LETÍCIA FERREIRA GONTIJO SILVEIRA

**Análise do gene *KISS1* nos
distúrbios puberais humanos**

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

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Silveira, Letícia Ferreira Gontijo

Análise do gene *KISS1* nos distúrbios puberais humanos / Letícia Ferreria Gontijo
Silveira. -- 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.Puberdade precoce 2.Hipogonadismo 3.Hormônio liberador de
gonadotropina 4.Gonadotropinas 5.Sistema hipotálamo-hipofisário 6.Proteínas
supressoras de tumor 7.Mutação

USP/FM/SBD-432/08

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, 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

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico, pela valiosa orientação e pelo exemplo como profissional competente e dedicada e, acima de tudo, pelo carinho e amizade. Por estar sempre presente e disponível quando precisamos, com sua alegria, incentivos constantes e otimismo incansável.

À Profa. Dra. Berenice Mendonça, que me recebeu no LIM/42 de braços abertos e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desse grupo, tendo chefe uma pessoa que admiro profundamente.

Ao Prof. Dr. Ivo Arnhold pelas suas sempre preciosas sugestões e observações.

À equipe do Brigham and Women's Hospital, especialmente às Dras. Ursula Kaiser, Suzy Bianco e Xu Shuyun pela colaboração e pelos ensinamentos, que enriqueceram imensamente este trabalho.

Às funcionárias Ana Lúcia, Cristiane, Cristina, Cidinha, Fran e Nilda, pela boa vontade e competência que tanto facilitam o nosso trabalho no laboratório.

À colega Helena pela colaboração nos experimentos.

Aos Drs. Vinícius Brito, Chin Jia Lin, Emília Modolo Pinto e Alexander Jorge pelas sugestões e colaborações.

Às colegas Ana Paula, Milena, Priscilla, Rocio e Ericka, que além de ajudarem na organização da casuística, se tornaram grandes amigas ao longo dos anos.

Um agradecimento especial à minha colega, amiga e "dupla",

Mariza, pela colaboração fundamental nos experimentos, amizade e cumplicidade.

Ao novo colega Acácio, pela grande contribuição na reta final.

Aos amigos Antônio, Bia, Débora, Fred, Karina, Luciana Montenegro, Maria Estela e Viviani por todo o apoio e incentivo.

A todos os colegas do LIM/42, que, pela boa convivência, tornaram muito mais agradáveis a vida no laboratório.

Aos meus pais, pelo amor incondicional e por terem me dado a base que foi o começo de tudo e à minha avó, que sempre dizia que eu ia voar pra longe.

Aos pacientes e seus familiares pela boa vontade em participar desse projeto.

E, finalmente, a todos que acreditaram e que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 – Introdução	1
1.1 - Puberdade normal.....	2
1.2 - Distúrbios do desenvolvimento puberal de origem central.....	4
1.2.1 - Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG).....	4
1.2.2 - Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI).....	6
1.3 - Causas genéticas dos distúrbios puberais.....	7
1.4 - <i>KISS1</i> e o eixo gonadotrófico.....	9
1.4.1- Estrutura gênica e proteica do <i>KISS1</i>	10
1.4.2 – Via de sinalização kisspeptina/GPR54.....	13
1.4.3 – Estudos do complexo kisspeptina/GPR54 em modelos animais..	15
1.4.4 – Kisspeptina em humanos.....	21
2 - Objetivos.....	22
3 – Pacientes e métodos.....	24
3.1 – Casuística	25
3.2 – Avaliação hormonal.....	30
3.2.1- Dosagem de kisspeptina plasmática.....	33
3.3 – Pesquisa de mutações.....	34
3.3.1 - Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos..	35
3.3.2 - Amplificação de DNA genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
3.3.3 - Sequenciamento automático.....	36
3.3.4 - Análise estatística dos polimorfismos.....	37
3.4 - Estudos de expressão.....	38
3.4.1 - Extração de RNA.....	38
3.4.1.1 - Extração de RNA de placenta.....	38
3.4.1.2 - Quantificação do RNA.....	39
3.4.1.3 - Tratamento com DNase.....	39

3.4.2- Síntese de cDNA.....	40
3.4.3- Amplificação do cDNA do <i>KISS1</i>	40
3.4.4 - Clonagem e transformação.....	41
3.4.5- Mutagênese sítio dirigida3.4.6- Transfecção.....	42
3.4.6- Transfecção.....	42
3.4.7 - Análise da expressão protéica por radioimunoensaio (RIE).....	43
3.5 - Estudos de sinalização (ensaio de fosfato de inositol).....	45
3.6 - Ensaio de ligação ao receptor.....	46
4 - Resultados.....	47
4.1 - Pesquisa de mutações no gene <i>KISS1</i>	48
4.1.1 Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas	48
4.1.1.1 Variante c.374C>T (p.P74S).....	48
4.1.1.2 Apresentação clínica: PPDG associada à mutação p.P74S.....	49
4.1.1.3 Dosagem de kisspeptina plasmática.....	50
4.1.1.4 Variante c.422 C>G (p.H90D).....	52
4.1.1.5 Apresentação clínica: PPDG associada à mutação p.H90D.....	53
4.1.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado.....	54
4.1.3 Polimorfismos.....	55
4.2 - Estudos funcionais.....	59
4.2.1 - Quantificação da kisspeptina secretada.....	59
4.2.2 - Estudos de sinalização das variantes p.P74S e p.H90D.....	61
4.2.2.1 Variante p.P74S.....	61
4.2.2.2 Variante p.H90D.....	63
4.2.3 Ensaio de ligação ao receptor.....	64
5 - Discussão.....	65
5.1 - Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas.....	67
5.1.1 Variante p.P74S.....	67
5.1.2 Variante p.H90D.....	70

5.1.3 Estudo funcional da variante p.P74S.....	72
5.1.4 Estudo funcional da variante p.H90D.....	74
5.2 – IHH.....	75
5.3 – Polimorfismos.....	76
6 – Conclusões.....	79
7 – Referências.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

ARC	Núcleo arqueado
AVPV	Núcleo anteroventral-paraventricular
Bmax	Capacidade máxima de ligação
BSA	Albumina de soro bovino
cDNA	DNA complementar
CHO	Células derivadas de ovário de <i>hamster</i> chinês
cpm	Contagens por minuto
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
CV	Coeficiente de variação
<i>CYP11B1</i>	Gene que codifica a 11-hidroxilase
<i>CYP19</i>	Gene que codifica a aromatase
<i>CYP21</i>	Gene que codifica a 21-hidroxilase
DAG	Diacylglicerol
<i>DAX-1</i>	Gene 1 da reversão sexual dose-sensível, hipoplasia adrenal congênita, região crítica no cromossomo X
DEPC	Dimetil pirocarbonato
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EC50	Concentração efetiva média
EGF	Fator de crescimento epitelial
ER- α	Receptor α de estrógeno
ER- β	Receptor β de estrógeno
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FGF8	Fator 8 de crescimento de fibroblastos
<i>FGFR-1</i>	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico
<i>GABRA1</i>	Gene que codifica a subunidade $\alpha 1$ do receptor GABA _A
GAD	Descarboxilase do ácido glutâmico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas

GnRHR	Receptor de GnRH
GPR54	Receptor acoplado a proteína G – 54
HCl	Ácido clorídrico
HEK-293	Células derivadas de rim embrionário humano
<i>HESX1</i>	Gene homeobox da bolsa de Rathke
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
HHIn	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósxico
IC	Idade cronológica
ICV	Intracerebroventricular
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IO	Idade óssea
IP	Fosfato de inositol
IP3	Trifosfato de inositol
kb	Kilobases
Kd	Constante de dissociação
KDa	Kilodalton
LB	Meio de cultura de Luria-Bertani
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHX3</i>	Gene <i>homeobox</i> LIM 3
<i>LEP</i>	Gene que codifica a leptina
<i>LEPR</i>	Gene que codifica o receptor da leptina
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
NELF	Fator embrionário nasal liberador de LH
NPY	Neuropeptídeo Y
<i>NPY-Y1R</i>	Gene que codifica o receptor tipo 1 do neuropeptídeo Y
OD	Densidade óptica
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato

<i>PC1</i>	Gene que codifica a enzima pró-convertase 1
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pERK	ERK fosforilada
PIP2	Fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato
<i>PKC</i>	Proteína quinase C
<i>PLC</i>	Fosfolipase C
PPDG	Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas
PPIG	Puberdade precoce independente de gonadotrofinas
PROK2	Proquinecitina 2
PROKR2	Receptor 2 da proquinecitina
<i>PROP-1</i>	Gene profeta do fator de transcrição específico da pituitária
RIE	Radioimunoensaio
RNA _m	RNA mensageiro
RM	Ressonância magnética
SDS	Sulfato dodecil de sódio
SF-1	Fator esteroideogênico 1
SNC	Sistema nervoso central
SOC	Meio de cultura super-ótimo com repressão de catabólitos (adição de glicose)
SP1	Proteína da especificidade 1
TE	Tampão de Tris e EDTA
TGF- α	Fator de transformação de crescimento α
Tris	Trisaminometano
TTF1	Fator de transcrição tireoidiano 1
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
χ^2	Qui-quadrado
x g	Força centrífuga relativa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do gene <i>KISS1</i> , e seus produtos proteicos, as kisspeptinas.....	12
Figura 2. Cascata de sinalização da kisspeptina/GPR54.....	14
Figura 3. Conexões hipotalâmicas dos neurônios de Kisspeptina.....	20
Figura 4. Eletroferograma mostrando a substituição de uma citosina por uma timina em heterozigose no exon 3 do gene <i>KISS1</i> (c.374C>T).....	49
Figura 5. Eletroferograma mostrando a substituição de uma citosina por uma guanina em homozigose no exon 3 do gene <i>KISS1</i> (c.422c>G).....	52
Figura 6. Eletroferograma mostrando a inserção de uma timina em heterozigose no exon 3 do gene <i>KISS1</i> (c.588-589insT).....	55
Figura 7. Eletroferograma mostrando as variantes polimórficas identificadas nos 3 exons do gene <i>KISS1</i>	56
Figura 8. Eletroferograma mostrando as variantes polimórficas identificadas na região promotora do gene <i>KISS1</i>	58
Figura 9. Quantificação da kisspeptina por radioimunoensaio (RIE).....	60
Figura 10. Produção de fosfato de inositol (IP) total em células CHO-GPR54 estimuladas com doses crescentes de Kp54-WT e Kp54-P74S.....	62
Figura 11. Produção de fosfato de inositol (IP) total em células CHO-GPR54 estimuladas com Kp54-WT e Kp54-P74S 12, 4 e 0h após pré-incubação.....	63
Figura 12 Produção de fosfato de inositol (IP) total em células CHO-GPR54 estimuladas com doses crescentes de Kp54-WT e Kp54-H90D.....	64
Figura 13. Alinhamento da sequência de amino ácidos da kisspeptina de diferentes espécies de mamíferos.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com PPDG.....	28
Tabela 2. Características clínicas e hormonais de 61 pacientes não relacionados com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico.....	30
Tabela 3. Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos.....	32
Tabela 4. Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e RIE em pré-púberes e adultos.....	32
Tabela 5. Oligonucleotídeos usados para amplificação do gene <i>KISS1</i> ..	35
Tabela 6. Dosagem de Kisspeptina plasmática por RIE.....	51
Tabela 7. Características clínicas dos pacientes com as variantes p.P74S e p.H90D no gene <i>KISS1</i>	54
Tabela 8. Frequência alélica dos polimorfismos identificados nos exons de 1 a 3 do gene <i>KISS1</i> em pacientes com PPDG, HHI e controles.....	56
Tabela 9. Frequência genotípica dos polimorfismos identificados nos exons de 1 a 3 do gene <i>KISS1</i> em pacientes com PPDG, HHI e controles.....	57
Tabela 10. Frequência alélica dos polimorfismos identificados na região promotora do gene <i>KISS1</i> em pacientes com PPDG e controles...	58
Tabela 11. Frequência genotípica dos polimorfismos identificados na região promotora do gene <i>KISS1</i> em pacientes com PPDG e controles...	59
Tabela 12. Quantificação por RIE da kisspeptina secretada por células HEK-293 transfectadas com cDNA do <i>KISS1</i>	60

RESUMO

Silveira LFG. *Análise do gene KISS1 nos distúrbios puberais humano* [tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 94p

A kisspeptina, codificada pelo gene *KISS1*, é um neuropeptídeo crucial na regulação do início da puberdade. A kisspeptina estimula a secreção hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) após se ligar ao seu receptor GPR54. Mutações inativadoras do GPR54 são atualmente consideradas como uma causa rara de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) normósico. Recentemente, uma mutação ativadora no receptor GPR54 foi implicada na patogênese da puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG). Com base nesses achados, levantamos a hipótese de que alterações no gene *KISS1* poderiam contribuir para a patogênese de distúrbios puberais centrais. O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de variantes no gene *KISS1* em pacientes com PPDG e HHI. Sessenta e sete crianças brasileiras com PPDG (63 meninas e 4 meninos) e 61 pacientes com HHI (40 homens e 21 mulheres) foram selecionados, incluindo casos esporádicos e familiares em ambos os grupos. A população controle consistiu de 200 indivíduos com história de desenvolvimento puberal normal. A região promotora e os 3 exons do gene *KISS1* foram amplificados e submetidos a sequenciamento automático. Duas novas variantes no gene *KISS1*, p.P74S e p.H90D, foram identificadas em duas crianças não relacionadas, portadoras de PPDG idiopática. Ambas as variantes estão localizadas na região amino-terminal da kisspeptina-54 e estavam ausentes em 400 alelos controles. A variante p.P74S foi identificada em heterozigose em um menino que desenvolveu puberdade com um ano de idade. Sua mãe e avó materna, que apresentavam história de desenvolvimento puberal normal, eram portadoras da mesma variante em heterozigose, sugerindo penetrância incompleta e/ou herança sexo-dependente. A variante p.H90D foi identificada em homozigose em uma menina com PPDG, que desenvolveu puberdade aos

seis anos de idade. Sua mãe, com história de menarca aos dez anos de idade, era portadora da mesma variante em heterozigose. Células transfectadas estavelmente com GPR54 foram estimuladas com concentrações crescentes de kisspeptina-54 (kp-54) humana selvagem ou contendo as mutações (kp-54 H90D e kp-54 P74S) e o acúmulo de fosfato de inositol (IP) foi medido. Nos estudos *in vitro*, a kp-54 P74S apresentou uma capacidade de ativação do receptor GPR54 semelhante à kp-54 selvagem. A kp-54 p.H90D mostrou uma ativação da sinalização do receptor significativamente mais potente que a kp-54 selvagem, sugerindo que essa é uma mutação ativadora. No grupo de HHI, uma nova variante (c.588-589insT) foi identificada em heterozigose na região 3' não traduzida do gene *KISS1* em um paciente do sexo masculino. O papel dessa variante no fenótipo de HHI permanece indeterminado. Em conclusão, duas mutações no gene *KISS1* foram descritas pela primeira vez em associação com PPDG.

Descritores: 1.Puberdade precoce 2.Hipogonadismo 3.Hormônio liberador de gonadotropina 4.Gonadotropinas 5.Sistema hipotálamo-hipofisário 6.Proteínas supressoras de tumor 7.Mutação

ABSTRACT

Silveira LFG. *KISS1 gene analysis in patients with central pubertal disorders* [thesis]. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 94p.

