kisspeptina radioativa (100.000 cpm de ^{125}I-kisspeptina-10, Perkin Elmer) em DMEM, contendo 10 mM de HEPES e 1% de BSA. Após quatro horas no gelo, as células foram transfectadas a 37°C de 0 a 120

minutos. A fração não específica ligada à membrana para cada tempo foi realizada em paralelo na presença de 10^{-5}M de kisspeptina-10 não marcada. As células foram lavadas três vezes com PBS contendo BSA a 0,5% e, em seguida, lavadas por três minutos no gelo com solução ácida, contendo PBS, 0,5% de BSA e 50 mM ácido acético. A fração da membrana ligada à ^{125}I-kisspeptina-10 foi coletada e mensurada em um contador gama. A contagens específicas foram calculadas e representadas em gráficos, utilizando-se o *software Prism 3.0 GraphPad* (San Diego, CA).

4. Resultados

4.1 Puberdade Precoce

4.1.1 Análise do DNA

Uma nova variante foi identificada no exon 5 do gene *GPR54* na análise do seqüenciamento automático. Esta variante caracterizou-se pela substituição em heterozigose da base nucleotídea guanina por citosina na posição 1157 (1157G>C) (Figura 3), resultando na troca de uma arginina por uma prolina na posição 386 (R386P) da porção carboxiterminal do receptor (Figura 4). A variante R386P foi encontrada em apenas uma menina adotada com PPDG; e não foi detectada em nenhum dos 150 controles normais nem nos 53 pacientes com PPDG idiopática pelo método de digestão com a enzima *SmaI*.

Uma nova variante, 565G>A, foi identificada em heterozigose no exon 4 em três (2 meninas e 1 menino) de 53 pacientes com PPDG (10,5%) e se caracterizou pela substituição do aminoácido alanina por treonina, na posição 189 (A189T) da terceira hélice transmembrana do receptor. Essa alteração foi também encontrada em 2 de 300 alelos de controles normais, caracterizando uma freqüência alélica de 0,6% na população brasileira.

Seis polimorfismos foram identificados no gene *GPR54*. Dois polimorfismos silenciosos, 24A>G e 83G>C, localizados no exon 1 foram identificados em heterozigose em 17 e 1 de 53 pacientes com PPDG,

respectivamente. Dois polimorfismos silenciosos, 615A>C e 687C>T, localizados no exon 4, foram encontrados em heterozigose em duas meninas e uma menina com PPDG, respectivamente. Dois polimorfismos conhecidos foram encontrados no exon 5. O primeiro polimorfismo, 1091T>A, caracterizou-se pela substituição de uma histidina por leucina na posição 364 da proteína (H364L) e foi identificado em heterozigose em 28% dos pacientes com PPDG. O segundo polimorfismo era silencioso, 1156 G>A, e foi encontrado em apenas uma menina com PPDG. Os polimorfismos 24A>G (G8G), 615A>C (A205A), 1091T>A (H364L) e 1156G>A (A385A) foram previamente descritos (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). Os polimorfismos 83G>C (S61S) e 687C>T (R229R) não haviam sido relatados na literatura. Não foram identificadas alterações nos exons 2 e 3 de nenhum dos pacientes com PPDG.

4.1.2 Estudo Funcional da Mutação R386P

Estudos em células COS-7 não demonstraram alteração significativa da afinidade do receptor GPR54 mutado (R386P) com o ligante kisspeptina em comparação com o receptor selvagem (Figura 5). O acúmulo de IP em condições basais não foi significativamente diferente entre as células transfectadas com o receptor selvagem e com o receptor contendo a mutação R386P, indicando que não havia ativação constitutiva do receptor (Figura 6A). Além disso, não houve diferença nas curvas dose-resposta ou de resposta máxima entre o GPR54 selvagem e

o GPR54 R386P, quando utilizadas concentrações crescentes de kisspeptina (10^{-11}M a 10^{-7} M) por 45 minutos. Esses achados demonstram que a afinidade pelo receptor mutado, assim como o grau de sua expressão na superfície das células não estava alterada. No entanto, um estudo ao longo do tempo, demonstrou que o acúmulo de IP após estimulo com kisspeptina atingiu um pico por volta de 2 horas, tanto nas células transfectadas com o receptor selvagem ou com o receptor mutante R386P, e que esse estímulo diminuía com o tempo. Contudo, esse decaimento era mais lento em células transfectadas com o receptor mutante GPR54 R386P, mantendo as concentrações de IP significativamente mais altas no tempo 18 horas (Figura 6B). Esse efeito de ativação prolongada também foi evidenciado quando as células COS-7 foram transfectadas simultaneamente com o GPR54 selvagem e mutante R386P (Figura 6C). O pico de fosforilação de ERK ocorreu aos 10 minutos após a estimulação com kisspeptina em todas as células e decresceu ao longo do tempo. Nas células transfectadas com o GPR54 R386P, a quantidade de pERK decaiu mais lentamente do que nas células transfectadas com o receptor selvagem e se manteve significativamente mais alta no tempo 60 minutos (Figura 7). Estudos da cinética da ligação do receptor indicaram que o receptor GPR54 R386P permanecia por tempos mais prolongados na superfície da membrana plasmática após estímulo com a kisspeptina, quando comparado com o receptor selvagem (Figura 8).

4.2 Hipogonadismo Hipogonadotrófico

4.2.1 Análise de DNA

Identificamos duas novas mutações em três pacientes com HHIn (Tabela 9). A primeira alteração, uma mutação do tipo inserção/deleção (*indel*), foi encontrada em homozigose e se caracterizou pela deleção de 3 nucleotídeos GCA na posição -2 a -4 e pela inserção de 7 nucleotídeos ACCGGCT no sítio 3' aceptor de *splicing* no intron 2 (IVS2-4_-2delGCAinsACCGGCT) do gene *GPR54*. (Figura 9). Essa mutação complexa foi encontrada em dois irmãos com HHIn, sem desenvolvimento puberal aos 14 anos e 20 anos de idade, respectivamente. Ambos apresentavam concentrações baixas de gonadotrofinas e pré-puberais de testosterona (Pacientes 1 e 2, Tabela 9). A mãe destes pacientes era portadora da mesma alteração em heterozigose e referiu desenvolvimento puberal normal. O pai dos pacientes referiu desenvolvimento puberal normal, porém não estava disponível para estudos moleculares.

Uma transversão em heterozigose no exon 5, 754G>C, resultou na troca de um ácido glutâmico por uma glutamina na posição 252 (E252Q), na terceira alça intracelular do receptor GPR54 em um paciente com HHIn esporádico (Paciente 3, Tabela 9). A análise de DNA da mãe desse paciente com desenvolvimento puberal normal não demonstrou a referida mutação. O pai do paciente relatava puberdade normal, porém não estava disponível para estudos moleculares.

As mutações IVS2-4_-2delGCAinsACCGGCT e E252Q estavam ausentes em 120 controles normais. O seqüenciamento automático dos genes *FGFR1*, *GnRHR* e *KiSS1* não revelaram alterações adicionais no paciente heterozigoto para a variante E252Q.

Identificamos ainda cinco polimorfismos exônicos do *GPR54* nesse grupo: G8G, S61S, A205A, A189T e H364L. Além disso, identificamos seis variantes alélicas: IVS1+51G>A, IVS1-34G>A no intron 1; IVS3+31A>G no intron 3; IVS4+64G>T, IVS-38C>A, IVS4-46C>G no intron 4. Não foram identificadas alterações nos exons 2 e 3 de nenhum dos pacientes com HHI.

4.2.2 Predição de *splicing*

A análise computacional utilizando o *software NetGene2* demonstrou que a mutação IVS2-4_-2delGCAinsACCGGCT, localizada em sítio de *splicing*, gera receptores anormais pela perda do sítio de *splicing* constitutivo, seguida da utilização de, pelo menos 4 diferentes sítios crípticos a montante da mutação (Figura 10).

4.2.3 Análise do gene *GPR54* pelo método MLPA

Deleções envolvendo os exons 1 e 4 do gene *GPR54* foram excluídas no DNA genômico do paciente com a mutação E252Q, utilizando o método MLPA. Adicionalmente, não foram encontradas deleções exônicas nos genes *FGFR1*, *GnRH1*, *GnRH-R* e *NELF* nesse paciente ou no restante do grupo com HHI.

4.3 Retardo puberal

Mutações não foram identificadas nos pacientes portadores de RCCP. Identificamos apenas os polimorfismos exônicos e intrônicos do *GPR54* descritos anteriormente no grupo de HHIn, com exceção do polimorfismo IVS3-60G>T no intron 3.

5. Discussão

A secreção do GnRH hipotalâmico é regulada por diversos fatores inibitórios e estimulatórios[1]. Em humanos, o início da puberdade requer o aumento da secreção pulsátil de GnRH, no entanto os mecanismos neurobiológicos envolvidos na reativação da secreção de GnRH que coincide com o início da puberdade ainda são pobremente entendidos[76]. A identificação de mutações inativadoras e deleções no gene *GPR54* em humanos com ausência de desenvolvimento puberal foi a primeira evidência de que o sistema kisspeptina-GPR54 é essencial para a ativação da secreção do GnRH para o início da puberdade[28, 29, 77]. Posteriormente, estudos em animais demonstraram que a infusão intermitente de kisspeptina em ratos e primatas resulta em maturação sexual precoce e liberação prematura de GnRH, respectivamente[54, 61].

Até o momento, apenas oito diferentes mutações inativadoras foram descritas no gene *GPR54* em pacientes com HHIn. Dentre elas; seis mutações de ponto (L148S, R331X, X399R, R297L ,C223R e L102P)[29, 39, 40], uma deleção de 155 pb[28] e uma inserção (1001_1002insC)[38]. No presente estudo identificamos duas novas variantes no receptor GPR54 em pacientes com HHIn, além da primeira mutação ativadora desse receptor em uma criança com puberdade precoce.

5.1 Puberdade Precoce

A paciente com a mutação R386P apresentava telarca desde o nascimento, porém com progressão lenta, sugerindo uma secreção estrogênica precoce leve e persistente. A possibilidade de telarca isolada foi excluída com base na progressão dos caracteres sexuais secundários e no avanço de idade óssea[78]. Apesar da resposta limítrofe ao estímulo com GnRH na sua avaliação inicial, é conhecido que aproximadamente 8% das meninas com PPDG podem ter resposta pré-puberal ao teste de estímulo com GnRH[73]. Além disso, a boa resposta aos efeitos supressivos do agonista de GnRH, evidenciada pela redução no avanço da idade óssea, e pela desaceleração da progressão dos caracteres sexuais secundários, confirmou a presença da ativação do eixo gonadotrófico nesta paciente. A segregação familiar não foi possível nessa paciente adotada porque seus pais biológicos não estavam disponíveis para os estudos moleculares. Entretanto, a ausência da mutação R386P na população controle brasileira assim como nas populações norte-americana e européia sugere que a mutação R386P não é um polimorfismo[28, 40, 79].

Os estudos *in vitro* não revelaram diferenças significativas na atividade basal de células transfectadas com o receptor GPR54 R386P, indicando que a mutação R386P não gera atividade constitutiva do receptor. Os ensaios de ligação com kisspeptina e a curva dose-resposta também não demonstraram diferenças na constante de dissociação (K_d), na concentração efetiva máxima (EC_{50}) ou na capacidade máxima de ligação, indicando que a

afinidade do receptor mutante pelo ligante e a quantidade de GPR54 expresso na superfície celular das células transfectadas não estão alterados. No entanto, em estudos ao longo do tempo, a taxa de decaimento do IP após estímulo com kisspeptina foi mais lenta nas células transfectadas com GPR54 R386P, resultando em quantidades significativamente altas de IP no tempo 18 horas. Semelhantemente, a fosforilação de ERK nas células transfectadas com o mutante também estava prolongada, confirmando a ativação das vias de sinalização intracelular do receptor GPR54 R386P em resposta à kisspeptina.

Esses achados confirmam uma diminuição na velocidade de dessensibilização do GPR54 R386P. Estudos de cinética da ligação do GPR54 após estímulo com kisspeptina demonstraram que o receptor GPR54 R386P permanece na superfície da membrana celular por tempos mais prolongados, sugerindo uma diminuição na taxa de internalização ou degradação do receptor mutado. Estudos mais recentes realizados por *Bianco e cols*. sugerem uma redução na taxa de degradação do receptor com R386P[80].

Mutações ativadoras em receptores acoplados à proteína G, relacionadas a diferentes mecanismos, têm sido identificadas em diversas doenças humanas[81, 82]. A maioria das mutações resulta em ativação constitutiva do receptor, quando o receptor permanece ativado na ausência do seu ligante. No entanto, uma ativação constitutiva do GPR54 poderia prejudicar a pulsatilidade da secreção de GnRH, levando conseqüentemente à puberdade atrasada ao invés de precoce. De fato, a infusão contínua de kisspeptina leva à diminuição das concentrações de LH em macacos[64]. Em

contrapartida, descrevemos um novo modelo de ativação não-constitutiva, caracterizado pela diminuição da dessensibilização do receptor. Este mecanismo é caracterizado pela manutenção do sinal intracelular após estímulo inicial do ligante e, geralmente, ocorre devido à alteração dos mecanismos fisiológicos de interrupção do sinal intracelular. A dessensibilização é um fenômeno característico dos receptores acoplados à proteína G e é associado à redução da transdução do sinal intracelular por meio de fosforilação da região carboxiterminal após estímulo com o respectivo ligante[83]. Após a ativação pelo ligante, o receptor é fosforilado e capturado por proteínas citoplasmáticas chamadas de arrestinas. As arrestinas têm o papel de desacoplar o receptor transmembrana da sua proteína G e prepará-lo para internalização por proteínas chamadas clatrinas. Uma vez ocorrida a internalização, o receptor poderá ser degradado ou reciclado, retornando à membrana citoplamática[83].

