FRANCISCA DELANIE BULCÃO DE MACEDO

Mutações inativadoras no gene *MKRN3* são causa de puberdade precoce central familial

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latronico

São Paulo

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Macedo, Francisca Delanie Bulcão de
Mutações inativadoras no gene *MKRN3* são causa de puberdade precoce central familial / Francisca Delanie Bulcão de Macedo. -- São Paulo, 2016.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Ana Claudia Latronico.

Descritores: 1.Puberdade precoce/genética 2.Gene MKRN3 3.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 4.Mutação genética 5.Impressão genômica

USP/FM/DBD-105/16

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, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do processo 2013/06391-1.

Dedicatória

A meus pais, pelo amor incondicional e a meu marido Jefferson, pelo apoio em todos os momentos.

Agradecimentos

Com certeza, esta conquista não é só minha. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por ter iluminado todos os passos desta caminhada e por ter me conduzindo à pessoa certa- minha orientadora, no lugar certo e na hora certa.

A meus pais, Delano e Ivna, meus grandes incentivadores, por terem me proporcionado condições para chegar até aqui, pela base familiar sólida, paciência e compreensão.

À minha querida orientadora Dra. Ana Claudia Latronico, por ter me dado a oportunidade de realizar esta tarefa, por ter acreditado em meu trabalho e por me permitir esse crescimento como pessoa, médica e pesquisadora. Nesse momento, faltam palavras para descrever minha enorme admiração e gratidão a essa pessoa que foi mais do que uma excelente mentora, mas também, amiga e conselheira. Esses quase 4 anos de doutorado, sem dúvida alguma, trazem um legado pessoal e profissional que vai durar para a vida inteira. Muito obrigada!

À Dra. Berenice Bilharinho Mendonça, pela oportunidade de fazer parte deste renomado grupo de pesquisa, pelas brilhantes ideias e sugestões e pelo exemplo de liderança e dedicação ao próximo.

Ao Vinícius Nahime Brito, essa pessoa incrível, pelo apoio e amizade sincera e por ter me orientado no ambulatório durante 3 anos, compartilhando seus ensinamentos.

Ao grupo da puberdade, Priscilla Cukier, Danielle Bessa, Marina Cunha e Carolina Ramos, pela convivência amigável e aprendizado mútuo.

À bióloga Luciana Ribeiro Montenegro, pela dedicação e auxílio no trabalho de bancada, parte fundamental no sucesso desta tese e, pela amizade.

Ao Dr. Ivo Jorge P. Arnhold, Dr. Alexsander Augusto L. Jorge e Dra. Luciani Renata S. Carvalho, pelas valiosas discussões científicas e ensinamentos compartilhados.

Às secretárias Nildinha e Rosângele, pelo carinho e paciência e, principalmente, pelo acolhimento.

Às funcionárias do LIM 42, Cidinha, Cris, Fran, Miriam e Mariana Funari, pela orientação e apoio na bancada.

Aos funcionários da Endocrinologia, Cida, Rosana, Rubens, Roberta e Roseli, pelo excelente trabalho, disponibilidade e suporte.

A todos os amigos de pós-graduação que, em algum momento, estiveram presentes nessa jornada, compartilhando decisões, angústias, alegrias, momentos em congressos, em especial Gabriela S. Resende, Danielle S. Bessa, João Luiz O. Madeira, Letícia Vilela, Flávia Cunha e Rafael Loch.

A Letícia Gontijo, Larissa Gomes e Fernanda Correa, pelas orientações, exemplo de dedicação e convívio sempre agradável.

Aos nossos colaboradores nacionais, Prof. Sonir Roberto Rauber Antonini, Prof. Gil Guerra- Júnior, Prof. Carlos Alberto Longui, Profa. Cristiane Kochi e Prof. Magnus Regius D. Silva, pela importante colaboração, compartilhando os pacientes para o estudo genético e pelos comentários e sugestões.

Aos nossos colaboradores internacionais, Andrew Dauber, Ana Paula Abreu e Ursula B. Kaiser, pela oportunidade ímpar de participar dessa enorme conquista que foi a descoberta do MKRN3 na puberdade precoce central. Agradeço também pelos valiosos ensinamentos e sugestões nos artigos.

A todos os nossos pacientes e familiares, por serem o motivo principal deste trabalho, sem a colaboração dos quais não seria possível esta conquista.

A meu marido e companheiro Jefferson, essa pessoa maravilhosa com quem tenho o imenso prazer de conviver, pela compreensão nas minhas ausências, pelo otimismo nos momentos de angústia e pelo apoio constante.

A meus queridos irmãos, Yuri, Yane e Igor, pela amizade e parceria, pelo exempo de profissionalismo e dedicação à Medicina e à pesquisa.

A meus avós, Júlio, Cired *(in memoriam),* Iúna *(in memoriam)* e Celsa, pelos valiosos princípios que são transmitidos ao longo das gerações. Agradeço, em especial, a minha querida avó Celsa, pela fé incondicional, por ter orado para que tudo desse certo nas minhas apresentações em congressos, aulas, entrevistas e pelo incentivo em todos as conquistas de minha vida.

A toda minha família, tios, primos, cunhados e sogra, pelo apoio e torcida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

Epígrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que eu era antes”.

(Marthin Luther King)

Normalização Adotada

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

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

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

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

Sumário

Listas de abreviaturas
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Summary
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Desenvolvimento puberal normal 2
1.2 Puberdade precoce 5
1.2.1 Puberdade precoce central 7
1.2.2 A genética da puberdade precoce central 8
1.3 Novas metodologias na determinação das bases genéticas da puberdade precoce central 12
1.4 Hipótese 16
2 OBJETIVOS 17
3 MÉTODOS 19
3.1 Considerações éticas 20
3.2 Pacientes 20
3.3 Avaliação hormonal 23
3.4 Avaliação molecular 25
3.4.1 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico 25
3.4.2 Sequenciamento exômico global 26
3.4.3 Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) 28
3.4.4 Sequenciamento automático direto 29
3.4.5 Análises *in silico* 30
3.5 Análise estatística 31
3.6 Amplificação dependente de hibridização com múltiplas sondas para análise de metilação (MS-MLPA) 32
3.7 Hibridização genômica comparativa (CGH-ARRAY) 35
4 RESULTADOS 38
4.1 Puberdade precoce central familial 39
4.1.1 Sequenciamento exômico global 39
4.1.1.1 Variantes Identificadas no sequenciamento exômico global 41

4.1.1.1.1 Variante Frameshift p.Arg213Gly*73 41
4.1.1.1.2 Variante Nonsense p.Tyr391* 42
4.1.1.1.3 Variante Missense p.Arg365Ser 42
4.1.1.1.4 Variante Frameshift p.Ala162Glyfs*14 43
4.1.2 Sequenciamento automático (Sanger) 45
4.1.2.1 Variantes Identificadas no sequenciamento direto 45
4.1.2.1.1 Variante Frameshift c.482_483delC p.Pro161Argfs*10 45
4.1.2.1.2 Variante Frameshift c.482_483 p.Pro161Argfs*16 46
4.1.3 Correlação genótipo- fenótipo 47
4.1.4 Análise *in silico* da variante missense c.1095G>T p.Arg365Ser 49
4.2 Puberdade precoce central esporádica 49
4.2.1 Pesquisa de mutações no gene *MKRN3* 49
4.2.2 Correlação genótipo- fenótipo 50
4.2.3 Análise de segregação familiar 53
4.2.4 Análise *in silico* da variante p.Phe417Ile 55
4.2.5 Polimorfismos 55
4.3 Pesquisa de mutações na região promotora do *MKRN3* 56
4.3.1 Análise *in silico* da variante -150_-147TCAGdel na região promotora do *MKRN3* 58
4.4 Variação do Número de Cópias e Análise de Metilação no *locus* 15q11-13 58
4.5 Hibridização genômica comparativa (CGH array) 60
5 DISCUSSÃO 61
5.1 Puberdade precoce central 62
5.2 Um novo gene candidato na puberdade precoce central: *MKRN3* 65
5.3 Estrutura gênica e proteica do MKRN3 68
5.4 Papel do MKRN3 na regulação do eixo reprodutivo 72
6 CONCLUSÕES 74
7 ANEXOS 77
8 REFERÊNCIAS 103
9 APÊNDICE 118

Listas

Lista de Abreviaturas

ABL	Gene que codifica a proteína *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*
ACCP	Atraso constitucional do crescimento e da puberdade
BCR	Gene que codifica a proteína *breakpoint cluster region*
cDNA	DNA complementar
CI	Centro de *imprinting*
CGH	Hibridização genômica comparative
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DP	Desvio-padrão
E2	Estradiol
EA	Estatura alvo
EAP1	*Enhanced at Puberty Gene*
ECLIA	Ensaio eletroquimioluminescência
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento epithelial
EUA	Estados Unidos da América
FSH	Hormônio folículo-estimulante
FSHR	Gene que codifica o receptor do FSH
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABRA1	Gene que codifica a subunidade α1 do receptor $GABA_A$
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GNRH1	Gene que codifica o GnRH
GnRHR	Gene que codifica o receptor de GnRH
GPR54	Gene que codifica o receptor acoplado à proteína G – 54
HCl	Ácido clorídrico
HhaI	Enzima de restrição
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
IC	Idade cronológica
IE	Idade estatural
IFMA	Ensaio imunofluorométrico

IO	Idade óssea
IRF2BPL	*Interferon regulatory factor 2 binding protein-like*
Kb	Kilobases
KISS1	Gene que codifica a kisspeptina
KISS1R	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
LH	Hormônio luteinizante
LIN28B	Gene que codifica a proteína *Lin-28 homolog A*
miRNA	Micro-RNA
MKRN3	Gene que codifica a proteína makorin ring finger 3
MS-MLPA	Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	*National Center for Biotechnology and Information*
NDN	Gene que codifica a proteína necdin
NHLBSEVS	National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Variant Server
NKB	Neurocinina B
NK3R	Receptor da neurocinina B
NKX2-1	Gene que codifica a proteína *NK2 homeobox 1*
NPY	Neuropeptídeo Y
NPY-Y1R	Gene que codifica o receptor tipo 1 do neuropeptídeo Y
PANTHER	Protein Analysis through Evolutionary Relationship
Pb	Pares de base
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polymerase
PP	pelos pubianos
PolyPhen2	Polymorphism Phenotyping, version 2
PPC	Puberdade precoce central
PPP	Puberdade precoce periférica
RIE	Ensaio de radioimunoensaio
RNAm	RNA mensageiro
RM	Ressonância magnética
RT-PCR	Real time- Protein chain reaction
SA	Síndrome de Angelman

SIFT	Sort Intolerant from Tolerant
SNC	Sistema Nervoso Central
SNRPN	Gene que codifica a proteína *small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*
SPW	Síndrome de Prader Willi
T	Testosterona
TAC3	Gene que codifica a Preprotaquicinina 3
TAC3R	Gene que codifica o receptor da Preprotaquicinina 3
TGF-α	Fator de transformação de crescimento alpha
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TTF1	Gene que codifica o fator de transcrição tireoidiano tipo 1
UTR	Região não traduzida
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
χ^2	Qui-quadrado

Lista de Figuras

Figura 1 - Estratificação dos pacientes ..... .22

Figura 2 - Representação esquemática do sequenciamento exômico (ILLUMNA) 27

Figura 3 - Esquema ilustrativo do procedimento de MS-MLPA (Nygren *et al.*, 2005) 34

Figura 4 - Representação esquemática do CGH array 36

Figura 5 - Filtros usados para seleção de variantes associadas ao fenótipo 40

Figura 6 - Análise de segregação familiar das cinco famílias com mutação no gene *MKRN3* identificadas no estudo de sequenciamento exômico global ……..... 44

Figura 7 - Análise de segregação familiar de duas famílias com mutação no gene *MKRN3* identificadas por meio do sequenciamento direto 46

Figura 8 - Análise de segregação familiar de três das seis meninas não relacionadas com PPC aparentemente esporádica e mutação no *MKRN3*.....…….54

Figura 9 - Segregação familiar da paciente com mutação na região promotora do *MKRN3* e eletroferograma mostrando a variante -150_-147TCAGdel, em heterozigose, na região promotora do gene *MKRN3* 57

Figura 10 - Representação esquemática dos padrões de pico obtidos no estudo de MLPA do *locus* 15q11, com e sem digestão com a enzima *HhaI* (coluna esquerda). Histogramas com dados representativos de um indivíduo, normalizado para os resultados de três indivíduos (controles) e controles internos (coluna da direita) 59

Figura 11 - Representação esquemática do gene *MKRN3* 70

Figura 12 - Representação esquemática da proteína MKRN3 71

Figura 13 - Representação esquemática do mecanismo de ação do MKRN3 73

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Genes candidatos relacionados à PPC e as variantes encontradas 15

Tabela 2 - Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes 24

Tabela 3 - Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios de IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes 24

Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região codificadora do gene *MKRN3* 30

Tabela 5 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região promotora do gene *MKRN3* 30

Tabela 6 - Caracterização clínica, laboratorial e molecular dos pacientes com PPC familial causada por mutação no *MKRN3.* 48

Tabela 7 - Características clínicas e laboratoriais de seis meninas com PPC aparentemente esporádica causadas por mutação no *MKRN3* 52

Tabela 8 - Frequência genotípica do polimorfismo c.663C>T (rs2239669) no gene *MKRN3* em pacientes com PPC e controles. 55

Tabela 9 - Frequência alélica do polimorfismo c.663C>T (rs2239669) no gene *MKRN3* em pacientes com PPC e controles 56

Resumo

Macedo FDB. *Mutações inativadoras no gene MKRN3 são causa de puberdade precoce central familial* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2016.

A maioria dos casos de puberdade precoce central (PPC) em meninas permanece idiopática. A hipótese de uma causa genética vem se fortalecendo após a descoberta de alguns genes associados a este fenótipo, sobretudo aqueles implicados com o sistema kisspeptina (*KISS1* e *KISS1R)*. Entretanto, apenas casos isolados de PPC foram relacionados à mutação na kisspeptina ou em seu receptor. Até recentemente, a maioria dos estudos genéticos em PPC buscava genes candidatos selecionados com base em modelos animais, análise genética de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, ou ainda, nos estudos de associação ampla do genoma. Neste trabalho, foi utilizado o sequenciamento exômico global, uma metodologia mais moderna de sequenciamento, para identificar variantes associadas ao fenótipo de PPC. Trinta e seis indivíduos com a forma de PPC familial (19 famílias) e 213 casos aparentemente esporádicos foram inicialmente selecionados. A forma familial foi definida pela presença de mais de um membro afetado na família. DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico de todos os pacientes. O estudo de sequenciamento exômico global realizado pela técnica ILLUMINA, em 40 membros de 15 famílias com PPC, identificou mutações inativadoras em um único gene, *MKRN3*, em cinco dessas famílias. Pesquisa de mutação no *MKRN3* realizada por sequenciamento direto em duas famílias adicionais (quatro pacientes) identificou duas novas variantes nesse gene. O *MKRN3* é um gene de um único éxon, localizado no cromossomo 15 em uma região crítica para a síndrome de Prader Willi. O gene *MKRN3* sofre imprinting materno, sendo expresso apenas pelo alelo paterno. A descoberta de mutações em pacientes com PPC familial despertou o interesse para a pesquisa de mutações nesse gene em 213 pacientes com PPC aparentemente esporádica por meio de reação em cadeia de polimerase seguida de purificação enzimática e sequenciamento automático direto (Sanger). Três novas mutações e duas já anteriormente identificadas, incluindo quatro frameshifts e uma variante missense, foram encontradas, em heterozigose, em seis meninas não relacionadas. Todas as novas variantes identificadas estavam ausentes nos bancos de dados (1000 Genomes e Exome Variant Server). O estudo de segregação familial em três dessas meninas com PPC aparentemente esporádica e mutação no *MKRN3* confirmou o padrão de herança autossômica dominante com penetrância completa e transmissão exclusiva pelo alelo paterno, demonstrando que esses casos eram, na verdade, também familiares. A maioria das mutações encontradas no *MKRN3* era do tipo frameshift ou nonsense, levando a stop códons prematuros e proteínas truncadas e, portanto, confirmando a associação com o fenótipo. As duas mutações missenses (p.Arg365Ser e p.Phe417Ile) identificadas estavam localizadas em regiões de dedo ou anel de zinco, importantes para a função da proteína. Além disso, os estudos *in silico* dessas duas variantes demonstraram patogenicidade. Todos os pacientes com mutação no *MKRN3* apresentavam características clínicas e

hormonais típicas de ativação prematura do eixo reprodutivo. A mediana de idade de início da puberdade foi de 6 anos nas meninas (variando de 3 a 6,5) e 8 anos nos meninos (variando de 5,9 a 8,5). Tendo em vista o fenômeno de imprinting, análise de metilação foi também realizada em um subgrupo de 52 pacientes com PPC pela técnica de MS-MLPA, mas não foram encontradas alterações no padrão de metilação. Em conclusão, este trabalho identificou um novo gene associado ao fenótipo de PPC. Atualmente, mutações inativadoras no *MKRN3* representam a causa genética mais comum de PPC familial (33%). O *MKRN3* é o primeiro gene imprintado associado a distúrbios puberais em humanos. O mecanismo preciso de ação desse gene na regulação da secreção de GnRH necessita de estudos adicionais.

Descritores: puberdade precoce/ genética; gene *MKRN3;* sequenciamento de nucleotídeos em larga escala; mutação genética; impressão genômica.

Summary

Macedo FDB. *Inactivating mutations in the MKRN3 gene are cause of familial central precocious puberty* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2016.