Kisspeptin, encoded by the *KISS1* gene, is an important regulator of puberty onset. After binding to its receptor GPR54, kisspeptin stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion by the hypothalamic neurons. Inactivating GPR54 mutations are a rare cause of normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH). Recently, a unique GPR54 activating mutation was implicated in the pathogenesis of gonadotropin dependent precocious puberty (GDPP). Based on these observations, we hypothesized that mutations in the *KISS1* gene might be associated with central pubertal disorders. The aim of this study was to investigate *KISS1* mutations in idiopathic GDPP and normosmic IHH. Sixty-seven Brazilian children (63 girls and 4 boys) with idiopathic GDPP and 61 patients with normosmic IHH (40 men and 21 women) were selected. Familial and sporadic cases were included in both groups. The control population consisted of 200 individuals who had normal timing of puberty. The promoter region and the 3 exons of the *KISS1* gene were amplified and automatically sequenced. Two novel *KISS1* missense mutations, p.P74S and p.H90D, were identified in two unrelated children with idiopathic GDPP. Both mutations were absent in 400 control alleles and are located in the amino-terminal region of kisspeptin-54. The p.P74S mutation was identified in the heterozygous state in a boy who developed puberty at 1 yr of age. His mother and maternal grandmother, who had normal pubertal development, were also heterozygous for the p.P74S mutation, suggesting incomplete penetrance and/or sex-dependent inheritance. The p.H90D mutation was identified in the homozygous state in a girl with GDPP, who developed puberty at 6 yr of age. Her mother, who had menarche at 10 yr of age, carried the p.H90D mutation in the heterozygous state. CHO cells stably transfected with GPR54 were stimulated with different concentrations of synthetic human wild type or

mutant kisspeptin-54 (KP54) and inositol phosphate (IP) accumulation was measured. *In vitro* studies revealed that the capacity of the p.P74S mutant KP54 to stimulate IP production was similar to the wild type. The p.H90D kisspeptin-54 showed a significantly more potent activation of GPR54 signaling in comparison to the wild type *in vitro*, suggesting a gain-of-function mutation. In the IHH group, a heterozygous variant in the 3' UTR of the *KISS1* gene (c.588-589insT) was identified. The role of this variant in the IHH phenotype remains to be determined. In conclusion, two *KISS1* mutations were described for the first time in association with GDPP.

Descriptors: 1.Puberty, precocious 2.Hypogonadism 3.Gonadotropin-releasing hormone 4.Gonadotropins 5. Hypotjalamo-hupophyseal system 6.Tumor suppressor proteins 7.Mutations

1. INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Puberdade normal

A puberdade é um período de transição da infância para a vida adulta. Esse complexo processo biológico de desenvolvimento sexual caracteriza-se pela maturação do eixo gonadotrófico, desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, aceleração do crescimento e maturação das gônadas (ovários e testículos), com consequente aquisição da função reprodutiva (1-3).

A secreção pulsátil do hormônio secretor de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo é o primeiro passo conhecido no início da puberdade. Na hipófise, o decapeptídeo GnRH se liga ao seu receptor na superfície dos gonadotrofos, estimulando a síntese e secreção das gonadotrofinas: hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). As gonadotrofinas, por sua vez, estimulam a produção dos esteróides sexuais gonadais, testosterona nos testículos e estradiol nos ovários, e a maturação dos gametas (2, 4).

Em primatas, o eixo gonadotrófico é ativo durante o período neonatal, caracterizando-se pela secreção pulsátil de GnRH e consequentemente das gonadotrofinas, seguido por um período de quiescência relativa durante a infância. O início da puberdade é marcado pela reativação da secreção pulsátil de GnRH (5). Fisiologicamente, a idade de início da puberdade varia amplamente e segue uma distribuição normal ou gaussiana (5). Tal variabilidade é determinada pela interação de um conjunto complexo de fatores, envolvendo aspectos genéticos,

étnicos, nutricionais, ambientais e socioeconômicos (5). Foi observado que a variação etária do início da puberdade apresenta um padrão familiar. A idade da menarca semelhante entre mães e filhas e a maior concordância do desenvolvimento puberal entre gêmeos monozigóticos quando comparados a dizigóticos são aspectos que reforçam o papel dos fatores genéticos na modulação do eixo gonadotrófico (6, 7). Evidências sugerem que 50 a 95% da variabilidade na idade de início da puberdade pode ser controlada geneticamente (6, 7). No entanto, os fatores responsáveis pela inibição do pulso gerador de GnRH na infância e sua reativação no início da puberdade ainda não são totalmente conhecidos (1, 5, 8).

Atualmente a hipótese mais aceita para explicar o mecanismo de início do processo puberal envolve a modulação central da secreção de GnRH independente da inibição exercida pelos esteróides gonadais (1, 5, 8). A regulação da secreção de GnRH é dependente de uma rede de neuropeptídeos que controlam a secreção pulsátil do GnRH, com fatores inibitórios predominando no período da infância e fatores excitatórios e permissivos desencadeando a reemergência da secreção pulsátil de GnRH no início da puberdade (1, 5, 8).

Vários neurotransmissores e neuromoduladores apresentam propriedades excitatórias ou inibitórias sobre a secreção de GnRH (1, 2). O ácido gama-amino butírico (GABA), neuropeptídeo Y (NPY), opióides endógenos, β -endorfinas, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e melatonina são os principais neurotransmissores inibitórios, enquanto a glicina, glutamato,

norepinefrina, dopamina, prostagandinas, serotonina, fatores de crescimento derivados da glia, tais como fatores transformadores de crescimento (TGF- α), fator de crescimento epidermal (EGF) são primariamente excitatórios (1, 5, 8). O estado nutricional e aquisição de uma massa corporal mínima são importantes para o início do desenvolvimento puberal e ocorrência da menarca. A leptina é um hormônio secretado principalmente pelos adipócitos e tem sido implicada no início da puberdade humana (2). A leptina exerce seu efeito diminuindo a sinalização dos neurônios secretores de NPY e é atualmente considerada um fator permissivo que informa o cérebro sobre os estoques periféricos de energia (8).

Nos últimos anos, a kisspeptina e seu receptor GPR54 foram revelados como um dos principais fatores estimulatórios da secreção de GnRH e têm sido fortemente implicados na regulação do início da puberdade (9-11).

1.2 - Distúrbios do desenvolvimento puberal de origem central

1.2.1 - Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG)

Puberdade precoce é definida como o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários antes dos oito anos nas meninas e dos nove anos nos meninos (5, 12, 13). A menarca antes dos nove anos de idade nas meninas pode ser considerada como um critério adicional. A puberdade precoce é classificada em dois grandes grupos de acordo com a etiologia: puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG),

também denominada puberdade precoce central ou verdadeira e puberdade precoce independente de gonadotrofinas (PPIG), também chamada de puberdade precoce periférica ou pseudo-puberdade precoce (14).

A PPDG resulta da ativação prematura dos neurônios secretores de GnRH enquanto a PPIG é causada pela secreção de esteróides sexuais independente do estímulo das gonadotrofinas. Clinicamente, ambas são caracterizadas pelo desenvolvimento precoce dos caracteres sexuais secundários, aceleração do crescimento linear e avanço da idade óssea, com consequente prejuízo da estatura final (14).

A prevalência estimada de puberdade precoce é de 0,01 a 0,05% (12). A puberdade precoce é aproximadamente 10 vezes mais comum em meninas do que em meninos, sendo que na população dinamarquesa a prevalência estimada é de cerca de 0,2% em meninas e menos de 0,05% em meninos (15). Hamartomas hipotalâmicos, lesões tumorais, infecções, traumas e irradiação do sistema nervoso central (SNC), são causas conhecidas de ativação precoce do eixo gonadotrófico (3, 13). Nas meninas, a grande maioria dos casos de puberdade precoce é de origem central e mais de 90% dos casos não apresentam causas orgânicas detectáveis e são considerados idiopáticos (3, 5). Em contraste, em até 75% dos meninos com PPDG, são encontradas lesões do SNC, sendo a mais comum o hamartoma hipotalâmico, especialmente em crianças menores de quatro anos de idade (3, 13, 16).

Uma recente análise de 156 pacientes com PPDG idiopática constatou uma prevalência de 27,5% de casos familiares, sugerindo um

papel para os fatores genéticos na patogênese da PPDG. Análise de segregação nestas famílias sugeriu um modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo-dependente (17).

1.2.2 - Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI)

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) congênito é definido como ausência parcial ou completa de desenvolvimento puberal, caracterizado por baixas concentrações de esteróides sexuais associados a valores inapropriadamente normais ou baixos de gonadotrofinas, com o restante da função hipofisária normal, na ausência de uma causa anatômica (18). O HHI é uma condição clínica rara e geneticamente heterogênea, podendo se manifestar de forma esporádica ou ser herdada como um traço autossômico dominante, recessivo ou ligado ao X. O HHI congênito é causado por um defeito na produção ou secreção de GnRH pelo hipotálamo ou pela resistência hipofisária à ação do GnRH (18). O HHI encontra-se frequentemente associado a anosmia ou hiposmia, caracterizando a síndrome de Kallmann (18, 19). A síndrome de Kallmann é a forma mais comum de hipogonadismo hipogonadotrófico, com incidência estimada de 1/10.000 homens e 1/50.000 mulheres (20). Tipicamente o diagnóstico de hipogonadismo congênito é realizado durante a segunda ou terceira década de vida, quando os indivíduos afetados apresentam-se com retardo do desenvolvimento puberal, amenorréia primária ou infertilidade. Em alguns casos, a suspeita diagnóstica pode ser aventada na infância, devido à presença de micropênis e criptorquidismo, principalmente na vigência de história

familiar de hipogonadismo (19).

1.3 - Causas genéticas dos distúrbios puberais

Inúmeros genes envolvidos em diferentes estágios do desenvolvimento e função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal foram descritos nas últimas décadas (21). Estes genes codificam uma rede complexa de fatores de transcrição, proteínas de matriz, neurotransmissores, enzimas e receptores hormonais cujas ações são fundamentais para a aquisição e manutenção de uma função reprodutiva normal (21). Defeitos monogênicos implicados em distúrbios puberais foram identificados, elucidando algumas condições de precocidade e de atraso puberal (22, 23). Genes classicamente implicados na patogênese do HHI incluem *KAL-1*, associado à Síndrome de Kallmann ligada ao X, e o receptor de GnRH (*GnRHR*), associada ao HHI normósmico (HHIn). Nos últimos anos, defeitos nos genes *FGFR-1* (receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos) e seu ligante *FGF8* (fator 8 de crescimento de fibroblastos), *PROK2* (proquinecitina 2) e *PROKR2* (receptor 2 da proquinecitina) foram identificados na Síndrome de Kallmann de herança autossômica e também em casos de HHIn, mostrando que dentro da mesma família um único defeito genético pode levar a um espectro fenotípico variável (23-26). Além disso, mutações inativadoras das subunidades beta do LH e FSH causando HHI seletivo foram relatadas em raras ocasiões (23). Recentemente, foram descritas famílias com HHI de causa digênica, com mutações nos genes *FGFR1* e *NELF* (fator embrionário nasal liberador de LH) em uma família com síndrome de

Kallmann e uma associação de mutações no *GnRHR* e *FGFR1* em uma família com HHIn. Esses achados podem explicar a variabilidade fenotípica muitas vezes encontrada dentro de um mesmo pedigree, até então atribuída somente a penetrância incompleta em caso de doenças monogênicas (27).

Outros genes causadores de hipogonadismo hipogonadotrófico associado a outras deficiências hormonais incluem fatores de transcrição hipofisários (*HESX1*, *LHX3*, *PROP-1*), receptores nucleares órfãos (*DAX-1*, associado com hipoplasia adrenal ligada ao X, e *SF-1*), e genes envolvidos no metabolismo energético (*LEP*, *LEPR* e *PC1*) (28).

Defeitos genéticos relacionados à puberdade precoce independente de gonadotrofinas foram descritos nas últimas décadas. Mutações levando à ativação constitutiva de receptores acoplados a proteína G incluem: mutações no receptor do LH, causando puberdade precoce familiar limitada ao sexo masculino, também chamada de testotoxicose, e mutações na subunidade α da proteína G na síndrome de McCune-Albright (29). Mutações nos genes das enzimas envolvidas na síntese dos esteróides (*CYP21*, *CYP11B1*, *CYP19*) e no receptor do glicocorticóide também são causas raras de PPIG (30, 31). Embora tais defeitos monogênicos expliquem alguns casos de PPIG, até recentemente não haviam sido identificadas alterações estruturais em genes que afetam o eixo gonadotrófico, causando PPDG.

Análise de mutações em receptores de neurotransmissores hipotalâmicos inibitórios da secreção pulsátil de GnRH (*GABRA-1*, *NPY-Y1*) foram realizadas em 33 meninas com PPDG (32, 33). Nenhuma

mutação foi encontrada no *GABRA-1*; no *NPY-Y1R* uma única variante (K374T) foi identificada em heterozigose em uma menina com PPDG familiar. Contudo essa variante não alterou a atividade do receptor *in vitro*, e aparentemente não contribui significativamente para o fenótipo de puberdade precoce (33).

Em 2008, Teles *et al.* (34) identificaram uma mutação no gene *GPR54* (p.R386P) que resulta em uma ativação não constitutiva do receptor, associada ao fenótipo de PPDG em uma menina brasileira adotada. Estudos *in vitro* demonstraram que a mutação p.R386P localizada na cauda carboxi-terminal do GPR54 leva à ativação prolongada da via de sinalização intracelular em resposta a kisspeptina, devido a um atraso na dessensibilização do receptor (34). No entanto, a etiologia molecular da grande maioria dos casos de PPDG permanece desconhecida.

1.4 - *KISS1* e o eixo gonadotrófico

A primeira evidência de que o desenvolvimento puberal humano depende da sinalização do complexo kisspeptina/GPR54 ocorreu em 2003, quando mutações inativadoras do receptor GPR54 foram descritas em indivíduos portadores de HHIn, com um padrão de herança autossômica recessiva (4, 35). Atualmente mutações no gene *GPR54* estão presentes em cerca 5% de todos os pacientes com HHIn investigados (4, 35-37). O *GPR54* foi clonado em 1999 e identificado como um receptor órfão acoplado à proteína G, com 40% de homologia com a família dos receptores da galanina (38). O GPR54 é expresso principalmente em

placenta, hipotálamo, hipófise e pâncreas (39-41).

1.4.1- Estrutura gênica e proteica do KISS1

O ligante do GPR54 foi descrito a partir da identificação de peptídeos endógenos com alta afinidade e atividade agonista pelo receptor GPR54 (39-41). Esses peptídeos, genericamente conhecidos como kisspeptinas, são derivados de uma proteína precursora codificada pelo gene *KISS1*.

O *KISS1* foi isolado originalmente em uma linhagem celular de melanoma maligno como um gene supressor de metástases e mapeado no braço longo do cromossomo 1 (1q32) (42, 43). O gene *KISS1* é composto por três exons, sendo que o primeiro exon e os primeiros 38 pb do segundo exon não são traduzidos. A sequência codificadora consiste dos últimos 103 pb do exon 2 e do exon 3 (42, 43). O produto inicial do *KISS1* é uma proteína hidrofílica de 145 aminoácidos, a kisspeptina-1, com uma massa molecular de 15,4 kDa, que possui uma sequência sinalizadora de secreção com 19 amino ácidos, dois sítios dibásicos potenciais de processamento (nos amino ácidos 57 e 67) e um sítio preditivo de clivagem terminal e amidação (43). A kisspeptina-1 é submetida à clivagem proteolítica seguida de transferência de um grupo NH₂ para a sua porção carboxi-terminal, dando origem a kisspeptina-54 (68-121), com 54 aminoácidos, correspondentes às posições 68 a 121 do peptídeo precursor. A kisspeptina-54 foi inicialmente denominada metastina, devido a sua capacidade de suprimir metástases de linhagens celulares de melanoma e de carcinoma de mama *in vivo* (42, 44). A

kisspeptina-54 é abundantemente expressa na placenta (45). Entretanto, fragmentos de kisspeptinas endógenas de menor tamanho, as kisspeptinas-10, -13 e -14, também foram isolados da placenta humana e compartilham com a kisspeptina-54 a sequência carboxi-terminal de 10 aminoácidos seguida de um grupo amida, a kisspeptina-10 (112-121), altamente conservada entre as espécies (39-41). Como nenhum sítio de clivagem que resultaria na síntese desses fragmentos foi detectado, é possível que esses peptídeos menores sejam produtos de degradação da kisspeptina-54 (41, 45). Apesar da denominação inicial de metastina, com o reconhecimento do seu importante papel no sistema reprodutivo, o termo kisspeptina passou a ser amplamente utilizado para denominar esse grupo de peptídeos com um domínio C-terminal Arg-Phe-NH₂, característico da super família RF-amida (46). Todos esses peptídeos possuem alta afinidade de ligação pelo receptor GPR54 (40). Muir *et al.* (40) demonstraram que esses 10 aminoácidos da região carboxi-terminal são os responsáveis pela bioatividade das kisspeptinas. A ausência de um dos 10 resíduos ou do grupo amida na extremidade carboxi-terminal reduz drasticamente a afinidade pelo receptor (40). A representação esquemática do gene *KISS1* e seus produtos protéicos são mostrados na **figura 1**.