O mecanismo de dessensibilização envolve a interação direta dessas proteínas com a região carboxiterminal do receptor. A mutação R386P localizada na região carboxiterminal do GPR54 causaria uma resposta celular prolongada nos neurônios de GnRH, resultando em pulsos de GnRH de maior amplitude em resposta ao estímulo com kisspeptina. Um mecanismo semelhante de ativação, envolvendo dessensibilização diminuída, foi descrito em um paciente com síndrome de Cushing independente de ACTH[84]. A ativação ocorreu devido a uma mutação na região carboxiterminal do receptor de melanocortina-2, afetando a sinalização celular[84].

O aumento da expressão de kisspeptina hipotalâmica na puberdade contribui para a maturação do eixo gonadotrófico[51, 58]. Com base nesses achados, nós especulamos que o retardo na dessensibilização do receptor GPR54 com a mutação R386P potencialize os efeitos estimulatórios da kisspeptina na secreção de GnRH, acelerando assim a maturação do eixo gonadotrófico, podendo ser responsável pela ativação mais precoce do eixo hipotalâmico-gonadal na paciente. Além disso, a presença de telarca desde o nascimento na nossa paciente, é consistente com a atividade neonatal do sistema kisspeptina-GPR54, como é inferido pelo achado de criptorquidismo e micropênis em um lactente com HHIn devido à mutação inativadora do GPR54.

Durante a realização do presente trabalho, um estudo realizado por *Luan, X e cols.*[85] relacionou um polimorfismo na posição 5' não traduzida do gene *GPR54* ao fenótipo de PPDG. No entanto, nenhum estudo funcional desse novo polimorfismo foi realizado[85].

5.2 Hipogonadismo Hipogonadotrófico e Retardo Puberal

Mutações do gene *GPR54* foram responsáveis por aproximadamente 3,2% dos casos dos 276 pacientes com HHIn estudados até hoje, incluindo os 33 pacientes desse estudo. Portanto, mutações inativadoras do *GPR54* são responsáveis por um pequeno número de casos familiares e por raros casos de HHIn esporádico.

O presente estudo descreveu duas novas variantes do gene *GPR54* em pacientes com HHIn. A primeira variante é uma mutação *indel* em homozigose, caracterizada pela deleção de 3 nucleotídeos na posição -2 a -4 e uma inserção de 7 nucleotídeos (IVS2 -2_-4delGCAinsACCGGCT) no intron 2. Essa alteração estava ausente em 240 alelos de indivíduos normais. Apesar de estudos funcionais serem necessários para caracterizar o efeito dessa mutação, é sabido que trocas de apenas um nucleotídeo na região canônica AG/GT nas junções de *splicing*, já foram relacionadas a várias patologias[86]. Análise *in silico* para predição de sítio de *splicing* confirmou que a substituição dos nucleotídeos GCA pelos ACCGGCT no *GPR54* poderia resultar em retenção anormal do intron 2 ou exclusão do exon 3, devido à perda do sítio constitutivo de *splicing* e uso de sítios crípticos. Os dois eventos resultariam na síntese de proteínas anômalas, decorrentes da introdução de códons de parada ou pela inserção/deleção de diferentes resíduos na proteína (Figura 9). Acreditamos que essa nova mutação *indel* do *GPR54* leve à produção de transcritos anormais e, portanto a perda de função do receptor.

A variante E252Q foi identificada em heterozigose em um paciente do sexo masculino com HHIn esporádico. O ácido glutâmico (E) é um resíduo conservado em algumas espécies como o porco, peixe e ouriço-do-mar, porém não é conservado em primatas ou roedores. Essa mutação *missense* era ausente em 240 alelos de controles normais. Nenhuma outra mutação foi encontrada na região codificadora do *GPR54* desse paciente. Além disso, mutações em outros genes envolvidos no hipogonadismo

hipogonadotrófico como *FGFR1*, *GnRHR* ou *KiSS-1* foram excluídas. Deleções em heterozigose dos exons 1 e 4 do gene *GPR54* foram também descartadas após análise do DNA genômico desse paciente pelo método de MLPA. Todos os casos descritos, até o momento, de mutações no gene *GPR54* associadas a HHIn ocorreram em homozigose ou em heterozigose composta, sugerindo uma herança autossômica recessiva dessa condição. Um possível mecanismo de perda de função do receptor GPR54 E252Q seria a interferência do receptor mutado na função do receptor selvagem, fenômeno conhecido como "efeito dominante negativo" [87, 88]. Além disso, como nosso estudo molecular compreendeu apenas a região codificadora do *GPR54*, a pesquisa de mutações nas regiões intrônicas e em regiões regulatórias seria importante. Não se descarta ainda a possibilidade de a variante E252Q representar um polimorfismo raro.

Retardo constitucional do crescimento e da puberdade é a causa mais comum de puberdade atrasada[89-91]. Em geral, os pacientes têm história familiar, sugerindo uma origem genética[92]. No entanto, nesse estudo não foram encontradas mutações no *GPR54* nesse grupo de pacientes, como havia sido relatado por *Semple e cols*[40].

6. Conclusões

1. Descrevemos a primeira mutação ativadora autossômica dominante no GPR54 (R386P) em uma menina com PPDG. A ativação da sinalização intracelular do receptor GPR54 com a mutação R386P é resultante da diminuição da dessensibilização após ligação com kisspeptina.

2. Descrevemos uma nova mutação inativadora no gene *GPR54*, em sítio de *splicing* (IVS2 -2_-4 delGCAinsACCGGCT) em dois irmãos com HHIn. A inativação do receptor GPR54 é provavelmente secundária à utilização de sítios crípticos de *splicing* e geração de uma proteína truncada.

3. O papel da variante E252Q identificada em heterozigose ainda não está bem definido no fenótipo de HHIn.

4. Mutações inativadoras no gene *GPR54* são uma causa rara de HHIn.

5. O fenótipo de RCCP não parece estar relacionado com mutações no gene *GPR54*.

7. Anexos

Tabela 1- Causas de hipogonadismo hipogonadotrófico

1- Tumores do SNC

2- Má-formações congênitas

3- Radioterapia

4- Processos inflamatórios

5- Traumas

6- Lesões vasculares

8- Miscelânea – hipogonadismo transitório

- Doença crônica
- Desnutrição
- Anorexia nervosa
- Exercícios extenuantes
- Amenorréia psicológica

Tabela 2- Doenças monogênicas do eixo reprodutivo

Gene	*Locus*	Herança	Fenótipo Predominante
KAL	Xp22.3	Ligada ao X	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) e anosmia/hiposmia
FGFR1	8p11.2	AD	HHI com ou sem anosmia/hiposmia
SF1	9q33	AR or AD	Sexo reverso XY, agenesia gonadal associada ou não a insuficiência adrenal
DAX1	Xp21.3	Ligada ao X	HHI e hipoplasia adrenal congênita
Leptina	7q31.3	AR	HHI e obesidade
PC1	5q15	AR	Hipogonadismo hipogonadotrófico, hipocortisolismo e obesidade
GPR54	19q	AR	HHI com olfato normal
GnRHR	4q21.2	AR	HHI com olfato normal
HESX1	3p21.2	AR/AD	Hipopituitarismo, neuro-hipófise ectópica, displasia septo-óptica
LHX3	9q34.3	AR	Hipopituitarismo, malformações esqueléticas cervicais
PROP1	5q35	AR	Hipopituitarismo
FSHR	2p21	AR	Hipogonadismo hipergonadotrófico, falência ovariana precoce
LHR	2p21	AR	Hipogonadismo hipergonadotrófico em ambos os sexos; genitália ambígua em homens
LHβ	19q13.32	AR	Hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo
FSHβ	11p13	AR	Hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo

AR: autossômica recessiva, AD: autossômica dominante

Tabela 3- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com PPDG idiopática

Caso	Sexo	IC do início puberal (anos)	IC# (anos)	IO (anos)	Idade estatural (anos)	DP (altura/IC)	Estadio puberal (Tanner)	LH (U/L) basal	LH (U/L) pico após GnRH	E_2 (pg/mL)
1*	F	5,8	6,6	11,0	9,0	2,2	M4P2	1,9	31,5	53,3
2*	F	4,5	10,2	11,0	9,0	-0,8	M4P5	4,2	-	98,8
3*	F	6,8	9,8	11,5	11,0	0,9	M4P4	1,7	34,1	20,2
4*	F	5,5	8,0	11,0	9,0	1,0	M3P4	<0,6	8,5	22,0
5*	F	5,0	8,2	11,0	10,5	2,4	M4P1	1,2	19	13,1
6*	F	4,5	7,0	7,8	8,7	2,0	M3P1	<0,6	11,4	<13
7	F	6,0	7,3	9,0	8,7	1,5	M3P3	<0,6	8,1	<13
8	F	4,0	5,2	6,8	6,3	1,5	M3P1	<0,6	16,9	<13
9	F	6,2	8,7	12,0	10,7	2,1	M4P4	1,2	-	19,8
10	F	1,2	2,6	6,8	4,0	2,8	M4P4	2,6**	30**	<10**
11	F	0,6	1,7	2,0	1,7	0,0	M4P3	1,1	-	60,4
12	F	3,2	3,4	6,8	5,0	3,0	M4P4	5,0	-	<13
13	F	6,2	6,6	10,0	8,0	1,2	M2P1	0,7	7,5	45,0
14	F	2,3	7,2	11,0	10,0	2,8	M3P2	0,9	-	<13
15	F	2,3	4,7	8,8	6,8	2,6	M4P1	0,7	18,8	19,1
16	F	6,0	6,4	8,8	7,6	1,2	M2P2	<0,6	9,5	<10**
17	F	7,0	7,8	11,0	10,0	2,1	M3P1	4,3	15,0	59,8
18	F	5,9	9,6	12,0	9,6	0,0	M4P3	0,7	-	<13
19*	F	3,2	6,5	8,8	10,0	3,7	M4P3	<0,6	4,2/10,0$	<13
20	F	6,5	8,0	12,0	10,0	2,0	M3P3	1,5	76,9	21,1
21	F	6,4	7,8	11,0	10,5	4,4	M3P4	1,0	12,0	15,0
22	F	3,2	5,2	12,0	8,8	3,5	M4P3	4,9**	23,7**	14**
23	F	6,7	7,3	10,0	8,2	0,8	M3P2	1,4	20,0	<13

F: feminino, M: masculino, IC: idade cronológica, #: primeira consulta, IO: idade óssea, DP: desvio padrão, E_2: estradiol, **RIA (radioimunuoensaio), * história familiar, $ 2 h após a primeira ampola de leuprolide *depot*

Tabela 3- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com PPDG idiopática (continuação)

Caso	Sexo	IC do início puberal (anos)	IC# (anos)	IO (anos)	Idade estatural (anos)	DP (altura/IC)	Estadio puberal (Tanner)	LH (U/L) basal	LH (U/L) pico após GnRH	E_2 (pg/mL)	T (ng/dL)
24	F	6,8	7,8	8,8	8,2	-0,2	M3P3	2,8**	41,0**	<10**	
25	F	4,0	6,8	9,5	9,5	3,0	M4P3	6,1	-	62,0	
26	F	2,3	7,4	11,0	10,6	3,3	M2P4	2,2	9,8	21,0	
27	F	2,0	4,8	8,0	6,3	1,8	M3P1	3,8**	28,8**	23,0**	
28	F	0,3	8,6	11,0	9,17	0,6	M4P2	<0,6	6,4/8,5$^{\$}$	22,0	
29	M	3,0	5,1	13,0	8,5	4,3	P4	1,1	-		92
30	M	1,0	1,4	2,6	1,8	0,5	P2	11,5**	47,2**		200**
31	F	7,0	8,5	11,0	9,5	0,9	M3P2	<0,6	2,3	13,0	
32	F	4,0	7,0	11,0	8,7	1,5	M3P2	0,7	-	<13,0	
33	F	6,0	8,7	12,0	10,5	1,6	M5P4	1,5	13,5	62,0	
34	F	6,0	8,0	11,0	8,6	0,4	M3P3	1,0	8,0	17,4	
35	F	6,0	8,2	12,0	8,7	0,4	M3P2	<0,6	5,3/12$^{\$}$	13,4	
36*	F	-	6,8	7,8	8,0	1,2	M3P1	3,5**	35,0**	<10,0**	
37	F	7,0	8,0	12,0	10,0	1,9	M4P3	1,2	-	20,5	
38	F	7,0	8,7	11,0	9,8	0,9	M3P3	1,2	19,0	13,1	
39*	F	7,0	9,7	11,0	9,8	0,0	M4P3	3,7	-	16,0	
40	F	7,0	8,9	11,0	9,8	0,8	M3P4	<0,6	8,0	40,0	
41*	F	-	8,4	12,0	11,7	2,1	M4P5	5,4		53,4	

F: feminino, M: masculino, IC: idade cronológica, #: primeira consulta, IO: idade óssea, DP: desvio padrão, E_2: estradiol, **RIA (radioimunuoensaio), T: testosterona, * história familiar, $^{\$}$ 2 h após a primeira ampola de leuprolide *depot*

Tabela 3- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com PPDG idiopática (continuação)