Most cases of central precocious puberty (CPP) in girls remain idiopathic. The hypothesis of a genetic cause has been strengthened after the discovery of some genes associated with this phenotype, particularly those involved with the kisspeptin system (*KISS1* and *KISS1R*). However, genetic defects in *KISS1* and its receptor are rare and have been identified in only a few patients with CPP.over the past years. To date, most genetic studies in CPP was based mainly on a candidate gene approach, including genes selected in animal studies, human models of patients with hypogonadotropic hypogonadism or in genome wide association studies. In the present study, we used whole exome sequencing, a more advanced method of sequencing, to identify variants associated with CPP. Thirty-six patients with the familial form of CPP (19 families) and 213 apparently sporadic cases were initially selected. The familial form was defined by the presence of more than one member affected in the family. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes in all patients. Whole exome sequencing performed by ILLUMINA technique in 40 members of 15 families with CPP, identified inactivating mutations in a single gene, *MKRN3*, in five out of these families. Analysis of *MKRN3* mutations performed by automatic sequencing in two additional families (four patients) identified two novel mutations. *MKRN3* is an introless gene located on chromosome 15, in the Prader Willi syndrome critical region, and it is expressed only by the paternal allele due to the maternal imprinting. Following the initial findings, we searched for *MKRN3* mutations in 213 patients with apparently sporadic CPP using polymerase chain reaction followed by direct enzymatic purification and automated sequencing (Sanger). Three new mutations and two previously reported, including four frameshifts and one missense variant was identified in six unrelated girls with CPP. All variants were not described in the two databases (1000 Genomes and Exome Variant Server). The familial segregation analysis performed in three out of these girls with apparently sporadic CPP and *MKRN3* mutations confirmed the autosomal dominant inheritance with complete penetrance and exclusive transmission through the paternal allele, revealing familial inheritance in apparently sporadic cases. Most of these *MKRN3* mutations were frameshifts or nonsense, leading to premature stop codons and truncated proteins, thus demonstrating positive genotype- phenotype correlation. The two missense mutations (p.Arg365Ser and p.Phe417Ile) identified were located within zinc finger motifs, regions predicted to be essential for the protein function. Besides that, all missense mutations were predicted to be pathogenic by *in silico* analysis. All patients carrying MKRN3 mutations exhibited typical clinical and hormonal features of premature activation of the reproductive axis. The median age of puberty onset was 6.0 years in girls (ranging from 3.0 to 6.5) and 8.0 years in boys (ranging from 5.9 to 8.5). In view of the imprinting phenomenon, methylation analysis was also performed in a subgroup of 52 patients with CPP by MS-MLPA technique, but no methylation abnormalities were detected. In

conclusion, our work has identified a new gene associated with CPP. Currently, inactivating mutations in *MKRN3* represent the most common genetic cause of familial CPP (33%). *MKRN3* is the first imprinted gene associated with pubertal disorders in humans. However, its precise mechanism of action in the regulation of GnRH secretion needs further studies.

Descriptors: puberty, precocious/ genetics; gene *MKRN3*; high-throughput nucleotide sequencing; mutation, genetic; genomic imprinting.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESENVOLVIMENTO PUBERAL NORMAL

A puberdade é um período de transição do desenvolvimento humano, correspondente à passagem da fase da infância para a adolescência, circunstanciada por alterações endócrinas, neurológicas e comportamentais [1,2]. Entre as modificações endócrinas, destacam-se o aparecimento dos caracteres sexuais secundários, o estirão do crescimento e a produção dos gametas maduros, resultando em maturação sexual e desenvolvimento da capacidade reprodutiva.

No período fetal e nos primeiros meses após o nascimento, ocorre uma significativa secreção de GnRH decorrente da ativação do eixo hipotálamo- hipófise-gonadal. Essa fase é seguida por um longo período de relativa quiescência da produção hormonal até o início da adolescência. Nesse momento, a reativação do eixo hipotálamo- hipófise- gonadal e a subsequente reemergência da secreção pulsátil do hormônio decapeptídeo liberador de gonadotrofina (GnRH), de origem hipotalâmica, marcam o início da puberdade [3]. Os pulsos de GnRH estimulam a produção de gonadotrofinas - hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH) - pela hipófise anterior que, por sua vez, promovem a produção dos gametas maduros e a síntese dos esteroides gonadais: testosterona nos testículos e estradiol nos ovários.

Os mecanismos envolvidos na supressão relativa da secreção de GnRH durante a infância e subsequente reativação puberal ainda não são totalmente conhecidos. Atualmente, a hipótese mais aceita defende que o início da puberdade é dependente de um mecanismo central, marcado pelo aumento de estímulos excitatórios e concomitante redução dos aferentes inibitórios sobre a secreção pulsátil de GnRH, sendo este processo independente da inibição exercida pelos esteroides sexuais [2-4].

Estudos experimentais e clínicos das décadas de 1980 e 1990 identificaram vários neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no controle da secreção de GnRH [1,5,]. O ácido gama-aminobutírico (GABA), neuropeptídeo Y (NPY), opioides endógenos, β-endorfinas, peptídeo intestinal vasoativo (VIP), hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a melatonina são os principais neurotransmissores inibitórios, e a glicina, glutamato, norepinefrina, dopamina, prostaglandinas, serotonina e fatores de crescimento derivados da glia, tais como o fator transformador de crescimento (TGF-α) e o fator de crescimento epidermal (EGF) são primariamente excitatórios [1,5].

Além dos moduladores neuronais, diversos fatores endógenos, ambientais, étnicos, nutricionais e genéticos interagem entre si para determinar o início preciso da puberdade. A leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos e também um dos primeiros responsáveis pela ligação entre o metabolismo e o eixo reprodutivo, tem desempenhado papel importante no controle metabólico da fertilidade [6-9]. A leptina exerce seu efeito diminuindo a sinalização dos neurônios secretores de NPY e é, atualmente, considerada

um fator permissivo que informa o hipotálamo sobre os estoques periféricos de energia [1].

Algumas evidências apontam também para o importante papel da genética na regulação do início da puberdade: 1. Correlação entre idade da menarca de mãe e filha; 2. Variação de início da puberdade entre diferentes grupos raciais demonstrada em estudos populacionais; 3. Maior concordância dos eventos puberais em gêmeos monozigóticos que dizigóticos [3,10]. Nesses estudos, o cálculo de hereditariedade sugeriu que mais de 50- 80% da variação no início da puberdade podem ser controlados geneticamente. A ampla variação na idade de início da puberdade segue uma distribuição normal ou gaussiana que parece ser modulada por variações em múltiplos genes [3]. Além disso, De Vries *et al*.[11] analisando 156 pacientes com PPC idiopática constataram uma prevalência de 27,5% de casos familiares, sugerindo um papel dos fatores genéticos na patogênese da PPC. Nestas famílias, a análise de segregação sugeriu um modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo-dependente [11]. Posteriormente, quatro estudos independentes de associação do genoma identificaram dois *loci* associados com a variação na idade da menarca: 6q21 (incluindo o gene *LIN28B*) e 9q31.2 [12-15]. Portanto, a puberdade resulta, provavelmente, de uma complexa interação de base genética com uma variedade de reguladores endócrinos e ambientais.

1.2 PUBERDADE PRECOCE

Classicamente, a puberdade precoce é definida como o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos em meninas e 9 anos nos meninos [3,10,16]. Esse intervalo normal para idade de início da puberdade corresponde ao período no qual 95% das crianças iniciaram o desenvolvimento dos caracteres sexuais [17,18]. No entanto, esses limites cronológicos de idade vêm sendo objetos de intensa discussão. Uma diminuição na idade média da menarca foi observada nos Estados Unidos (EUA) e em alguns países da Europa entre os séculos XIX e XX [19]. Um estudo com 17.000 meninas sugeriu um ajuste na média de idade da puberdade nos EUA, uma vez que 27,3% das meninas afro-americanas e 6,7% das meninas caucasianas apresentaram início da puberdade aos 7 anos de idade [20]. A quantidade de gordura corporal e a exposição a desreguladores endócrinos têm sido sugeridos como importantes fatores associados com esta tendência de antecipação do início da puberdade no sexo feminino [21]. Mais recentemente, uma modificação de idade de início da puberdade foi também observada nos meninos [22]. Herman Giddens *et al.*[22] demonstraram que meninos americanos estão iniciando o desenvolvimento sexual, em média de 6 meses a 2 anos, antes do esperado. A menarca antes dos 9 anos em meninas pode também ser considerada um critério adicional de precocidade sexual.

A idade de início da puberdade tem implicações substanciais para a saúde biológica, psicossocial e a longo prazo. A idade precoce da menarca é um fator de risco para câncer de mama, doenças cardiovasculares,

depressão, diabetes, obesidade e hipertensão [23-25]. Em meninos, a puberdade precoce é um fator de risco para câncer de testículo [26]. Algumas evidências sugerem também que crianças com puberdade precoce apresentam maior risco de alterações de comportamento e distúrbios psicológicos na vida adulta quando comparadas à poulação geral [27].

A puberdade precoce tem prevalência estimada de 0,01 a 0,05% e é, aproximadamente, 10 vezes mais comum em meninas do que em meninos [10]. Na população dinamarquesa, a prevalência estimada de puberdade precoce é de cerca de 0,2% em meninas e menos de 0,05% em meninos [28].

A precocidade sexual pode ocorrer como resultado da secreção de esteroides sexuais independentemente da ativação do eixo gonadotrófico (puberdade precoce independente de gonadotrofinas ou puberdade periférica- PPP) ou, mais comumente, por uma ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, de forma semelhante ao desenvolvimento fisiológico, porém, em idade cronológica inadequada (puberdade precoce dependente de gonadotrofinas ou puberdade precoce central - PPC). Clinicamente, as duas formas assemelham-se, sendo caracterizadas pelo desenvolvimento precoce dos caracteres sexuais secundários, aceleração do crescimento linear e avanço da idade óssea, com consequente prejuízo da estatura final [29,30]. Na PPC, os caracteres sexuais secundários são concordantes com o sexo do paciente (isossexual). Ao contrário, a PPP pode levar ao padrão isossexual ou heterossexual (feminização de meninos ou virilização de meninas), além da progressão desordenada dos caracteres sexuais secundários, podendo a menarca ser a primeira manifestação. Em

ambas as formas de puberdade precoce, iso ou heterossexual, os esteroides sexuais determinam a aceleração da velocidade de crescimento e da maturação esquelética, culminando com a fusão prematura das epífises ósseas e o comprometimento da estatura final. A avaliação laboratorial é útil no diagnóstico diferencial das formas de precocidade sexual. Os valores de LH em condição basal e após estímulo (teste com GnRH exógeno ou análogo de GnRH) confirmam a ativação do eixo gonadotrófico, sendo fundamental para a distinção entre PPC e PPP e na escolha correta do tratamento.

1.2.1 Puberdade precoce central

A PPC é uma condição rara, com incidência estimada de 1:5.000 a 1:10.000, mais frequente no sexo feminino, em uma proporção de 3-23 meninas: 1 menino [29,31]. Várias alterações neurológicas podem levar à PPC, incluindo tumores, trauma, infecções, irradiação do SNC ou malformações. O hamartoma hipotalâmico- uma malformação congênita não-neoplásica, representa a causa orgânica mais comum de PPC em ambos os sexos. Exposição crônica a esteroides sexuais, de fonte exógena ou endógena como resultado de algumas doenças com produção periférica de esteroides, pode também causar ativação prematura do eixo hipotálamo- hipófise-gonadal [32,33]. No entanto, a maioria das causas de PPC em meninas e cerca de 50% dos casos em meninos não apresentam alterações detectáveis no SNC e são descritas como idiopáticas [32,33]. Independentemente da etiologia da PPC, orgânica ou idiopática, a base do tratamento é o bloqueio da

secreção de gonadotrofinas com os análogos de GnRH, sendo a cirurgia reservada para alguns tumores ou malformações volumosas, com sintomas neurológicos de difícil controle [33].

1.2.2 A genética na puberdade precoce central

Ao longo dos últimos anos, diversos genes (*GNRH1, GNRHR, FSHR, LHR, LIN 28B, GABRA-1, NPY-1, KISS1, KISS1R, TAC3, TACR3, EAP1, TTF-1*) foram implicados na regulação e função do eixo reprodutivo, mas poucos foram os defeitos moleculares, incluindo polimorfismos e mutações, que mostraram associação ao fenótipo de PPC **(Tabela 1)**. Nessa área, as principais descobertas estão relacionadas ao sistema da kisspeptina, cujo papel como estimulador da secreção de GnRH na puberdade foi demonstrado nos últimos anos [34]. Inicialmente descoberto como um gene supressor tumoral, o gene *KISS1* é composto por três éxons, mapeado no cromossomo 1q32-q41 e codifica a síntese de uma proteína de 154 aminoácidos, a kisspeptina, que atua por meio de ligação a seu receptor (KISS1R ou GPR54). O KISS1R é um receptor com sete domínios transmembrana, composto por 398 aminoácidos e está acoplado à proteína G. O sistema kisspeptina- KISS1R vem sendo implicado na patogênese da PPC desde 2008, quando Teles *et al*. [35] descreveram uma mutação (p.Arg386Pro) no *KISS1R,* resultando em ativação não constitutiva do receptor, em uma menina brasileira adotada com PPC. Outros polimorfismos foram encontrados no *KISS1R*, envolvendo crianças chinesas e uma menina

coreana com PPC, porém apenas uma dessas alterações foi correlacionada positivamente com o fenótipo [36,37]. Posteriormente, Silveira *et al*. [38] descreveram duas variantes na kisspeptina (KISS1), p.Pro74Ser e p.His90Asp, em três crianças brasileiras não relacionadas com PPC. A mutação ativadora p.Pro74Ser foi identificada, em heterozigose, em um menino com início muito precoce do desenvolvimento puberal (1 ano de idade). Análises funcionais mostraram que, após uma pré-incubação com soro humano, a capacidade do vetor mutante em estimular a transdução de sinal foi significativamente maior quando comparado ao vetor não mutado, sugerindo uma maior resistência da kisspeptina mutada à degradação *in vitro* e consequente aumento da biodisponibilidade dessa proteína [38]. Por outro lado, a variante p.His90Asp foi descrita em homozigose em duas meninas não relacionadas com PPC. No entanto, estudos *in vitro* dessa variante não mostraram alterações na atividade ou na resistência à degradação quando comparada à kisspeptina selvagem [38]. Embora a identificação desses casos tenha contribuído para elucidar o papel do sistema kisspeptina na regulação do desenvolvimento puberal, nenhum outro caso de mutação ativadora no *KISS1R* ou *KISS1* foi descrito em pacientes com PPC desde então, sugerindo que alterações nesses genes são raras [37].

Em 2009, diferentes estudos de associação do genoma identificaram variações genéticas no cromossomo 6q21, envolvendo o gene *LIN28B* ou próximo a seu *locus*, associadas à idade de início da menarca [12-15]. Esse fato despertou o interesse pelo *LIN28B* em estudos do desenvolvimento

puberal. O *LIN28B* é um homólogo humano do *lin28* do nematódeo *Caenorhabtidis elegans* [39]. Mutações deletérias no *lin28* resultam em desenvolvimento precoce (passagem de larva para adulto) e transformação parcial do fenótipo sexual em *Caenorhabtidis elegans* [39]. As proteínas da família LIN28 são potentes repressores pós-transcricionais da biogênese dos micro-RNAs let7, os quais são microRNAs expressos de forma tempo-específica e que controlam o início do desenvolvimento sexual. Em 2010, Silveira-Neto *et al*. [40] descreveram uma variante nova no *LIN28B* (p.His199Arg), em heterozigose, em uma menina brasileira de 4 anos com PPC esporádica, porém o estudo funcional *in vitro* demonstrou que essa variante não alterou a função do gene na regulação da expressão do let-7 miRNA.

Posteriormente, um outro sistema foi também implicado na regulação do eixo reprodutivo: o sistema da neurocinina B (NKB). A neurocinina B é membro da família das taquicininas, que são peptídeos neurotransmissores excitatórios. Em humanos, a NKB e seu receptor (NK3R) são codificados pelos genes *TAC3* e *TACR3*, respectivamente. O papel do NKB no controle da secreção de gonadotrofinas e início da puberdade foi enfatizado a partir da descrição de mutações inativadoras nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico normósmico isolado, representando atualmente 6% dos casos de hipogonadismo [41]. No entanto, os mecanismos pelos quais esse sistema exerce seus efeitos no controle da função reprodutiva ainda não são bem conhecidos. Em 2012, estudando o papel desses genes na PPC, Tusset *et al*. [42] identificaram uma nova variante

(p.Ala63Pro) na neurocinina B, em heterozigose, em uma menina brasileira com PPC. Essa variante estava ausente nos controles e nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico estudados. Entretanto, sua mãe, também heterozigota para a mutação, apresentou desenvolvimento puberal em idade cronológica adequada, sugerindo falta de correlação genótipo-fenótipo [42].

Mais tarde, Cukier *et al*.[43] estudaram dois fatores de transcrição moduladores da expressão de GnRH- *Thyroid transcription fator (TTF1,* também conhecido como *NKX2-1) e enhanced at puberty* (*EAP1;* também chamado *IRF2BPL*, interferon regulatory factor 2 binding protein-like) em 71 pacientes com PPC idiopática. Nenhuma mutação germinativa foi identificada nesse grupo de pacientes. Entretanto, estudos *in silico*, utilizando programas computacionais de interação gênica, sugeriram que *TTF1* e *EAP1* são componentes importantes de uma rede de genes envolvidos com o controle da menarca [43].

Dessa forma, a etiologia da maioria dos casos de PPC permanece desconhecida (idiopática), sugerindo que outros genes e/ou mecanismos, ainda não conhecidos, possam estar envolvidos. Na **Tabela 1** estão sumarizados os principais genes implicados com a PPC e as variantes encontradas.