Cromossomo 1q32: *KISS1*

Kisspeptinas

Figura 1. Representação esquemática do gene *KISS1*, contendo 3 exons, e seus produtos proteicos, as kisspeptinas. O RNAm do *KISS1* é traduzido em um peptídeo precursor de 145 aminoácidos, chamado kisspeptina-1, que é posteriormente clivada dando origem à kisspeptina-54, também conhecida como metastina. Peptídeos menores, de 14, 13 e 10 aminoácidos também foram identificados. Todos esses peptídeos apresentam um radical RF-amida na porção carboxi-terminal, essencial para a ligação das kisspeptinas ao receptor.

Pb, pares de base; kb, kilobases; KP, kisspeptina; KDa, kilodalton.

1.4.2 – Via de sinalização kisspeptina/GPR54

As kisspeptinas se ligam ao GPR54 e induzem principalmente a cascata típica dos receptores acoplados à proteína Gαq/11, ativando a fosfolipase C (PLC), com subsequente hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). O acúmulo de IP3 nas células provoca uma mobilização das reservas de cálcio intracelular e o DAG ativa a proteína quinase-C (PKC) (**Figura 2**) (39-41, 47).

Além dessa via clássica, a ação das kisspeptinas nos neurônios de GnRH requer a ativação de mecanismos sinalizadores adicionais envolvendo a família das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) (39, 47). As kisspeptinas induzem fortemente a fosforilação das quinases reguladas por sinal extracelular (ERK 1 e 2) e causam um estímulo mais fraco da fosforilação da MAPK p38 (**Figura 2**) (39, 47). Castellano *et al.* (48) demonstraram que o bloqueio da via das MAPK aboliu a secreção de GnRH induzida por kisspeptina em fragmentos hipotalâmicos *ex-vivo*. No entanto, o padrão específico de quinases ativadas pelo estímulo do GPR54 parece depender do contexto celular estudado (47). É cada vez mais claro que a ativação de vias específicas é seletivamente desencadeada pelas kisspeptinas de acordo com o tipo celular, regulando funções distintas como estímulo da secreção hormonal e inibição de migração celular (39, 47, 49).

As vias da proteína Gαq/11 e da MAPK possuem um papel bem estabelecido na indução da secreção do GnRH, porém sua função nas ações anti-metastáticas e anti-migratórias das kisspeptinas ainda

necessitam ser mais bem esclarecidas (47).

Figura 2. Cascata de sinalização da kisspeptina. A ligação da kisspeptina ao receptor acoplado a proteína Gq, GPR54, ativa a PLC, que induz à hidrólise de PIP2 em IP3 e DAG, levando a mobilização de cálcio intracelular e ativação da PKC, que por sua vez leva a fosforilação da ERK.

PLC, fosfolipase C; PIP2, fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato; IP3, trifosfato de inositol; Ca^{++} , cálcio; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C; RAF1, MEK, quinases serina-treonina; ERK, quinase regulada por sinal extracelular; pERK, ERK fosforilada.

1.4.3 – Estudos do complexo kisspeptina/GPR54 em modelos animais

Diversos estudos em modelos animais e humanos demonstraram que a kisspeptina desempenha um papel crucial na regulação do início da puberdade (46). Após se ligar ao seu receptor GPR54, a kisspeptina estimula a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelos neurônios hipotalâmicos, levando à secreção de gonadotrofinas hipofisárias e esteróides sexuais (**Figura 3**).

Camundongos transgênicos que não expressam os genes *gpr54* ou *kiss1* foram gerados por diferentes grupos de pesquisadores (4, 50-52). O fenótipo desses animais é em geral similar, com pequenas variações que podem ser atribuídas ao tipo de mutação realizada em cada linhagem (53). Tanto a falta de expressão do *kiss1* quanto do *gpr54* levam a um fenótipo de ausência de maturação sexual, com gônadas hipodesenvolvidas, hipogonadismo hipogonadotrófico e infertilidade. Entretanto, a migração dos neurônios produtores de GnRH e o conteúdo de GnRH no hipotálamo são normais. Além do sistema reprodutivo, não foram descritas alterações em outros órgãos ou sistemas. As gônadas e a hipófise anterior mantêm a responsividade ao estímulo com GnRH exógeno (53). Camundongos *knock-out* para o *kiss1* respondem à administração de kisspeptina exógena, enquanto os animais *knock-out* para o *gpr54* não respondem (52). Em conjunto, esses achados sugerem que o defeito primário desses animais está na incapacidade de secreção de GnRH pelo hipotálamo e reforçam as evidências de que a kisspeptina é o ligante exclusivo do GPR54 (53).

A kisspeptina é um potente estimulador da secreção de LH. Em

camundongos, a administração intracerebroventricular (ICV) de doses de até 1 fmol de kisspeptina-10 ou -54 levou a um aumento significativo da secreção de LH e FSH 30 minutos após a injeção (54). Várias vias de administração (ICV, subcutânea, intraperitoneal e intravenosa) resultaram em efeitos similares da kisspeptina em diferentes espécies de mamíferos, como camundongos, ratos, ovelhas e primatas, incluindo o homem (54-61). Gottsch *et al.* (54), observaram que o pré-tratamento com antagonistas de GnRH bloqueia o efeito da kisspeptina confirmando que a capacidade da Kisspeptina de estimular a liberação de gonadotrofinas é dependente da secreção de GnRH. Esses achados são consistentes com o fenótipo observado nos camundongos knock-out para o *gpr54* que são capazes de secretar LH em resposta ao GnRH exógeno (50).

Administração repetida de kisspeptina a animais imaturos mostrou-se capaz de induzir precocemente o desenvolvimento puberal (56, 60). A administração ICV de kisspeptina a cada 12 horas, durante sete dias, a ratas imaturas induziu abertura vaginal precoce, aumento do peso uterino e aumento de LH e estradiol precocemente em relação aos animais não tratados (56). Em macacos *rhesus* machos agonádicos, a administração central ou periférica de kisspeptina induziu a secreção precoce de GnRH e LH (60). Posteriormente, foi observado que a administração intermitente de kisspeptina é mais eficiente em manter a secreção de GnRH do que a infusão contínua de kisspeptina nesses animais, a qual produz uma dessensibilização do receptor GPR54 (62).

Tanto a kisspeptina quanto o seu receptor são amplamente

expressos em humanos (39-41). Foi demonstrado por RT-PCR que o RNAm do *KISS1* é expresso principalmente na placenta, mas também no cérebro, incluindo hipotálamo, gânglios da base, hipófise, além de órgãos periféricos como pâncreas, testículos e em menor grau no fígado e intestino delgado (39-41). Estudos com hibridização *in situ* e imunohistoquímica em ratos, camundongos, ovelhas e primatas mostraram que a expressão do RNAm do *KISS1* no hipotálamo ocorre principalmente nos núcleos arqueado (ARC) e anteroventral-paraventricular (AVPV) (54, 60, 63-66).

Em ratos machos e fêmeas, a expressão hipotalâmica de *kiss1*, avaliada por RT-PCR, aumentou dramaticamente após gonadectomia bilateral em animais adultos e retornou aos valores anteriores após reposição de esteróides sexuais (10). Semelhantemente, Smith *et al.* (63, 65) estudaram camundongos machos e fêmeas intactos e castrados e constataram, através de hibridização *in situ*, um aumento significativo da expressão do RNAm do *kiss1* no núcleo arqueado uma semana após a castração, que foi revertido com reposição de testosterona ou estradiol, sugerindo um efeito inibitório para os esteróides sexuais. Em contraste, no AVPV, a expressão de *kiss1* foi reduzida após gonadectomia e aumentou com a reposição de esteróides, mostrando um padrão de retroalimentação positiva (63, 67). Foi constatado ainda que praticamente todos os neurônios que expressam kisspeptina no ARC e AVPV co-expressam o receptor α de estrógeno (ER- α), enquanto apenas 25-30% desses neurônios expressam o ER- β . Camundongos fêmeas ovariectomizados que não expressam o ER- β respondem à reposição de

estradiol do mesmo modo que os animais selvagens, mostrando que os efeitos do estradiol são mediados diretamente através do ER- α . Nos machos, os efeitos da testosterona são mediados tanto pelo receptor de andrógenos (AR) quanto pelo ER- α , após a aromatização de testosterona em estradiol no ARC. Contudo, no AVPV, o aumento da transcrição do RNAm do *kiss1* induzido pela testosterona parece ser apenas via ER- α . O ARC é conhecido por mediar a regulação da retroalimentação negativa da secreção de GnRH e gonadotrofinas, enquanto o AVPV parece estar envolvido na regulação da retroalimentação positiva que leva ao pico de LH pré-ovulatório nas fêmeas (68) **(Figura 3)**.

A expressão do RNAm de *kiss1* e *gpr54* no hipotálamo aumenta progressivamente ao longo do desenvolvimento pós-natal, atingindo níveis máximos no início da puberdade em roedores e primatas (10, 60). Clarkson & Herbison (69) demonstraram através de imuno-histoquímica que o conteúdo de kisspeptina no AVPV aumenta cerca de sete vezes no início da puberdade. Foi observado ainda um aumento significativo de sobreposição de fibras de kisspeptina e corpos celulares de neurônios de GnRH.

Foi evidenciado um dimorfismo sexual importante na população de neurônios que expressam a kisspeptina no AVPV, com expressão de kisspeptina pelo menos 10 vezes maior nas fêmeas adultas, em comparação com os machos. Essa diferença é aparente desde o período neonatal. O AVPV é uma das poucas áreas sexualmente dimórficas no cérebro dos roedores que é maior na fêmea do que no macho (68, 69). Esses dados sugerem que os neurônios secretores de kisspeptina no

AVPV estão envolvidos em processos sexualmente diferenciados, como a geração do pico de LH pré-ovulatório ou a regulação do comportamento sexual (70, 71). Em contraste, no ARC o conteúdo de kisspeptina é semelhante em machos e fêmeas (68, 69).

Recentemente foi demonstrado por imuno-histoquímica que, além do hipotálamo, kisspeptina e GPR54 são co-expressos em gonadotrofos, sugerindo a possibilidade de uma ação parácrina e/ou autócrina da kisspeptina na hipófise (72). De fato, Gutierrez-Pascual *et al.* (73) demonstraram que a kisspeptina-10 é capaz de estimular moderadamente a secreção de LH de células pituitárias *in vitro*.

Figura 3. Conexões hipotalâmicas dos neurônios de Kisspeptina: As kisspeptinas se ligam aos receptores GPR54 na superfície dos neurônios secretores de GnRH e estimula a secreção de GnRH, resultando em aumento da secreção hipofisária de gonadotrofinas, que estimulam a síntese de esteróides sexuais pelas gônadas. O estradiol regula a expressão do *KISS1* em ambos os sexos, com um mecanismo de retroalimentação negativa no ARC e, no sexo feminino, retroalimentação positiva no AVPV.

AVPV, núcleo anteroventral-periventricular; ERα, receptor α de estrogênio; FSH, hormônio folículo-estimulante; LH, hormônio luteinizante.

Adaptado de Popa *et al.* (74)

1.4.4 – Kisspeptina em humanos

A kisspeptina está normalmente presente em baixas concentrações (picomolares) no plasma de adultos humanos, porém seus níveis plasmáticos aumentam mais de 10.000 vezes no final da gestação (75). Como a kisspeptina e o GPR54 são altamente expressos na placenta, sugere-se que haja um papel fisiológico para a kisspeptina na gestação, provavelmente relacionado ao controle da migração das células trofoblásticas (35, 36, 75).

IHH e PPDG são condições relacionados a anormalidades da secreção pulsátil das gonadotrofinas induzida pelo GnRH hipotalâmico. Considerando-se a importância do complexo Kisspeptina/GPR54 na regulação da secreção do GnRH, e consequentemente no desenvolvimento puberal, é possível que alterações nestes genes possam contribuir para a patogênese desses distúrbios puberais. Mutações patológicas no GPR54 foram descritas em casos de IHH e PPDG (4, 34-37). Além do GPR54, a Kisspeptina é um candidato óbvio para rastreamento de mutações em distúrbios puberais de origem central.

No presente trabalho, estudamos a presença de mutações funcionais e polimorfismos no gene *KISS1* nos distúrbios puberais centrais.

2- OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1- Pesquisar mutações e polimorfismos do gene *KISS1* em pacientes portadores de distúrbios puberais centrais idiopáticos, incluindo puberdade precoce dependente de gonadotrofinas e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico.

2.2- Caracterizar os efeitos das novas mutações do *KISS1* eventualmente identificadas e estabelecer a correlação entre o genótipo mutante e o fenótipo observado nesses pacientes.

3 - PACIENTES E MÉTODOS

3 - PACIENTES E 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 755/05) e o consentimento informado formal foi concedido pelos pacientes ou responsáveis.

3.1 – Casuística

Foram selecionados 128 pacientes portadores de distúrbios puberais centrais idiopáticos: 67 com PPDG e 61 com HHIn. Os pacientes com puberdade precoce foram selecionados no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), além de alguns casos isolados provenientes de outros serviços. 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 200 indivíduos adultos, de ambos os sexos, que não apresentaram anormalidades no desenvolvimento puberal.

Dos 67 pacientes com PPDG, 63 (94%) eram do sexo feminino e 4 (6%) 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 magnética (RM) do SNC sem anormalidades e resposta terapêutica satisfatória ao tratamento com análogos de GnRH *depot*. Cinquenta dos 67 pacientes apresentavam a forma esporádica e 17 pacientes, pertencentes a 13 famílias, apresentavam a forma familiar de PPDG, totalizando 25% de casos familiares. A idade cronológica (IC) média do início do aparecimento dos caracteres sexuais secundários foi de $5,2 \pm 2$ anos (0,33 – 7,7 anos), e a IC média da primeira consulta foi $7,4 \pm 1,8$ anos (1,66 – 10,25 anos). O estágio de desenvolvimento mamário variou de 2 a 5 e o estágio dos pêlos pubianos variou de 1 a 4., de acordo com os critérios de Tanner e Marshall (76, 77) Os três pacientes do sexo masculino apresentavam testículos maiores que 2,5 cm ao diagnóstico. A idade óssea (IO) média foi $10,1 \pm 2$ anos (2 - 12 anos), segundo os critérios de Greulich e Pyle (78). Os pacientes apresentavam em média um avanço de IO de 2,7 anos em relação à IC. A **Tabela 1** resume os achados clínicos dos pacientes com PPDG.

No grupo de 61 pacientes com HHIn, 40 (65,5%) indivíduos eram do sexo masculino e 21 (34,5%) do sexo feminino. Os critérios clínicos e laboratoriais utilizados para a inclusão dos pacientes com HHIn foram: a falta de aparecimento ou desenvolvimento incompleto de caracteres sexuais secundários após os 18 anos em ambos os sexos, concentrações baixas de esteróides sexuais (testosterona ou estradiol) para o sexo e idade associados a concentrações séricas de LH baixas ou inapropriadamente normais em condição basal e/ou após teste de estímulo com GnRH exógeno, olfato normal e RM do SNC sem evidências

de anormalidades.

Cinquenta e um dos 61 pacientes (83,6%) apresentavam a forma esporádica de HHIn e 10 (16,4%) apresentavam a forma familiar.

Todos os pacientes do sexo masculino apresentavam diâmetro testicular reduzido para a idade cronológica. Criptorquidia uni ou bilateral estava presente em 17,5% dos casos. Ginecomastia foi observada em 20% dos pacientes. A média de idade cronológica da primeira consulta foi de 24 anos e variou de 17 a 49 anos. LH e FSH basais estavam suprimidos em 63,3% e 36,6% dos pacientes, respectivamente, e apresentava valores intra-púberes no restante dos casos.