Caso	Sexo	IC do início puberal (anos)	IC# (anos)	IO (anos)	Idade estatural (anos)	DP (alt/IC)	Estadio puberal (Tanner)	LH (U/L) basal	LH (U/L) Pico após GnRH	E_2 (pg/mL)
42	F	2,8	4,3	6,8	4,8	1,1	M4P1	0,6	13,5	18,2
43	F	6,0	9,8	11,0	8,8	-1,0	M4P3	0,8	-	22,2
44	F	7,5	8,5	12,0	10,8	2,4	M3P3	1,1	-	35,0
45	F	7,0	8,6	11,0	11,0	2,3	M4P1	-	15,1$^{\$}$	51,0
46	F	7,3	8,0	11,0	11,8	4,1	M3P3	1,5	-	<13,0
47*	F	6,8	8,3	11,5	10,3	2,2	M4P3	1,5	-	46,3
48	F	6,8	7,5	8,8	8,8	1,3	M3P1	1,2	27,6	15,0
49	F	5,0	7,7	11,5	9,8	2,1	M4P1	1,6	29,4	26,8
50*	F	5,0	6,8	10	8,3	1,6	M4P3	1,6	-	29
51	F	6,0	7,8	11	11,2	3,4	M3P3	<0,6	6,9	<13
52	F	7,0	8,0	11,0	9,5	1,7	M3P1	<0,6	9,9	38
53	F	6,0	6,7	8,8	9,8	0,5	M3P2	1,5	-	20

F: feminino, M: masculino, IC: idade cronológica, #: primeira consulta, IO: idade óssea, DP: desvio padrão, E_2: estradiol, * história familiar, $^{\$}$2 h após a primeira ampola de leuprolide *depot*

Tabela 4- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com HH idiopático

Casos	Sexo	IC (anos)	Altura (cm)	DP (Alt/IC)	IO (anos)	GC/mamas (Tanner)	TD (cm)	TE (cm)	LH/FSH (basal) (U/L)	LH/FSH (pico) (UI/L)	T (ng/dL)	E_2 (pg/mL)
1*	M	17,3	160,0	-2,1	13,5	T3	CR	1,7	1,7/3,5	6,5/6,3	28,3	
2*	M	19,5	170,2	-0,7	15,0	T3	2,8	3,1	0,7/1,4	9,8/2,7	47,0	
3	M	16,1	153,5	-2,6	13,5	-	3,5	3,5	9,7/5,9**	22,4/13,9**	31,0**	
4	M	27,0	180,0	+0,9	-	-	2,4	2,7	<0,6/<1,0	-	42,0	
5	M	28,0	166,0	-1,3	17,0	-	3,5	2,8	<0,6/<1,0	6,6/1,7	54,0	
6	M	23,0	183,5	+1,3	-	T3	CR	CR	0,8/1,6	9,4/4,4	68,0	
7c	M	19,9	167,6	-1,1	-	-	3,0	3,0	<0,6/0,8	7,0/2,6	24,0	
8*	F	21,0	146,0	-2,7	-	M1	NV	NV	<0,6/<1,0	1,5/2,8		15,0
9	F	20,0	159,8	-0,4	14,0	M1	0,7	0,6	<0,6/1,5	5,1/5,5		<13,0
10	M	22,0	178,6	0,5	-	T2	2,5	2,5	<0,6/1,0	2,7/1,3	<14,0	
11*c	M	30,0	167,4	-1,1	17,0	-	2,0	2,0	<0,6/<1,0	0,8/3,5	35,0	
12	M	25,0	152,0	-2,7	18,0	T2	3,0	CR	<0,6/<1,0	<0,6/<1,0	43,0	-
13*	M	19,0	176,0	+0,1	-	-	<2,0	<2,0	<0,6/1,0	2,3/1,7	<14,0	
14*	F	16,2	157,0	-0,8	10,0	M1	1,1	1,5	<0,6/<0,1	4,7/5,2		<13
15	F	30,0	170,5	+1,4	-	M5	2,7	1,3	1,7/3,0	12,0/6,4		<13
16	F	16,3	154,9	-1,2	11,0	M2	2,6	1,3	<0,6/<1,0	1,4/1,7		<13
17c	F	14,3	144,3	-2,4	11,0	M1	1,2	1,7	<0,6/<1,0	1,7/2,4		<13
18	F	17,0	160,2	-0,3	15,0	M3	1,8	1,9	<0,6/<1,0	3,8/2,8		<13
19	F	28,0	159,0	-0,5	-	M4	1,0	0,8	<0,6/<1,0	0,9/1,9		<13
20	M	20,7	167,2	-1,2	17,0	-	2,3	2,3	<0,6/1,0	1,0/2,8	34,0	

F: feminino, M: masculino IC: idade cronológica, DP: desvio padrão, IO: idade óssea, GC: ginecomastia, TD: testículo direito, TE: testículo esquerdo,T: testosterona, E_2: estradiol, **RIA (radioimunuoensaio), CR: criptorquidia, * história familiar, c: consangüinidade

Tabela 4- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com HH idiopático (continuação)

Casos	Sexo	IC (anos)	Altura (cm)	DP (Alt/IC)	IO (anos)	GC/mamas (Tanner)	TD (cm)	TE (cm)	LH/FSH (basal) (U/L)	LH/FSH (pico) (U/L)	Testo (ng/dL)	E_2 (pg/mL)
21*	M	22,0	169,6	-0,7	15,0	T3	1,5	1,5	<0,6/<1,0	1,7/1,9	26,0	
22	F	17,8	160,2	-0,3	15,0	M3	-	-	<0,6/<1,0	-		<13,0
23	M	34,0	-	-	-	-	<4,0	<4,0	0,1/1,0	2,0/2,6	70,0	
24	M	19,0	164,0	-1,6	16,0	-	2,5	2,5	1,1/2,4	-	38,0	
25*	M	24,0	ND	ND	ND	-	ND	ND	0,3/2,3	3,9/6,3	24,0	
26*	M	14,0	ND	ND	ND	-	<4,0	<4,0	<0,1/1,2	-	24,0	
27	M	24,0	ND	ND	16,0	-	2,0	2,0	<7,8**	<2,0**	<30,0**	
28	M	25,0	ND	ND	16,0	-	CR	3,0	<7,8**	<2,0**	<30,0**	
29	M	27,0	ND	ND	ND	-	4,1	3,6	<7,8/<2,0**	-	<30,0**	
30	M	23,0	ND	ND	16,0	-	2,0	3,0	<7,8/<2,0**		<30,0	
31	M	21,0	ND	ND	14,0	-	2,1	3,2	<7,8/<2,0**		<30,0	
32	M	24,0	ND	ND	ND	-	CR	4,7	1,2/1,2		128,5	
33	M	27,0	ND	ND	16,0	T2	2,5	2,5	0,2/1,2		45,9	

F: feminino, M: masculino IC: idade cronológica, DP: desvio padrão, IO: idade óssea, GC: ginecomastia, TD: testículo direito,TE: testículo esquerdo, T: testosterona, E_2: estradiol, **RIA (radioimunuoensaio), CR: criptorquidia ,* história familiar

Tabela 5- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com RCCP

Casos	Sexo	IC# (anos)	DP altura	IC início puberdade	IO (anos)	LH basal (U/L)	FSH basal (U/L)	T (ng/dL)	E_2 (pg/mL)	HFAM
1	M	16,7	-2,8	16,0	14,0*	1,4	<1,0	63,0		não
2	M	16,5	-4,8	16,5	11,0	0,9	<1,0	80,0		não
3	M	14,0	-2,8	14,0	12,5	0,8	1,4	68,0		sim
4	M	15,7	-3,3	15,7	12,5	1,2	1,6	138,0		não
5	M	15,0	-4,1	16,1	11,0	1,3	2,5	47,0		não
6	M	16,5	-4,7	16,5	11,0	ND	ND	ND		ND
7	F	12,0	2,1	13,1	10,1	<0,6	2,3		<13,0	sim
8	M	14,8	-2,7	14,0	ND	0,7	1,1	29,0		sim
9	M	14,3	-2,6	14,4	11,0	1,2	1,8	15,0		não
10	M	14,4	-3,5	16,4	ND	0,6	1,5	<14,0		não
11	M	10,2	-2,0	14,7	10,0	<0,6	1,3	<14,0		não
12	M	15,2	-2,14	15,3	11,5	ND	ND	ND		sim
13	F	14,3	-3,1	13,4	11,0*	0,6	4,9		19,1	sim
14	M	10,2	-2,1	14,3	11,0*	<0,6	1,2	<14,0		não
15	M	16,8	-3,6	15,6	13,5*	ND	ND	ND		não
16	M	15,0	-5,6	15,1	12,5	<0,6	1,6	<7,0		sim
17	F	12,4	-2,3	14,0	11,0	1,3	3,7		<13,0	sim
18	M	15,0	-2,5	14,0	13,0*	ND	ND	ND		não

F: feminino, M: masculino IC: idade cronológica, #: primeira consulta, DP: desvio padrão, IO: idade óssea, T: testosterona, E_2: estradiol , HFAM; história familiar, *IO na ocasião da primeira consulta

Tabela 5- Dados clínicos e hormonais dos pacientes com RCCP (continuação)

Casos	Sexo	IC# (anos)	DP altura	IC puberdade	IO (anos)	LH basal (U/L)	FSH basal (U/L)	Testo (ng/dL)	E_2 (pg/mL)	HFAM
19	M	13,5	-2,7	14,1	12,7	1,9	2,4	146		sim
20	M	6,0	-2,4	14,8	11,0	1,0	2,2	<14,0		sim
21	M	15,0	-2,7	15,8	12,5	<0,6	1,0	<14,0		não
22	M	14,5	-3,6	14,5	12,0	0,3	1,1	23,0		não
23	M	9,5	-1,3	14,0	12,5	1,8	3,8	37,0		não
24	M	16,0	-2,7	15,9	12,5	3,2	3,5	43,0		não
25	M	14,5	-2,8	14,3	11,0*	ND	ND	ND		não
26	M	14,3	-2,2	15,0	13,0	0,6	1,8	<14,0		não
27	F	12,0	-3,5	13,0	11,0	1,3	2,4		77,0	sim
28	M	12,1	-3,2	14,1	13,0	1,5	2,4	24,0		sim

F: feminino, M: masculino IC: idade cronológica, #: primeira consulta, DP: desvio padrão, IO: idade óssea, T: testosterona, E_2: estradiol , HFAM; história familiar, * IO na ocasião da primeira consulta

Tabela 6- Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos

	Testosterona ng/dL	LH basal U/L	LH pico* U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 14	≤ 0,6	< 9,6	IFMA
Adultos	200 - 950	1,4 - 9,2	12 - 29,7	
Pré-púberes	< 10		Delta< 15	RIE
Adultos	350 - 1090		Delta ≥ 15	

* após 100 µg de gonadorelina i.v.

Tabela 7- Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e RIE em pré-púberes e adultos

	Estradiol pg/mL	LH basal U/L	LH pico* U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 13	≤ 0,6	< 6,9	IFMA
Adultas fase folicular	30 - 94	1,0 - 8,4	7,6 - 31,7	
Pré-púberes	< 10		Delta < 15	RIE
Adultas fase folicular	10 - 80		Delta ≥ 15	

* após 100 µg de gonadorelina i.v.

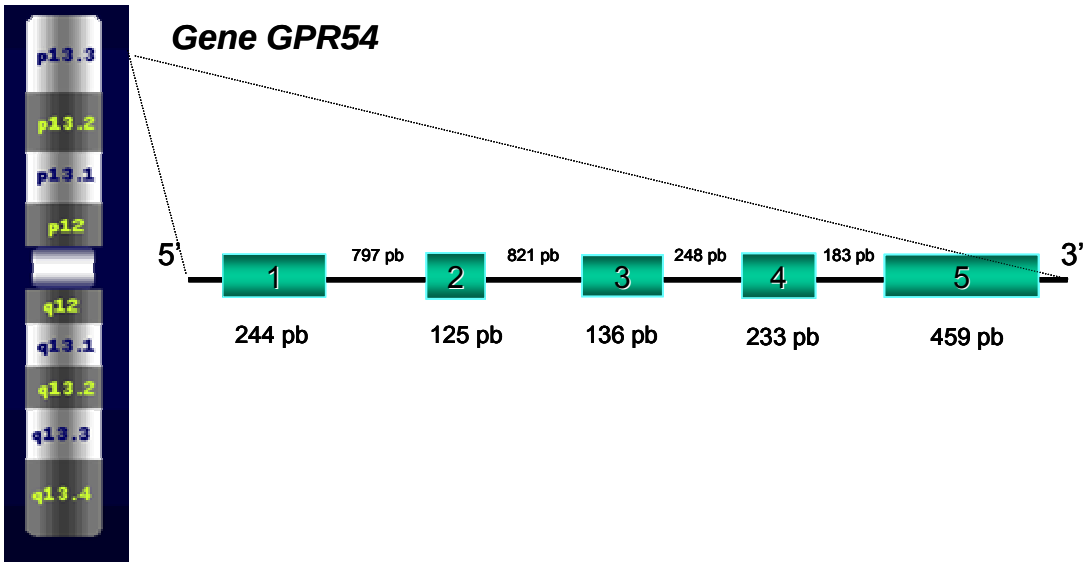
Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos cinco exons do gene *GPR54*

EXONS	Oligonucleotídeos
EXON 1	*GPR54*-e1F: 5'-GCTGGGTGAATAGAGGGC-3',
	GPR54-e1R: 5'-GGAGTTTGCGACCTCTAGC-3'
EXON 2	*GPR54*-e2F: 5'-CCATCCTGCTGGTCACTCG-3',
	GPR54-e2R: 5'-CACTGCGGAGCGCACTCC-3'
EXON 3	*GPR54*-e3F: 5'-GCCTGAGTGTTCGCACACG-3',
	GPR54-e3R: 5'-GCGCCCATTTTCCAGATGC-3'
EXON 4	*GPR54*-e4F: 5'-GCATCTGGAAAATGGGCGC-3',
	GPR54-e4R: 5'-GGAAGGCGTAGAGCAGCG-3'
EXON 5	*GPR54*-e5F: 5'-GGAGGACAGCAAGGCTGG-3',
	GPR54-e5R: 5'-AAACTGCACCGAACGTCACA-3'.