1.3 NOVAS METODOLOGIAS NA DETERMINAÇÃO DAS BASES GENÉTICAS DA PPC

Fenótipos específicos e complexos podem ser causados por alterações cromossômicas, como deleções e duplicações, em determinadas regiões do genoma. O desenvolvimento de técnicas de bandeamento cromossômico na década de 1970, seguido posteriormente pelos métodos de hibridização *in situ* nos anos 1980 e 1990, permitiram o mapeamento de genes e a detecção de rearranjos citogenéticos e aneuploidias. Exemplos clássicos dessas descobertas são as aneuplodias do cromossomo 21 (síndrome de Down), do cromossomo 18 (síndrome de Edwards), do cromossomo 13 (síndrome de Patau), do cromossomo X (síndrome de Turner e Klinefelter) e do cromossomo Y (síndrome de Jacobs), além da translocação 9/22, responsável pela fusão dos genes *BCR/ABL*, relacionado ao Linfoma de Hodgkin [44,45]. Nesse contexto, foi também desenvolvida a técnica de hibridização genômica comparativa (CGH), baseada na comparação direta de dois genomas por diferenças no conteúdo do DNA [46]. No entanto, a baixa resolução (detecta alterações de, aproximadamente, 5-10Mb), a necessidade de confirmação pela técnica de hibridização *in situ* e o intenso trabalho laboratorial limitavam o uso do CGH. Para reduzir essas dificuldades, técnicas de *microarray* genômico foram desenvolvidas para aplicação por esse método. O CGH array baseia-se nos mesmos princípios do CGH convencional, exceto que sua análise envolve fragmentos de DNA, como modelos para hibridização [47]. As aplicações clínicas do CGH array são inúmeras: câncer de mama, glioblastoma, rabdomiossarcoma, carcinoma

nasofaríngeo, câncer de ovário, tumores de bexiga, tumores adrenocorticais, além de detecções de rearranjos no 1p36 e anormalidades em *locus* selecionados do genoma. Esta técnica apresenta várias vantagens em relação às descritas anteriormente: alta resolução, boa sensibilidade, fácil compreensão e rapidez [48].

Outra metodologia que vem sendo desenvolvida e tem evoluído desde a decodificação completa do genoma humano, permitindo avanços na área da genética é o sequenciamento exômico [49]. O sequenciamento exômico é uma forma altamente eficaz de análise genética, em que > 90% do DNA codificador de um indivíduo (1% de todo o genoma) é sequenciado ao mesmo tempo [50]. Enquanto no sequenciamento exômico, também conhecido como "*target exome capture*", sequencia-se toda a região codificadora do genoma, utilizando-se sondas específicas para cobrir todos os éxons do genoma; no sequenciamento exômico avançado, sequencia-se além da região codificadora as regiões não traduzidas próximas aos éxons (UTRs), permitindo assim o estudo das regiões promotoras dos genes e regiões intrônicas intragênicas envolvidas na expressão genética. Comparado ao sequenciamento completo do genoma (*whole genome sequencing*), o sequenciamento exômico permite uma abordagem mais custo-efetiva para identificação de mutações e apresenta a vantagem de uma interpretação menos complexa [51]. No sequenciamento exômico, a região codificadora do DNA é sequenciada, usando tecnologias de nova geração e a sequência do paciente é comparada com a sequência referência do genoma humano, permitindo a identificação de variantes genéticas e possíveis genes

candidatos pela análise de substituições de nucleotídeos, rearranjos estruturais e variação nos números de cópias [52].

Em um estudo de sequenciamento exômico de oito indivíduos controles (que fazem parte do projeto Hap Map) e quatro pacientes portadores da síndrome de Freeman-Sheldon, que é uma doença rara com herança autossômica dominante, foi demonstrado ser possível identificar um gene candidato associado a doenças monogênicas estudando um pequeno número de pacientes [53]. Neste mesmo estudo, foi sugerido que, em doenças mais complexas como doenças oligogênicas, a mesma estratégia pode ser utilizada com um número maior de pacientes. No campo da Endocrinologia, o sequenciamento exômico levou a grandes avanços na compreensão de muitas doenças, incluindo os tumores adrenais em pacientes com síndrome de Cushing, hiperaldosteronismo primário, distúrbios do crescimento e Diabetes mellitus tipo 2, bem como uma infinidade de raras síndromes genéticas com envolvimento endócrino importante [52]. O principal benefício da exoma, em relação ao estudo de gene candidato, consiste na investigação simultânea de 20.000 genes [49]. No entanto, essa magnitude de genes estudados resulta em um grande número de variantes genéticas que necessitam ser avaliadas cuidadosamente quanto à sua associação positiva ou negativa com o fenótipo.

Tabela 1 - Genes candidatos relacionados à PPC e as variantes encontradas

Gene	Locus	Variantes raras na PPC	Referências
GABRA1	5q34	7 SNPs - nenhum relacionado com PPC (156T>C; 1323 G>A; IVS2-712(GT)n; IVS3+12A>T; IVS8+45T>G; IVS9+76T>G; IVS10+15G>A.)	Brito *et al*. JCEM (2005)
NPY-1R	7p15.3	p.K374T	Freitas *et al.* Fertil and Steril (2007)
KISS1	1q32.1	p.P74S p.H90D	Silveira *et al*. JCEM (2010)
GPR54 ou KISS1R	19p13.3	p.R386P	Teles *et al.* NEJM (2008)
LIN28B	6q16-q21	p. H199R	Silveira-Neto *et al*. Horm Res Pediatr (2012)
NKB	12q13.3	p.A63P	Tusset *et al.* ABEM (2012)
NK3R	4q24	p.A449S	
TTF -1	9q34.13	-	Cukier *et al.* Horm Res (2013)
EAP1	14q23	p.E87E, p.A163A, p.Y415Y e p.C758C	

1.4 HIPÓTESE

Pacientes com PPC, de origem familial e esporádica, poderiam apresentar defeito em um ou múltiplos genes, ainda não estudados em humanos, que exerceriam papel preponderante na regulação do eixo reprodutivo e na determinação do início da puberdade. O uso de técnicas mais modernas de biologia molecular poderiam ser úteis na detecção de deleções, duplicações e substituições de nucleotídeos e, possivelmente, na identificação de genes, ainda não conhecidos, relacionados à PPC.

A abordagem desta hipótese compreende inicialmente a identificação de possíveis genes envolvidos na regulação do início da puberdade por sequenciamento exômico em um grupo selecionado de PPC familial. Caso algum gene candidato seja identificado, os resultados serão confirmados por sequenciamento automático, e o estudo ampliado para a população com PPC forma esporádica.

Com isso, visamos a um melhor entendimento da fisiologia do GnRH e da regulação do eixo reprodutivo, tornando possível um aconselhamento genético e acompanhamento mais adequado para esses pacientes.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Análise clínica e genética de pacientes com PPC idiopática:

2.1A- Analisar potenciais anormalidades no genoma de crianças com PPC de origem familial por meio de sequenciamento exômico global;

2.1B- Ampliar o estudo com a análise de genes selecionados em pacientes com PPC esporádica;

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

2.1D- Estabelecer o provável mecanismo de ação das proteínas codificadas pelos genes selecionados.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), aprovação parecer nº 974.135. Consentimento Livre e Esclarecido, por escrito, foi obtido de todos os pais ou responsáveis e pacientes entre 6 e 10 anos (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, desenvolvido de acordo com sexo e faixa etária), assim como assentimento, por escrito, dos pacientes entre 2 e 6 anos.

3.2 PACIENTES

A casuística de pacientes com PPC foi subdividida em dois grupos: PPC- forma familial e PPC- forma aparentemente esporádica. Selecionamos 19 famílias com PPC- forma familial (36 pacientes) e 213 pacientes com PPC aparentemente esporádica. Os pacientes com PPC familial 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 provenientes de outros serviços (Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo- SP, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais - MG e Nemours Children's Clinic, Jacksonville, Florida). Os heredogramas das 19 famílias pré selecionadas estão ilustrados no **Anexo B**. Os pacientes com PPC

esporádica foram selecionados dos Serviços de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo em São Paulo (HCFMUSP- SP, médico responsável Dr. Vinícius Nahime Brito) ou Ribeirão Preto (HCFMUSP-RP, médico responsável Dr. Sonir Roberto R. Antonini), do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, médico responsável Dr. Gil Guerra Júnior) e do Medical Faculty Skopje - Macedônia.

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

A idade cronológica (IC) média do início do aparecimento dos caracteres sexuais secundários foi de 5,65 ± 2,2 anos (variando do nascimento a 9,7 anos), e a IC média da primeira consulta foi 7,6 ± 1,8 anos (variando de 1,3 a 10,75 anos). O estádio de desenvolvimento mamário variou entre 2 e 5 e o estádio dos pelos pubianos variou entre 1 e 5, de acordo com os critérios de Tanner e Marshall [17,18]. Os dez pacientes do sexo masculino apresentavam diâmetro testícular superior a 2,5 cm ou volume testicular maior que 4 mL ao diagnóstico. A idade óssea (IO) média foi 10 ± 2,2 anos (1 – 13,5 anos), conforme os critérios de Greulich e Pyle [54]. Os

pacientes apresentavam em média um avanço de IO de 1,7 anos em relação à IC. Três pacientes tinham características sindrômicas. Os achados clínicos e hormonais dos 213 pacientes com PPC estão resumidos no **Anexo C**. Dois grupos controles foram utilizados em diferentes etapas deste estudo. Para o sequenciamento exômico global, utilizamos como controles 50 amostras do 1000 Genomes, e, na análise de mutações na região promotora do gene *MKRN3,* foi usado um grupo controle constituído de 50 indivíduos adultos de ambos os sexos, que não apresentaram anormalidades no desenvolvimento puberal.

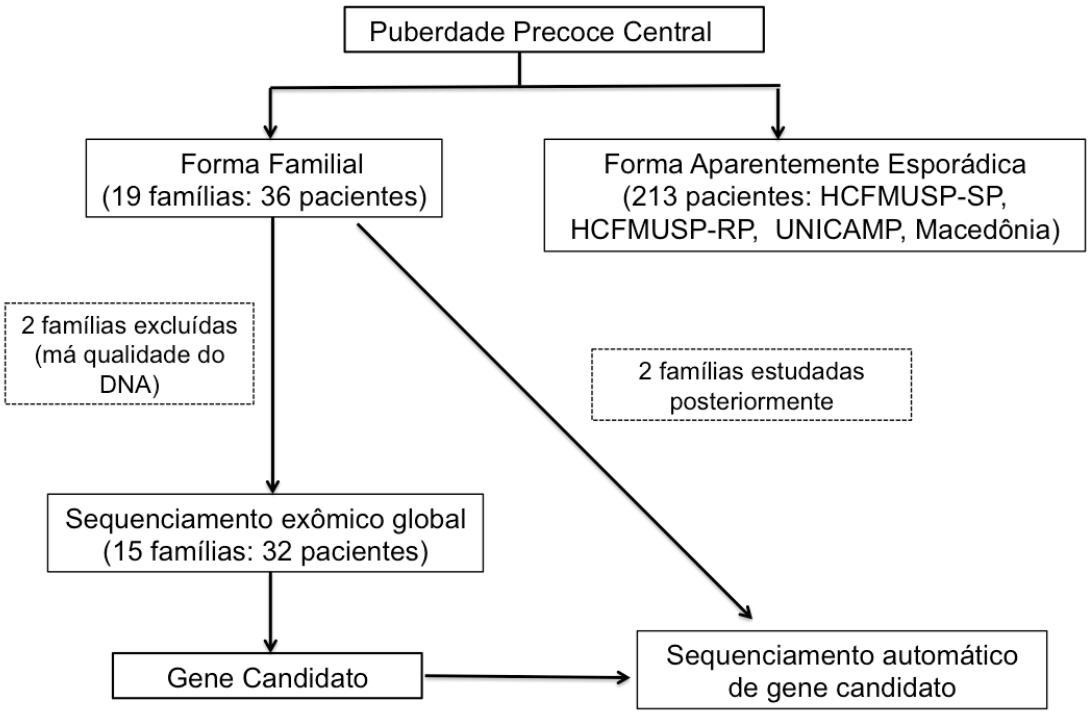


Figura 1 - Estratificação dos pacientes

3.3 AVALIAÇÃO HORMONAL

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

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

Para o diagnóstico de PPC, foram consideradas concentrações puberais no sexo feminino: LH basal > 0,6 U/L ou após estímulo com GnRH> 6,9 U/L e estradiol > 13 pg/mL para o IFMA [55], LH basal> 0,2 U/L ou após estímulo com GnRH >5 U/L e estradiol > 15 pg/mL para o ECLIA [56]. No sexo masculino, foram consideradas concentrações puberais: LH basal > 0,6 U/L ou após estímulo com GnRH> 9,6 U/L e testosterona > 14 ng/dL para o IFMA [55]; LH basal > 0,2 U/L ou após estímulo com GnRH> 5 U/L e

testosterona >12 ng/dL para o ECLIA [56]. Adicionalmente, LH > 10 U/L (IFMA) ou LH > 5,0 U/L (ECLIA), dosado 2 horas após a administração da primeira ampola de acetato de leuprolida 3,75 mg, via subcutânea, também foi considerado como resposta puberal para ambos os sexos [30].

Tabela 2 - Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e ECLIA em crianças pré-púberes

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

*após 100 µg de gonadorelina i.v.

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

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

*após 100 µg de gonadorelina i.v.

3.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR

3.4.1 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico

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

A concentração do DNA foi estimada com base na 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 4ºC até sua utilização.

3.4.2 Sequenciamento exômico global

Neste estudo, o sequenciamento exômico foi realizado no Broad Institute (Cambridge, MA), usando a tecnologia de clonagem molecular Illumina HiSeq 2000 (Illumina Inc, San Diego, CA). Por esta técnica, o DNA genômico extraído de leucócitos do sangue periférico dos pacientes selecionados foi inicialmente quebrado em fragmentos com tamanhos predeterminados e separados em fitas simples, por meio de enzimas polimerases. Em seguida, adaptadores com sequências de oligonucleotídeos universalmente conhecidas foram acrescentados às terminações dos fragmentos de DNA. Esses adaptadores são complementares aos primers de PCR e oligonucleotídeos imobilizados na matriz sólida para a amplificação do DNA – amplificação em ponte. Durante cada ciclo de sequenciamento, a adição de quatro bases de nucleotídeos marcadas (citosina, adenina, tiamina e guanina) e enzimas à matriz seguida da estimulação com laser permitiu a leitura das bases complementares aos diversos fragmentos de DNA dispersos na matriz sólida. As sequências complementares obtidas foram alinhadas e comparadas com bancos de dados de referência (Human Genome version 19), usando o Burrows-Wheeler Aligner (http://bio-bwa.sourceforge.net/) para a detecção de variantes genéticas **(Figura 2)**. Posteriormente, foram aplicados o Genome Analysis Toolkit (http://broadinstitute.org/gatk), o escore de qualidade de recalibração de cada base e o realinhamento indel. Os polimorfismos e as variantes indel identificados foram genotipados comparando todas as amostras simultaneamente, usando o escore de qualidade de recalibração

de cada variante. Para avaliação do efeito funcional das variantes, foi usado o SnpEff 2.0.5 (http://snpeff.sourceforge.net/).

Todas as variantes identificadas na região codificadora do *MKRN3* durante o estudo de sequenciamento exômico global foram confirmadas pelo método de amplificação por reação em cadeia de polimerase seguida de sequenciamento automático convencional (Sanger).

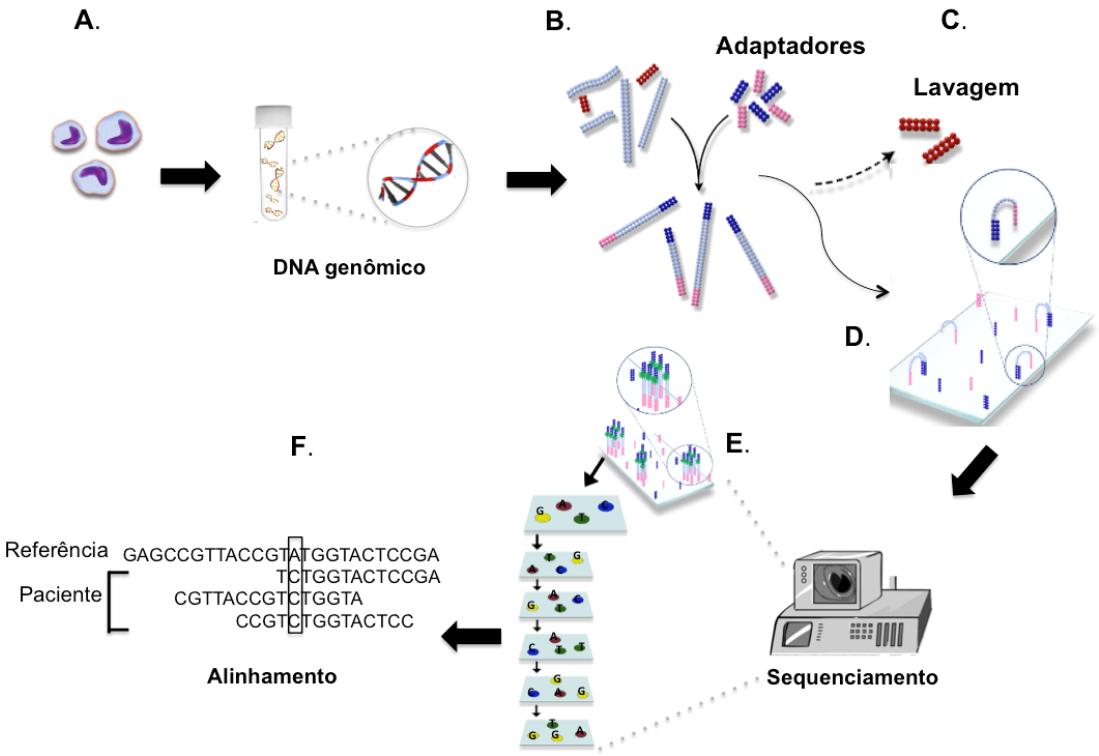


Figura 2 - Representação esquemática do sequenciamento exômico (ILLUMNA). **A.** Extração do DNA de leucócitos do sangue periférico; **B**. Fragmentação do DNA e ligação de adaptadores específicos. Os adaptadores possuem sequência complementar aos primers dipostos na matriz; **C.** Lavagem dos fragmentos não codificadores; **D.** Amplificação dos éxons em ponte.; **E.** Sequenciamento com tecnologia de alto rendimento; **F.** Comparação das leituras do paciente com a sequência referência.