Entre as 21 pacientes do sexo feminino, a média de idade cronológica da primeira consulta foi de 22 anos e variou de 14 a 34 anos. LH e FSH basais estavam suprimidos em 80% e 60% das pacientes, respectivamente, e apresentava valores intra-púberes no restante dos casos. Os achados clínicos dos pacientes com HHIn estão resumidos na **Tabela 2.**

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com PPDG

Paciente	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP	peso (kg)	Mamas/pênis [#]	PP	EA (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH	LH 2h pós lupron
1	f	5,8	6,6	129,5	11	9	2,46	30	4	2	166	1,9	6,2	53,3		31,5	
2	f	6,5	10,2	131,7	11	9	-0,1	37	4	5	153	4,2		98,8			
3	f	6,8	9,8	141,4	11,5	11	0,7	34,8	3	4	153	1,7	4,6	<13			
4	f	5,5	8	132	11	9	1,21	28,2	3	4	160,5	1	1,9	17,4			8,8
5	f	5	8,2	140	11	10,5	1,9	39,2	4	1	158,5	1,7	3,9	34,6			34,1
6	f	4,5	7	129	7,8	8,7	1,97	26,3	3	1	158,5	<0,6	1,6	<13		11,4	
7	f	6	7,3	129,5	9	8,7	1,31	38,2	3	1	157,5	<0,6		<13		8,1	
8	f	4	5,25	116,5	6,8	6,3	1,25	19,6	3	1	158,5	<0,6	2	<13		16,9	13,4
9	f	6	8,7	141,5	12	10,7	2,1	33,2	4	4	153,5	1,2		19,8			
10	f	1,25	2,66	100,5	6,8	4	2,8	18,3	4	4	168,7	2,6*		4,4		30*	
11	f	0,66	1,66	83	2	1,7	0	12,4	4	3	144,5	1,1	4,3	60,4	<14	21	13,1
12	f	3,17	3,42	106	6,8	5	2,26	19,1	4	1	149	5	9,8	<13		89,7	
13	f	6,25	6,66	124	10	8	1,43	25,7	2	1	?	0,7		45		7,5	
14	f	2,33	7,25	136,4	11	10	3,13	37,7	3	2	155,5	0,9		<13			
15	f	2,33	4,75	118,8	8,8	6,8	2,27	24,7	4	1	160	0,7	1,5	19,1		18,8	
16	f	6	6,42	123,1	8,8	7,6	0,73	26,6	2	2	?	<0,6		<10*		9,5	
17	f	5,8	9,66	135	12	9,6	0,08	39,3	4	3	153,5	0,7	1,7	<13			13,2
18	f	3,2	6,5	136	8,8	10	3,69	30,4	4	3	169,5	<0,6	3,7	<13		4,2	10
19	f	6,5	8,08	136,8	12	10	2,05	33,6	3	3	?	1,5		21,1		76,9	
20	f	6,4	7,83	141,5	11	10,5	3,05	32,8	3	4	?	1		15		12	
21	f	3,2	5,17	129,4	12	8,8	3,5	30	4	3	148	4,9*		14*		23,7*	
22	f	6,7	7,5	128,4	10	8,2	0,9	38,8	3	2	156,5	1,4	2	<13		20	23
23	f	6,8	7,8	125,5	8,8	8,2	0,15	27,9	3	3	153,5	2,8*	4,5	<10*		41*	
24	f	4	6,8	136	9,5	9,5	3,22	31,3	4	3	153	6,1	4,7	62			
25	f	2,3	7,6	140,3	11	10,5	2,67	34,4	2	3	161,5	2,2	6	21		9,8	
26	f	2	4,8	115	8	6,3	2,4	23,3	3	1	?	3,8*	16,3*	23*		28,8*	
27	f	0,3	8,6	131,5	11	9,2	0,63	26,7	4	2	adotiva	0,5	1	22		6,4	8,5
28	m	2,3	5,2	129	13	8,5	4,36	27,9	10,5	4	178,5	1,1	1,1		92		17,7
29	m	1	1,4	85	2,6	1,8	0,5	14,3	2	2	165	11,5*	8,3*		600*	47,2 *	
30	f	5	8,4	133	11	9,5	0,88	30,5	3	2	157	<0,6	<1,0	13		2,3	
31	f	4	7	128,7	11	8,7	1,5	31,3	3	2	155,5	0,7	<1,0	<13			4,2
32	f	6	8,7	157,2	12	10,5	1,6	39,7	5	4	157,2	1,5	5,9	62,2		13,5	
33	f	6	8	127,8	11	8,6	0,5		3	3	?	1		17,4		8	
34	f	6	8,25	128,6	12	8,7	0,4	30,7	3	2	152,25	<0,6	2,7	13,4		5,3	12

35	f		6,8	125	7,8	8	1,2		3	1	?	3,5*		<10*		35,0*	
36	f	7	8	136	12	10	1,9	35	4	3	157,5	1,2	4,1	20,5			50,4
37	f	7	8,7	135,4	11	9,8	0,9	32,6	3	3	154,5	1,2	1,8	13,1		19	
38	f	7	8,9	135,3	11	9,8	0,78	29	3	4	155,5	<0,6	2	40		8	
39	f		8,4	146,7	12	11,8	2,1	51,5	4	5	155,5	5,4	4,4	53,4			
40	m	6	8,1	131	10	8,9	0,83	30,5	8	1	167	1,18	1,53		116		14,1
41	f	2,8	4,25	106,6	6,8	4,8	1,16	19,5	4	1	158	0,6	4,2	18,2		13,5	
42	f	6	9,8	129	11	8,8	-1	27	4	3	147	0,8	3,5	22,2			
43	f	7	8,5	141,8	12	10,8	2,38	42	3	3	adotiva	1,1	5,6	35			10,3
44	f	7	8,6	142,4	11	11	2,3	31,6	3	1	165			17			15,1
45	f	7,3	8	148,5	11	11,8	4	42,2	3	3	171,5	1,5	2,7	<13			45,8
46	f	6,8	8,25	139	11,5	10,3	2,26	38,3	4	3	158,5	1,5	5,6	46,3			
47	f	6,8	7,5	129,5	8,8	8,8	1,3	30,8	3	1	157,3	1,2	3,9	15		27,6	
48	f	5	7,65	135,1	11,4	9,8	2,1	27	4	1	148,5	1,6	2,8	26,8		29,4	
49	f	5	7,8	127,2	10	8,3	1,6	28	4	3	?	1,6	4,7	29			23,5
50	f	6	7,8	143,5	11	11,2	3,4	31,1	3	3	168	<0,6	1,2	<13		6,9	7,7
51	f	7	8	135	11	9,5	1,7	25,5	3	1	153	<0,6	3,4	38		9,9	
52	m	8	10,75	150	13,5	12,5	1,4	43,2	9	4	166,2	1,7	1,8		312		
53	f	6	6,7	120,9	8,8	7,2	0,5	27,1	3	2	156,5	1,6	4,6				
54	f	7	9,7	135	11	9,8	0	28,9	4	3	160	3,7	3,6	16			
55	f	6	8,25	142,6	11	11	2,7	36,5	3	3	174,5	2,1	1,2	15			
56	f	5	9,1	143,2	12	11,1	1,92	39,6	3	3	170,5	0,9	4,1	22			27,8
57	f	6	8,5	141	10	10,8	1	30	4	3	158,2	<0,6	3	<13		24	
58	f	6	7,6	130	11	9	1	30,7	3	2	149	<0,6	<1,0	14,4		3,3	4,4
59	f	6,2	7	114	7	6,2	0	19,8	3		?	<0,6	1,13	13,2		36	
60	f	7,7	8,25	133,2	11	9,4	1,08	28,6	3	3	166,5	<0,6	4,2	31	<11		17,6
61	f	7,6	7,75	132,2	8,8	9,3	1,42	33,6	3	2	163,5	1	5,3	69,9			
62	f	6,7	7,3	133,2	8,8	9,5	2,18	33,8	4	2	155,6	0,3	3,7	27,2		16,91	16
63	f	3	7,5	133,3	11,6	9,5	2	33,3	2	1	160,5	0,8	5,4	33		4,1	8,6
64	f	8	8,5	121	11	7,3	-1,1	24	3	1	149,2	<0,6	3,1	34,2			16,3
65	f	7	9,1	142,5	11	11	1,8	43,6	4	3	163,2	0,7	3,6	30		5,1	
66	f	7	8,25	133	11	9,4	0,9	31,6	3	2	?	0,6	3,5	46			
67	f	0	8,3	132,2	11	9,3	0,9	28	4	1	158,5	1,3	3	14,6		15,1	

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

* Exames realizados por radioimunoensaio (RIE). Os demais exames foram realizados por IFMA.

Tabela 2. Características clínicas e hormonais de 61 pacientes não relacionados com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósico

Características clínicas	Homens (n=41) (média ±DP)	Mulheres (n=21) (média ±DP)
Idade do diagnóstico (anos)	24 ± 6,6	22 ± 6,4
Altura (cm)	170,5 ± 10	156,4 ± 8,1
IO (anos)	15,5 ± 1,7	12,4 ± 2,1
Mamas (Estádio de Tanner)	*	2,2±1,5
Pênis (cm)	6,3 ± 3,3	
Gônadas D/E (cm)	2,8 ± 0,8/ 2,7 ± 0,9	1,8 ± 0,9/ 1,8 ± 0,5
Pêlos pubianos (Estádio de Tanner)	2,9 ± 0,9	2,9 ± 1,3
Familiar (%)	15%	19%

* ginecomastia em 17,5% dos casos

3.2 – Avaliação hormonal

O diagnóstico laboratorial dos distúrbios do desenvolvimento puberal foi baseado nas dosagens das gonadotrofinas (LH e FSH) e dos esteróides sexuais (estradiol e testosterona). No 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 de LH e FSH basais e após estímulo com GnRH considerados normais, estão descritos nas **Tabelas 3 e 4**.

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 (79); LH_(delta) após estímulo com GnRH > 15 U/L e estradiol > 10 pg/mL para o RIE (80). 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 (79); LH_(delta) após estímulo com GnRH > 15 U/L e testosterona > 10 ng/dL para o RIE (80). Adicionalmente, LH > 10 U/L, dosado 2 horas após administração da primeira ampola de acetato de leuprolida 3,75 mg via subcutânea, também foi considerado como resposta puberal para ambos os sexos (81).

Valores de esteróides sexuais abaixo do limite normal associado a concentrações inapropriadamente normais ou baixas de LH e FSH, basais ou após estímulo com GnRH (**Tabelas 3 e 4**), na ausência de deficiências combinadas dos hormônios hipofisários, foram os critérios hormonais adotados para a determinação do diagnóstico de HHIn.

Tabela 3. 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 4. 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.

3.2.1- Dosagem de kisspeptina plasmática

As concentrações de kisspeptina plasmática foram avaliadas em quatro gestantes, 20 indivíduos adultos com história de desenvolvimento puberal normal (10 mulheres e 10 homens). Adicionalmente um indivíduo do sexo masculino com 15 anos de idade e desenvolvimento puberal normal e o paciente do sexo masculino portador de PPDG com uma mutação no gene *KISS1*, após o final do tratamento e desenvolvimento puberal completo, aos 15 anos de idade. As amostras de plasma foram colhidas em tubos gelados contendo 1mg/mL EDTA agitados suavemente, imediatamente transferidas para tubos de centrifugação contendo leupeptina, para inibição de proteases, centrifugadas a 1600 x g por 15 min a 4°C e estocadas a -70°C até a realização do ensaio.

A concentração de kisspeptina plasmática foi determinada pelo método de radioimunoensaio (RIE), utilizando-se o produto comercial *KISS-1 (68-121)-Amide/Metastin (1-54)-Amide (Human) RIA (Phoenix Pharmaceuthicals Belmont, CA, EUA)*, de acordo com as instruções do fabricante. Este é um ensaio competitivo, realizado em fase líquida, utilizando-se kisspeptina marcada com ¹²⁵I e anticorpos policlonais dirigidos ao fragmento 1-54 da kisspeptina. O coeficiente de variação (CV) intra-ensaio foi < 8%.

3.3 – Pesquisa de mutações

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 ressuspensão 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 ressuspensão em TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria com luz ultravioleta (*Ultrospec III – Pharmacia Biotech, EUA*); o grau de pureza foi avaliado pela relação A260/280. A integridade do material foi verificada com eletroforese em gel de agarose 1% e visualização por transiluminação com luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídio. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização.

3.3.2 - Amplificação de DNA genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico obtido foi utilizado como substrato para a amplificação dos três exons do gene *KISS1* e da região promotora proximal, incluindo 1 kb da região 5' a montante do sítio de início de transcrição, por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos (**Tabela 5**).

Tabela 5. Oligonucleotídeos usados para amplificação do gene *KISS1*

Região amplificada	Oligonucleotídeos específicos
Região promotora 2	KISSpro2-f 5'-GAG CGT CCT GTC TGA GGG TA-3'
	KISSpro2-r 5'-AGA GAG GGG ACT TCC AGG TG-3'
Região promotora 1	KISSpro1-f 5'-ACC TGG AAG TCC CCT CTC TG-3'
	KISSpro1-r 5'-AGC CTC TGA GGT GAC GAG AC-3'
Exon1	KISS 1-f 5'-GGGCTTTATAAAAGGGATGTG-3'
	KISS 1-r 5'-GTCTTAGAACGGATTCCCTG-3'
Exon 2	KISS 2-f 5'-CAGATCCTGTGCCTGACCT-3'
	KISS 2-r 5'-TTGCAACAACCCACTTGCT-3'
Exon 3	KISS 3-f 5'-GTGTTGCAAAGCCATCTTTC-3'
	KISS 3-r 5'-TCTTTTATTGCCTCGGGTTG-3'

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25 U de enzima *Taq polimerase* (Amersham Pharmacia, Upsala, Suécia) e tampão da reação fornecido pelo fabricante contendo 1,5 mM de MgCl₂. Para a amplificação do exon 3 foi utilizada a enzima *Platinum[®] Taq PCRx DNA polimerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), específica para amplificação de regiões ricas em GC, 2,5 µL do tampão *10X PCRx Amplification Buffer* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e 1,5 Mm de MgSO₄. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento variando de 55 a 59°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

3.3.3 - Sequenciamento 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, utilizando-se

o produto comercial *EXO-SAP* contendo as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* e exonuclease I (*Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA*). A reação de Sequenciamento foi realizada utilizando o produto comercial *ABI Prism™ BigDye Terminator* (*Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA*). Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer* (*Perkin Elmer, Foster City, CA*). As sequenciais obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information (NCBI)*.

3.3.4 - Análise estatística dos polimorfismos

Para comparar as frequências genotípica e alélica dos polimorfismos no *KISS1* entre pacientes com PPDG, HHI e controles, foram considerados apenas indivíduos não relacionados, incluindo somente o propósito de cada família com PPDG, totalizando 64 pacientes com PPDG e 61 pacientes com HHI. A distribuição genotípica e a frequência alélica entre pacientes com PPDG ou HHI e o grupo controle foram avaliadas em tabelas de contingência, pelo teste exato de Fisher ou pelo teste qui-quadrado (χ^2). Para a análise dos dados, foi utilizado o programa *GraphPad InStat3* (*San Diego, CA, EUA*). Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

3.4 - Estudos de expressão

3.4.1 - Extração de RNA

3.4.1.1 - Extração de RNA de placenta

Para a obtenção do DNA complementar (cDNA) do *KISS1*, RNA total foi extraído a partir de placenta humana utilizando-se o reagente *Trizol* (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), de acordo com as instruções do fabricante. Fragmentos de placenta conservados em nitrogênio líquido foram pesados e colocados em *Trizol* na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Em seguida, procedeu-se a homogeneização dos tecidos através de homogeneizador elétrico rotativo (*Biospec Products, Bartlesville, OK, EUA*) e a extração do RNA conforme, como descrito a seguir: o tecido homogeneizado em *Trizol* foi colocado em um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de *Trizol*, seguido de agitação manual por 15 segundos e centrifugação. Após a centrifugação, observou-se a separação da amostra em três fases. A fase aquosa (onde está o RNA total) foi retirada cuidadosamente e transferida para outro tubo. Adicionou-se isopropanol (0,5 mL para cada mL de *Trizol*) e após centrifugação (10 minutos a 20.000 x g, a 4°C), observou-se a formação de um “*pellet*”, que corresponde ao RNA total precipitado. Em seguida, o “*pellet*” foi lavado com etanol 75%, novamente centrifugado (7500 x g por 5 minutos a 4°C) e seco. Procedeu-se então a dissolução do *pellet* resultante em 50 µL de água tratada com DEPC.