Tabela 9 - Características clínicas e hormonais de três pacientes com HHIn, e mutações do gene *GPR54*

Caso	Idade (anos)	Sexo	LH (U/L) Basal	LH (U/L) Pico	FSH (U/L) Basal	FSH (U/L) Pico	T ng/dL	Mutações no *GPR54*	Estado
1*	20	M	0,3	3,9	2,3	6,3	24	IVS2 -2_-4 delGCA insACCGGCT	Homozigose
2*	14	M	<0,1	-	1,2	-	24	IVS2 -2_-4 delGCA insACCGGCT	Homozigose
3	19	M	1,1	-	2,4	-	38	E252Q	Heterozigose

M: masculino; T: testosterona; *Pacientes 1 e 2 são irmãos (casos 25 e 26. Tabela 4); Paciente 3 (caso 24. Tabela 4)



Cromossomo 19

Figura 1 - Esquema representativo do gene do receptor *GPR54* humano. O gene *GPR54* está localizado na região telomérica do braço curto do cromossomo 19. Os retângulos numerados representam os cinco exons que são separados pelos introns. Os números em cada porção representam o tamanho de cada exon e intron em pares de base (pb). O *GPR54* é constituído de 3499 pb ao longo da sua extensão.

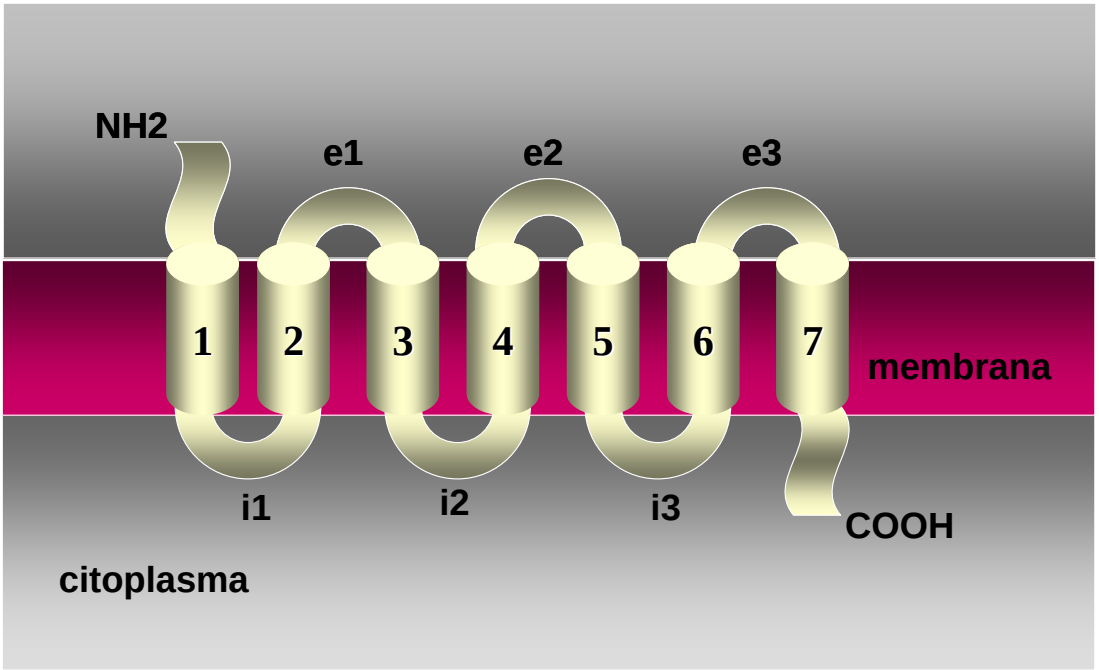


Figura 2 - Modelo da estrutura de um receptor acoplado à proteína G, com sete hélices transmembranosas numeradas de 1 a 7: 3 alças intracelulares (i1, i2 e i3) e 3 alças extracelulares (e1, e2 e e3). O receptor apresenta, ainda, um domínio aminoterminal (NH_2) que é extracelular e um carboxiterminal (COOH), intracelular.

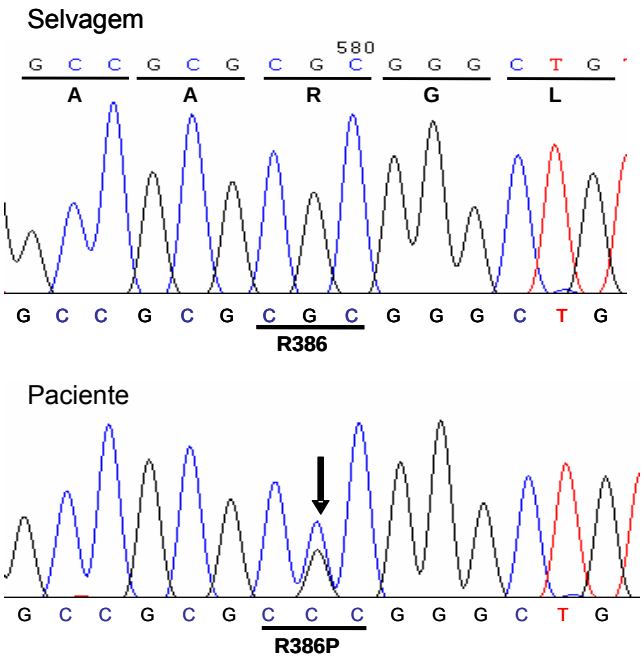


Figura 3 - Seqüência de nucleotídeos do gene *GPR54* selvagem e mutante (R386P). A região sublinhada mostra a sequência de nucleotídeos CGC que codifica o aminoácido arginina na posição 386 em um indivíduo normal (imagem superior) e a troca em heterozigose para CCC (R386P) na paciente (imagem inferior).

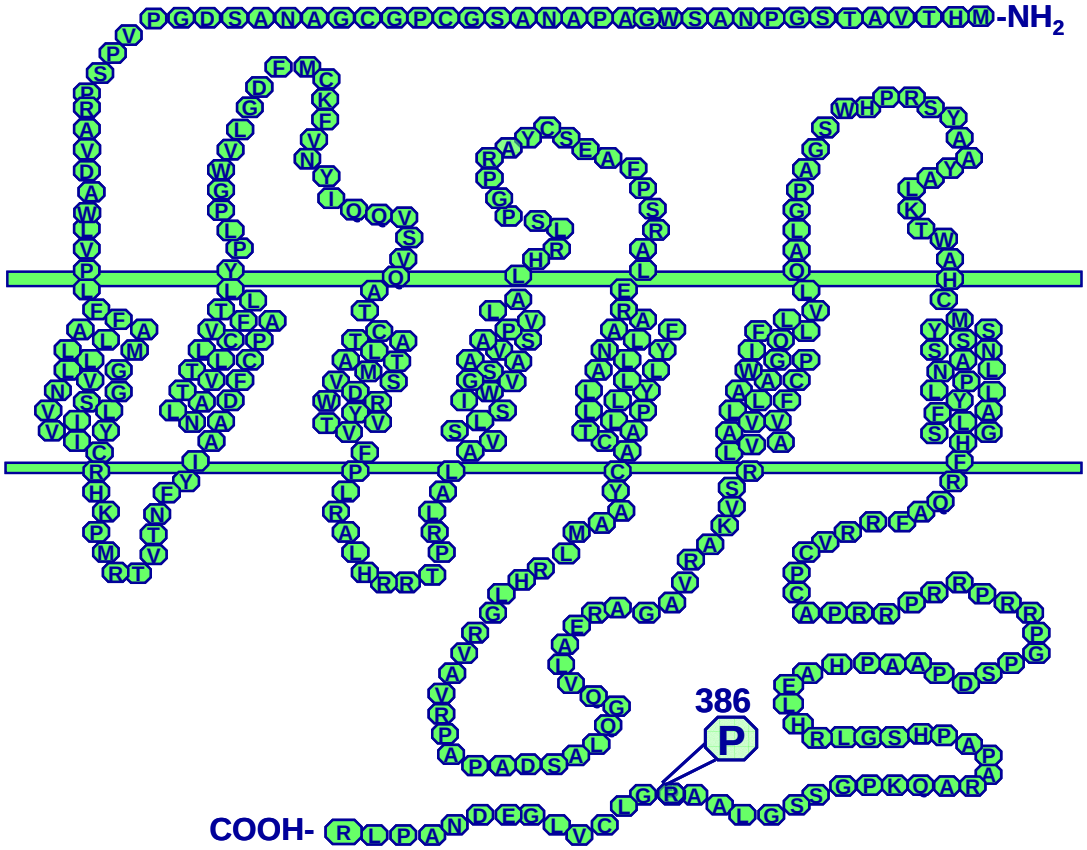


Figura 4 - Representação da seqüência de aminoácidos do receptor GPR54. Em destaque, a posição da substituição R386P na região carboxiterminal do receptor.

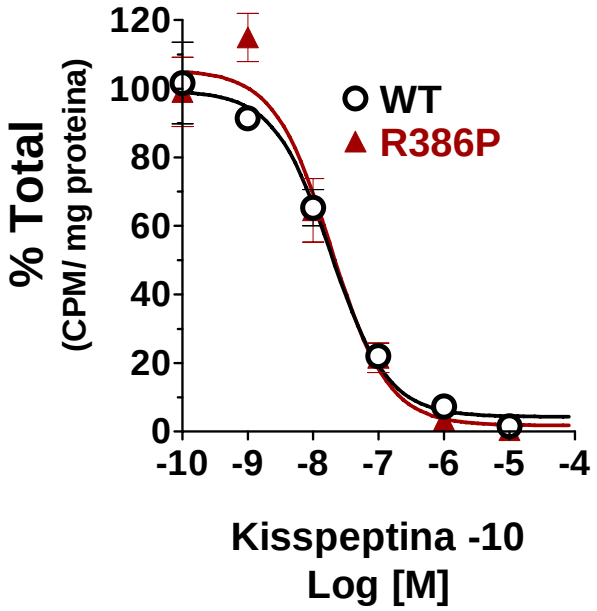
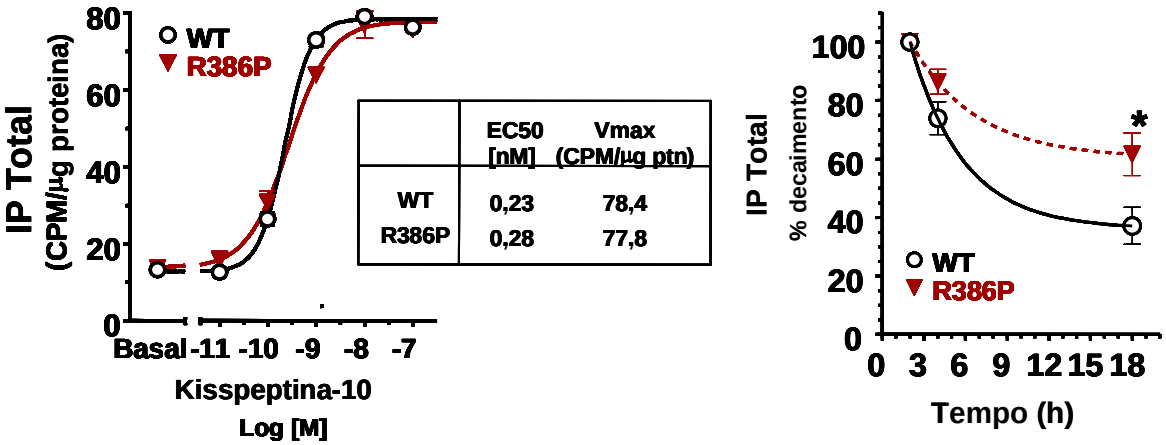
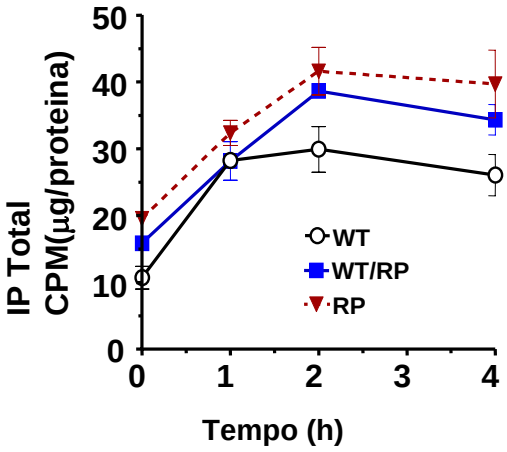


Figura 5 - Ensaio de deslocamento de ligação. As células COS-7 foram transitoriamente transfectadas com o GPR54 selvagem ou mutante R386P e incubadas por 20 minutos, à temperatura ambiente com ^{125}I-kisspeptina e, na presença de kisspeptina não marcada, nas concentrações de 10^{-10} M a 10^{-5} M. Cada ponto da curva é resultado da média de erro-padrão de três replicatas.