3.4.3 Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico dos pacientes selecionados foi utilizado como substrato para a amplificação das regiões codificadora e promotora proximal do gene *MKRN3,* por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos **(Tabelas 4 e 5).** A região promotora do *MKRN3* compreende 1000pb, incluindo 750 pb da região 5' a montante do sítio de início de transcrição [57]. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL. Para cada reação, foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 100 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,0 U de enzima *Go Taq DNA polymerase* (*Promega, Madison, WI, EUA)* e 5,0 µL do tampão *5X Green Flexi Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, EUA*). A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *Veriti ®96- Well Thermal Cycler* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*, *EUA)* e consistiu das seguintes etapas: 1) Região codificadora do gene *MKRN3* - desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos; 2) Região promotora do gene *MKRN3* - desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Todos os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

3.4.4 Sequenciamento automático direto (Sanger)

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada com base na comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos de um marcador de peso molecular de concentração conhecida em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à pré-purificação enzimática, utilizando-se o produto comercial *EXO-SAP,* contendo as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* e exonuclease I *(Affymetrix, USB Products, Cleveland, Ohio, EUA).* As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o produto comercial *ABI Prism™ Big DyeTerminator* (*Applied Biosystems, Foster City, CA*, *EUA)*. Para estas reações, utilizamos também pares de oligonucleotídeos internos, tendo em vista o grande número de pares de bases nos fragmentos estudados **(Tabelas 4 e 5).** Os produtos destas reações foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3130xL automatic DNA sequencer* (*Applied Technologies, Foster City, CA*). As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information (NCBI)*.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para amplificação e sequenciamento automático da região codificadora do gene *MKRN3*

Oligonucleotídeos (PCR)	Oligonucleotídeos internos (sequenciamento)
1F:5´GCCTCAAGCCCATAAAGAAA3'	1F:5´GCCTCAAGCCCATAAAGAAA3´
3R:5´GGGAAAACAGGCAATAGCAG3´	1R:5´AGCCATCTGCTTCCTCTCAG3´
	2F:5´GGCATTTGGACAAAGCAGA3´
	2R:5´CACTGGGAATGACCAATTC3´
	3F:5´CCAATTGCAACCATTCCTTC3´
	3R:5´GGGAAAACAGGCAATAGCAG3

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

Oligonucleotídeos (PCR)	Oligonucleotídeos internos (sequenciamento)
P1F: 5´GAA ACA AAG GGC TGC CAT GA 3´	P1F: 5´GAA ACA AAG GGC TGC CAT GA 3´
P2R: 5´ATC TGG AGC AGC AGA TTC CC 3´	P1R: 5´GGC AGT CCC TAA GTC CCT TC 3´
	P2F: 5´CGC GAT CGG GCA TTA AAA GA 3´
	P2R: 5´ATC TGG AGC AGC AGA TTC CC 3´

3.4.5 Análises *In Silico*

Todas as variantes missenses identificadas foram submetidas a análises de predição *in silico*. Para avaliação das substituições nucleotídicas quanto ao impacto functional, foram utilizados os programas PolyPhen2 (Polymorphism Phenotyping, version 2), PANTHER (Protein Analysis through Evolutionary Relationship) e/ou SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant). Para os programas PolyPhen2 e PANTHER, a variação de escores é de 0 a 1,0,

sendo 0 (zero) indicativo de efeito neutro e 1,0, provavelmente deletério. Já no SIFT, escores < 0,05 são preditores de promover alteração na função da proteína. Todos os algoritmos desses programas estão baseados na homologia das sequências dos aminoácidos de proteínas contendo o mesmo domínio functional, no grau de conservação dessas sequências de aminoácidos durante a evolução, e nas propriedades físicas de cada aminoácido. Assim, o impacto da alteração do aminoácido sobre a estrutura da proteína e, consequentemente, sobre sua função é avaliado, e esta é classificada como potencialmente deletéria ou não.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo c.663C>T (rs2239669) no gene *MKRN3* entre pacientes com PPC e controles, foram considerados apenas indivíduos não relacionados. Para esta análise, utilizamos o grupo controle do banco de dados do Ensemble. A distribuição genotípica e a frequência alélica entre pacientes com PPC 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 *SigmaStat v3.5* (*San Jose, CA, EUA*). Foram considerados significantes os valores de $p < 0,05$.

3.6 AMPLIFICAÇÃO DEPENDENTE DE HIBRIDIZAÇÃO COM MÚLTIPLAS SONDAS PARA ANÁLISE DE METILAÇÃO (MS-MLPA): METHYLATION-SPECIFIC MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION)

Cinquenta e duas pacientes com PPC idiopática (familial e esporádica) foram selecionadas aleatoriamente para este estudo. Este método permite avaliar o estado de metilação de múltiplos genes, simultaneamente com a detecção do número de cópias [58]. Baseia-se em reação por PCR e permite a detecção semiquantitativa de alterações no DNA, na região promotora de vários genes, em uma única reação [58]. A discriminação entre as sequências metiladas e não metiladas foi efetuada por meio de hibridização de sondas contendo o local de reconhecimento para a enzima sensível à metilação, *HhaI* (Promega, Leiden, Holanda). Todas as sondas de MS-MLPA são sequências de cópia única e foram desenhadas e preparadas, como descrito por Schouten *et al*. [59]. Neste estudo, utilizamos o kit comercial: SALSA MS-MLPA Kit ME028, MRC Holland, Amsterdam, Netherlands. Este produto comercial é constituído por 32 sondas para o *locus* 15q11, região crítica para a síndrome de Prader Willi. Cinco dessas sondas são capazes de reconhecer dinucleotídeos CpG na região promotora dos genes *SNRPN* (quatro sondas) e *NDN* (uma sonda). Este produto comercial continha ainda 14 sondas referência e três fragmentos controle.

O protocolo de MS-MLPA foi consituído de cinco passos **(Figura 3)**: 1) Desnaturação de 20ng de DNA genômico de cada paciente, 2) Reação de

ligação e hidrólise realizada overnight por 16h, 3) Reação de PCR, 4) Separação dos produtos de amplificação por eletroforese capilar no Sequenciador ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), usando o LIZ® size standard e 5) Análise dos resultados obtidos.

A análise dos dados foi efetuada usando o Gene Mapper Analysis software V.5 (Life Technologies). Para compensar a diferença na eficiência do PCR de amostras individuais, a fração de cada pico foi normalizada pela divisão do valor de pico de cada sonda amplificada, pelo valor combinado de sondas de referência dentro da amostra. Desta forma, a porcentagem de metilação foi calculada pela divisão das áreas dos picos normalizados das amostras metiladas (sujeitas à hidrólise pela enzima), pela área dos picos normalizados das amostras não metiladas (não sujeitas à hidrólise pela enzima de restrição).

Uma redução relativa de 35-50% no valor de pico (ou área) de uma amostra não digerida de uma sonda específica era indicativo de uma deleção heterozigótica da região correspondente do DNA genômico. Os padrões de metilação foram determinados por comparação do valor de pico da amostra digerida de uma sonda específica pela amostra não digerida - a ausência de uma redução do valor de pico, após a digestão indicava que ambas as cópias de DNA correspondentes a essa sonda foram metiladas (e, assim, resistentes à digestão pela enzima *HhaI*), enquanto que uma redução de ~ 50% no valor do pico indicava que uma cópia foi metilada, e uma perda completa de um pico indicava que nenhuma cópia foi metilada [60]. Amostra de DNA de um paciente com síndrome de Prader Willi causada por dissomia

uniparental materna (confirmado por análise de microssatélites) foi usada como controle positivo para detectar anormalidades de metilação.

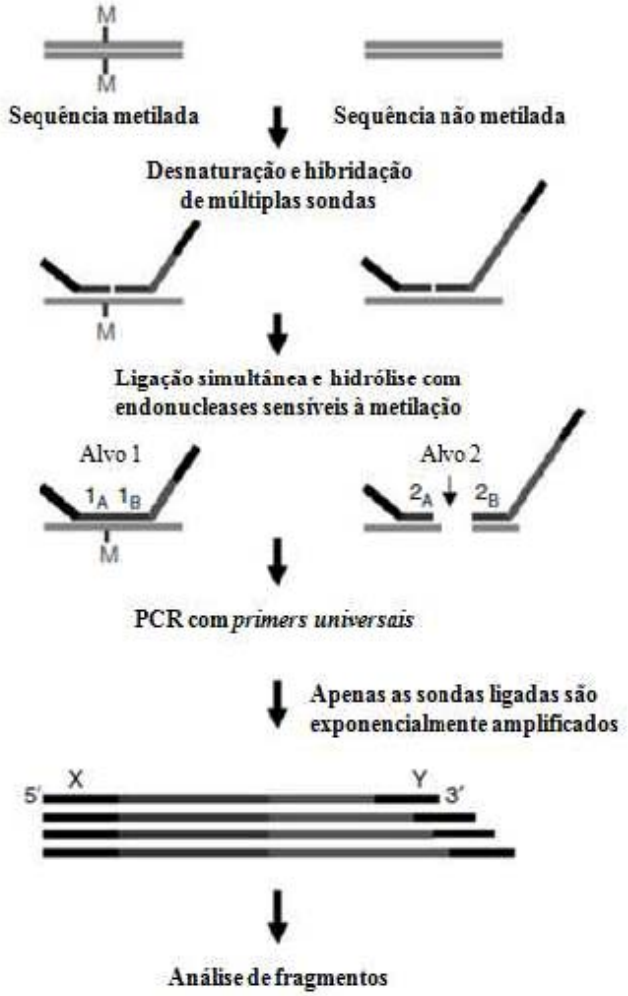


Figura 3 - Esquema ilustrativo do procedimento de MS-MLPA (Nygren *et al.*, 2005[58])

As sondas específicas para cada gene, que continham um local de reconhecimento para enzima de restrição *HhaI*, foram hibridizadas com o DNA-alvo. Posteriormente, ocorreu ligação e hidrólise com esta enzima, sensível à metilação. As sequências não digeridas (metiladas) foram

amplificadas. Nas regiões CpG não metiladas, o complexo DNA/sonda foi digerido e, consequentemente, não ocorreu amplificação. Para cada amostra de DNA, o MS-MLPA foi realizado com e sem a hidrólise pela enzima *HhaI*.

3.7 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH ARRAY)

Duas pacientes com PPC e características sindrômicas foram submetidas ao estudo de CGH array **(Anexo C, Tabela C 1, Pacientes 61 e 71)**. Nessa etapa, o DNA genômico extraído das pacientes selecionadas foi misturado com uma amostra de DNA controle, ambos marcados com diferentes fluorocromos. O DNA misturado foi colocado em uma placa de microarray, contendo diversos clones de cromossomos humanos. A placa de array está disposta de modo que a localização exata de cada fragmento dentro de todo o genoma pode ser identificado. Após hibridização, imagens de computador revelaram a proporção do DNA (controle versus paciente) para cada clone, tendo por base a fluorescência obtida, e estes dados foram analisados por um software específico e apresentados na forma gráfica. Para sequências onde houve uma duplicação na amostra do paciente, haverá mais verde do que a fluorescência vermelha e uma emissão verde global. Por outro lado, deleções irão resultar em um nível reduzido de fluorescência verde em relação à fluorescência vemelha da amostra controle e uma emissão vermelha global **(Figura 4)**. Este estudo foi realizado em colaboração com a Prof. Carla Rosenberg no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo.

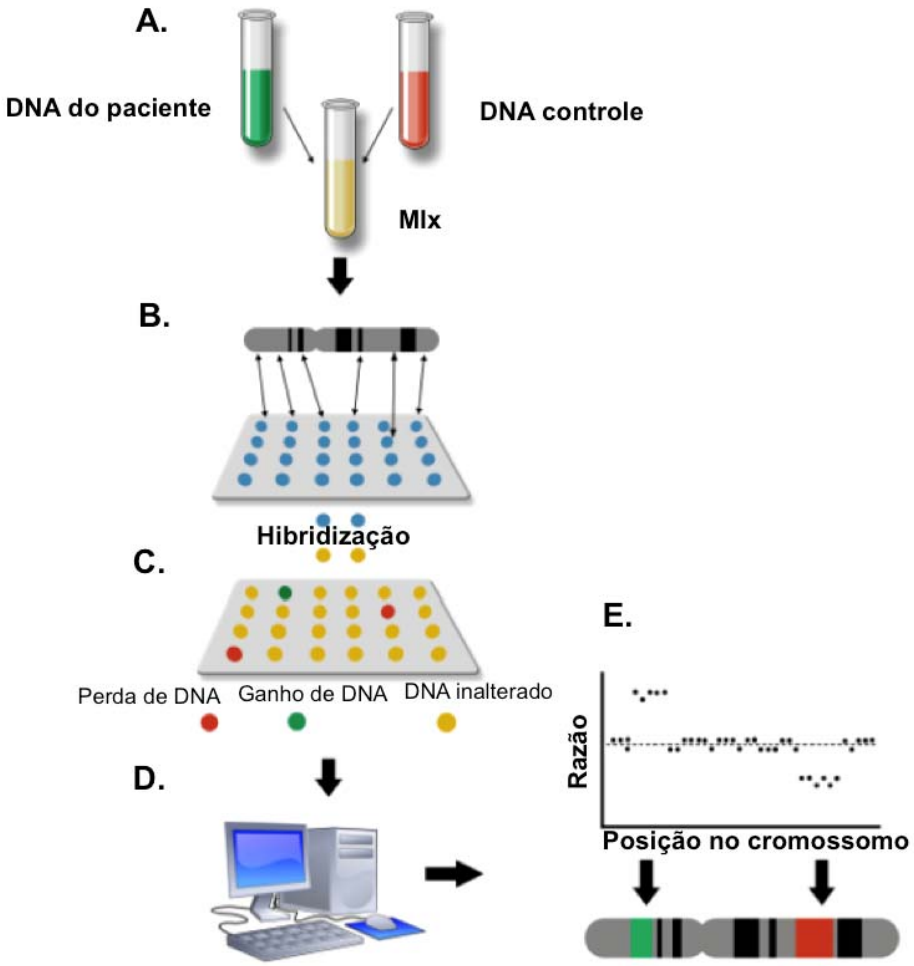


Figura 4 - Representação esquemática do CGH array. **A**. DNA controle (vermelho) e DNA do paciente (verde) marcados com diferentes corantes fluorescentes. **B**. Placa de microarray imobilizada com fragmentos de DNA clonados ou sintetizados, representativos de todo o genoma. **C**. DNA controle e DNA do paciente co-hibridizados em uma placa de microarray **D.** Scanner com software específico. **E.** Gráfico mostrando região de duplicação (verde) e deleção (vermelho).

Para a execução desta técnica, foram utilizados os dados de hibridização e leitura do Agilent 2x 400K CGH + SNP array, obtidos da Agilent Technologies. A variação no número final de cópias foi obtida por

relatórios gerados no Agilent Genomic Workbench 6.5 software package (Agilent Technologies, Santa Clara CA, United States).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Puberdade precoce central familial

4.1.1 Sequenciamento exômico global

Sequenciamento exômico realizado em 40 membros de 15 famílias com diagnóstico de PPC idiopática identificou 304.930 variantes. Rigorosos critérios foram usados como filtros para selecionar as mutações, provavelmente, causadoras do fenótipo de PPC **(Figura 5).** Cinco famílias apresentaram mutação no gene *MKRN3*, incluindo duas mutações do tipo frameshift (p.Arg213Gly*73, p.Ala162Glyfs*14), uma mutação nonsense (p.Tyr391*) e uma mutação missense (p.Arg365Ser). Uma mutação (p.Ala162Glyfs*14) foi comum a duas famílias. Todas as variantes foram confirmadas por sequenciamento automático.