3.4.1.2 - Quantificação do RNA

O RNA foi quantificado por leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, com luz ultravioleta (*Ultrospec III – Pharmacia Biotech, EUA*); o grau de pureza foi avaliado pela relação A260/280 (considerou-se uma relação 260/280 OD como satisfatória entre os valores de 1,8 e 2). Para verificação da integridade das amostras, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1%. Foram consideradas íntegras aquelas amostras que apresentaram as bandas ribossomais 18S e 28S intactas à visualização por transiluminação com luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídio. As amostras foram conservadas a -80°C.

3.4.1.3 - Tratamento com DNase

Para eliminar a possibilidade de contaminação com DNA genômico ou plasmidial (no caso do RNA de células transfectadas), as amostras de RNA total foram tratadas com DNase utilizando-se o produto comercial *Turbo DNA-free (Ambion, FosterCity, CA, USA)* de acordo com as instruções do fabricante, como descrito a seguir: após a quantificação do RNA, as amostras foram diluídas para 10 µg em 50 µL (200 ng/µL). Foram adicionados 0,1 volume de tampão *10x TURBO DNase buffer* e 1 µL de *TURBO DNase* e a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida foi adicionado 0,1 volume de reagente inativador da DNase e a reação foi incubada por 2 minutos em temperatura ambiente e centrifugada por 90 segundos. O sobrenadante, contendo o RNA tratado, foi transferido para um novo tubo.

3.4.2- Síntese de cDNA

A síntese de cDNA total realizada por transcrição reversa utilizando-se o produto comercial *High-capacity cDNA archive* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), de acordo com as instruções do fabricante. Quatro microgramas de RNA total de cada amostra foram reversamente transcritos, utilizando-se oligonucleotídeos randômicos fornecidos pelo fabricante, em um volume final de 50 µl.

3.4.3- Amplificação do cDNA do *KISS1*

O cDNA do gene *KISS1* foi amplificado por PCR a partir do cDNA total de placenta utilizando-se o seguinte par de oligonucleotídeos: KISScDNA-f 5'-CTCTTGAGACCGGGAGCCCA-3' e KISScDNA-r 5'-TCACTGCCCCGCACC TGC-3', englobando toda a sequência do RNAm do gene *KISS1*. A reação foi realizada num volume final de 25 µL utilizando-se 100-200 ng de cDNA, 100 µmol de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 5 µL tampão de PCR 1x e 1,25 U de enzima *Taq polimerase*. A amplificação foi realizada em um aparelho *GeneAmp PCR System 2400* (*Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA*). O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado por transiluminação em luz ultravioleta.

3.4.4 - Clonagem e transformação

O cDNA do *KISS1* foi clonado e transformado no vetor de expressão de células eucarióticas *pcDNA3.1/V5-HisTOPO TA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Em um microtubo contendo bactérias *E. coli* quimicamente competentes, foram adicionados 4 µl de produto de PCR (cDNA do *KISS1*) e 1 µl do vetor. A solução foi incubada em temperatura ambiente por 5 minutos, em seguida incubada no gelo por 30 minutos, submetida a choque térmico a 42°C por 30 segundos e imediatamente colocada no gelo novamente. Em seguida foram adicionados 250 µl de meio SOC a reação foi deixada em agitação (200 rpm) a 37°C por 1h. 80 µl da reação de transformação foram estriados em uma placa de Petri (diâmetro de 10 cm) com meio LB-Agar contendo ampicilina, que foi incubada a 37°C durante 12h. A seleção de clones positivos foi realizada através de PCR com oligonucleotídeos flanqueando a região do inserto e Sequenciamento automático, confirmando a sequência e direção correta do inserto. A colônia escolhida foi colocada em meio de cultura LB com ampicilina para proliferação de bactérias resistentes e posteriormente os plasmídeos contendo o cDNA do *KISS1* (pcDNA 3.1-*KISS1*wt) foram isolados utilizando-se o produto comercial *QIAprep Miniprep Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). DNA plasmidial isolado foi novamente sequenciado, confirmando da sequência correta.

3.4.5- Mutagênese sítio dirigida

O vetor pcDNA 3.1-*KISS1*wt foi utilizado como substrato para mutagênese sítio dirigida utilizando-se o produto comercial *QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, Ca, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Para inserção das mutações c.369C>T e c.417C>G foram utilizados os seguintes pares de oligonucleotídeos específicos: KISSMUT-f 5'-CCTCGCTGTCCCCGTCCCCCGAGAGCTCC-3', KISSMUT-r 5'- GGAGCTCTC GGGGGACGGGGACAGCGAGG - 3' ; e KISSMUT2-f 5'-TGTCCGCCCCCGACAGCC GCCAG-3' e KISSMUT2-R 5'-CTGGCGGCTGTCTGGGGGCGGACA-3', respectivamente. Os produtos das reações de mutagênese foram submetidos a transformação e os plasmídeos purificados, como descrito na sessão anterior. A inserção das mutações foi confirmada por sequenciamento direto e os plasmídeos contendo os cDNAs selvagem e mutantes do *KISS1* foram posteriormente purificados utilizando-se o produto comercial *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA).

3.4.6- Transfecção

Com o intuito de comparar a expressão do RNA e protéica do *KISS1* selvagem e mutante, os vetores contendo as sequências selvagem (pcDNA 3.1-*KISS1*wt) e mutante (pcDNA 3.1-*KISS1*P74S) do cDNA do *KISS1*, e um vetor vazio (pcDNAempty) foram transfectados transitoriamente em células de rim embrionário humano (HEK-293). As células foram mantidas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's*

Medium (DMEM), suplementado com soro fetal bovino a 10% e incubadas a 37°C, em 5% CO₂. As células foram transferidas para placas de seis poços 24 horas antes da transfecção, na concentração de 5 x 10⁵ células por poço. A transfecção foi realizada com 0,2 µg de cada vetor (pcDNA 3.1-*KISS1wt* e pcDNA 3.1-*KISS1P74S*), em triplicata, em células HEK-293 70% confluentes, utilizando-se Lipofectamina 2000 (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*). Para análise da expressão protéica foram transfectados 2 µg de cada vetor.

3.4.7 – Análise da expressão protéica por radioimunoensaio (RIE)

Para a análise da secreção de kisspeptina pelas células transfectadas com o cDNA do *KISS1*, o meio de cultura foi trocado 24h após a transfecção e 48h depois o meio condicionado foi coletado em tubos contendo coquetel de inibidores de protease (*Roche Applied Science, Indianapolis, IN, EUA*) e armazenados a -80°C. A concentração de kisspeptina no meio condicionado foi dosada por RIE para kisspeptina humana, com duplo anticorpo, desenvolvido na *Reproductive Endocrine Unit (REU)* do *Massachusetts General Hospital (MGH)*, (*Boston, MA, EUA*). O coeficiente de variação (CV) inter-ensaio foi de 6.5% e o CV intra-ensaio foi de 7.9%.

Para o RIE, Kisspeptina-54 humana foi sintetizada pela *Tufts University (Boston, MA, EUA)*. Anticorpo de coelho anti-kisspeptina 1-25 humana (N-terminal) foi desenvolvido no *MGH (Boston, MA, EUA)*. Anticorpo de coelho anti-metastina 45-54 (kisspeptina-10) (C-terminal)

foi comprado da *Phoenix Pharmaceuticals (Belmont, CA, EUA)* e posteriormente marcado com ^{125}I . O anticorpo marcado foi armazenado a -20°C e utilizado dentro do período de uma semana. Os padrões de kisspeptina 54 e as amostras foram diluídas em PBS e plasma humano livre de kisspeptina (1:1).

Para a realização do ensaio, placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos anti-kisspeptina 1-25 ($0.5\ \mu\text{g/poço}$) dissolvidos em tampão de ligação (15 mM de carbonato de sódio e 35 mM de bicarbonato de sódio, $\text{pH} = 9,6$) e incubadas a 4°C por 12 a 16h. As placas foram lavadas duas vezes com PBS e bloqueadas com solução a 1% de albumina de soro bovino (BSA) em PBS ($200\ \mu\text{L/poço}$) e novamente incubadas a 4°C por 12 a 16h. Após nova lavagem, foram adicionados 100uL de padrão de kisspeptina-54 ou amostra em cada poço, em triplicata, e a placa foi mais uma vez incubada a 4°C por 12 a 16h e lavada duas vezes com Tween-20 0,01% em PBS e duas vezes com PBS. Anticorpo anti-metastina 45-54 (kisspeptina-10) marcado com ^{125}I (200.000-220.000 cpm/100 μl) foi adicionado. Após incubação em temperatura ambiente por 2h, a placa foi lavada quatro vezes com Tween-20 0,01% em PBS, duas vezes com PBS e procedeu-se a leitura em um contador gama. Os valores obtidos foram corrigidos pelo conteúdo de proteínas totais de cada amostra.

Os resultados do RIE foram analisados com o auxílio do programa *GraphPad Prism 3.0 (San Diego, CA, EUA)*. As dosagens foram realizadas em triplicata em cada ensaio e a para a análise estatística foi utilizado o teste qui-quadrado (χ^2), com um valor de $p < 0,05$ aceito como

estatisticamente significativa.

3.5 - Estudos de sinalização (ensaio de fosfato de inositol)

Kisspeptina-54 humana selvagem (kp54-wt) e contendo as mutações P74S (kp54-P74S) e H90D (kp54-H90D) foram sintetizadas quimicamente (*Tufts University, Boston, MA, EUA*). Uma linhagem de células CHO transfectadas estavelmente com o receptor GPR54 (CHO-GPR54) foi estabelecida na *Division of Hypertension, Diabetes and Endocrinology* do *Brigham and Women's Hospital (BWH)*. As células foram mantidas em meio de cultura DMEM/F12 (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos penicilina/streptomicina 1mg/mL e neomicina 800 µg/mL em placas de 6 poços e incubadas a 37°C, em 5% CO₂. O meio de cultura das células foi substituído por DMEM sem inositol. As células foram incubadas a 37°C por duas horas e em seguida, 2 µCi/ml de mioinositol marcado com trício (myo-(2-³H)-inositol) (*Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA*) foram adicionado às células, seguidos de 10 mM de cloreto de lítio após 15 minutos. Após incubação por 12 a 18 horas As células foram então estimuladas com doses crescentes (10⁻¹¹ a 10⁻⁷ M) de kp54-wt, kp54-P74S ou kp54-H90D, em triplicata, por uma hora. Após o período de estimulação, as células foram lisadas com ácido fórmico, os extratos celulares foram neutralizados, centrifugados e tiveram seu conteúdo protéico quantificado. O sobrenadante de cada poço foi carregado em colunas de resina para troca de ânions AG-X8 (*Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, EUA*), previamente equilibradas. As colunas foram lavadas

quatro vezes e o inositol total foi eluído. O acúmulo de inositol total radioativo foi medido um contador beta, e corrigido pelo conteúdo de proteínas totais das células. Os ensaios de sinalização foram analisados pelo teste de ANOVA bidirecional, seguido do teste de Bonferroni para análise comparativa. A concentração efetiva média (EC_{50}) e o valor máximo de estímulo para as curvas de dose resposta foram calculados utilizando-se o programa *GraphPad Prism* (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.6 - Ensaios de ligação ao receptor

Células CHO-GPR54 foram incubadas com kisspeptina radioativa (100.000 cpm de ^{125}I -kisspeptin-10) (*Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA*) na presença de 10^{-10} a 10^{-5} M de kp54-wt ou kp54-H90D não marcadas em DMEM contendo 10 mM HEPES e 1% BSA por 20 min, em temperatura ambiente. As células foram lavadas seis vezes com 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 (K_d) e a capacidade máxima de ligação (B_{max}) foram calculadas, baseadas na análise de regressão não-linear da análise da competição de ligação, utilizando-se o programa *Prism 3.0 GraphPad* (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 – RESULTADOS

4 – RESULTADOS

4.1 - Pesquisa de mutações no gene *KISS1*

O DNA genômico dos pacientes selecionados foi usado para amplificação dos 3 exons do gene *KISS1*, compreendendo a região 5' não traduzida, codificada pelo exon 1 e parte do exon 2, e toda a região codificadora do gene. A região promotora foi amplificada a partir do DNA dos pacientes portadores de PPDG. Todos os produtos de PCR foram analisados por sequenciamento automático.

No grupo de PPDG, duas novas variantes foram identificadas no exon 3 do gene *KISS1*, ambas localizadas na região correspondente à porção amino-terminal da kisspeptina-54.

4.1.1 Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas

4.1.1.1 Variante *c.374C>T* (*p.P74S*)

A primeira variante identificada foi uma transição de uma citosina por uma timina em heterozigose na posição 374 do cDNA do gene *KISS1* (*c.374C>T*) (**Figura 4**), resultando na substituição de uma prolina por uma serina na posição 74 da kisspeptina-1 (*p.P74S*). Esta variante está localizada na região amino-terminal da kisspeptina-54, em uma sequência PEST, que consiste de uma região rica nos amino ácidos prolina, ácido glutâmico, serina e treonina, associada a proteínas de rápida degradação.

A variante p.P74S foi identificada em um menino com PPDG esporádica. Sua mãe e avó materna eram portadoras da mesma variante, em heterozigose, apesar de apresentarem histórico de desenvolvimento puberal normal. A variante c.374C>T estava ausente nos 400 alelos controles analisados.

Figura 4. Eletroferograma mostrando a substituição de uma citosina por uma timina em heterozigose no exon 3 do gene *KISS1* (c.374C>T), em comparação com uma sequência normal.

4.1.1.2 Apresentação clínica: PPDG associada à mutação p.P74S

Este paciente, do sexo masculino, foi avaliado em nosso ambulatório pela primeira vez com 1,5 anos de idade, apresentando história de início de caracteres sexuais secundários aos 12 meses de idade. Na história pregressa, apresentava relato de parto a termo, por cesariana, sem intercorrências, e peso ao nascimento de 4 kg, sem histórico de convulsões ou outros sintomas clínicos ou neurológicos associados. Nos antecedentes familiares, a mãe do paciente apresentava uma estatura de 151 cm e história de menarca aos 12 anos de idade. A

avó materna, com estatura de 150 cm, teve menarca aos 14 anos de idade. O pai não estava disponível para avaliação, porém foi colhida a informação de estatura e desenvolvimento puberal normais. O paciente é filho único e não há relato de outros casos de puberdade precoce na família. Ao exame clínico, o paciente apresentava pelos pubianos Tanner 3, pênis: 8,0 x 2,0 cm, bolsa escrotal pregueada, testículo direito: 2,3 x 1,5 cm, testículo esquerdo: 2,6 x 1,2 cm, estatura: 85 cm, com DP: 0,5 e idade estatural (IE): 1,7 anos. Exames complementares mostraram: idade óssea (IO): 2,7 anos, LH basal (RIE): 11,5 UI/L, pico de LH após GnRH (RIE): 47,2 UI/L, FSH basal (RIE): 8,3 UI/L, testosterona: 600 ng/dL, precursores androgênicos normais e RM do sistema nervoso central sem anormalidades, em duas ocasiões. O paciente foi tratado com análogo de GnRH (acetato de leuprolida 3,75 mg a cada 28 dias) de 1991 a 2001, com supressão dos valores de gonadotrofinas e testosterona. O tratamento foi interrompido na idade cronológica de 10,7 anos, com IO de 12,5 anos. Aos 16 anos, o paciente havia atingido uma estatura final de 165,6cm (estatura alvo = 165 cm). Acompanhamento clínico prolongado confirmou a ausência de outras condições clínicas ou neurológicas associadas. O resumo da apresentação clínica do paciente portador da variante p.P74S pode ser visto na **Tabela 7**.