A B



C

Figura 6 - Produção de IP após estímulo com kisspeptina em células transfectadas com o GPR54 selvagem ou mutante R386P. Em (A), acúmulo de IP total mensurado após 45 minutos de estimulação com diferentes doses de kisspeptina 10^{-11} M - 10^{-7} M. Em (B), as células foram estimuladas com 10^{-9} M de kisspeptina por 2 h, 4 h, e 18 h. Os resultados foram representados em porcentagem de decaimento em relação à estimulação máxima (tempo 2h). Cada ponto da curva é a média do erro-padrão de cinco experimentos independentes, cada um realizado em duplicata ou triplicata. *p < 0,05 comparado ao GPR54 selvagem no tempo correspondente. Em (C), as células foram cotransfectadas com 50 ng de receptor selvagem, 50 ng de GPR54 R386P e 25 ng de selvagem mais 25 ng de R386P e o acúmulo de IP total foi mensurado após estímulo com kisspeptina-10 na concentração de 10^{-8} M nos tempos 0, 1 h, 2 h, e 4 h.

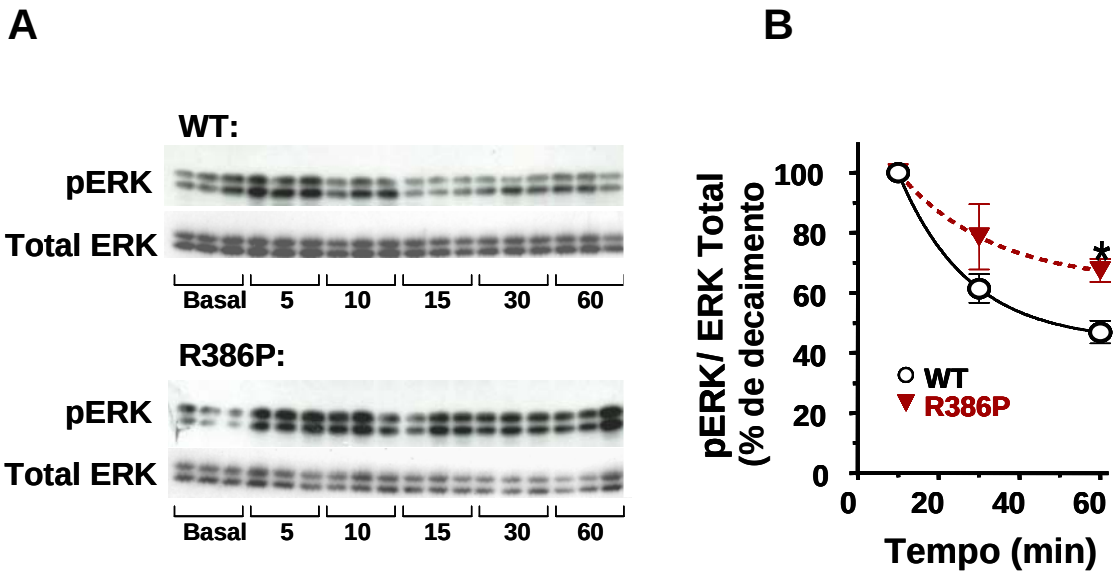


Figura 7 - Fosforilação de ERK ao longo do tempo em células transfectadas com GPR54 selvagem ou mutante R386P. A fosforilação de ERK (pERK) foi mensurada por *Western blot* após estimulação com 3 x 10^{-9} M de kisspeptina-10 por 0, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min ou 60 minutos. A intensidade das bandas da pERK foram normalizadas pela quantidade de ERK total. Em (A), experimento representativo de *Western Blot*. Em (B), gráfico da quantidade relativa do conteúdo de pERK (pERK/total ERK) em porcentagem relativa de decaimento em relação ao estímulo máximo (10 minutos). Cada ponto da curva representa a média do erro-padrão de 5 experimentos independentes. *p < 0,001 comparado ao GPR54 selvagem no tempo correspondente.

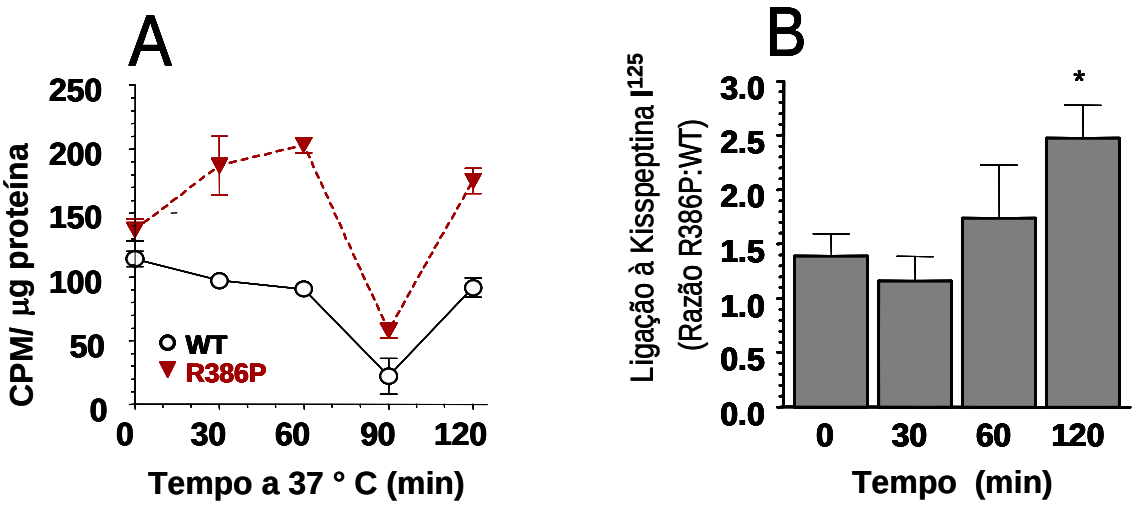
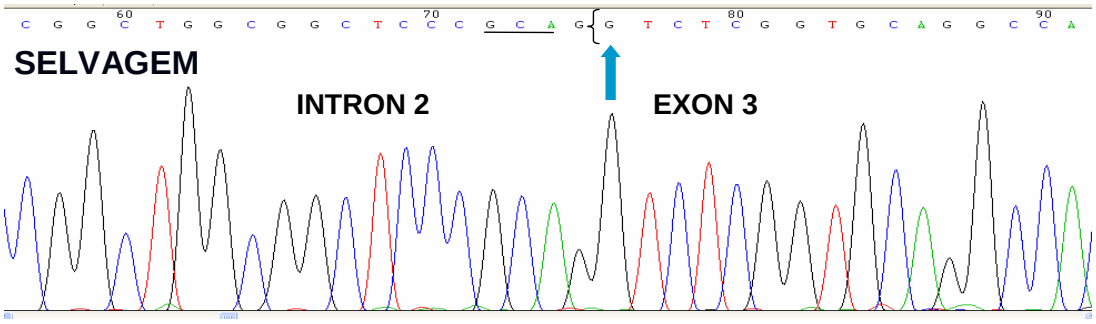


Figura 8 - Estudo de ligação ao receptor ao longo do tempo. Ligação da kisspeptina marcada com ^{125}I à superfície da membrana plasmática das células COS-7 transfectadas com o GPR54 selvagem ou com a mutação R386P. A ligação não-específica para cada ponto foi mensurada pela incubação com kisspeptina-10 na concentração de 10^{-5} M e subtraída da contagem total em cada ponto, correspondente para determinação das contagens específicas. As contagens específicas foram corrigidas pelo conteúdo protéico. Em (A), esquema representativo do ensaio ao longo do tempo mostrando a quantidade de ^{125}I-kisspeptina-10 ligada à membrana de células COS-7 transfectadas com o GPR54 selvagem ou mutante R386P; (B) razão R386P:WT da fração ligada à membrana de ^{125}I-kisspeptina-10. Cada barra representa a média do erro-padrão de 5 experimentos independentes. *p<0,05 comparado ao t=0.

A



B

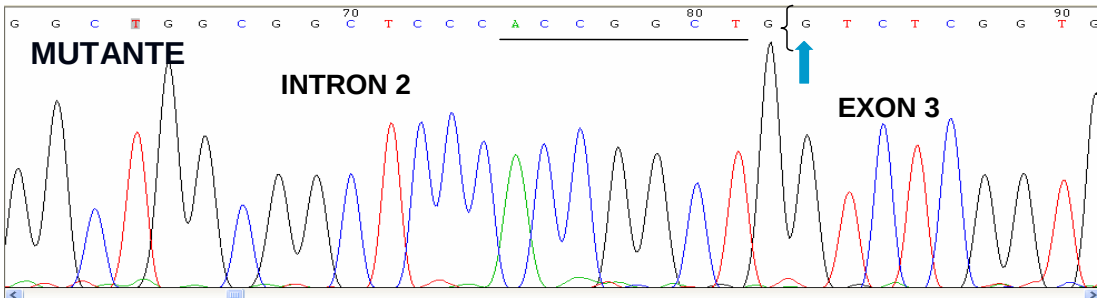
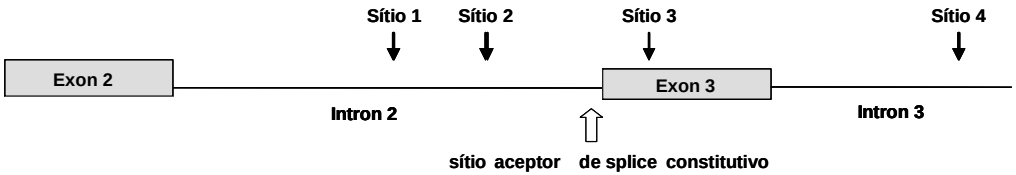


Figura 9 - Seqüência do intron 2 e exon 3 do *GPR54* selvagem (A) e com a mutação *indel* em homozigose, IVS2 -2_-4 delGCA insACCGGCT, em um paciente com HHI familial (B).



(A)

```
Sítio constitutivo  1 MHTVATSGPNASWGAPANASGCPGCGANASDGPVPSPRAVDAWLVPLFFAALMLLGLVGNSLVIYVICRHKPMRTVTNFYIANLAATDVTFLLCCVPFTALLYPLPGWVLGDFMCKFVNY 120
sítio_1             1 MHTVATSGPNASWGAPANASGCPGCGANASDGPVPSPRAVDAWLVPLFFAALMLLGLVGNSLVIYVICRHKPMRTVTNFYIANLAATDVTFLLCCVPFTALLYPLPGWVLGDFMCKFVNY    120
sítio_2             1 MHTVATSGPNASWGAPANASGCPGCGANASDGPVPSPRAVDAWLVPLFFAALMLLGLVGNSLVIYVICRHKPMRTVTNFYIANLAATDVTFLLCCVPFTALLYPLPGWVLGDFMCKFVNY 120
sítio_3             1 MHTVATSGPNASWGAPANASGCPGCGANASDGPVPSPRAVDAWLVPLFFAALMLLGLVGNSLVIYVICRHKPMRTVTNFYIANLAATDVTFLLCCVPFTALLYPLPGWVLGDFMCKFVNY   120
sítio_4             1 MHTVATSGPNASWGAPANASGCPGCGANASDGPVPSPRAVDAWLVPLFFAALMLLGLVGNSLVIYVICRHKPMRTVTNFYIANLAATDVTFLLCCVPFTALLYPLPGWVLGDFMCKFVNY 120
                      ****************************************************************************************************************

Sítio constitutivo 121 IQQVS-----------VQATCATLTAMSVDRWYVTVFPLRALHRRTPRLALAVSLSIWVGSAAVSAPVLALHRLSPGPRAYCSEAFPSRALERAFALYNLLALYLLPLLATCACYAAML 228
sítio_1            121 IQQSP-------------------------------------------------------------------------------------------------------125
sítio_2            121 IQQVATRPAGGSHRLVSVQATCATLTAMSVDRWYVTVFPLRALHRRTPRLALAVSLSIWVGSAAVSAPVLALHRLSPGPRAYCSEAFPSRALERAFALYNLLALYLLPLLATCACYAAML 240
sítio_3            121 IQQAT---------------CATLTAMSVDRWYVTVFPLRALHRRTPRLALAVSLSIWVGSAAVSAPVLALHRLSPGPRAYCSEAFPSRALERAFALYNLLALYLLPLLATCACYAAML 224
sítio_4            121 IQQGQ-------------------------------------------------------------------------------------------------------- 125
                       ***

Sítio constitutivo 229 RHLGRVAVRPAPADSALQGQVLAERAGAVRAKVSRLVAAVVLLFAACWGPIQLFLVLQALGPAGSWHPRSYAAYALKTWAHCMSYSNSALNPLLYAFLGSHFRQAFRRVCPCAPRRPRRP 348
sítio_1            126 ------------------------------------------------------HLLSPQPALDTPPRTLPVYVPECSHT-------------------------------------   151
sítio_2            241 RHLGRVAVRPAPADSALQGQVLAERAGAVRAKVSRLVAAVVLLFAACWGPIQLFLVLQALGPAGSWHPRSYAAYALKTWAHCMSYSNSALNPLLYAFLGSHFRQAFRRVCPCAPRRPRRP 360
sítio_3            225 RHLGRVAVRPAPADSALQGQVLAERAGAVRAKVSRLVAAVVLLFAACWGPIQLFLVLQALGPAGSWHPRSYAAYALKTWAHCMSYSNSALNPLLYAFLGSHFRQAFRRVCPCAPRRPRRP 344
sítio_4            126 ------------------------------------------------------RGCRRGARAFAGWLGERLPGRHVGDRWFPERGLHPGLWHRLCGGVCAGARPAPPVTRAARLLQ   188

Sítio_constitutivo 349 RRPGPSDPAAPHAELHRLGSHPAPARAQKPGSSGLAARGLCVLGEDNAPL 398
sítio_1                ------------------------------------------------
sítio_2            361 RRPGPSDPAAPHAELHRLGSHPAPARAQKPGSSGLAARGLCVLGEDNAPL 410
sítio_3            345 RRPGPSDPAAPHAELHRLGSHPAPARAQKPGSSGLAARGLCVLGEDNAPL 394
sítio_4                ------------------------------------------------
```

(B)

Figura 10 - (A) Representação esquemática dos exons 2 e 3 do gene *GPR54*. A seta branca indica o sítio aceptor de *splicing* constitutivo do intron 2 e as quatro setas pretas indicam o sítios crípticos de *splicing* que poderiam ser utilizados após a perda do sítio constitutivo. (B) Alinhamento da seqüência de aminoácidos do receptor do GPR54 selvagem e as quatro predições de potenciais proteínas. A utilização dos sítios 1 e 4 resultaria em proteínas truncadas (151 e 188 aminoácidos). A utilização do sítio 2 resultaria em uma proteína mais longa (410 aminoácidos), e o uso do sítio 3 resultaria na perda de quatro aminoácidos altamente conservados da proteína (QVSV).