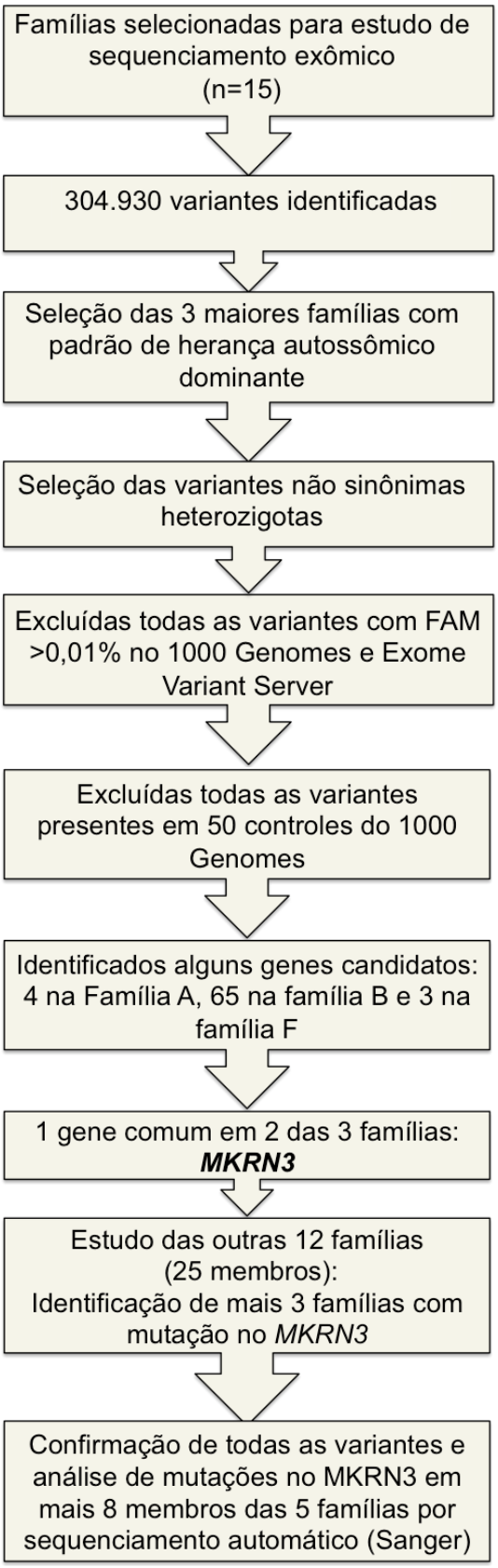


Figura 5 - Filtros usados para seleção de variantes associadas ao fenótipo

4.1.1.1 Variantes identificadas no sequenciamento exômico global

4.1.1.1.1 Variante Frameshift c.637delC p.Arg213Gly*73

A mutação frameshift em heterozigose no *MKRN3*, c. 637delC p. Arg213Gy*73, foi identificada em três irmãos com PPC pertencentes a uma família dos EUA de origem caucasiana **(Família B, Figura 6).** Seu pai, assintomático, também era portador da mutação. O DNA da avó paterna não estava disponível para a análise molecular. No entanto, sua história de menarca precoce sugere que o indivíduo II.1, pai das crianças afetadas, possa ter herdado a mutação de sua mãe, mas não tenha manifestado o fenótipo de PPC por este gene ser expresso apenas pelo alelo paterno. O caso índice (III.1) apresentou história de telarca aos 5,7 anos e pubarca aos 6,6 anos. Sua irmã (III.3) teve telarca aos 6,6 anos e seu irmão (III.2) apresentou desenvolvimento puberal aos 8 anos. Todos os três irmãos afetados possuíam LH basal e/ou após estímulo em níveis puberais e idade óssea avançada ao diagnóstico **(Tabela 6).** A deleção de uma citosina na posição 637 do *MKRN3* resultou em uma mutação frameshift no aminoácido 213 da proteína e em um stop códon prematuro, gerando uma proteína truncada com 286 ao invés de 507 aminoácidos.

4.1.1.1.2 Variante Nonsense c.1171_1172insA p.Tyr391*

A inserção de uma adenina na posição 1171 do gene *MKRN3*, c.1171_1172insA p.Tyr391*, foi encontrada em duas irmãs brasileiras com PPC (III.1 e III.2), no pai afetado (II.2), na tia paterna (II.3) e no avô paterno (I.1) **(Família F Figura 6).** As duas irmãs afetadas apresentaram telarca aos 6,2 e 5,7 anos, respectivamente, além de níveis púberes de LH estimulado. A inserção de uma adenina na posição 1171 do gene *MKRN3* resultou em um stop códon nessa posição, gerando uma proteína de 391 aminoácidos, com perda do último dedo de zinco.

4.1.1.1.3 Variante Missense c.1095G>T p.Arg365Ser

Uma mutação missense nova, c.1095G>T p.Arg365Ser, foi identificada em todos os três irmãos com fenótipo de PPC de uma família caucasiana da Bélgica **(Família G, Figura 6).** O caso índice teve telarca aos 6,2 anos (III.1) e sua irmã (III.3) apresentou telarca e pubarca aos 5,4 anos. Ao diagnóstico, ambas apresentavam avanço na idade óssea e LH púbere após estímulo. O irmão (III.2) apresentou avaliação médica aos 9,7 anos com aumento peniano, IO avançada e pelos pubianos no estadiamento 3 de Tanner. A data precisa do início das manifestações puberais no indivíduo III.2 não é clara. A mutação foi herdada do pai, que é carreador assintomático da mesma alteração. A mãe não apresenta a mutação descrita. O aminoácido arginina (Arg) está localizado na estrutura de anel de zinco da proteína, que é altamente conservada entre as espécies.

4.1.1.1.4 Variante Frameshift c.475_476insC p.Ala162Glyfs*14

A inserção em heterozigose de uma citosina na posição 475 do gene *MKRN3* gerou uma proteína truncada de 176 aminoácidos em membros de duas famílias com PPC de diferentes origens **(Famílias K e P, Figura 6).**

A Família K, de origem brasileira, apresenta dois irmãos com PPC. O paciente III.2 teve história de aumento peniano e pubarca aos 5,9 anos. Na primeira avaliação aos 8,1 anos, apresentava IO de 10 anos, volume testicular 10 mL bilateral (Tanner 3) e comprimento peniano de 9,5 cm. Os exames laboratoriais eram compatíveis com puberdade: LH basal e após estímulo púberes e testosterona elevada. O irmão (III.3) também teve história de desenvolvimento sexual prematuro, apresentando estadiamento 3 de Tanner para pelos pubianos e genitália aos 9,6 anos. Ambos os irmãos herdaram a mutação do pai, que é carreador assintomático. A história clínica e o DNA da mãe não estavam disponíveis para esse estudo.

A outra família (Família P) identificada com essa mesma mutação, de origem caucasiana e proveniente dos EUA, apresenta dois irmãos com história de PPC. O caso índice (III.1) teve aumento testicular e peniano aos 8,5 anos. Sua irmã (III.2) apresentou telarca aos 5 anos. Ao diagnóstico, ambos tinham IO avançada e LH basal púbere. O pai, não afetado, é carreador da variante em heterozigose e a mãe assintomática não é portadora da mutação.

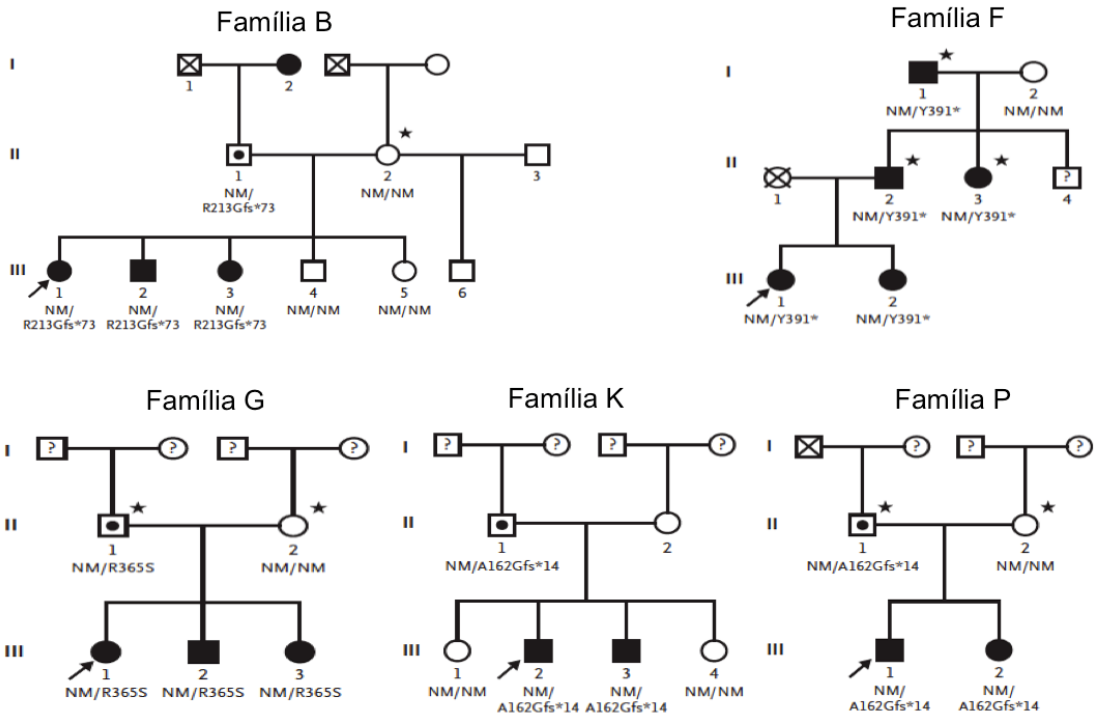


Figura 6 - Análise de segregação familiar das cinco famílias com mutação no gene *MKRN3* identificadas no estudo de sequenciamento exômico global. O caso índice está indicado pela seta. NM significa alelo não mutado, círculo sexo feminino, quadrado sexo masculino, símbolo cheio membro afetado, símbolo com X falecimento, símbolo com ponto de interrogação genótipo desconhecido e símbolo com ponto no interior carreador assintomático. O asterisco (*) indica que o individuo foi estudado apenas por sequenciamento direto.

4.1.2 Sequenciamento Automático (Sanger)

Pesquisa de mutação no *MKRN3* foi realizada pela técnica convencional (sequenciamento direto) em duas famílias **(Famílias R e S, Figura 7).** Duas novas variantes frameshift foram encontradas: p.Pro161Argfs*10 (Família R) e p.Pro161Argfs*16 (Família S).

4.1.2.1 Variantes identificadas no sequenciamento direto

4.1.2.1.1 Variante Frameshift c.482_483delC p.Pro161Argfs*10

A deleção de uma citosina na posição 482 do gene *MKRN3*, c.482_483delC p.Pro161Argfs*10, foi encontrada em duas irmãs brasileiras com PPC (II.1 e II.2) e em seu pai (I.1), carreador assintomático **(Família R, Figura 7).** O caso índice (II.2) apresentou telarca e pubarca aos 6,4 anos, avanço de idade óssea e LH em condição basal púbere. Foi tratada com análogo de GnRH por 1,9 anos, com boa resposta, atingindo altura final de 168,5 cm (z-score: 1,05) e menarca aos 11,8 anos. Sua irmã (II.1), não tratada, apresentou menarca aos 8,5 anos e tem altura final de 158 cm (z-score: -0,7). A deleção de uma citosina na posição 482 do gene *MKRN3* resultou em um stop códon prematuro, gerando uma proteína truncada com 171 aminoácidos.

4.1.2.2 Variante Frameshift c.482_483 p.Pro161Argfs*16

Uma mutação frameshift, c.482_483 p.Pro161Argfs*16, foi identificada na região codificadora do *MKRN3* em uma paciente brasileira com fenótipo de PPC (III.1), em seu pai (II.2) e tia paterna (II.1) **(Família R, Figura 7).** O caso índice teve telarca aos 6 anos e pubarca aos 6,3 anos (III.1). Seu pai (II.2) e tia paterna (II.1) apresentaram também história de puberdade precoce, embora a data precisa do início das manifestações puberais no individuo II.2 não seja clara. Por sua vez, a mãe da paciente (II.3) apresentou menarca aos 12 anos e não apresenta a mutação descrita.

A inserção de uma citosina na posição 482 do *MKRN3* resultou em uma mutação frameshift no aminoácido 161 e em um stop códon prematuro, gerando uma proteína truncada com 177 em lugar de 507 aminoácidos.

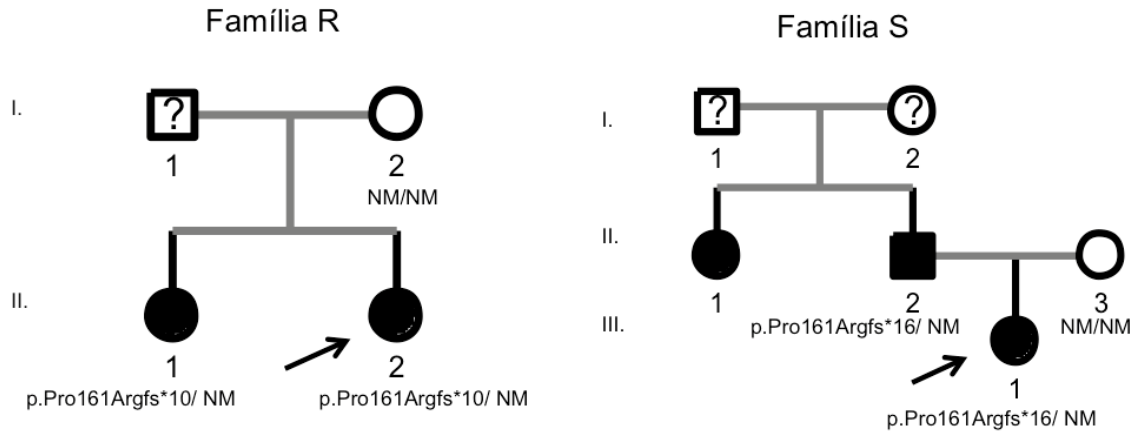


Figura 7 - Análise de segregação familiar de duas famílias com mutação no gene *MKRN3* identificadas por meio do sequenciamento direto. O caso índice está indicado pela seta. NM significa alelo não mutado, círculo sexo feminino, quadrado sexo masculino, símbolo cheio membro afetado, símbolo com ponto de interrogação genótipo desconhecido

4.1.3 Correlação genótipo- fenótipo

Todos os 19 pacientes (11 mulheres e oito homens) com PPC causada por mutações no *MKRN3* apresentaram características clínicas e hormonais típicas de ativação prematura do eixo reprodutivo, incluindo sinais de precocidade sexual, como desenvolvimento das mamas e pelos pubianos e aumento testicular, crescimento linear acelerado, idade óssea avançada, níveis púberes de LH basal e/ou após estímulo. A mediana de idade de início puberal foi de 6 anos nas meninas (variando de 5 a 6,5 anos) e 8 anos nos meninos (variando 5,9- 8,5 anos). O tempo exato de início da puberdade não ficou claro em dois meninos, mas a avaliação clínica e laboratorial confirmou o diagnóstico de PPC. A paciente índice da Família B e seu irmão apresentavam esotropia, que é um critério menor de diagnóstico para a síndrome de Prader Willi. Nenhuma outra característica da síndrome de Prader Willi fo identificada. Nos dados da **Tabela 6** estão sumarizadas as principais características clínicas e laboratoriais, bem como as mutações encontradas nas cinco famílias estudadas por sequenciamento exômico global e nas duas famílias avaliadas exclusivamente por sequenciamento direto.

Tabela 6 - Caracterização clínica, laboratorial e molecular dos pacientes com PPC familial causada por mutação no *MKRN3.*

Família e origem	**Membros**	**Manifestação clínica inicial (idade em anos)**	**Diagnóstico** Idade Anos	Mamas/ Genitália Estádio Tanner	IO anos	**LH IU/L** Basal	Pós LHRH	**FSH IU/L** Basal	**E2 pg/mL**	**T ng/dL**	**Mutação** DNA	***MKRN3*** Proteína
B EUA	I	Telarca (5,7)	6,5	2	7,7	0,8	13,6	3,8	25	-	637delC	Arg213Glyfs*73
	II	Gonadarca (8)	8,7	3	11	2,9	20	2,5	-	78	637delC	Arg213Glyfs*73
	III	Telarca (6,5)	6,7	2	7,8	1,1	17	4,5	<15	-	637delC	Arg213Glyfs*73
F Brasil	I	Telarca (6,2)	7,0	3	7,0	<0,6	36	1,1	13	-	1171_1172insA	Tyr391*
	II	Telarca (5,7)	6,0	3	6,0	<0,6	37	1,1	11	-	1171_1172insA	Tyr391*
G Brasil	I	Gonadarca e pubarca (5,9)	8,1	3	10	1,2	6,7	1,5	-	116	475_476insC	Ala162Glyfs*14
	II	Gonadarca e pubarca desconhecidos	9,7	3	9,7	1,6	11	0,8	-	548	475_476insC	Ala162Glyfs*14
K EUA	I	Gonadarca e pubarca (8,5)	8,8	3	11	4,1	-	3,1	-	216	475_476insC	Ala162Glyfs*14
	II	Telarca (5,0)	6,5	2	8,3		7,4	13	-		475_476insC	Ala162Glyfs*14
P Bélgica	I	Gonadarca e pubarca desconhecidos	9,7	3	12	2	19	4,4	-	67	1095G>T	Arg365Ser
	II	Telarca (6,2)	6,4	2	9,4*	<0,1	7,3	7	49	-	1095G>T	Arg365Ser
	III	Telarca (5,4)	5,7	2	8,5	0,5	12	3,6	<15		1095G>T	Arg365Ser
Q Brasil	I	Menarca (8,5)									482_483delC	Pro161Argfs*10
	II	Telarca e pubarca (6,4)	7,8	3	11	1,0	12	2,9	15		482_483delC	Pro161Argfs*10
R Brasil	I	Telarca (6,0) e pubarca (6,3)	6,9	3	9,3	2,7	16,6	6,5	47		482_483insC	Pro161Argfs*16

IO: idade óssea; E2: estradiol; T: testosterona; * IO aos 7,4 anos.

4.1.4 Análise *in silico* da variante missense c.1095G>T p.Arg365Ser

O possível efeito da substituição de uma arginina por uma serina na posição 365 da proteína MKRN3 foi avaliado por diferentes programas de predição *in silico* (escore no PolyPhen2: 1,0 e escore no PANTHER: 0,95), e sugeriu que essa variante poderia afetar a estrutura e, consequentemente, a função da proteína.

4.2 Puberdade Precoce Central Esporádica

4.2.1 Pesquisa de mutações no gene *MKRN3*

A identificação do *MKRN3,* como novo gene candidato relacionado à PPC familial por meio de sequenciamento exômico global, despertou o interesse em buscar novas mutações em pacientes com a forma aparentemente esporádica de PPC. O DNA genômico dos 213 pacientes selecionados foi usado para amplificação do único éxon do gene *MKRN3*. Todos os produtos de PCR foram analisados pós-sequenciamento automático.