4.1.1.3 Dosagem de kisspeptina plasmática

No intuito de verificar se os valores de kisspeptina plasmática do paciente portador da mutação p.P74S estavam elevados em relação à população controle, foi realizada dosagem de kisspeptina plasmática

através de RIE (*Phoenix Pharmaceuticals Belmont, CA, EUA*) do propósito aos 15 anos de idade, de um indivíduo do mesmo sexo e idade, e de 20 adultos normais, sendo 10 mulheres e 10 homens, além de quatro gestantes, que apresentam níveis sabidamente elevados de kisspeptina plasmática (Horikoshi *et al.*, 2003). Os resultados podem ser vistos na **Tabela 6.**

Tabela 6. Dosagem de kisspeptina plasmática por RIE

Indivíduos	kisspeptina-54 (pg/mL)
PPDG tratado (p.P74S)	20,9
Controle pareado	18,9
Adultos normais	22,5 ± 5 (17,5 a 27,5)
Gestantes	>320

Os valores de kisspeptina plasmática se mostraram muito elevados durante o período gestacional, em concordância com achados anteriores (75). Não houve diferença entre os valores de kisspeptina plasmática encontrados no propósito e nos controles não gestantes.

4.1.1.4 Variante c.422 C>G (p.H90D)

Uma segunda variante, c.422 C>G, foi identificada em homozigose em uma menina com PPDG familiar (**Figura 5**). Essa variante também estava localizada no exon 3, levando à substituição de uma histidina por um ácido aspártico na posição 90 da kisspeptina-1 (p.H90D). A mãe da paciente, com histórico de menarca aos 10 anos de idade, era portadora da mesma variante em heterozigose. O pai da paciente não estava disponível para avaliação. A variante c.422 C>G estava ausente nos 400 alelos controles analisados.

Figura 5. Eletroferograma mostrando a substituição de uma citosina por uma guanina em homozigose no exon 3 do gene *KISS1* (c.422c>G), em comparação com uma sequência normal.

4.1.1.5 Apresentação clínica: PPDG associada à mutação p.H90D

Uma menina de 8,2 anos foi avaliada em nosso ambulatório com queixa de telarca aos 6 anos de idade, seguida de pubarca aos 8 anos. Na história pregressa, apresentava relato de parto normal a termo, sem intercorrências e peso ao nascimento de 3,75 kg. Negava exposição a esteroides sexuais, convulsões ou outros sintomas clínicos ou neurológicos. Sua mãe teve menarca aos 10 anos de idade. O exame clínico evidenciou mamas Tanner 4, pelos pubianos Tanner 3, peso: 38,3 kg, altura: 139 cm, com DP: 2,26, correspondendo a uma IE de 10,3 anos. A IO era de 11,5 anos. Sinais adicionais de puberdade, como acne, pêlos axilares e sangramento vaginal estavam ausentes. Não havia outras alterações no exame físico. Os exames complementares mostraram: FSH basal (IFMA): 5,3 UI/L, LH basal (IFMA): 1,5 UI/L, estradiol: 46,3 ng/dL; ultra-sonografia pélvica demonstrou ovários direito e esquerdo com volumes de 1,5 e 2,1 cm³, respectivamente, sem cistos; RM do sistema nervoso central sem anormalidades. Tratamento com análogo de GnRH (acetato de leuprolida 3,75 mg a cada 28 dias) foi instituído por dois anos (dos 8,3 aos 10,4 anos), com resposta satisfatória. Na última consulta, a paciente estava com 11,3 anos de idade, IO de 13 anos e estatura de 154,2 cm (estatura alvo = 158,5 cm). Menarca espontânea havia ocorrido há um mês. O resumo da apresentação clínica da paciente portadora da variante p.H90D pode ser visto na **Tabela 7**.

Tabela 7. Características clínicas dos pacientes com as variantes p.P74S e p.H90D no gene *KISS1*

	p.p.P74S	p.H90D
sexo	masculino	feminino
puberdade	12m	6a
Início de seguimento	18m	8a 3m
	estádio puberal: T3	pp: T3 mamas: T4
	IO: 3a	IO: 11a 6m
Exames	T: 600 ng/dL	FSH: 5,3 UI/L
	FSH (RIE): 8,3 UI/L	LH: 1,5 UI/L
	LH (RIE): 11,5 UI/L	Estradiol: 46,3 ng/dL
	LH pós GnRH: 47,2 UI/L	
RM	normal	normal
Tratamento	Acetato de leuprolida	Acetato de leuprolida

RM: ressonância magnética

4.1.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado

No grupo de HHI, encontramos uma nova variante no exon 3 do gene *KISS1*, em um paciente com HHI esporádico. Foi identificada uma inserção de um timina entre os nucleotídeos das posições 588 e 589 do cDNA do *KISS1*, em heterozigose, c.588-589insT, levando a uma alteração da janela de leitura na região 3' não traduzida do transcrito (**Figura 6**). A variante c.588-589insT estava ausente nos 400 alelos controles analisados.

O paciente portador da variante c.588-589insT apresentou-se aos 20 anos de idade com ausência de pilificação facial, genital e axilar, micropênis e falta de libido. Não apresentava queixas olfatórias e o teste olfativo confirmou olfato normal. Ao exame físico, o paciente apresentava hábito eunucoide, com estatura: 163 cm, PC/PV (relação das medidas

púbis-chão/púbis-vértice): 1,2, peso: 63 kg, testículos menores que 2 cm e micropênis. Exames laboratoriais revelaram LH basal (RIE): 5 UI/L, FSH basal (RIE): 9 UI/L, testosterona: 67 ng/dL e RM de sistema nervoso central sem alterações.

Figura 6. Eletroferograma mostrando a inserção de uma timina em heterozigose no exon 3 do gene *KISS1* (c.588-589insT), em comparação com uma sequência normal.

4.1.3 Polimorfismos

Foram encontradas seis variantes polimórficas exônicas: duas na região 5' não traduzida (c.9delT e c.66G>A) e quatro na região codificadora, não sinônimas (c.212G>A, c.261A>G, c.396C>G e c.571delA) (**Figura 7**). Os polimorfismos exônicos encontrados haviam sido previamente descritos (SNP ID: rs33914690, rs12998, rs35431622, rs1132112, rs4889, ref seq CONTIG NT-004487 www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP e (36)), e não houve diferença estatística nas frequências genotípica e alélica das variantes entre as populações estudadas (PPDG, HHI e controles) (**Tabelas 8 e 9**).

Figura 7. Eletroferograma mostrando as variantes polimórficas identificadas nos 3 exons do gene *KISS1*, incluindo regiões codificadoras e não traduzidas.

Tabela 8. Frequência alélica dos polimorfismos identificados nos exons de 1 a 3 do gene *KISS1* em pacientes com PPDG, HHI e controles

Exon	Nucleotídeo	Localização	PPDG	HHI	Controles
1	c.9delT	5' UTR	T 53,7% _ 46,3%	T 62,3% _ 37,7%	T 64,3% _ 35,7%
1	c.66G>A	5' UTR	G 91,8% A 8,2%	G 95,1% A 4,9%	G 92% A 8%
2	c.212G>A	E20Q	G 97% A 3%	G 97,5% A 2,5%	G 98,2% A 1,8%
3	c.261A>G	Q36R	A 92,5% G 7,5%	A 92,6% G 7,4%	A 95,5% G 4,5%
3	c.396C>G	P81R	C 71,6% G 28,4%	C 70,5% G 29,5%	C 67,2% G 32,8%
3	c.571delA	Omite 7 aa	A 74% _ 26%	A 79,5% _ 20,5%	A 77,2% _ 22,8%

Tabela 9. Frequência genotípica dos polimorfismos identificados nos exons de 1 a 3 do gene *KISS1* em pacientes com PPDG, HHI e controles

Exon	Nucleotídeo	Localização	PPDG	HHI	Controles
1	c.9delT	5' UTR	T/T 28,3% T/_ 50,7% _/_ 21%	T/T 37,7% T/_ 49,2% _/_ 13,1%	T/T 40,5% T/_ 47,5% _/_ 12%
1	c.66G>A	5' UTR	G/G 83,6% G/A 16,4% A/A 0%	G/G 90,2% G/A 9,8% A/A 0%	G/G 85% G/A 14% A/A 1%
2	c.212G>A	E20Q	G/G 94% G/A 6% A/A 0%	G/G 95,1% G/A 4,9% A/A 0%	G/G 96,5% G/A 3,5% A/A 0%
3	c.261A>G	Q36R	A/A 85% A/G 15% G/G 0%	A/A 88,5% A/G 8,2% G/G 3,3%	A/A 92% A/G 7% G/G 1%
3	c.396C>G	P81R	C/C 52,2% C/G 38,8% G/G 9%	C/C 49,2% C/G 42,6% G/G 8,2%	C/C 41,5% C/G 51,5% G/G 7%
3	c.571delA	Omite 7 aa	A/A 58,2% A/_ 31,3% _/_ 10,5%	A/A 62,3% A/_ 34% _/_ 3,7%	A/A 59% A/_ 36,5% _/_ 4,5%

Na região promotora, identificamos quatro variantes polimórficas: -463C>T, -424C>T, -362T>C e -69G>A (**Figura 8**). As SNPs -463C>T, -424C>T haviam sido previamente descritas (SNP ID: rs3924585, rs3924586, ref seq CONTIG NT-004487 www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). As variantes -362T>C e -69G>A são inéditas. As frequências genotípica e alélica das variantes polimórficas encontradas não foram estatisticamente diferentes entre crianças com PPDG e controles (**Tabelas 10 e 11**).

Figura 8. Eletroferograma mostrando as variantes polimórficas identificadas na região promotora do gene *KISS1*.

Tabela 10. Frequência alélica dos polimorfismos identificados na região promotora do gene *KISS1* em pacientes com PPDG e controles

Nucleotídeo	PPDG	Controles
-463 C>T	C 92,5% T 7,5%	C 92,8% T 7,2%
- 424G>A	G 47,8% A 52,2%	G 45,2% A 54,8%
-362T>C	T 94,8% C 5,2%	T 94,3% C 5,7%
-69G>A	G 98,5% A 1,5%	G 98,1% A 1,9%

Tabela 11. Frequência genotípica dos polimorfismos identificados na região promotora do gene *KISS1* em pacientes com PPDG e controles

Nucleotídeo	PPDG	Controles
-463 C>T	C/C 85,1% C/T 14,9% T/T 0%	C/C 85,6% C/T 14,4% T/T 0%
- 424G>A	G/G 29,8% G/A 35,8% A/A 34,4%	G/G 17,3% G/A 55,8% A/A 26,9%
-362T>C	T/T 89,5% T/C 10,5% C/C 0%	T/T 88,5% T/C 11,5% C/C 0%
-69G>A	G/G 97% G/A 3% A/A 0%	G/G 96,1% G/A 3,9% A/A 0%

4.2 - Estudos funcionais

4.2.1 - Quantificação da kisspeptina secretada

O estudo consistiu inicialmente na análise comparativa da secreção de kisspeptina por células de mamíferos transfectadas com vetores contendo as sequências selvagem (pcDNA 3.1-*KISS1wt*) ou mutante (pcDNA 3.1-*KISS1P74S*) do cDNA do *KISS1*.

Kisspeptina-54 secretada no meio condicionado das células transfectadas foi dosada por RIE. Os resultados mostrados são a média de duas transfecções individuais, realizadas em triplicata. Kisspeptina-54 não foi detectada no meio condicionado de células transfectadas com o vetor vazio (controle negativo). Não houve diferença significativa entre

os valores de kisspeptina selvagem e mutante (p.P74S) (Tabela 12 e Figura 9).

Tabela 12. Quantificação por RIE da kisspeptina secretada por células HEK-293 transfectadas com cDNA do *KISS1*

Kisspeptina-54	Concentração (pg/mL)
selvagem	1135 ± 48 (991-1249) *
p.P74S	1180,5 ± 38 (1084-1335) *
vetor vazio	ND [#]

Média ± erro padrão (intervalo); # Não detectável

Figura 9. Quantificação da kisspeptina por radioimunoensaio (RIE): 48h após transfecção transiente com vetores contendo o cDNA do *KISS1* selvagem, mutante ou vetor vazio, o meio de cultura foi coletado e a kisspeptina-54 secretada foi quantificada. Os gráficos representam a média de 3 experimentos realizados em triplicata.

4.2.2 - Estudos de sinalização das variantes p.P74S e p.H90D

Com a finalidade de avaliar a capacidade de sinalização intracelular das kisspeptinas contendo as variantes p.P74S e p.H90D, células CHO-GPR54 foram estimuladas com concentrações crescentes (10^{-10} - 10^{-6} M) de kisspeptina-54 humana selvagem (kp54-wt) e contendo as variantes P74S (kp54-P74S) e H90D (kp54-H90D) por 2 h.

4.2.2.1 Variante p.P74S

Acúmulo máximo de inositol foi observado com 10^{-6} M de kisspeptin-54, tanto selvagem quanto mutante. Não houve diferença significativa entre a kp54-wt e a kp54-P74S na curva dose-resposta ou na resposta máxima, indicando que a presença da variante p.P74S na kisspeptin-54 não afetou a via de sinalização do GPR54 (**Figura 10**).

No intuito de avaliar se a variante p.P74S poderia afetar a estabilidade da kisspeptina-54, em um segundo grupo de experimentos as kisspeptinas kp54-wt e kp54-P74S foram pré-incubadas a 37°C em DMEM suplementado com soro fetal bovino a 10%, por um período de 2 a 12 h antes de serem usadas para estimular as células CHO-GPR54. Ainda assim a capacidade de indução de sinalização da kp54-wt e kp54-P74S permaneceu semelhante, indicando que não houve diferença na degradação da kisspeptina nesse experimento (**Figura 11**).

Figura 10. Produção de fosfato de inositol (IP) total em células CHO-GPR54 estimuladas com doses crescentes de Kp54-WT e Kp54-P74S. O acúmulo de IP total foi medido em contagens por minuto (cpm), 2 h após estímulo com 10^{-10} a 10^{-6} M de kisspeptina-54 humana. Esse gráfico mostra um experimento representativo de seis experimentos independentes realizados em triplicata. As barras representam o erro padrão.

Figura 11. Produção de fosfato de inositol (IP) total em células CHO-GPR54 estimuladas com 5×10^{-9} M de Kp54-WT e Kp54-P74S, em triplicata, 12, 4 e 0h após pré-incubação em DMEM suplementado com soro fetal bovino 10% a 37°C. O acúmulo de IP total foi medido em contagens por minuto (cpm) 2 h após estímulo. As barras representam o erro padrão.

4.2.2.2 Variante p.H90D

Acúmulo máximo de inositol foi observado nas concentrações 10^{-7} M de kp54-H90D e 10^{-6} M de kp54-wt. Foi observado um desvio para a esquerda na curva dose resposta da kp54-H90D em relação à kp54-wt, indicando que a variante p.H90D apresentou uma ativação significativamente mais potente do receptor GPR54 em comparação à kisspeptina-54 selvagem (**Figura 12**).

Figura 12 Produção de fosfato de inositol (IP) total em células CHO-GPR54 estimuladas com doses crescentes de Kp54-WT e Kp54-H90D. O acúmulo de IP total foi medido em contagens por minuto (cpm) 2 h após estímulo com 10^{-10} a 10^{-6} M de kisspeptina-54 humana. Esse gráfico mostra um experimento representativo de seis experimentos independentes realizados em triplicata. As barras representam o erro padrão.

4.2.3 Ensaios de ligação ao receptor

Ensaios de ligação foram realizados com o intuito de comparar a afinidade das kisspeptinas kp54-wt e kp54-H90D pelo receptor GPR54. Os dois peptídeos apresentaram uma constante de dissociação (K_d) similar, indicando que não houve diferença entre a afinidade de ligação das kisspeptinas kp54-wt e kp54-H90D ao receptor em células CHO-GPR54.

5 – DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

A puberdade depende da ativação do eixo gonadotrófico, cujo evento principal é a re-emergência da secreção pulsátil de GnRH. Várias mutações têm sido identificadas em um número crescente de genes envolvidos na regulação do eixo gonadotrófico e, portanto, do início da puberdade (23). Recentemente, uma mutação ativadora no receptor GPR54 foi implicada na patogênese da PPDG, previamente considerada idiopática (34). Essa descoberta trouxe uma nova perspectiva para a fisiologia desse importante período de transição da vida.