8. Referências

1. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2364-8.

2. Grumbach M M. Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology and disorders. Section 24: 969-1166. In: Williams Textbook of Endocrinology. 11th Edition ed: W.B. *Saunders Company*. 2008.

3. Seminara SB, Crowley WF, Jr. Perspective: the importance of genetic defects in humans in elucidating the complexities of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Endocrinology* 2001;142(6):2173-7.

4. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev* 2001;22(1):111-51.

5. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 2002;57 Suppl 2:2-14.

6. Plant TM. Neurophysiology of puberty. *J Adolesc Health* 2002;31(6 Suppl):185-91.

7. Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(12):6609-15.

8. El Majdoubi M, Sahu A, Ramaswamy S, Plant TM. Neuropeptide Y: A hypothalamic brake restraining the onset of puberty in primates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000;97(11):6179-84.

9. Plant TM. Leptin, growth hormone, and the onset of primate puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(1):458-60.

10. Partsch CJ, Sippell WG. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. *Human reproduction update* 2001;7(3):292-302.

11. Gonzalez ER. For puberty that comes too soon, new treatment highly effective. *Jama* 1982;248(10):1149-51, 55.

12. Brunner HG, Otten BJ. Precocious puberty in boys. *N Engl J Med* 1999;341(23):1763-5.

13. Bierich JR, Nolte K, Drews K, Brugmann G. Constitutional delay of growth and adolescence. Results of short-term and long-term treatment with GH. *Acta endocrinologica* 1992;127(5):392-6.

14. Clayton PE, Shalet SM, Price DA. Endocrine manipulation of constitutional delay in growth and puberty. *The Journal of endocrinology* 1988;116(3):321-3.

15. Du Caju MV, Op De Beeck L, Sys SU, Hagendorens MM, Rooman RP. Progressive deceleration in growth as an early sign of delayed puberty in boys. *Horm Res* 2000;54(3):126-30.

16. Sedlmeyer IL, Palmert MR. Delayed puberty: analysis of a large case series from an academic center. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(4):1613-20.

17. 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.

18. 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.

19. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2447-54.

20. Kalantaridou SN, Chrousos GP. Clinical review 148: Monogenic disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(6):2481-94.

21. Lin L, Conway GS, Hill NR, Dattani MT, Hindmarsh PC, Achermann JC. A homozygous R262Q mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor presenting as constitutional delay of growth and puberty with subsequent borderline oligospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(12):5117-21.

22. Franco B, Guioli S, Pragliola A, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 1991;353(6344):529-36.

23. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 1991;67(2):423-35.

24. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003;33(4):463-5.

25. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS genetics* 2006;2(10):e175.

26. de Roux N, Young J, Misrahi M, Schaison G, Milgrom E. Loss of function mutations of the GnRH receptor: a new cause of hypogonadotropic hypogonadism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12 Suppl 1:267-75.

27. Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(16):6281-6.

28. 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 USA* 2003;100(19):10972-6.

29. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349(17):1614-27.

30. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev* 1998;19(5):521-39.

31. Pawlowitzki IH, Diekstall P, Schadel A, Miny P. Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *American journal of medical genetics* 1987;26(2):473-9.

32. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, et al. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet* 1993;5(1):83-6.

33. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992;326(3):179-83.

34. Latronico AC. Naturally occurring mutations of the luteinizing hormone receptor gene affecting reproduction. *Semin Reprod Med* 2000;18(1):17-20.

35. Latronico AC, Shinozaki H, Guerra G, Jr., et al. Gonadotropin-independent precocious puberty due to luteinizing hormone receptor mutations in Brazilian boys: a novel constitutively activating mutation in the first transmembrane helix. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4799-805.

36. Latronico AC, Lins TS, Brito VN, Arnhold IJ, Mendonca BB. The effect of distinct activating mutations of the luteinizing hormone receptor gene on the pituitary-gonadal axis in both sexes. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53(5):609-13.

37. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, et al. Two Novel Missense Mutations in GPR54 in a Patient with Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2004.

38. Lanfranco F, Gromoll J, von Eckardstein S, Herding EM, Nieschlag E, Simoni M. Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2005;153(6):845-52.

39. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, de Roux N. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(3):1137-44.

40. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, et al. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(3):1849-55.

41. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett* 1999;446(1):103-7.

42. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001;411(6837):613-7.

43. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 2001;276(31):28969-75.

44. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *Journal of the National Cancer Institute* 1996;88(23):1731-7.

45. Lee JH, Welch DR. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. *Cancer research* 1997;57(12):2384-7.

46. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001;276(37):34631-6.

47. Stafford LJ, Xia C, Ma W, Cai Y, Liu M. Identification and characterization of mouse metastasis-suppressor KiSS1 and its G-protein-coupled receptor. *Cancer research* 2002;62(19):5399-404.

48. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(25):10714-9.

49. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004;145(9):4073-7.

50. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology* 2004;80(4):264-72.

51. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004;145(10):4565-74.

52. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320(2):383-8.

53. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol* 2004;16(10):850-8.

54. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *The Journal of physiology* 2004;561(Pt 2):379-86.

55. 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.

56. Messager S, Chatzidaki EE, Ma D, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(5):1761-6.

57. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, et al. Ontogeny and mechanisms of action for the stimulatory effect of kisspeptin on gonadotropin-releasing hormone system of the rat. *Mol Cell Endocrinol* 2006;257-258:75-83.

58. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci* 2005;25(49):11349-56.

59. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, et al. Characterization of the potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54. *Endocrinology* 2005;146(1):156-63.

60. Patterson M, Murphy KG, Thompson EL, Patel S, Ghatei MA, Bloom SR. Administration of kisspeptin-54 into discrete regions of the hypothalamus potently increases plasma luteinising hormone and testosterone in male adult rats. *J Neuroendocrinol* 2006;18(5):349-54.

61. Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. *Endocrinology* 2006;147(2):1007-13.

62. Tovar S, Vazquez MJ, Navarro VM, et al. Effects of single or repeated intravenous administration of kisspeptin upon dynamic LH secretion in conscious male rats. *Endocrinology* 2006;147(6):2696-704.

63. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, et al. Effects of KiSS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 2005;146(4):1689-97.

64. Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Jr., Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications. *Endocrinology* 2006;147(5):2122-6.

65. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. Endocrinology 2006;147(12):5817-25.

66. Plant TM. The role of KiSS-1 in the regulation of puberty in higher primates. *Eur J Endocrinol* 2006;155 Suppl 1:S11-6.

67. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology* 2005;146(9):3686-92.

68. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology* 2005;146(7):2976-84.

69. Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006;26(25):6687-94.

70. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Archives of disease in childhood* 1969;44(235):291-303.

71. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Archives of disease in childhood* 1970;45(239):13-23.

72. C, P. An updated endocrinology classic. Williams Textbook of Endocrinology, Tenth Edition edited by P. Reed Larson, Henry M. Kronenberg, Shlomo Melmed and Kenneth S. Polonsky. Saunders, 2003. US$149.95 (xxii+1927 pages) ISBN 0 7216 9184 6. CD-ROM US$149.95 ISBN 0 7216 9196 X. Hard copy and CD-ROM US$229.00 ISBN 0 7216 9268 0. *Trends Endocrinol Metab* 2003;14(8):347-8.

73. Brito VN, Batista MC, Borges MF, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(10):3539-44.

74. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonca BB. A single luteinizing hormone determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(9):4338-42.

75. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* 2002;30(12):e57.

76. Ebling FJ, Cronin AS. The neurobiology of reproductive development. *Neuroreport* 2000;11(16):R23-33.

77. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312(4):1357-63.

78. Pescovitz OH, Hench KD, Barnes KM, Loriaux DL, Cutler GB, Jr. Premature thelarche and central precocious puberty: the relationship between clinical presentation and the gonadotropin response to luteinizing hormone-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;67(3):474-9.

79. Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, et al. Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2006;155 Suppl 1:S3-S10.

80. Bianco S, Teles M, Latronico A, Kaiser U. A GPR54 Mutation Identified in a Patient with Precocious Puberty Decreases Receptor Degradation: An Alternative Mechanism for Increased G Protein-Coupled Receptor Activity. In: *The Endocrine Society's 90th Annual Meeting*; 2008 June; San Francisco; 2008.

81. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving g proteins and g protein-coupled receptors. *Annual review of medicine* 2004;55:27-39.

82. Schoneberg T, Schulz A, Biebermann H, Hermsdorf T, Rompler H, Sangkuhl K. Mutant G-protein-coupled receptors as a cause of human diseases. *Pharmacology & therapeutics* 2004;104(3):173-206.

83. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* 2001;53(1):1-24.

84. Swords FM, Baig A, Malchoff DM, et al. Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 2002;16(12):2746-53.

85. Luan X, Yu H, Wei X, et al. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. *Neuroendocrinology* 2007;86(2):77-83.

86. Buratti E, Baralle M, Baralle FE. Defective splicing, disease and therapy: searching for master checkpoints in exon definition. *Nucleic acids research* 2006;34(12):3494-510.

87. Leanos-Miranda A, Ulloa-Aguirre A, Ji TH, Janovick JA, Conn PM. Dominant-negative action of disease-causing gonadotropin-releasing hormone receptor (GnRHR) mutants: a trait that potentially coevolved with decreased plasma membrane expression of GnRHR in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(7):3360-7.

88. Knollman PE, Janovick JA, Brothers SP, Conn PM. Parallel regulation of membrane trafficking and dominant-negative effects by misrouted gonadotropin-releasing hormone receptor mutants. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(26):24506-14.

89. Rosenfield RL. Clinical review 6: Diagnosis and management of delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70(3):559-62.

90. Argente J. Diagnosis of late puberty. *Horm Res* 1999;51 Suppl 3:95-100.

91. Kulin HE. Delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(10):3460-4.

92. Sedlmeyer IL, Hirschhorn JN, Palmert MR. Pedigree analysis of constitutional delay of growth and maturation: determination of familial aggregation and inheritance patterns. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(12):5581-6.

Apêndice

BRIEF REPORT

A *GPR54*-Activating Mutation in a Patient with Central Precocious Puberty

Milena Gurgel Teles, M.D., Suzy D.C. Bianco, Ph.D., Vinicius Nahime Brito, M.D., Ericka B. Trarbach, Ph.D., Wendy Kuohung, M.D., Shuyun Xu, M.D., Stephanie B. Seminara, M.D., Berenice B. Mendonca, M.D., Ursula B. Kaiser, M.D., and Ana Claudia Latronico, M.D.

SUMMARY

Gonadotropin-dependent, or central, precocious puberty is caused by early maturation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis. In girls, this condition is most often idiopathic. Recently, a G protein–coupled receptor, GPR54, and its ligand, kisspeptin, were described as an excitatory neuroregulator system for the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). In this study, we have identified an autosomal dominant GPR54 mutation — the substitution of proline for arginine at codon 386 (Arg386Pro) — in an adopted girl with idiopathic central precocious puberty (whose biologic family was not available for genetic studies). In vitro studies have shown that this mutation leads to prolonged activation of intracellular signaling pathways in response to kisspeptin. The Arg386Pro mutant appears to be associated with central precocious puberty.

Puberty represents a complex biologic process of sexual development that can be influenced by genetic, nutritional, environmental, and socioeconomic factors.[1] The activation of pulsatile hypothalamic GnRH secretion is a key event in the onset of puberty.[2] A network of hypothalamic neurons is critical for GnRH release and, consequently, pituitary gonadotropin secretion and gonadal steroid production during pubertal maturation.[3]

Precocious puberty is defined as the development of secondary sexual characteristics before the age of 8 years in girls and 9 years in boys.[4] There are several causes of precocious puberty, and it is of utmost importance to distinguish between central (gonadotropin-dependent) precocious puberty, which results from premature activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, and gonadotropin-independent precocious puberty. Central precocious puberty has a striking predominance among girls, and most of these cases are considered idiopathic.[1,4] However, it is known that genetic factors play a fundamental role in the timing of pubertal onset, as illustrated by the similar age at menarche among members of an ethnic group and in mother–daughter, monozygotic-twin, and sibling pairs.[5] More recently, de Vries et al.[6] reported a 27.5% prevalence of familial central precocious puberty; segregation analysis in these families suggested autosomal dominant transmission with incomplete sex-dependent penetrance.