No grupo de PPC aparentemente esporádica, três mutações novas e duas já identificadas anteriormente no grupo de PPC familial (p.Pro161Argfs*10, p.Pro161Argfs*16) foram encontradas no gene *MKRN3*, em heterozigose, em seis meninas não relacionadas. Estas variantes, incluindo quatro frameshifts e uma missense, estavam ausentes nos bancos de referência 1000 Genomes e NHLBS EVS (National Heart, Lung, and

Blood Institute Exome Variant Server). Todas as mutações frameshifts (p.Pro161Argfs*10, p.Pro161Argfs*16, p.Gln226Thrfs*6, p.Glu256Glyfs*36) estavam localizadas na região aminoterminal da proteína MKRN3, ao passo que a mutação missense (p.Phe417Ile) localizava-se em um dedo de zinco na região carboxiterminal.

4.2.2- Correlação genótipo-fenótipo

As seis pacientes com PPC aparentemente esporádica causada por mutações no *MKRN3* apresentavam quadro clínico e hormonal típico de ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, incluindo aparecimento precoce e progressivo de caracteres sexuais secundários, aceleração da velocidade de crescimento, idade óssea avançada e níveis puberais de LH basal ou pós-estímulo com GnRH. Uma paciente **(Paciente 5, Tabela 7)** apresentava características sindrômicas inespecíficas, tais como palato arqueado, anormalidades dentárias, clinodactilia e hiperlordose.

A idade de início puberal nas pacientes com mutação no *MKRN3* variou de 3 a 6 anos (média: 5,1 anos; mediana: 5,7 anos). As medianas do LH basal e LH pós-estímulo com GnRH foram 1,7 U/L (variando de 0,3 a 6,1) e 35 U/L (variando de 7,5 a 62,5), respectivamente. As meninas afetadas foram tratadas com análogos de GnRH *depot* por um período médio de 3,4 anos. Um controle clínico e hormonal adequado foi obtido em quatro das seis meninas, as quais atingiram altura final próxima à altura alvo prevista e tiveram menarca em idade apropriada. Duas pacientes não aderiram ao

tratamento. A caracterização clínica e hormonal bem como o seguimento das pacientes com PPC aparentemente esporádica e mutação no *MKRN3* estão sumarizadas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Características clínicas e laboratoriais de seis meninas com PPC aparentemente esporádica causadas por mutação no *MKRN3*

Paciente	**Manifestação Clínica Inicial (Idade em anos)**	**Diagnóstico**					**LH (IU/L)**		**FSH (IU/L)**	**E2 (pg/mL)**	**S Seguimento**
		Idade (Anos)	Estágio Tanner Mamas	Estágio Tanner Pelos pubianos	IMC (Z)	IO (Anos)	Basal	Pós-GnRH	Basal		Menarca (anos)
1	Telarca (5,4)	6,1	3	1	0,2	8,8	1,3	-	5	36	11,9
2	Telarca (6)	7,9	4	3	2,0	11	3,4	-	10	80	ND
3	Telarca (3) e pubarca (6)	6,7	3	1	1,5	8,8	1,8	62,5	4,9	60	ND
4	Telarca (4)	6,8	4	3	1,3	12	6,1	-	4,7	62	10
5	Telarca e pubarca (6)	6,6	3	2	1,4	7,8	1,6	-	4,6	20	12
6	Telarca (6)	7,1	3	1	0,2	8,8	0,3	7,5	4,4	44	12

IMC: índice de massa corpórea, IO: idade óssea; E2: estradiol; ND: não disponível

4.2.3 Análise de segregação familiar

Análise genética foi realizada em nove parentes de primeiro-grau de três das seis meninas com mutação no *MKRN3*, incluindo todos os pais (seis indivíduos), dois irmãos **(Famílias 1 e 3)** e uma filha **(Família 6).** Os parentes das outras três pacientes não estavam disponíveis para o estudo genético. A segregação familiar demonstrou que o alelo mutado foi transmitido pelo lado paterno em todas as famílias avaliadas, sendo os pais carreadores da mesma mutação de suas filhas afetadas, enquanto as mães não apresentaram mutação. A irmã mais nova (4 anos) da **Paciente 1** também apresentou mutação no MKRN3 (p. Pro161Argfs*16), porém, no momento do estudo genético, ainda não apresentava sinais de desenvolvimento puberal. O seguimento clínico desta paciente revelou aumento da velocidade de crescimento aos 6 anos, seguido de nível basal púbere de LH (0,4 mUI/ml) e telarca rapidamente progressiva (estágio Tanner 1 a 3), entre 6,3 e 6,7 anos. Os heredogramas das três famílias com PPC aparentemente esporádica e mutação no *MKRN3* disponíveis para estudo de segregação estão representados na **Figura 8** .

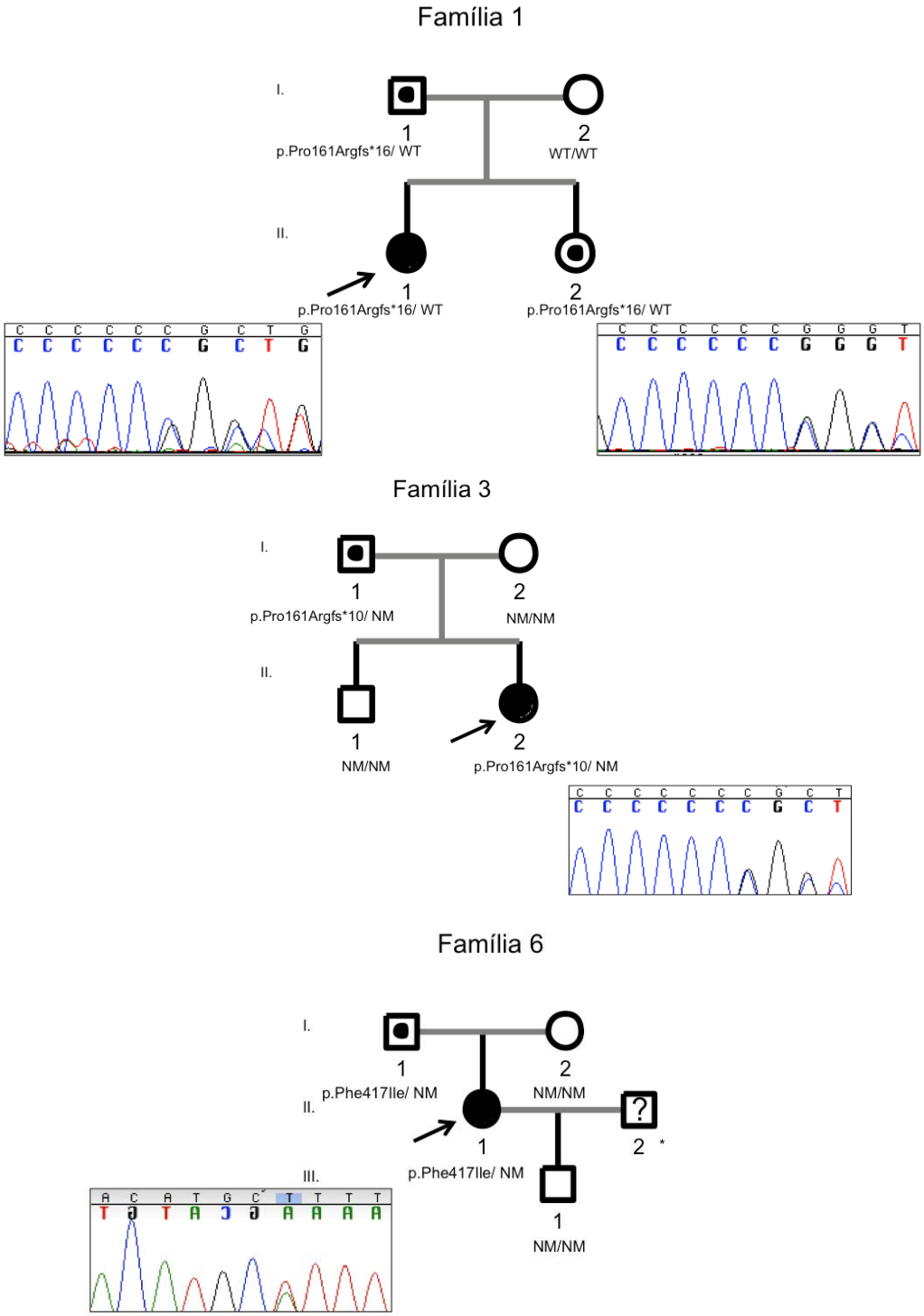


Figura 8 - Análise de segregação familiar de três das seis meninas não relacionadas com PPC aparentemente esporádica e mutação no *MKRN3*. O caso índice está indicado pela seta. NM significa alelo não mutado, círculo sexo feminino, quadrado sexo masculino, símbolo cheio membro afetado, símbolo com ponto de interrogação genótipo desconhecido e símbolo com ponto no interior carreador assintomático

4.2.4 Análise *in silico* da variante p.Phe417Ile

A substituição de uma fenilalanina por uma isoleucina na posição 417, localizada dentro de um dedo de zinco da proteína MKRN3, foi considerada patogênica em quatro diferentes programas de predição *in silico* (Mutation Taster, PolyPhen-2, SIFT e Panther).

4.2.5 Polimorfismos

Três variantes polimórficas exômicas, sinônimas (c.663C>T, c.402G>A, c.798C>T) foram encontradas no gene *MKRN3*. Os polimorfismos exômicos encontrados haviam sido previamente descritos (SNP ID: rs2239669, rs149344478, rs145255803, ref seq CONTIG NM_005664 www.ncbi.nlm.nih.gov). O polimorfismo rs2239669 foi frequente na população estudada, porém não houve diferença estatística nas frequências genotípica e alélica dessa variante comparadas aos controles do 1000 Genomes **(Tabelas 8 e 9)**.

Tabela 8 - Frequência genotípica do polimorfismo c.663C>T (rs2239669) no gene *MKRN3* em pacientes com PPC e controles

	Frequência Genotípica		Total
	CC	CT/TT	
PPC	157 (66,2%)	73/7 (33,8)	237
Controle	668 (61,2%)	368/56 (38,8%)	1092

Tabela 9 - Frequência alélica do polimorfismo c.663C>T (rs2239669) no gene *MKRN3* em pacientes com PPC e controles

	Frequência Alélica		Total
	C	T	
PPC	387 (81,4%)	87 (18,6%)	474
Controle	1.704 (78%)	480 (22%)	2184

4.3 PESQUISA DE MUTAÇÕES NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MKRN3*

A região promotora do gene *MKRN3* é reconhecida por ser sítio de ligação de potenciais fatores de transcrição (PEA3, SRE, SRF, C/EBP, AP2, testis-R). Sendo assim, variantes nessa região poderiam modular a expressão gênica e levar à PPC ou ao atraso constitucional do crescimento e da puberdade (ACCP).

Com base nessa hipótese, nós selecionamos 61 pacientes com PPC idiopática e 28 pacientes com ACCP para a pesquisa de mutações na região promotora do *MKRN3*. O grupo de ACCP foi constituído por pacientes acompanhados no Ambulatório de Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

História familiar de precocidade ou atraso puberal estavam presentes em 28% e 32% dos pacientes, respectivamente. Mutações inativadoras na região codificadora do *MKRN3* foram excluídas em todos os pacientes com PPC.

Uma variante rara, -150_-147TCAGdel, foi identificada na região promotora do *MKRN3* em uma paciente com PPC que apresentou início do desenvolvimento sexual aos 7,6 anos. Sua mãe, com história de menarca aos 10 anos, não apresenta a variante. O pai e os dois irmãos não estavam disponíveis para o estudo genético. Essa variante não está descrita no banco de dados do 1000 Genomes e também não foi encontrada em 150 exomas estudados pelo pesquisador Antônio Lerário, na Universidade de Michigan.

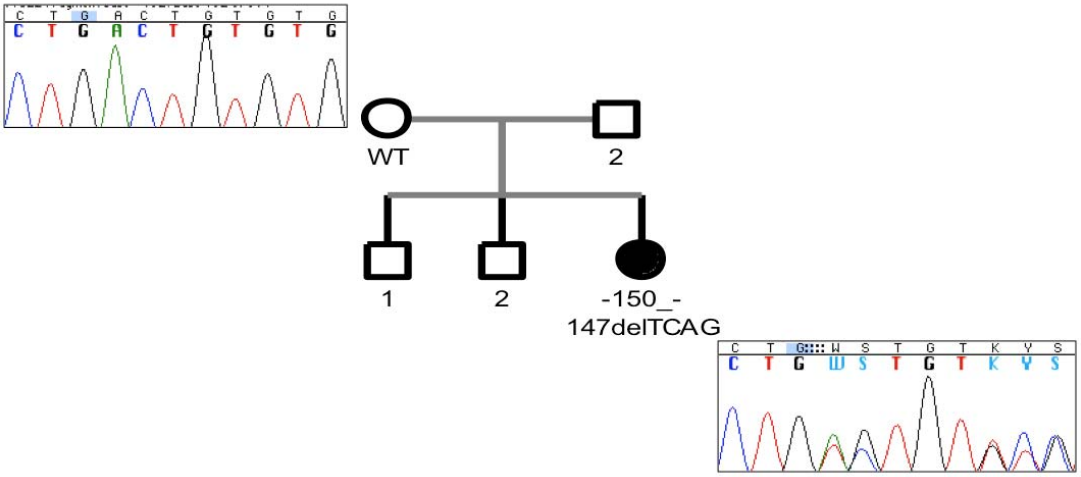


Figura 9 - Segreção familiar da paciente com mutação na região promotora do *MKRN3* e eletroferograma mostrando a variante -150_-147TCAGdel, em heterozigose, na região promotora do gene *MKRN3*

4.3.1 Análise *in silico* da variante -150_-147TCAGdel na região promotora do *MKRN3*

O efeito da deleção de quatro nucletídeos na posição -147 a -150 em relação ao sítio de início da transcrição (ATG) foi avaliado pelo programa *in silico* Genomatix software suite. Nesse programa, a comparação da sequência deletada com a sequência referência demonstrou a perda da ligação de um fator de transcrição chamado DREAM (downstream responsive element antagonist modulator).

4.4 VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS E ANÁLISE DE METILAÇÃO NO *LOCUS* 15q11-13

Dos 207 pacientes com PPC esporádica e 25 pacientes com PPC familial, sem mutação no *MKRN3*, foram selecionados 52 pacientes para estudo do número de cópias e anormalidades de metilação no *locus* 15q11 por meio da técnica de MS-MLPA. Nenhuma anormalidade foi encontrada nos casos analisados **(Figura 10)**.

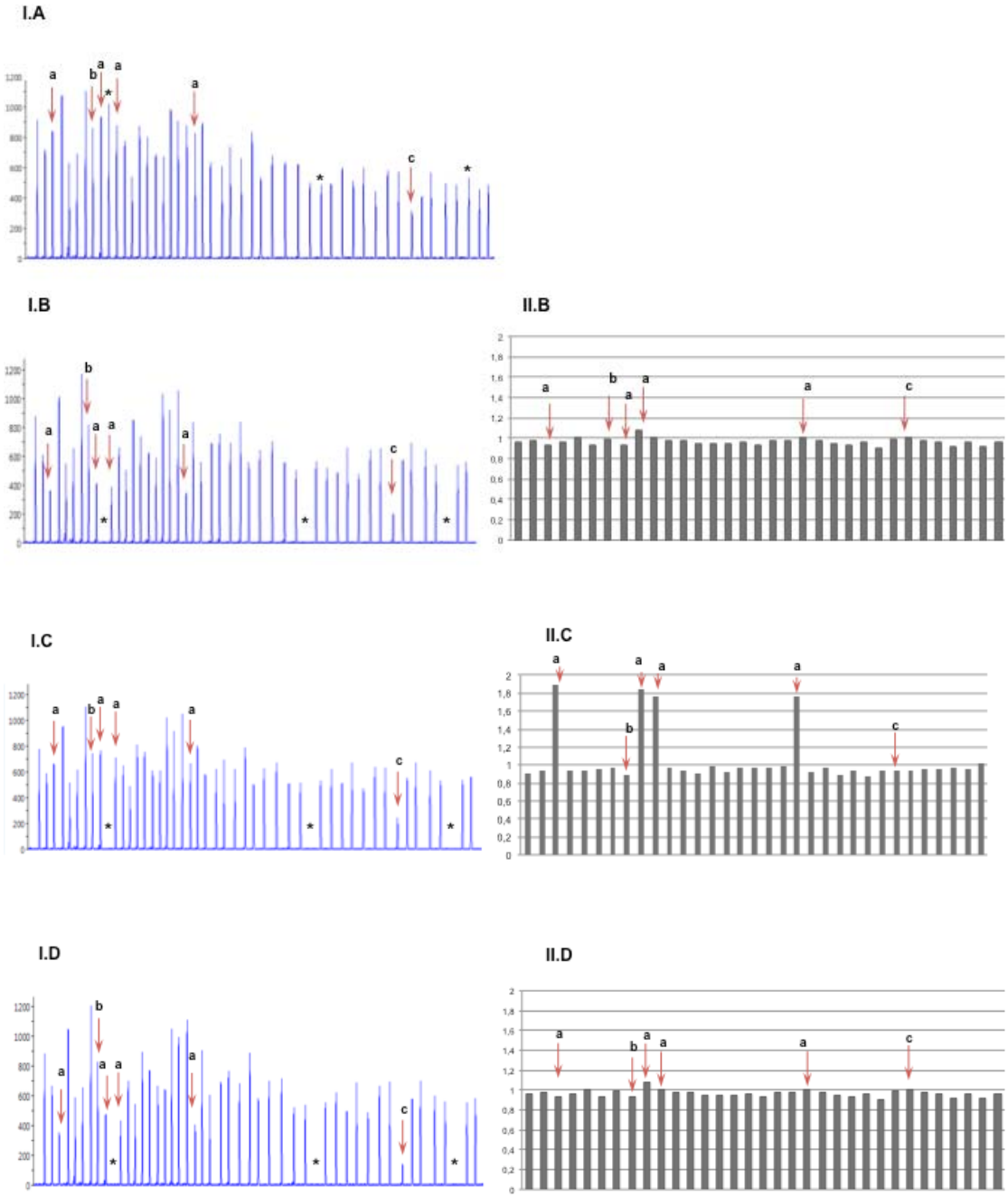


Figura 10 - Representação esquemática dos padrões de pico obtidos no estudo de MLPA do *locus* 15q11, com e sem digestão com a enzima *HhaI* (coluna esquerda). Histogramas com dados representativos de um indivíduo, normalizado para os resultados de três indivíduos (controles) e controles internos (coluna da direita). Valores relativos normalizados dentro de um intervalo de confiança de 0.7 a 1.3, correspondem à presença de duas cópias do gene

Figura 10 - legenda

a. Quatro sondas SNRPN. b. Sonda MKRN3 (éxon 1; não digerido por *HhaI*). c. Sonda NDN. O sítio reconhecido por esta sonda tem uma tendência para ser 'overdigested', e pode, por conseguinte, ser apenas 30% metilado.