A identificação, em 2003, de mutações inativadoras do GPR54 em pacientes com HHI despertou grande interesse na caracterização do papel desse receptor e de seu ligante kisspeptina no controle da função reprodutiva. Atualmente, as kisspeptinas são universalmente aceitas como potentes ativadores do eixo gonadotrófico, apresentando um papel fundamental no início da puberdade e no controle da secreção das gonadotrofinas (46).

Considerando-se a importância do complexo kisspeptina/GPR54 na regulação da secreção do GnRH, e consequentemente no desenvolvimento puberal, é possível que alterações no gene *KISS1* possam contribuir para a patogênese de distúrbios puberais centrais.

5.1 - Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas

No presente estudo, identificamos duas variantes raras no gene *KISS1* em pacientes com PPDG. Pela primeira vez alterações nesse gene foram associadas ao quadro de precocidade sexual.

5.1.1 Variante p.P74S

Uma variante na kisspeptina, p.P74S, foi identificada em heterozigose em um menino brasileiro com PPDG idiopática. A variante p.P74S estava ausente em 200 controles brasileiros, bem como em populações européias e asiáticas, sugerindo que essa alteração não é um polimorfismo (36, 82, 83). Uma variante alélica é considerada um polimorfismo gênico se está presente em mais de 1% de uma determinada população (84). Esse conceito é baseado na frequência populacional e não leva em conta os efeitos patogênicos de uma variante (84). Analisando-se 200 indivíduos, ou 400 alelos, podemos afirmar com um intervalo de confiança de 98,2% que não temos um alelo polimórfico de frequência populacional igual ou maior a 1% (84).

A mãe e a avó materna do paciente eram portadoras da mesma alteração em heterozigose (p.P74S), apesar de não apresentarem história de puberdade precoce. Estes achados sugerem penetrância incompleta ou fenótipo sexo-dependente, em concordância com o estudo de de Vries *et al.* (17) que sugere um modo de herança complexo para a puberdade precoce central familiar. Devemos considerar ainda a possibilidade da presença de algum outro fator genético não identificado, que possa contribuir para o fenótipo desse paciente, como alterações em regiões

regulatórias do gene *KISS1* ou, até mesmo, alterações associadas em outro gene envolvido na regulação do eixo gonadotrófico, considerando-se o modelo digênico ou oligogênico, descrito recentemente em casos de HHI (27).

O potencial patogênico da variante p.P74S é reforçado por diversos fatores: (1) a gravidade dos achados fenotípicos, (2) a importância fundamental do gene *KISS1* no desenvolvimento puberal, (3) a presença exclusiva da variante P74S no fenótipo de PPDG e, finalmente, (4) a localização da mutação em uma região potencialmente importante para a regulação da degradação proteolítica.

PPDG no sexo masculino, em especial abaixo dos quatro anos de idade, é geralmente secundária a lesões anatômicas do SNC, principalmente hamartomas hipotalâmicos. A presença de PPDG idiopática em um menino que apresentou desenvolvimento puberal extremamente precoce (12 meses de idade), com valores muito elevados de testosterona e gonadotrofinas basais, associados a RM normal do SNC, sugere uma causa genética para a puberdade precoce.

A dosagem de kisspeptina plasmática não revelou diferenças nos valores encontrados no paciente portador da mutação p.P74S e nos controles não gestantes, o que poderia ser atribuído ao fato do paciente já se encontrar com puberdade completa, em idade adulta na ocasião da dosagem. Podemos também levantar a hipótese de que os níveis periféricos de kisspeptina plasmática não refletem os níveis hipotalâmicos-hipofisários.

Análise comparativa da sequência de aminoácidos da kisspeptina mostrou que a prolina na posição 74 é altamente conservada entre os mamíferos, como mostrado na **Figura 13**. A prolina é um aminoácido com características únicas, no qual o átomo de nitrogênio está incorporado em um anel, causando uma transição drástica na direção da cadeia polipeptídica (85, 86). Consequentemente, a perda de uma prolina pode levar a uma alteração importante na estrutura da proteína. Além disso, essa mutação leva a uma substituição de um amino ácido hidrofóbico (prolina) por um aminoácido hidrofílico (serina).

A mutação p.P74S está localizada na região amino-terminal da kisspeptina-54, que não está diretamente envolvida na ligação ao receptor. Contudo, essa região provavelmente contribui para outros processos biológicos, como a regulação do processamento e secreção do peptídeo ativo ou a estabilização e proteção contra a digestão proteolítica (36, 41). Reforçando essa linha de raciocínio, é interessante observar que o aminoácido mutado está localizado em uma sequência PEST, uma região rica nos amino ácidos prolina (P), ácido glutâmico (E), serina (S) e treonina (T), associada com proteínas de rápida degradação (87, 88). Portanto, uma alteração nessa região poderia levar a uma mudança na cinética de degradação da kisspeptina, com aumento de sua meia-vida e, consequentemente maior ativação do receptor.

Figura 13. Alinhamento da sequência de amino ácidos da kisspeptina de diferentes espécies de mamíferos. As fontes das sequências são: *Homo sapiens* (GenBank, NP_002247.2), *Pan troglodytes* (GenBank, XP_514123.1), *Macaca mulatta* (GenBank, XP_001098284.1), *Bos taurus* (GenBank, XP_872566.1), *Rattus norvegicus* (GenBank, NP_859043.1) e *Mus musculus* (GenBank, NP_839991.1). A prolina na posição 74, substituída na variante p.P74S, está destacada em vermelho e a histidina na posição 90, substituída na variante p.H90D, está destacada e em amarelo. Adaptado de Roa *et al.* (89)

5.1.2 Variante p.H90D

A segunda variante, c.422 C>G, foi identificada em homozigose em uma menina brasileira que desenvolveu PPDG aos seis anos de idade. Essa variante também está localizada no exon 3 do *KISS1*, levando a substituição de uma histidina não conservada por um ácido aspártico na posição 90 da kisspeptina-1 (p.H90D), correspondendo à região amino-terminal da kisspeptina-54 (**Figura 13**). A mãe da paciente, que apresentou desenvolvimento puberal limítrofe, era portadora da mesma variante em heterozigose. Essa mutação acarreta na troca de um amino

ácido polar (histidina) por um aminoácido apolar (ácido aspártico). A variante p.H90D estava ausente em 200 controles brasileiros, sugerindo que essa alteração também não é um polimorfismo.

A paciente, apesar de apresentar a mutação em homozigose, desenvolveu o quadro de PPDG mais tardiamente, em relação ao paciente com a mutação p.P74S. Pode-se supor que a mutação p.H90D induza a um menor ganho de função em comparação com a mutação p.P74S e, nesse caso, seria necessária a presença da alteração em homozigose para ativação precoce da secreção de GnRH.

Outra linha de raciocínio envolve a questão do dimorfismo sexual na expressão do gene *KISS1*. Atualmente é bem estabelecido que a kisspeptina é diferencialmente expressa no núcleo AVPV, com uma expressão até 10 vezes maior no sexo feminino (68, 69). Podemos especular que mutações do gene *KISS1* levariam a diferentes graus de alteração da função da kisspeptina no hipotálamo no sexo feminino e no sexo masculino, levantando a questão da possibilidade de um fenótipo sexo-dependente.

O fato das duas mutações identificadas em pacientes com PPDG estarem localizadas na região amino-terminal reforça a hipótese de que essa região seja importante na função da kisspeptina, afetando provavelmente a regulação da meia vida, estabilidade ou biodisponibilidade do peptídeo.

Potenciais mecanismos de ativação dessas mutações incluem: aumento dos níveis de RNAm devido a um aumento da transcrição e/ou

diminuição da degradação, aumento da biodisponibilidade da kisspeptina devido a um aumento na produção e secreção, maior estabilidade (resistência a degradação), aumento de afinidade pelo receptor ou aumento de ativação e sinalização pós-receptor.

5.1.3 Estudo funcional da variante p.P74S

Com o objetivo de avaliar a hipótese de um aumento da produção ou da estabilidade da kisspeptina como mecanismo de ativação, planejamos um estudo funcional, que consistiu inicialmente na análise comparativa da expressão do RNAm do gene *KISS1* e seu produto proteico *in vitro*.

Diversas tentativas utilizando-se PCR em tempo real foram realizadas no intuito de comparar a expressão do RNAm do *KISS1* selvagem e mutante *in vitro*. RNA foi extraído de células HEK293 transfectadas com vetores contendo o cDNA do *KISS1* selvagem (pcDNA 3.1-*KISS1wt*) e com a variante p.P74S (pcDNA 3.1-*KISS1P74S*). Os níveis de RNAm do *KISS1* mutante se mostraram inicialmente mais elevados do que o selvagem 48 h após a transfecção, sugerindo que a variante p.P74S poderia aumentar a produção ou a estabilidade do RNAm do *KISS1*. Entretanto, os resultados preliminares não se mostraram reprodutíveis.

Para quantificar a produção, secreção e estabilidade das kisspeptinas selvagem e contendo a variante p.P74S, os níveis de kisspeptina foram dosados no meio de cultura das células transfectadas, utilizando-se RIE. A variante p.P74S não alterou a capacidade de

produção e secreção da kisspeptina. No entanto, os estudos *in vitro* podem não reproduzir o ambiente fisiológico e a maquinaria necessária para degradação da kisspeptina *in vivo*. Estudos em modelos animais podem ser necessários para avaliar a hipótese de aumento de kisspeptina disponível para ativação do receptor GPR54 como mecanismo de aumento de função.

Na avaliação da capacidade de indução da sinalização do receptor *in vitro*, não houve diferença significativa entre as kisspeptinas selvagem e mutante na curva dose-resposta ou na resposta máxima, indicando que a presença da variante p.P74S na kisspeptina-54 não afeta a via de sinalização do GPR54, nem a afinidade de ligação ao receptor. No entanto, a ausência de diferença de resposta do receptor a concentrações iguais de kisspeptina selvagem e mutante não descarta totalmente a hipótese de um papel ativador para essa mutação. De acordo com a nossa hipótese, um aumento de expressão da kisspeptina mutada associado à sinalização e ligação ao receptor preservadas, poderia levar a uma maior disponibilidade de kisspeptina para ativação do receptor.

Em uma tentativa de comparar a estabilidade das kisspeptinas selvagem e contendo a variante p.P74S, o ensaio de sinalização foi repetido, realizando-se uma pré-incubação dos peptídeos kp54-wt e kp54-P74S em meio de cultura celular contendo soro fetal bovino, a 37°C, por um período de 2 a 12 h, antes do estímulo do receptor. Além de não ter sido observada uma diferença na capacidade de sinalização entre as kp54-wt e kp54-P74S, é interessante notar que, mesmo após 12 horas de incubação, ambos os peptídeos mantiveram sua atividade

praticamente intacta. Esses achados sugerem que a kisspeptina-54 é estável a 37°C e que os componentes do meio de cultura (DMEM) suplementado com soro fetal bovino possivelmente não contêm as enzimas necessárias para sua degradação.

5.1.4 Estudo funcional da variante p.H90D

Na avaliação da indução de sinalização do receptor *in vitro*, observamos que a variante p.H90D apresentou uma ativação significativamente mais potente do receptor GPR54 em comparação com a kisspeptina-54 selvagem. Em contraste, nos ensaios de ligação ao receptor, as kisspeptinas kp54-wt e kp54-H90D apresentaram afinidades semelhantes pelo GPR54, sugerindo que a diferença na potência de ativação da sinalização se deve a algum outro mecanismo, que não um aumento na afinidade de ligação ao receptor, ainda a ser elucidado. Um aumento de afinidade pelo receptor não seria de fato esperado, já que as mutações estão situadas fora do domínio de ligação ao receptor. Além disso, um aumento na afinidade de ligação poderia levar a uma dessensibilização do receptor, uma vez que a secreção de kisspeptina é provavelmente pulsátil e o estímulo contínuo e prolongado do receptor GPR54 pode induzir à internalização e/ou degradação do receptor (34). De fato, foi demonstrado que a infusão contínua de kisspeptina leva a uma redução nos níveis de LH em macacos (90).

Os nossos achados sugerem que a variante p.H90D resulta em um ganho de função da kisspeptina por meio de um aumento na via de

sinalização do GPR54 por mecanismos independentes da afinidade de ligação. Como mecanismo de ativação, podemos especular que a mutação p.H90D poderia aumentar a estabilidade ou alterar o padrão de ligação da kisspeptina, fazendo com que ela se ligue e desligue com maior frequência ao receptor, resultando em maior disponibilidade do ligante.

5.2 – Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI)

No grupo de HHI, foi identificada uma alteração em heterozigose (c.588-589insT) na região 3' não traduzida do *KISS1*. Como esta variante está localizada na região não codificadora do transcrito do *KISS1*, a princípio consideramos essa alteração desprovida de potencial patogênico e, por essa razão, não foi realizado estudo funcional. Além disso, o fato da alteração ter sido identificada em heterozigose desfavorece a hipótese de que a variante c.588-589insT isoladamente seja a causa da doença. Não se pode, porém, descartar totalmente a possibilidade de que essa alteração contribua de alguma maneira para o fenótipo de HHI. A perda da função da kisspeptina, levando a uma deficiência na secreção de GnRH, seria provavelmente associada à inativação de ambos os alelos do gene *KISS1* (autossômica recessiva). Mutações crípticas em regiões regulatórias ou intrônicas afetando o outro alelo do *KISS1* poderiam resultar em inativação do segundo alelo, levando perda de função completa do gene. Não podemos deixar de considerar ainda a possibilidade de mutações em outros genes participantes da cascata regulatória do eixo gonadotrófico, que também poderiam contribuir para

o fenótipo, levando em conta o modelo digênico (27). Entretanto, a análise dos genes *FGFR1*, *KAL1*, *GnRHR*, *GPR54*, *PROK2* e *PROKR2* nesse paciente não revelou alterações adicionais (26, 34, 91-94).

Apesar do *KISS1* ser um gene candidato óbvio para pesquisa de mutações no HHI, até o momento nenhuma mutação comprovadamente inativadora desse gene foi demonstrada. Em 277 pacientes com HHI esporádico ou familiar investigados, apenas uma inserção de 20 nucleotídeos em homozigose na região 3' terminal da sequência codificadora do gene *KISS1* foi identificada em um menino com micropênis e criptorquidismo bilateral (36, 82). Essa alteração gera uma sequência duplicada que não altera o tamanho ou a sequência da proteína traduzida. Além disso, nenhum estudo funcional referente a esse achado foi publicado.

A variante c.588-589insT e a duplicação de 20 pb, estão localizadas na região 3' do gene *KISS1*. É possível que essa região exerça um papel regulatório na transcrição do gene. A importância dessas variantes poderá ser esclarecida em estudos funcionais futuros.

5.3 – Polimorfismos (SNPs)

O *KISS1* é um gene polimórfico com variações nucleotídicas descritas tanto na região codificadora quanto na região não codificadora. Na população estudada, identificamos dois SNPs na região não codificadora e quatro SNPs não sinônimos na região codificadora, previamente descritos, porém apenas um deles localizado dentro da sequência da kisspeptina-54 (P81R). Os SNPs encontrados não diferiram

significativamente em frequência nos grupos com PPDG, HHI e controle, sugerindo uma ausência de correlação desses SNPs, pelo menos em um caráter individual, com a regulação do início da puberdade. No presente estudo, a associação de haplótipos específicos com os fenótipos de PPDG não foi avaliada. No entanto, em uma recente apresentação, Nicolas de Roux ¹ mostrou um estudo ainda não publicado sobre haplótipos envolvendo SNPs da região 3' não traduzida em 25 casos de PPDG. Um dos haplótipos apresentou correlação positiva com o fenótipo de PPDG, reforçando um papel potencial para a região 3' não traduzida na regulação da transcrição do *KISS1* e, conseqüentemente, no início da puberdade.