The kisspeptin–GPR54 signaling complex has been proposed as a gatekeeper of pubertal activation of GnRH neurons and the reproductive axis.[7-9] Loss-of-function point mutations and deletions in *GPR54* have been identified in patients with familial or sporadic isolated hypogonadotropic hypogonadism.[7-9] In addition, *Gpr54*-knock-

From the Developmental Endocrinology Unit, Medical Investigation Laboratory, Clinicas Hospital, São Paulo University Medical School, São Paulo (M.G.T., V.N.B., E.B.T., B.B.M., A.C.L.); and the Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension, Brigham and Women's Hospital (M.G.T., S.D.C.B., W.K., S.X., U.B.K.); Harvard Reproductive Endocrine Sciences Center (M.G.T., S.D.C.B., W.K., S.X., S.B.S., U.B.K.); Boston University School of Medicine (W.K.); and the Reproductive Endocrine Unit, Massachusetts General Hospital (S.B.S.) — all in Boston. Address reprint requests to Dr. Latronico at the Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155–2° andar Bloco 6, 05403-900 São Paulo, Brazil, or at anacl@usp.br.

Drs. Teles and Bianco contributed equally to this article, as did Drs. Kaiser and Latronico.

N Engl J Med 2008;358:709-15.
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society.

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

out mice had a similar failure of sexual maturation.[8,10] In this study, we hypothesized that gain-of-function mutations of the human GPR54 receptor might be associated with premature activation of GnRH release, leading to central precocious puberty.

CASE REPORT

An 8-year-old adopted girl was referred to the Developmental Endocrinology Unit of Clinicas Hospital, São Paulo, for evaluation of precocious puberty. Premature breast development with slow progression had been observed since birth. At 7 years of age, the development of breasts accelerated and pubic hair was noted. The patient's medical history was unremarkable. She had no exposure to sex steroids, according to her family. She had no neurologic symptoms. Additional pubertal signs such as acne, oily skin, axillary hair, and menstrual bleeding were absent. There were no café au lait spots. At 8 years of age, her height was 131.5 cm and her weight 26.7 kg. The midparental height was not available. Breast development was Tanner stage 4 and pubic hair Tanner stage 2. Bone age was 11 years (according to the method of Greulich and Pyle[11]).

The basal luteinizing hormone level was less than 0.6 IU per liter (normal prepubertal levels, <0.6 to 0.7 IU per liter), and the basal follicle-stimulating hormone level was 2.6 IU per liter (normal prepubertal levels, <1.0 to 7.2 IU per liter). In addition, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone levels after stimulation with GnRH were 6.4 IU per liter and 5.9 IU per liter, respectively (typical luteinizing hormone level after puberty, >6.9 IU per liter).[12] The peak ratio of luteinizing hormone to follicle-stimulating hormone after GnRH stimulation was 1.08.[13] The luteinizing hormone level 2 hours after a depot injection of leuprolide acetate was 8.5 IU per liter (typical level after puberty, >10 IU per liter).[14] The serum estradiol level was 22 pg per milliliter (80 pmol per liter) (normal prepubertal level, <13 pg per milliliter [47 pmol per liter]). Detailed methods for the hormonal assays are given in the Supplementary Appendix (available with the full text of this article at www.nejm.org).

Pelvic ultrasonography showed no masses. Ovarian and uterine volumes were enlarged in relation to the chronologic age (right ovary, 4.4 cm^3; left ovary, 3.6 cm^3; uterus, 5.4 cm^3). The results of magnetic resonance imaging of the central nervous system were normal.

Despite the fact that the basal luteinizing hormone level was within the normal prepubertal range and the GnRH-stimulated level was not diagnostic of gonadotropin-dependent precocious puberty, the absence of either a primary ovarian disorder or a neurogenic cause of the patient's symptoms favored the diagnosis of idiopathic central precocious puberty. Therefore, treatment with a GnRH analogue (3.75 mg per month of a depot suspension of leuprolide acetate) was initiated and maintained for 4 years. The diagnosis of central precocious puberty was confirmed by a satisfactory response to the treatment, including partial regression of breast development (to Tanner stage 3), decrease in growth velocity, arrest of bone maturation, reduction of ovarian size, and gonadotropin suppression along with a return to prepubertal estradiol levels. Spontaneous menarche occurred at age 12 and was followed by regular menses. The patient's adult height is 152.2 cm.

METHODS

DNA ANALYSIS

Approval of the DNA-analysis methods was provided by the ethics committee of Clinicas Hospital. Written informed consent was provided by the parents of our patient and those of 53 unrelated children with idiopathic central precocious puberty, as well as by all 150 ethnically matched adult control subjects. All of the children provided oral assent. Genomic DNA was extracted from peripheral-blood leukocytes, and the entire coding region as well as the exon–intron boundaries of *GPR54* (GenBank accession number, NM_032551) were amplified and sequenced on an automated sequencer.[8]

GENERATION OF ARG386PRO GPR54 THROUGH SITE-DIRECTED MUTAGENESIS

The Arg386Pro GPR54 mutant was generated in vitro by means of site-directed mutagenesis with the QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) and the mammalian expression vector pCMVsport6, containing the full-length wild-type human GPR54 as a template.[8] We confirmed the presence of the mutation by using direct sequencing.

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

STUDIES OF GPR54 SIGNALING

Kidney-fibroblast cells from the African green monkey (COS-7 cells) were transiently transfected with 50 ng of wild-type GPR54, Arg386Pro GPR54, or an empty vector (pCMVsport6) using GenePORTER Transfection Reagent (Gene Therapy Systems). Total inositol phosphate and phosphorylation of extracellular signal–regulated kinase were measured at various points after stimulation with increasing levels of kisspeptin.[15] (For details, see the Methods section of the Supplementary Appendix.)

RESULTS

DNA ANALYSIS

Automated sequencing of the patient's genomic DNA for *GPR54* revealed a heterozygous substitution of cytosine for guanine at nucleotide position 1157 in exon 5, resulting in the substitution of proline for arginine at codon 386 (Arg386Pro) in the carboxy-terminal tail of the receptor (Fig. 1). The Arg386Pro mutation generates a restriction site recognized by *SmaI*; the mutation was screened in the 300 chromosomes from the 150 ethnically matched controls who had a history of normal pubertal development and in the 106 chromosomes from the 53 unrelated children (50 girls and 3 boys) who had idiopathic central precocious puberty. The Arg386Pro mutation was absent in all controls as well as in the unrelated patients with precocious puberty.

FUNCTIONAL ANALYSIS OF ARG386PRO GPR54

Binding studies performed in COS-7 cells transfected with wild-type or Arg386Pro GPR54 and incubated with ^{125}I-labeled kisspeptin revealed no significant effect of the amino acid substitution on the binding affinity of kisspeptin or the levels of expression of GPR54 (dissociation constant for wild-type GPR54, 4.4 nM; for Arg386Pro GPR54, 7.0 nM; maximal binding capacity for both types of GPR54, 20 nmol per milligram of protein) (Fig. S1 in the Supplementary Appendix).

Basal inositol phosphate levels did not differ significantly in COS-7 cells transfected with wild-type GPR54 and those transfected with Arg386Pro GPR54. In addition, there was no significant difference in the dose–response curves or in the maximal responses of wild-type GPR54 and Arg386Pro GPR54 to increasing concentrations of kisspeptin (10^{-11} to 10^{-7} M of kisspeptin-10) (Fig. 2A). The concentration of kisspeptin that provoked a response halfway between the baseline and maximum responses was 0.23 nM for wild-type GPR54 and 0.28 for Arg386Pro GPR54, and the maximal activity of inositol phosphate was 78.4 and 77.8 counts per minute per microgram of protein, respectively. However, a time-course study showed that inositol phosphate levels peaked at 2 hours for both wild-type and Arg386Pro GPR54, but the rate of the decline in inositol phosphate levels thereafter was slower in cells transfected with Arg386Pro GPR54, resulting in significantly higher inositol phosphate levels after 18 hours of stimulation with kisspeptin (Fig. 2B). This effect was also evident when both wild-type and Arg386Pro GPR54 were transfected into COS-7 cells (Fig. 2C).

To confirm this prolonged course of action associated with the mutant receptor, we measured the time course of the phosphorylation of extracellular signal–regulated kinase, another downstream effector of the GPR54 signaling cascade, in response to kisspeptin. The levels of phosphorylated extracellular signal–regulated kinase in all cells peaked at 10 minutes, after which the levels declined. The rate of decrease of phosphorylated extracellular signal–regulated kinase levels was slower in cells transfected with Arg386Pro GPR54 than in those transfected with wild-type GPR54, such that the levels in the Arg386Pro GPR54–transfected cells remained significantly higher after 60 minutes of exposure to kisspeptin (Fig. 3). Kinetic studies of GPR54 binding similarly indicated that Arg386Pro GPR54 remains in the cell-surface plasma membranes for longer periods after kisspeptin stimulation than does the wild-type receptor (Fig. S2 in the Supplementary Appendix).

DISCUSSION

In humans, the onset of puberty requires an increase in the pulsatile release of GnRH from the hypothalamus.[16] An excitatory neuronal system predominantly involved in the activation of GnRH secretion appears to be the kisspeptin–GPR54 signaling complex.[7,8,10] Indeed, mammalian models suggest an important role of kisspeptin, since intermittent infusion of this protein results in early sexual maturation in rats and early GnRH release in monkeys.[17,18]

In our study, we identified a heterozygous GPR54 mutation, Arg386Pro, in a girl with idio-

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

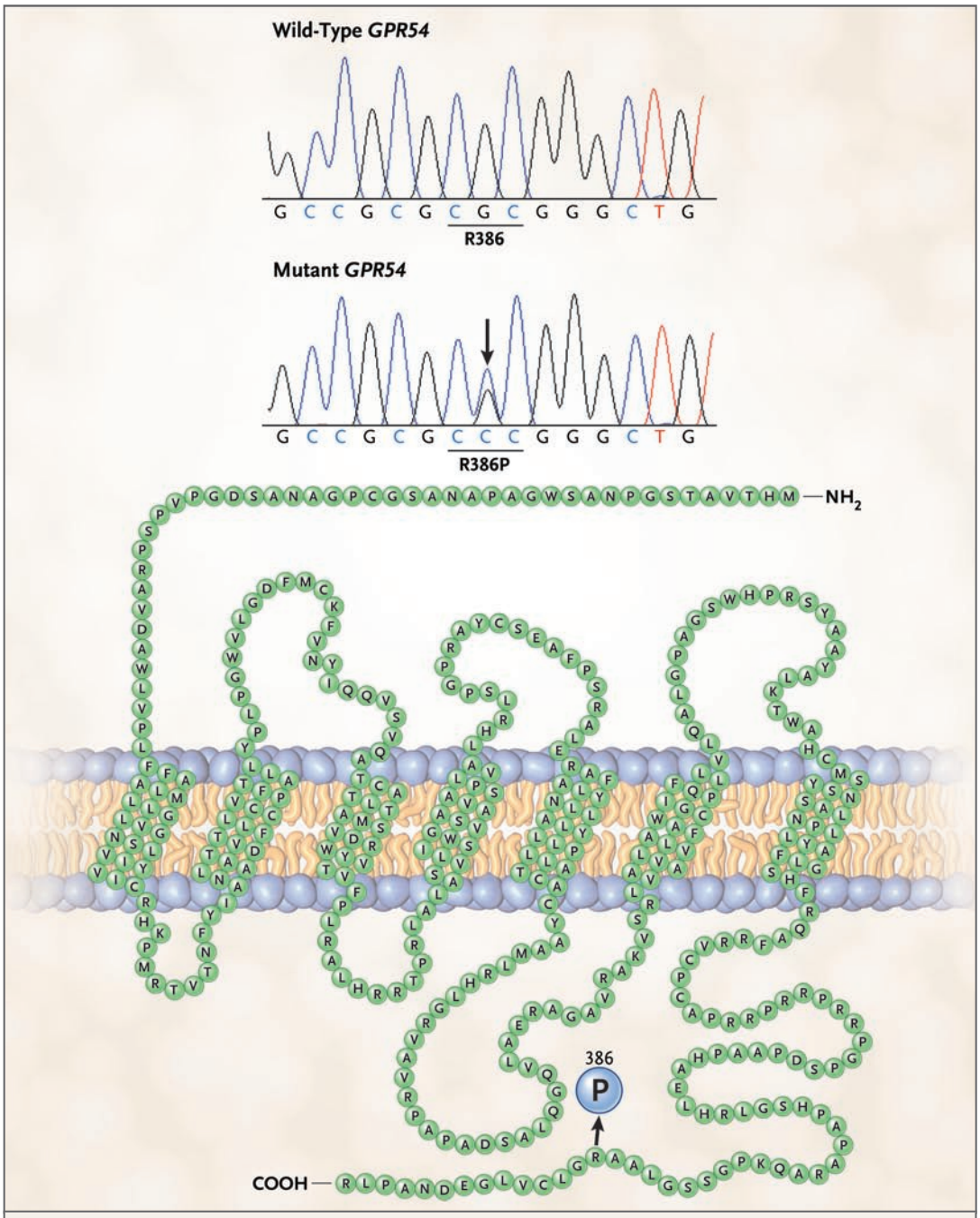


Figure 1. Sequences of Wild-Type and Mutant *GPR54*.