Controles positivos de digestão pela enzima *HhaI*.

A0. Indivíduo normal (não digerido). A1. Indivíduo normal (digerido com *HhaI*). Este exemplo mostra uma redução de cerca de 50% da altura (ou área) dos picos correspondentes às quatro sondas SNRPN (a) e à sonda NDN (c), indicando a metilação de apenas um alelo, como esperado. B. Paciente com a síndrome de Prader Willi, causada por dissomia uniparental materna (digerido com *HhaI*). Esse indivíduo não apresentou uma redução da altura do pico das quatro sondas SNRPN, indicando que ambos os alelos foram metilados. C. Indivíduo com PPC, sem mutação no *MKRN3* (digerido com HhaI), apresentando uma altura de pico semelhante ao indivíduo controle.

4.5 Hibridização genômica comparativa (CGH array)

Duas pacientes com PPC idiopática associado a manifestações sindrômicas foram selecionadas para a pesquisa de deleções e duplicações por CGH array. O estudo de hibridização genômica não detectou ganhos ou perdas de regiões cromossômicas nas pacientes estudadas.

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A puberdade precoce central idiopática é um problema endócrino comum, especialmente, entre as meninas. Quando não tratada de forma adequada, a puberdade precoce pode resultar em baixa estatura, distúrbios psicológicos e comportamentais, além de risco aumentado para câncer de mama e endométrio, doenças cardiovasculares, obesidade, Diabetes mellitus e síndrome dos ovários policísticos [23,61,62].

Fatores ambientais, socioculturais e metabólicos parecem desempenhar papel importante na regulação do início puberal, mas as evidências sugerem que estes fatores encontram-se sob influência de uma base genética [3,11,63].

Dessa forma, a busca por genes candidatos envolvidos no controle da transcrição gênica durante o processo puberal vêm despertando o interesse de vários pesquisadores dedicados ao estudo do eixo reprodutivo. A seleção dos genes candidatos baseou-se primariamente nos resultados de estudos em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito, em genes envolvidos nos processos fisiológicos de regulação da secreção de GnRH em modelos animais, ou ainda, nos estudos de associação ampla do genoma.

Apesar dos vários genes estudados na última década, apenas raros defeitos genéticos no *KISS1* e em seu receptor, *KISS1R,* foram identificados em pacientes com PPC até o momento [35,38].

Neste estudo, nós usamos uma abordagem baseada no emprego de novas metodologias como o sequenciamento exômico global para identificar variantes genéticas relacionadas à PPC. Utilizando-se dos avanços nas técnicas de sequenciamento e de uma criteriosa seleção de pacientes com PPC, especialmente das formas familiares, nós identificamos mutações inativadoras em único gene, *MKRN3,* em cinco das 15 famílias com PPC inicialmente estudadas. Mutações no *MKRN3* foram também encontradas em duas famílias analisadas posteriormente por sequenciamento automático.

Das mutações encontradas, 5 variantes eram do tipo frameshift ou nonsense levando a stop códon prematuro e, consequentemente, resultando em proteínas truncadas e uma mutação era do tipo missense, localizada em uma região de anel de zinco, importante para a função da proteína.

A análise de segregação familiar demonstrou um padrão de herança autossômica dominante, com penetrância completa e transmissão apenas pelo alelo paterno, de acordo com o fenômeno de *imprinting* materno esperado para este gene.

Em seguida, nós identificamos ainda mais três novas mutações no *MKRN3*, incluindo duas variantes frameshifts e uma missense, em seis meninas não relacionadas com a forma aparentemente esporádica de PPC.

O estudo de segregação familiar realizado em três dessas pacientes revelou que esses casos ditos inicialmente esporádicos eram, na verdade, também familiares, indicando que, muito frequentemente, a natureza familiar da precocidade sexual não é reconhecida.

Todos os pacientes com PPC causada por mutação no *MKRN3* apresentaram características clínicas e hormonais típicas de ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. A mediana de idade de início da puberdade foi de 6 anos nas meninas (variando de 3,0 a 6,5) e de 8 anos nos meninos (variando de 5,9 a 8,5) [64,65]. Considerando-se o limite inferior de idade para início da puberdade (8 anos nas meninas e 9 anos nos meninos), observamos que os meninos com mutação no *MKRN3* apresentam puberdade precoce em uma idade mais borderline quando comparados às meninas, sugerindo que a deficiência do MKRN3 tem um impacto menor no início da puberdade no sexo masculino. Possíveis explicações para esses achados podem ser: a dificuldade na determinação da idade precisa de início da puberdade no sexo masculino, uma vez que o aumento testicular não é tão evidente quanto a telarca e a menarca nas meninas e a possibilidade de fatores ambientais, nutricionais, étnicos desempenharem impacto maior na puberdade em meninas que em meninos.

Posteriormente a nossos achados, outros investigadores também reportaram mutações no *MKRN3* em pacientes com PPC familial de diferentes origens [66-73], contribuindo assim para expandir o espectro de mutações nesse gene.

Além disso, o importante papel do *MKRN3* no início da puberdade em humanos foi reforçado, mais recentemente, pelos estudos de associação ampla do genoma e ensaios de genotipagem em 182.416 mulheres de origem europeia (57 estudos), que evidenciaram 123 sinais em 106 loci genômicos associados com a idade da menarca [74]. Três desses *loci* estavam localizados em regiões de *imprinting*, incluindo o gene *MKRN3* [74].

Atualmente, mutações no *MKRN3* representam a causa genética mais comum de PPC, sendo responsável por 33-46% dos casos familiares [72,75].

5.2 Um Novo Gene Candidato Associado à PPC: Gene *MKRN3*

O *MKRN3* representa o primeiro gene imprintado associado com distúrbios da puberdade.

O gene *MKRN3*, inicialmente denominado ZNF 127 (zinc finger 127), foi clonado pela primeira vez em 1999 por Jong *et al.* [57] enquanto estudavam a região crítica da síndrome de Prader Willi (SPW). O *MKRN3* está localizado no cromossomo 15q11–13 em humanos (cromossomo 7C em ratos) em uma região que contém diversos genes imprintados associados com duas diferentes doenças neurocomportamentais: SPW e síndrome de Angelman (SA) [76,77]. Mutações ou perda de expressão em genes de transmissão exclusivamente materna, como o *UBE3A* levam à SA, enquanto a SPW parece ser causada por uma perda da expressão de múltiplos genes contíguos com herança exclusiva pelo alelo paterno, incluindo o *MKRN3* [78].

Apesar da localização do *MKRN3* em uma região crítica para a SPW, o papel desse gene para a síndrome não é conhecido.

O relato de dois pacientes com SPW e deleção no *locus* 15q11–13, não incluindo o *MKRN3*, sugerem que este gene não é essencial para o desenvolvimento da síndrome, mas não exclui que ele tenha papel em algumas características clínicas da SPW [79].

A expressão monoalélica diferencial do *MKRN3* ocorre por meio do silenciamento do alelo materno, que está associado à metilação de ilhas CpG localizadas nesse *locus* [57,80]. A explicação pela qual determinados genes sofrem expressão diferencial não é conhecida, mas é sabido que este processo é estabelecido ainda na fase do desenvolvimento das células germinativas em óvulos e espermatozoides e passa por várias alterações ao longo da vida do organismo, incluindo metilação, demetilação e metilação *de novo* [81].

A metilação do *MKRN3* e de outros genes imprintados localizados na região crítica da SPW/SA no cromossomo 15 estão sob regulação de um centro de *imprinting* (CI) que é subdividido em duas partes, o CI-SPW e o CI-SA, relacionados à SPW e SA, respectivamente [78]. O CI-SPW é formado por uma sequência de nucleotídeos envolvendo o promotor do gene *SNPRN*, enquanto o CI-SA compreende uma sequência de 880 pb localizada a montante do gene *SNRPN* [78,82]. O mecanismo molecular do CI não é bem conhecido, mas estudos animais e em humanos sugerem que o CI-SPW é regulado positivamente e ativa a expressão do alelo paterno [83,84], enquanto o

CI-SA atua inibindo o CI-SPW, permitindo a expressão do alelo materno [57, 85-87].

Com base nesses conceitos, neste estudo, nós realizamos a análise de metilação do *locus* 15q-11 por meio da técnica de MS-MLPA em um subgrupo de pacientes com PPC idiopática. O produto comercial utilizado incluía cinco sondas para o estudo de metilação, sendo 4 delas destinadas à metilação do gene *SNPRN*, importante componente do centro de *imprinting* desse *locus*. Nenhuma alteração de metilação foi encontrada no subgrupo de pacientes analisados. No entanto, em razão da ausência de uma sonda específica para metilação do *MKRN3*, não podemos excluir que uma metilação restrita a esse gene possa existir.

A participação de um mecanismo de regulação epigenética na determinação do início da puberdade foi sugerida também por Lominiczi *et al.* [88]. Em 2013, esses autores identificaram um complexo proteico de silenciamento transcricional conhecido como Polycomb, que reprime a expressão do *Kiss1* no núcleo arqueado do hipotálamo de ratas pela ação de dois genes principais, *Eed* e *Cbx7.* A expressão hipotalâmica dos genes *Eed* e *Cbx7* diminui antes do início da puberdade, e esta alteração está relacionada a um aumento da metilação do promotor desses genes, resultando no aumento da transcrição do *Kiss1*, um dos principais estimuladores da secreção de GnRH [88]. A participação desse mecanismo repressor de regulação epigenética no controle neuroendócrino da puberdade fornece um nova visão sobre o início da puberdade em

mamíferos [88]. Entretanto, até o momento, alterações de metilação e/ou expressão nesses genes não foram identificadas em pacientes com PPC.

5.3 ESTRUTURA GÊNICA E PROTEICA DO MKRN3

A região codificadora do *MKRN3* possui 2711pb e um éxon único **(Figura 11).** A tradução de seu RNAm gera um peptídeo de 507 aminoácidos denominado Makorin ring finger 3, pertencente à família Makorin, que se caracteriza pela presença de 2 ou 3 dedos de zinco C3H na região aminoterminal, um arranjo específico Cys-His e um anel em dedo de zinco **(Figura 12)** [57]. A família Makorin possui nove *loci* distribuídos ao longo do genoma, mas apenas três deles possuem função e foram identificados em vertebrados até o momento- *MKRN1*, *MKRN2* e *MKRN3*. [89,90]. O *MKRN1*, descoberto há 80-90 milhões de anos, é o precursor dessa família e parece desempenhar papel na ubiquitinação, induzindo à degradação proteínas do capsídeo viral, reguladores do ciclo celular p21 e p53, trancriptases reversas da telomerase humana, além de regular a transcrição da RNA polimerase tipo II, enzima essencial para expressão gênica [89]. O alto grau de homologia nas sequências de aminoácidos entre as proteínas da família Makorin, particularmente nos domínios em dedos de zinco, permite inferir que os outros membros dessa família, como o *MKRN2* e o *MKRN3,* possam ter mecanismos regulatórios semelhantes [89].

Por sua vez, a região promotora do *MKRN3* consiste em 1000pb (-750 a + 350pb em relação ao sítio de início da transcrição) e é

reconhecidamente uma região de ligação de potenciais fatores de transcrição [57] **(Figura 11)** que podem desempenhar papel importante na modulação da expressão gênica. Sendo assim, nós investigamos também mutações na região promotora do *MKRN3* em um subgrupo de pacientes. Uma variante rara, -150_-147 TCAGdelC, foi encontrada em uma menina com PPC idiopática. Sua mãe, com história de menarca aos 10 anos, não apresenta a mutação, o que está de acordo com o padrão de herança esperado para esse gene (alelo materno silenciado e transmissão apenas pelo alelo paterno). Estudo de segregação não foi possível no pai e dois irmãos não afetados. Interessantemente, o estudo *in silico* dessa variante revelou a perda da ligação de um fator de transcrição conhecido como DREAM. O DREAM (downstream responsive element antagonist modulator) é um fator de transcrição de ligação ao cálcio e presente no SNC, músculos, coração, sistema imune e órgãos reprodutores. Tradicionalmente, o DREAM é um fator de repressão transcricional, porém, em alguns genes, pode desempenhar também um papel de ativação, como na regulação da expressão do *GnRH* [91]. Leclerc GM *et al.*[91] demonstraram que o DREAM exerce um papel na ativação do promotor do *GnRH*, permitindo uma pulsatilidade na expressão e, consequentemente, na secreção do GnRH, evento fundamental para o início da puberdade. Dessa forma, nós especulamos que o fator de transcrição DREAM possa também desempenhar um papel de ativação no promotor do *MKRN3* e, portanto, a perda de sua ligação, levaria a uma diminuição na expressão do *MKRN3*,

resultando no início precoce da puberdade. Entretanto, estudos funcionais adicionais serão necessários para comprovar esta hipótese.

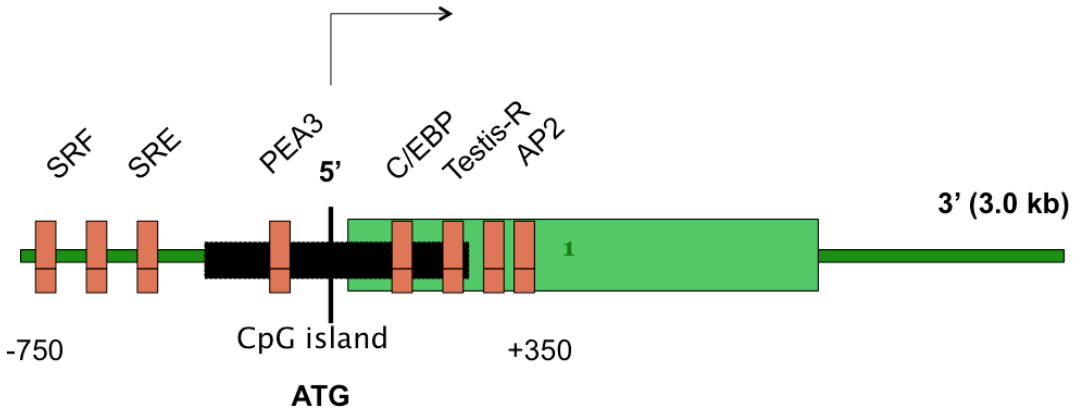


Figura 11 - Representação esquemática do gene *MKRN3*. Retângulo verde representa a região codificadora do gene; retângulo em preto indica ilha CpG na extremidade 5'; em laranja, estão representados possíveis fatores de transcrição; região promotora do gene está representada pelos nucleotídeos entre as posições – 750 e + 350 em relação ao ATG.

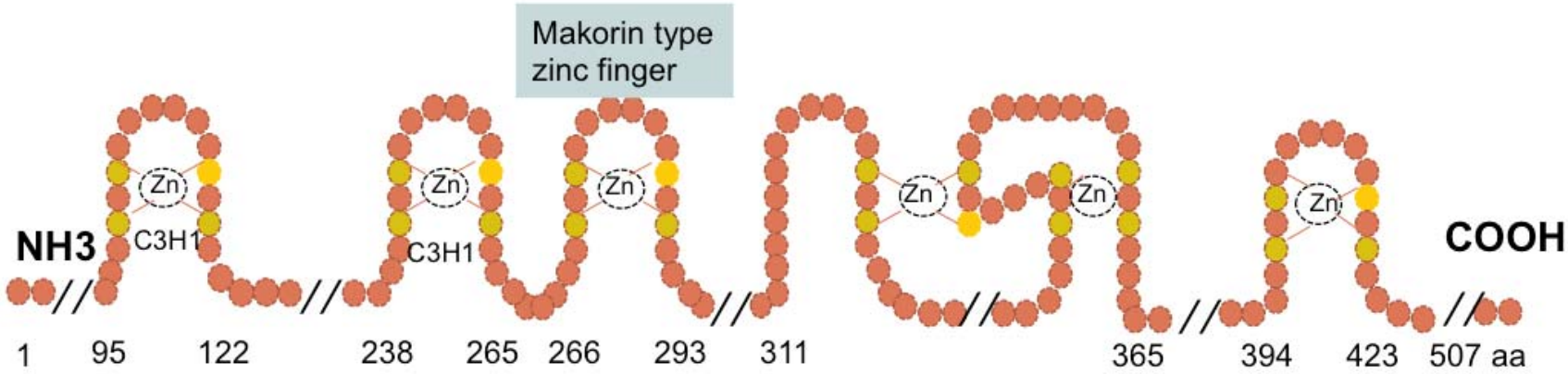


Figura 12 - Representação esquemática da proteína MKRN3, contendo 507 aminoácidos e constituída de dois dedos de zinco C3H na região aminoterminal, um arranjo Cys-His específico, um anel de zinco C3HC4 e um dedo de zinco na porção carboxiterminal. Zn, zinco; NH3, amino, COOH, carboxi

5.4 PAPEL DO MKRN3 NA REGULAÇÃO DO EIXO REPRODUTIVO

Até o presente estudo, nenhuma associação do *MKRN3* com o eixo hipotálamo- hipófise- gonadal havia sido descrita, e o mecanismo preciso pelo qual a deficiência desse gene leva à reativação precoce da secreção de GnRH ainda não é totalmente conhecido. A presença de resíduos de cisteína (Cys or C) e histidina (His or H) em arranjos característicos nos dedos de zinco C3H vêm sendo identificada em proteínas de ligação ao RNA [92,93,94]. Além disso, evidências sugerem que o anel de zinco C3HC4 é um domínio de reconhecimento para E3 ligases, enzimas importantes no processo de ubiquitinação proteica [95]. Uma análise recente de purificação por afinidade de células HEK293T co-transfectadas com MKRN3 e ubiquitina marcada (UB-His) detectou o MKRN3 no complexo proteico (Ub-His) imunoprecipitado, sugerindo um papel do MKRN3 no processo de ubiquitinação [96].