Uma sequência conservada de 1 kb na região 5' a montante do sítio de início de transcrição do *KISS1* foi analisada nos grupos PPDG e controle. Essa região tem despertado interesse crescente devido a presença de sequências consenso de ligação de fatores de transcrição conhecidos, alguns deles associados à regulação da transcrição do *KISS1* em estudos prévios, como o TTF1 e o Sp1 (95, 96). O estrógeno exerce um papel regulatório na transcrição hipotalâmica do *KISS1* através do ER α , porém o mecanismo molecular ainda não é bem estabelecido (97). Foi sugerido que essa regulação ocorre através da interação de ER α e Sp1 com regiões ricas em GC no promotor do *KISS1* (97).

Identificamos quatro SNPs na região promotora do *KISS1*, dois deles inéditos. O SNP -69G>A encontra-se em uma sequência consenso potencial de ligação do Sp1, porém as frequências genotípica e alélica

¹ *First world conference on kisspeptin signaling in the brain*, Cordoba, Espanha, 8 a 10 de outubro de 2008

deste e dos demais SNPs identificados não foram estatisticamente diferentes entre crianças com PPDG e controles.

O presente estudo trouxe novos conhecimentos sobre as bases moleculares da PPDG. Em resumo, identificamos duas novas mutações no gene *KISS1* em pacientes com PPDG, uma delas comprovadamente ativadora *in vitro* (p.H90D). Mutações no sistema kisspeptina/GPR54 são as primeiras causas monogênicas de PPDG descritas em humanos. Como perspectivas futuras, estudos *in vivo* estão sendo planejados no intuito de avaliar melhor o efeito das variantes p.P74S e p.H90D na função da kisspeptina. Modelos animais, incluindo o zebrafish (*Danio rerio*) e macaco rhesus (*Macaca mulatta*) serão utilizados para comparar os efeitos da administração da kisspeptina-54 selvagem com as kisspetinas-54 mutadas no sistema reprodutivo.

6 – CONCLUSÕES

6 – CONCLUSÕES

- Descrevemos duas novas variantes na kisspeptina, p.P74S e p.H90D, associadas com o fenótipo de puberdade precoce dependente de gonadotrofinas.
- O mecanismo potencial de ativação da variante p.P74S permanece indeterminado.
- A variante p.H90D resultou na ativação mais potente do receptor GPR54 *in vitro* em relação a kisspeptina-54 selvagem, indicando ganho de função. A segregação familiar dessa variante sugere herança autossômica recessiva.
- Descrevemos uma nova variante c.588-589insT no gene *KISS1* em heterozigose em um paciente com HHI. O papel dessa variante no fenótipo de HHI ainda não está definido.
- Polimorfismos no gene *KISS1* não parecem estar associados aos fenótipos de distúrbios puberais centrais.

7- REFERÊNCIAS

7- REFERÊNCIAS

1. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 2001 Feb;22(1):111-51.
2. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57 Suppl 2:2-14.
3. Kakarla N, Bradshaw KD. Disorders of pubertal development: precocious puberty. *Semin Reprod Med.* 2003 Nov;21(4):339-51.
4. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003 Oct 23;349(17):1614-27.
5. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2364-8.
6. Palmert MR, Hirschhorn JN. Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. *Mol Genet Metab.* 2003 Sep-Oct;80(1-2):1-10.
7. Banerjee I, Clayton P. The genetic basis for the timing of human puberty. *J Neuroendocrinol.* 2007 Nov;19(11):831-8.
8. Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update.* 2004 Jan-Feb;10(1):67-77.
9. Han SK, Gottsch ML, Lee KJ, Popa SM, Smith JT, Jakawich SK, et al. Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty. *J Neurosci.* 2005 Dec 7;25(49):11349-56.
10. Navarro VM, Castellano JM, Fernandez-Fernandez R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, 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 Oct;145(10):4565-74.
11. Navarro VM, Castellano JM, Garcia-Galiano D, Tena-Sempere M. Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Mar;8(1):11-20.
 12. 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 Oct;24(5):668-93.
 13. Partsch CJ, Sippell WG. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. *Hum Reprod Update*. 2001 May-Jun;7(3):292-302.
 14. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonca BB. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Feb;52(1):18-31.
 15. Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. *Pediatrics*. 2005 Dec;116(6):1323-8.
 16. Pescovitz OH, Comite F, Hench K, Barnes K, McNemar A, Foster C, et al. The NIH experience with precocious puberty: diagnostic subgroups and response to short-term luteinizing hormone releasing hormone analogue therapy. *J Pediatr*. 1986 Jan;108(1):47-54.
 17. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Apr;89(4):1794-800.
 18. Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 2000 Oct;23(9):560-5.

19. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001 Aug;55(2):163-74.
20. Pawlowitzki IH, Diekstall P, Schadel A, Miny P. Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am J Med Genet*. 1987 Feb;26(2):473-9.
21. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2447-54.
22. Kalantaridou SN, Chrousos GP. Clinical review 148: Monogenic disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2481-94.
23. Trarbach EB, Silveira LG, Latronico AC. Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency. *Pituitary*. 2007 Jul 12.
24. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest*. 2008 Aug 1;118(8):2822-31.
25. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, et al. Mutations in Prokineticin 2 (PROK2) and PROK2 Receptor (PROKR2) in Human Gonadotrophin-Releasing Hormone Deficiency: Molecular Genetics and Clinical Spectrum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jun 17.
26. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Costa EM, Versiani B, Baptista MT, et al. Loss-of-Function Mutations in the Genes Encoding Prokineticin-2 or Prokineticin Receptor-2 Cause Autosomal Recessive Kallmann Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Aug 5.

27. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest.* 2007 Feb;117(2):457-63.
28. Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. Hypogonadotropic hypogonadism. *Semin Reprod Med.* 2002 Nov;20(4):327-38.
29. 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 Nov;53(5):609-13.
30. Bachega TA, Billerbeck AE, Marcondes JA, Madureira G, Arnhold IJ, Mendonca BB. Influence of different genotypes on 17-hydroxyprogesterone levels in patients with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000 May;52(5):601-7.
31. Billerbeck AE, Mendonca BB, Pinto EM, Madureira G, Arnhold IJ, Bachega TA. Three novel mutations in CYP21 gene in Brazilian patients with the classical form of 21-hydroxylase deficiency due to a founder effect. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Sep;87(9):4314-7.
32. Brito VN, Mendonca BB, Guilhoto LM, Freitas KC, Arnhold IJ, Latronico AC. Allelic variants of the gamma-aminobutyric acid-A receptor alpha1-subunit gene (GABRA1) are not associated with idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty in girls with and without electroencephalographic abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jun;91(6):2432-6.
33. Freitas KC, Ryan G, Brito VN, Tao YX, Costa EM, Mendonca BB, et al. Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2007 Mar;87(3):627-34.

-
34. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14;358(7):709-15.
 35. 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 Sep 16;100(19):10972-6.
 36. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, et al. Two novel missense mutations in g protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Mar;90(3):1849-55.
 37. 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 Dec;153(6):845-52.
 38. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD, et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett*. 1999 Mar 5;446(1):103-7.
 39. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, 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 Sep 14;276(37):34631-6.
 40. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem*. 2001 Aug 3;276(31):28969-75.

41. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):613-7.
42. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst*. 1996 Dec 4;88(23):1731-7.
43. West A, Vojta PJ, Welch DR, Weissman BE. Chromosome localization and genomic structure of the KiSS-1 metastasis suppressor gene (KISS1). *Genomics*. 1998 Nov 15;54(1):145-8.
44. 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 Res*. 1997 Jun 15;57(12):2384-7.
45. Bilban M, Ghaffari-Tabrizi N, Hintermann E, Bauer S, Molzer S, Zoratti C, et al. Kisspeptin-10, a KiSS-1/metastatin-derived decapeptide, is a physiological invasion inhibitor of primary human trophoblasts. *J Cell Sci*. 2004 Mar 15;117(Pt 8):1319-28.
46. Roa J, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. New frontiers in kisspeptin/GPR54 physiology as fundamental gatekeepers of reproductive function. *Front Neuroendocrinol*. 2008 Jan;29(1):48-69.
47. Castano JP, Martinez-Fuentes AJ, Gutierrez-Pascual E, Vaudry H, Tena-Sempere M, Malagon MM. Intracellular signaling pathways activated by kisspeptins through GPR54: Do multiple signals underlie function diversity? *Peptides*. 2008 Aug 15.
48. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castano JP, Malagon MM, Aguilar E, 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 Sep 26;257-258:75-83.
49. Becker JA, Mirjolet JF, Bernard J, Burgeon E, Simons MJ, Vassart G, et al. Activation of GPR54 promotes cell cycle arrest and apoptosis of human tumor cells through a specific transcriptional program not shared by other Gq-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jan 21;326(3):677-86.
50. Funes S, Hedrick JA, Vassileva G, Markowitz L, Abbondanzo S, Golovko A, et al. The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Dec 26;312(4):1357-63.
51. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, et al. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jun 19;104(25):10714-9.
52. Lapatto R, Pallais JC, Zhang D, Chan YM, Mahan A, Cerrato F, et al. Kiss1-/- mice exhibit more variable hypogonadism than Gpr54-/- mice. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):4927-36.
53. Colledge WH. Transgenic mouse models to study Gpr54/kisspeptin physiology. *Peptides*. 2008 May 15.
54. Gottsch ML, Cunningham MJ, Smith JT, Popa SM, Acohido BV, Crowley WF, et al. A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology*. 2004 Sep;145(9):4073-7.
55. 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 Jul 23;320(2):383-8.

-
56. Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol*. 2004 Dec 1;561(Pt 2):379-86.
 57. Thompson EL, Patterson M, Murphy KG, Smith KL, Dhillo WS, Todd JF, et al. Central and peripheral administration of kisspeptin-10 stimulates the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Neuroendocrinol*. 2004 Oct;16(10):850-8.
 58. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, 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.
 59. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Feb 1;102(5):1761-6.
 60. 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 Feb 8;102(6):2129-34.
 61. Dhillo WS, Chaudhri OB, Patterson M, Thompson EL, Murphy KG, Badman MK, et al. Kisspeptin-54 stimulates the hypothalamic-pituitary gonadal axis in human males. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Dec;90(12):6609-15.
 62. Seminara SB. Mechanisms of Disease: the first kiss-a crucial role for kisspeptin-1 and its receptor, G-protein-coupled receptor 54, in puberty and reproduction. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006 Jun;2(6):328-34.

63. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):3686-92.
64. Brailoiu GC, Dun SL, Ohsawa M, Yin D, Yang J, Chang JK, et al. KiSS-1 expression and metastin-like immunoreactivity in the rat brain. *J Comp Neurol*. 2005 Jan 17;481(3):314-29.
65. Smith JT, Dungan HM, Stoll EA, Gottsch ML, Braun RE, Eacker SM, et al. Differential regulation of KiSS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse. *Endocrinology*. 2005 Jul;146(7):2976-84.
66. Franceschini I, Lomet D, Cateau M, Delsol G, Tillet Y, Caraty A. Kisspeptin immunoreactive cells of the ovine preoptic area and arcuate nucleus co-express estrogen receptor alpha. *Neurosci Lett*. 2006 Jul 3;401(3):225-30.
67. Smith JT, Clarke IJ. Kisspeptin expression in the brain: catalyst for the initiation of puberty. *Rev Endocr Metab Disord*. 2007 Mar;8(1):1-9.
68. Gottsch ML, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin-GPR54 signaling in the neuroendocrine reproductive axis. *Mol Cell Endocrinol*. 2006 Jul 25;254-255:91-6.
69. Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus; sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 2006 Dec;147(12):5817-25.
70. Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, et al. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*. 2005 Oct;146(10):4431-6.

71. 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 Jun 21;26(25):6687-94.
72. Richard N, Galmiche G, Corvaisier S, Caraty A, Kottler ML. KiSS-1 and GPR54 genes are co-expressed in rat gonadotrophs and differentially regulated in vivo by oestradiol and gonadotrophin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol*. 2008 Mar;20(3):381-93.
73. Gutierrez-Pascual E, Martinez-Fuentes AJ, Pinilla L, Tena-Sempere M, Malagon MM, Castano JP. Direct pituitary effects of kisspeptin: activation of gonadotrophs and somatotrophs and stimulation of luteinising hormone and growth hormone secretion. *J Neuroendocrinol*. 2007 Jul;19(7):521-30.
74. Popa SM, Clifton DK, Steiner RA. The role of kisspeptins and GPR54 in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:213-38.
75. Horikoshi Y, Matsumoto H, Takatsu Y, Ohtaki T, Kitada C, Usuki S, et al. Dramatic elevation of plasma metastin concentrations in human pregnancy: metastin as a novel placenta-derived hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Feb;88(2):914-9.
76. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969 Jun;44(235):291-303.
77. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970 Feb;45(239):13-23.
78. Greulich WW PS. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. . 2nd ed, ed. Stanford.: Stanford University Press. 1959.
79. Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation

- of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Oct;84(10):3539-44.
80. Lee PA. Laboratory monitoring of children with precocious puberty. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1994 Apr;148(4):369-76.
81. 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 Sep;89(9):4338-42.
82. de Roux N AJ, Houang M, Derbois D, Matsuda F, Meysing AU, Pugeat M, Le Bouc Y, Crowley WF Jr, Kelly P & Seminara S. An Unique Short 3' Duplication of the Coding Sequence of the GPR54 Ligand Identified in a Large Cohort of Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism Patients. *Endocrine Society's 86th Annual Meeting; 2004 16-19 June 2004; New Orleans, Louisiana, USA; 2004.*
83. Luan X, Zhou Y, Wang W, Yu H, Li P, Gan X, et al. Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls. *Eur J Endocrinol.* 2007 Jul;157(1):113-8.
84. Morton NE. *Methods in Genetic Epidemiolgy.* New York: Karger 1983.
85. Richardson JS, Richardson DC. The de novo design of protein structures. *Trends in biochemical sciences.* 1989 Jul;14(7):304-9.
86. MacArthur MW, Thornton JM. Influence of proline residues on protein conformation. *J Mol Biol.* 1991 Mar 20;218(2):397-412.
87. Harms JF, Welch DR, Miele ME. KISS1 metastasis suppression and emergent pathways. *Clinical & experimental metastasis.* 2003;20(1):11-8.
88. Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends in biochemical sciences.* 1996 Jul;21(7):267-71.

89. Roa J, Tena-Sempere M. KiSS-1 system and reproduction: comparative aspects and roles in the control of female gonadotropic axis in mammals. *Gen Comp Endocrinol*. 2007 Aug-Sep;153(1-3):132-40.
90. Seminara SB, Dipietro MJ, Ramaswamy S, Crowley WF, Jr., Plant TM. Continuous human metastatin 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 May;147(5):2122-6.
91. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJ, Kaiser UB, Latronico AC. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2680-6.
92. Trarbach EB, Baptista MT, Garmes HM, Hackel C. Molecular analysis of KAL-1, GnRH-R, NELF and EBF2 genes in a series of Kallmann syndrome and normosmic hypogonadotropic hypogonadism patients. *J Endocrinol*. 2005 Dec;187(3):361-8.
93. Versiani BR, Trarbach E, Koenigkam-Santos M, Dos Santos AC, Elias LL, Moreira AC, et al. Clinical assessment and molecular analysis of GnRHR and KAL1 genes in males with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007 Feb;66(2):173-9.
94. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, et al. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4006-12.
95. Mastronardi C, Smiley GG, Raber J, Kusakabe T, Kawaguchi A, Matagne V, et al. Deletion of the Ttf1 gene in differentiated neurons

- disrupts female reproduction without impairing basal ganglia function. *J Neurosci*. 2006 Dec 20;26(51):13167-79.
96. Mitchell DC, Abdelrahim M, Weng J, Stafford LJ, Safe S, Bar-Eli M, et al. Regulation of KiSS-1 metastasis suppressor gene expression in breast cancer cells by direct interaction of transcription factors activator protein-2alpha and specificity protein-1. *J Biol Chem*. 2006 Jan 6;281(1):51-8.
 97. Li D, Mitchell D, Luo J, Yi Z, Cho SG, Guo J, et al. Estrogen regulates KiSS1 gene expression through estrogen receptor alpha and SP protein complexes. *Endocrinology*. 2007 Oct;148(10):4821-8.