The wild-type cytosine–guanine–cytosine (CGC) sequence in *GPR54* exon 5 encodes arginine (R) at codon 386 (R386). The heterozygous substitution of C for G (shown for our patient with an arrow) results in the substitution of proline (P) for R (R386P) in the carboxy-terminal tail of the protein (shown embedded in a cellular membrane). In the nucleotide sequences (shown immediately under the two plots), T denotes the nucleotide thymidine.

pathic central precocious puberty. She had thelarche from birth, but with slow progression, suggesting an early, persistent, and mild increase in estrogen secretion. Isolated thelarche was ruled out on the basis of progressive secondary sexual development and accelerated growth and skeletal maturation.[13] Although during her initial evaluation the patient showed borderline-pubertal lu-

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

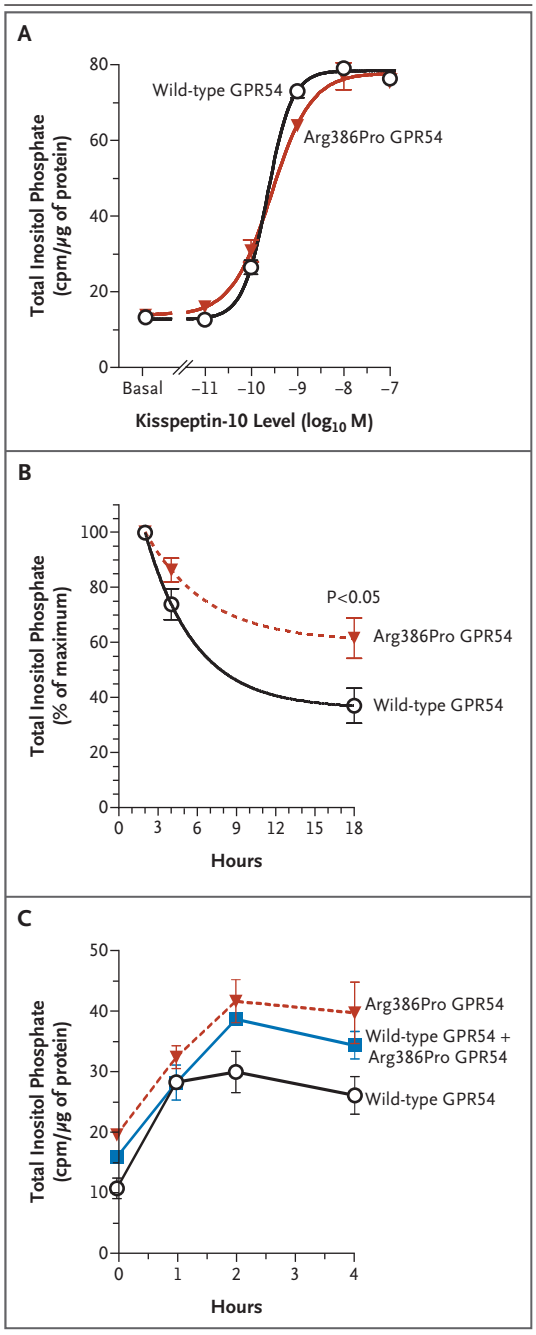


Figure 2. Kisspeptin-Stimulated Production of Inositol Phosphate in COS-7 Cells Transfected with Wild-Type GPR54 or Arg386Pro GPR54.

Total inositol phosphate accumulation was measured in counts per minute (cpm) 45 minutes after stimulation with 10^{-11} to 10^{-7} M of kisspeptin-10 (Panel A). In a separate experiment, cells were stimulated with 10^{-9} M of kisspeptin-10 for 0, 2, 4, or 18 hours; the resulting inositol phosphate levels are expressed as the percentage of the maximal level (at 2 hours) (Panel B). Each point is the mean of five independent experiments, each performed in duplicate or triplicate. Finally, cells were transfected with 50 ng of wild-type GPR54 only, 50 ng of Arg386Pro GPR54 only, or 25 ng of wild-type GPR54 and 25 ng of Arg386Pro GPR54. The total inositol phosphate accumulation was measured after stimulation with 10^{-8} M of kisspeptin-10 for 0, 1, 2, or 4 hours (Panel C). I bars represent the standard errors.

teinizing hormone levels after GnRH stimulation, approximately 8% of girls with gonadotropin-dependent precocious puberty have prepubertal luteinizing hormone levels after GnRH stimulation.[12] The suppressive effects of using a depot suspension of GnRH agonist on the pituitary–gonadal axis in our patient confirmed the presence of central activation of the GnRH axis. Segregation analysis was not feasible in this adopted girl, because her biologic family was not available for genetic studies. Nonetheless, the absence of the Arg386Pro mutation in an ethnically matched population, as well as in American and European populations, suggests that the Arg386Pro mutation is not a GPR54 polymorphism.[7,9,19]

In vitro studies revealed no significant differences in the activity of Arg386Pro GPR54 and wild-type GPR54 in transfected cells under basal conditions, indicating that the Arg386Pro mutation does not generate a constitutively active receptor. Nor did cells transfected with mutant GPR54 and those transfected with wild-type GPR54 and incubated with kisspeptin differ significantly in the dissociation constant for kisspeptin binding, the response halfway between the baseline and maximum responses on the dose–response curve, or in the maximal binding capacity or responsiveness to kisspeptin, indicating that the affinity of mutant GPR54 for its ligand and the expression levels of the receptor on the surface of the transfected cells were not altered.

Nevertheless, in repeated time-course studies, the rate of decline in inositol-phosphate accumulation after kisspeptin stimulation was slower in cells transfected with Arg386Pro GPR54 than in cells transfected with wild-type GPR54, resulting in significantly higher inositol phosphate levels for as long as 18 hours. Similarly, the phosphorylation of extracellular signal–regulated kinase was prolonged, confirming the extended activation of intracellular signaling pathways by the mutant GPR54 in response to kisspeptin. These findings indicate a significant reduction in the rate of desensitization of the mutant GPR54. Kinetic

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

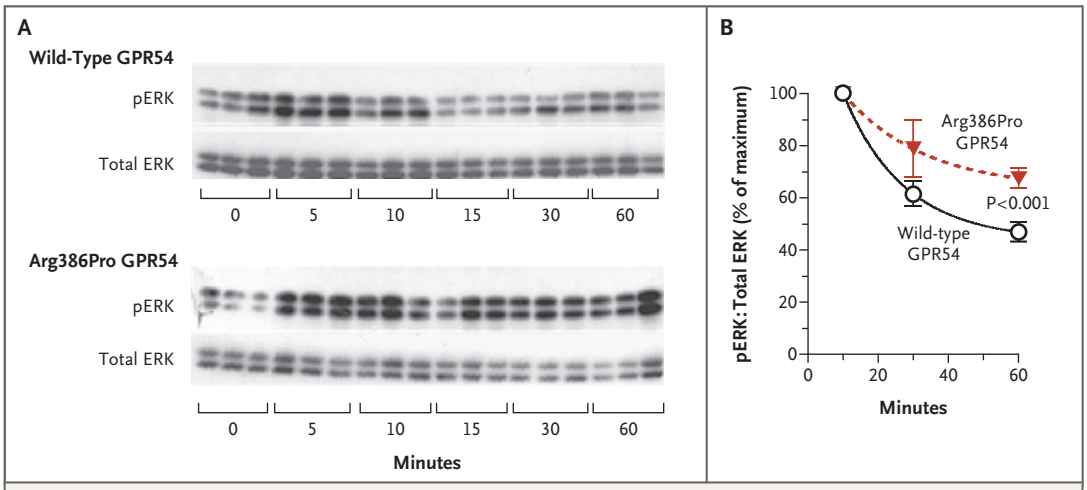


Figure 3. Time Course of Kisspeptin-Stimulated Phosphorylation of Extracellular Signal–Regulated Kinase (ERK) in COS-7 Cells Transfected with Wild-Type GPR54 or Arg386Pro GPR54.

Phosphorylated ERK (pERK) levels were measured by means of Western-blot analysis after stimulation with 3×10^{-9} M kisspeptin-10 for 0, 5, 10, 15, 30, or 60 minutes. Panel A shows representative Western blots. The intensity of the pERK bands was normalized to that of total ERK bands. Panel B shows the ratio of pERK to total ERK, expressed as percentage of the maximal level (at 10 minutes). Each point is the mean of five independent experiments; I bars represent the standard errors.

studies of ligand binding revealed that the Arg386Pro GPR54 remained on the plasma membrane of the cell surface after kisspeptin stimulation for longer periods than did the wild-type receptor, suggesting a reduced rate of internalization or degradation of the mutant receptor.

Desensitization of G protein–coupled receptors can occur through receptor phosphorylation, frequently on the carboxy-terminal tail, by intracellular kinases, leading to the uncoupling of the receptor from G proteins and other intracellular signaling pathways. Such phosphorylation may enhance the binding of arrestin, triggering receptor internalization.[20] A similar mechanism of receptor activation involving impaired desensitization has been reported in a patient with adrenocorticotropic hormone–independent Cushing's syndrome; the activation is due to a mutation in the carboxy-terminal tail of the melanocortin 2 receptor, a G-protein–coupled receptor affecting the signaling pathways of the G-protein alpha subunit G_s rather than G_q.[21]

Gain-of-function mutations in G protein–coupled receptors have been identified only in a few inherited disorders.[22] Most of these mutations result in constitutive activation of the receptor and downstream cellular responses. However, constitutive activation of GPR54 might be expected to disrupt pulsatile GnRH release, thereby resulting in delayed — rather than precocious — puberty, since coordinated pulsatile GnRH release is critical for the onset of puberty. Indeed, continuous infusion of kisspeptin has been shown to decrease luteinizing hormone levels in agonadal juvenile male monkeys.[23] In contrast, we describe a model of nonconstitutive receptor activation characterized by a reduction of the rate of GPR54 desensitization. This mechanism would result in an increased, prolonged cellular response and hence the release of an increased-amplitude pulse of GnRH in response to kisspeptin stimulation.

The increase in hypothalamic kisspeptin expression at puberty is believed to contribute to the maturation of the reproductive axis.[24,25] We speculate that the decreased GPR54 desensitization seen for the Arg386Pro mutant might increase the stimulatory effects of kisspeptin on GnRH secretion, thus accelerating the maturation of the reproductive axis. Furthermore, the presence of breast development during the neonatal period in our patient might be consistent with neonatal activity of the kisspeptin–GPR54 system, as inferred from the presence of cryptorchidism and micropenis in a male infant with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to a loss-of-function mutation in GPR54.[26]

In conclusion, we have identified an autosomal dominant Arg386Pro GPR54 mutation that pro-

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

longs intracellular GPR54 signaling in response to kisspeptin, which appears to be associated with a central precocious puberty phenotype.

Supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (05/50146-5, to Dr. Teles; and 05/04726-0, to Dr. Latronico), from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (300469/2005-5, to Dr. Latronico; and 300828/2005-5, to Dr. Mendonca), and from the National Institute of Child Health and Human Development and the National Institutes of Health (through cooperative agreement U54 HD28138 as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research, to Dr. Kaiser).

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

We thank Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold for his helpful discussions and comments.

REFERENCES

1. Delemarre-van de Waal HA. Secular trend of timing of puberty. Endocr Dev 2005;8:1-14.

2. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endocr Rev 2001;22:111-51.

3. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, et al. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? Endocrinology 2006;147:1166-74.

4. Papathanasiou A, Hadjiathanasiou C. Precocious puberty. Pediatr Endocrinol Rev 2006;3:Suppl 1:182-7.

5. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2364-8.

6. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:1794-800.

7. 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;100:10972-6.

8. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003;349:1614-27.

9. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, et al. Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 2005;90:1849-55.

10. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. Biochem Biophys Res Commun 2003;312:1357-63.

11. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford, CA: Stanford University Press, 1959:51, 103-5.

12. Brito VN, Batista MC, Borges MF, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab 1999;84: 3539-44.

13. Pescovitz OH, Hench KD, Barnes KM, Loriaux DL, Cutler GB Jr. Premature thelarche and central precocious puberty: the relationship between clinical presentation and the gonadotropin response to luteinizing hormone-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab 1988;67:474-9.

14. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonca BB. A single luteinizing hormone determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:4338-42.

15. Bedecarrats GY, Linher KD, Kaiser UB. Two common naturally occurring mutations in the human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor have differential effects on gonadotropin gene expression and on GnRH-mediated signal transduction. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:834-43.

16. Ebling FJ, Cronin AS. The neurobiology of reproductive development. Neuroreport 2000;11:R23-R33.

17. Plant TM, Ramaswamy S, Dipietro MJ. Repetitive activation of hypothalamic G protein-coupled receptor 54 with intravenous pulses of kisspeptin in the juvenile monkey (Macaca mulatta) elicits a sustained train of gonadotropin-releasing hormone discharges. Endocrinology 2006; 147:1007-13.

18. Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. J Physiol 2004;561:379-86.

19. Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, et al. Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol 2006;155:Suppl 1:S3-S10.

20. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. Pharmacol Rev 2001;53:1-24.

21. Swords FM, Baig A, Malchoff DM, et al. Impaired desensitization of a mutant adrenocorticotropin receptor associated with apparent constitutive activity. Mol Endocrinol 2002;16:2746-53.

22. Spiegel AM, Weinstein LS. Inherited diseases involving G proteins and G protein-coupled receptors. Annu Rev Med 2004;55:27-39.

23. Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF Jr, Plant TM. Continuous human metastin 45-54 infusion desensitizes G protein-coupled receptor 54-induced gonadotropin-releasing hormone release monitored indirectly in the juvenile male Rhesus monkey (Macaca mulatta): a finding with therapeutic implications. Endocrinology 2006;147:2122-6.

24. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, et al. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. Endocrinology 2004;145:4565-74.

25. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. J Neurosci 2005;25:11349-56.

26. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, de Roux N. Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. J Clin Endocrinol Metab 2007;92:1137-44.

Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society.

Downloaded from www.nejm.org by CHRISTIAN MUELLER on February 13, 2008 .
Copyright © 2008 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.