Uma outra hipótese sugere que o *MKRN3* poderia atuar como fator de transcrição, regulando diretamente a secreção de GnRH ou indiretamente por meio da inibição de fatores estimulatórios, tais como kisspeptina, neurocinina, etc **(Figura 13).** A evidência de uma significativa redução dos níveis de RNAm do *mkrn3* no núcleo arqueado de camundongos imediatamente antes da puberdade [64], corroborado pela demonstração recente da coexpressão do *mkrn3* em neurônios de Kiss1 e GnRH no núcleo arqueado de camundongos em estudos de RT-PCR [96], fortalecem os achados de que o *MKRN3* parece atuar como um fator inibitório da secreção de GnRH durante a infância.

Estudos adicionais, *in vitro* e *in vivo*, são fundamentais para esclarecer a função desse gene na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

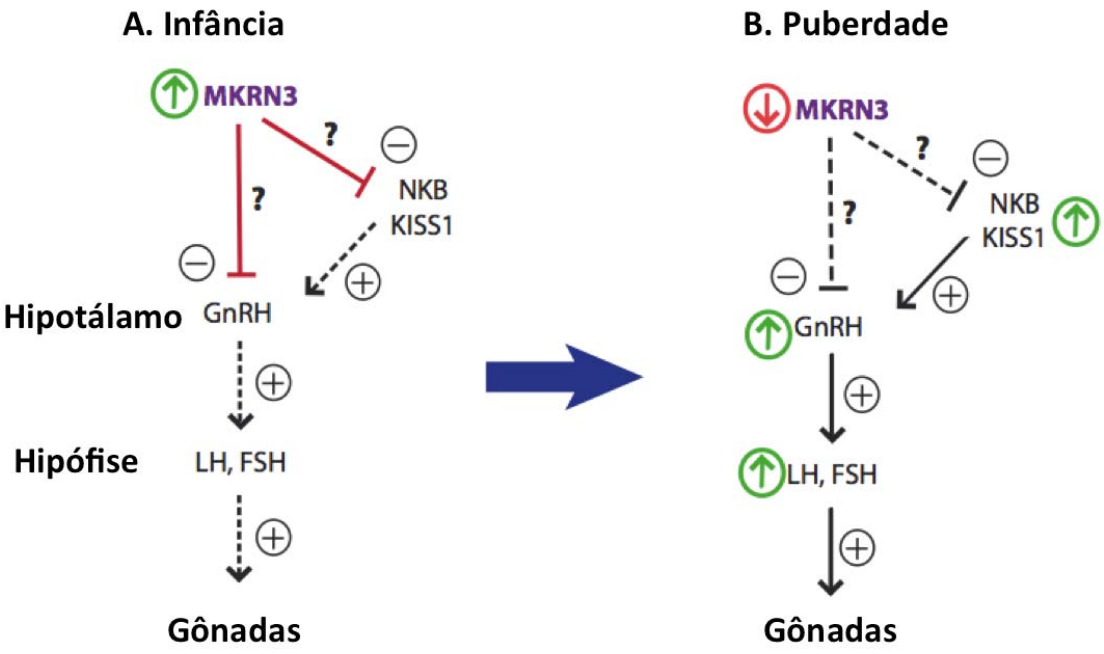


Figura 13 - Representação esquemática do mecanismo de ação do MKRN3 (adaptado de Abreu AP *et al.* J Mol Endocrinol, 2015). Estudos em humanos e camundongos sugerem que o MKRN3 seja um fator inibitório da secreção de GnRH durante a infância (diagarama A) e que a redução de sua expressão esteja associada com o aumento de fatores estimulatórios (kisspeptina, neurocinina B, etc) e/ou GnRH, resultando no início da puberdade (diagrama B). NKB: neurocinina B; - inibição; + estimulação; ↑ aumento; ↓ diminuição.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. Mutações inativadoras no gene MKRN3 representam atualmente a causa genética mais comum de PPC familial, respondendo por um terço dos casos estudados (33%);

2. Pela primeira vez, alterações nesse gene foram associadas ao quadro de precocidade sexual;

3. O *MKRN3* é o primeiro gene imprintado relacionado a distúrbios puberais;

4. A análise de segregação familiar demonstrou um padrão de herança autossômica dominante, com penetrância completa e transmissão apenas pelo alelo paterno;

5. A mediana de idade de início da puberdade foi de 6 anos nas meninas e 8 anos nos meninos. Diferenças clínicas e hormonais significativas entre pacientes com PPC com e sem mutação no *MKRN3* não foram observadas;

6. Uma variante rara, -150_-147TCAGdel, em heterozigose, foi identificada na região promotora do *MKRN3* em uma menina com PPC idiopática. O papel dessa variante na etiologia da PPC necessita de estudos adicionais;

7. Com base em um estudo de expressão do *mkrn3* em hipotálamos de camundongos, o *MKRN3* parece desempenhar um papel inibitório na secreção de GnRH, mas o mecanismo preciso pelo qual a deficiência do *MKRN3* leva ao fenótipo de PPC permanece indeterminado.

8 Anexos

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **NOVAS PERSPECTIVAS NO ESTUDO GENÉTICO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR : Dra Francisca Delanie Bulcão de Macedo

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 130982

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

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

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

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

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

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

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 2661-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 2661-6442 ramal 26 – email: cappesq@hcnet.usp.br. Horário de funcionamento: das 7:00 as 17:00h.

O material biológico e as informações obtidas nesse estudo poderão ser analisadas por grupo especializado no exterior (Universidade de Harvard, Boston, MA, Estados Unidos) e serão estudadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identidade de nenhum paciente. Você será mantido atualizado sobre os resultados parciais e finais da pesquisa.

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

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

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

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo ”**NOVAS PERSPECTIVAS NO ESTUDO GENÉTICO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA**“.

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

_____ Data / /

Assinatura do participante/ representante legal

_____ Data / /

Assinatura da testemunha

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

_____ Data / /

Pesquisador responsável

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO
PARTICIPANTES DE PESQUISA DE 2 A 6 ANOS INCOMPLETOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1.TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **NOVAS PERSPECTIVAS NO ESTUDO GENÉTICO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR: Dra Francisca Delanie Bulcão de Macedo

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 130982

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4.DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

CONFIDENCIAL

INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DE PESQUISA

PARTICIPANTES DE PESQUISA DE 2- 6 ANOS INCOMPLETOS

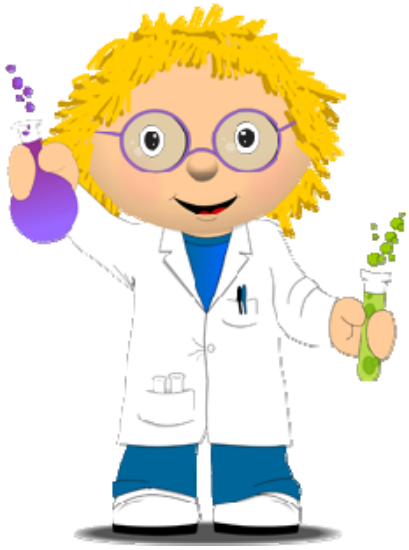
(AMBOS OS SEXOS)

O médico vai perguntar se você quer participar de um estudo. O papai e a mamãe já sabem disso.

O que vai acontecer?

O médico vai examinar você.

Você vai coletar exames de sangue. Para isso, vai ser uma agulha pequenininha na veia de seu braço (ou mão). Isso pode deixar uma manchinha roxa pequena e pinicar um pouco. Você vai sentir apenas o desconforto da picadinha da agulha, mas isso vai ser bem rápido. Esse é o único exame que você vai fazer para esta pesquisa.



Depois disso, vamos estudar o seu sangue para descobrir a causa de você estar se desenvolvendo antes que seus coleguinhas. Os resultados desse estudo poderão também ajudar outras crianças!

O participante da pesquisa é incapaz de ler o Termo de Assentimento, porém, as informações foram verbalmente explicadas a ele, que forneceu verbalmente sua aceitação para participar do estudo.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **NOVAS PERSPECTIVAS NO ESTUDO GENÉTICO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR: Dra Francisca Delanie Bulcão de Macedo

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 130982

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 4 anos

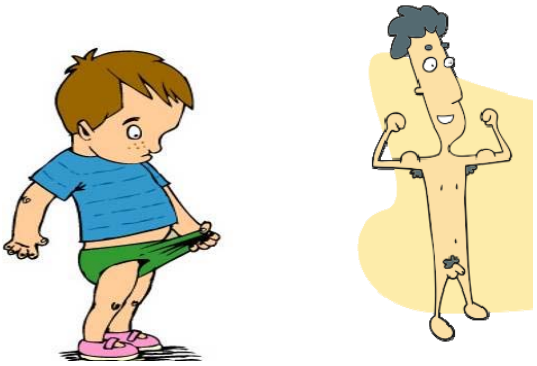
Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

CONFIDENCIAL

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

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



O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Seu médico irá examinar você.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

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

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

VOCÊ NÃO PRECISA ACEITAR O QUE SEU MÉDICO ESTÁ OFERECENDO.

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

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

Caso você queira participar, escreva seu nome aqui:

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

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

Você pode procurar também o comitê que aprova as pesquisas em Comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa (Av. Dr Éneas de Carvalho Aguiar, 255 Cerqueira César- 05403-000/ São Paulo – Brasil) pelo telefone (11) 2661-6442 Ramais 16/17/18/20.

Assinatura do representante legal Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____/____

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

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

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

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **NOVAS PERSPECTIVAS NO ESTUDO GENÉTICO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA.**

PESQUISADOR: Dra Francisca Delanie Bulcão de Macedo

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 130982

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

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO □

RISCO BAIXO □ RISCO MAIOR □

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 4 anos

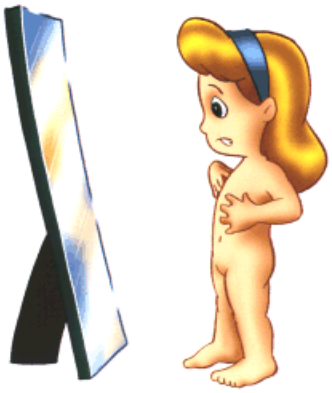
Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

CONFIDENCIAL

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

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



O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Seu médico irá examinar você.

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

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

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

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

Rubrica do participante de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

VOCÊ NÃO PRECISA ACEITAR O QUE SEU MÉDICO ESTÁ OFERECENDO.

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

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

Caso você queira participar, escreva seu nome aqui:

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

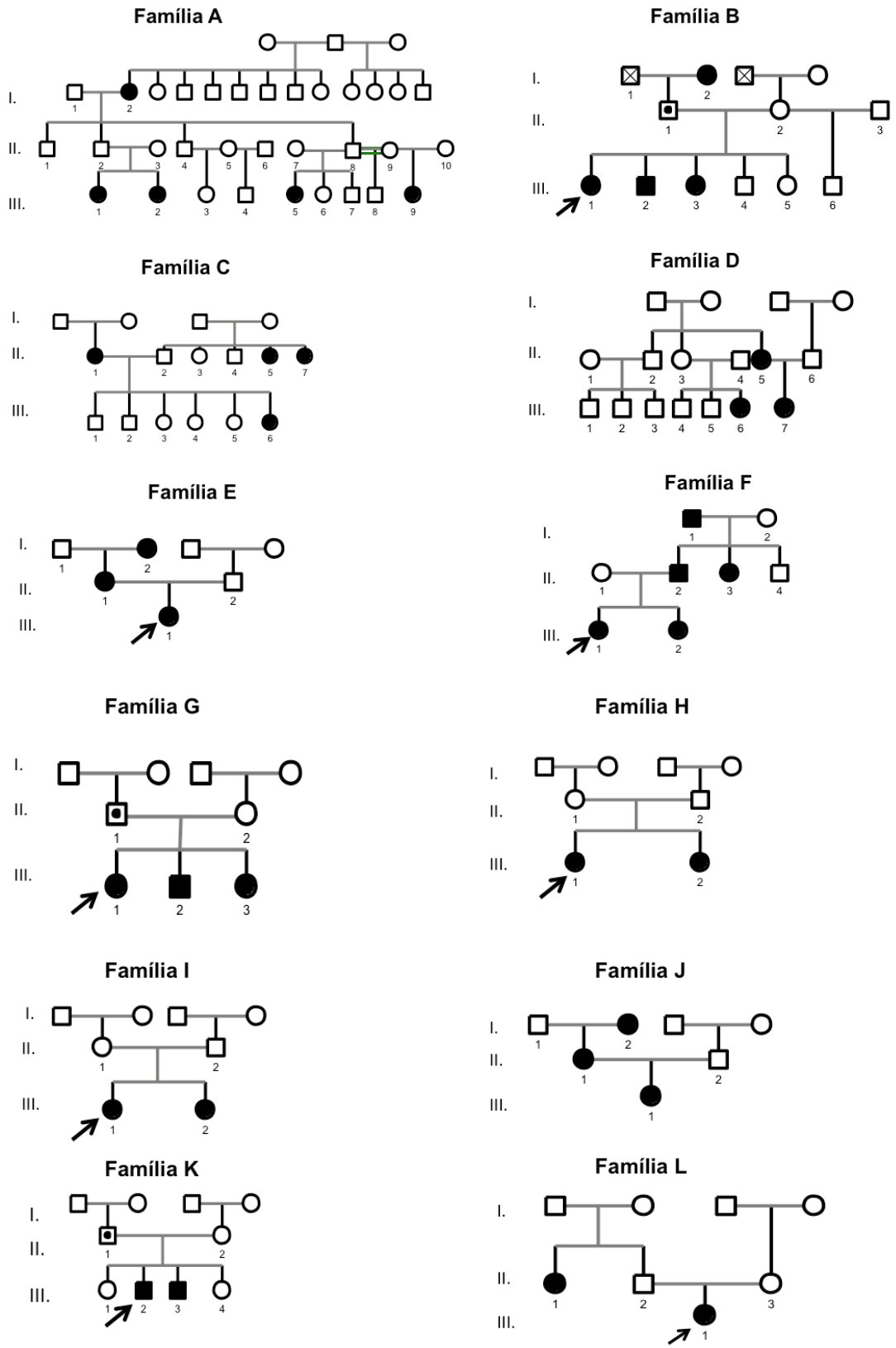
Você pode procurar seu médico ou alguém da equipe da Unidade de Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). Av. Dr Éneas Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo, Brasil. CEP: 05403-000. Telefone: (11)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

Você pode procurar também o comitê que aprova as pesquisas em Comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa (Av. Dr Éneas de Carvalho Aguiar, 255 Cerqueira César- 05403-000/ São Paulo – Brasil) pelo telefone (11) 2661-6442 Ramais 16/17/18/20.

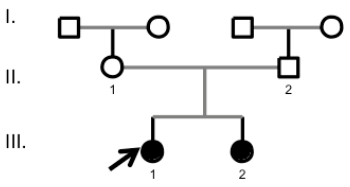
Assinatura do representante legal Data ___/___/___

Assinatura do responsável pelo estudo Data ___/___/___

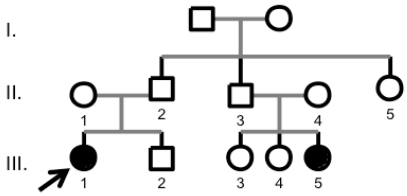
ANEXO B - Heredograma das 19 famílias estudadas.



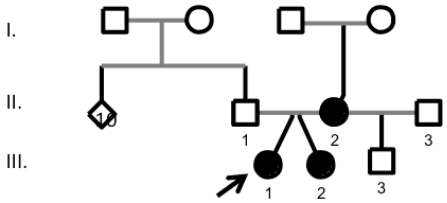
Família M



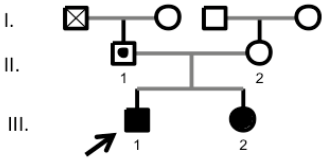
Família N



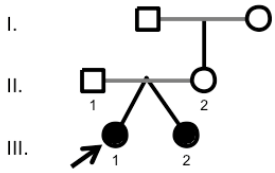
Família O



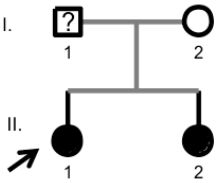
Família P



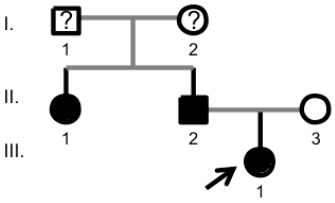
Família Q



Família R



Família S



ANEXO C (1-3). Dados clínicos e hormonais dos pacientes com PPC provenientes de diferentes centros

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

Paciente	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	6	7,3	129,5	9	8,7	1,31	38,2	3	3	157,5	<0,6	1,4	<13		8,1	
2	F	4	5,2	116,5	6,8	6,3	1,8	19,6	3	1	158,5	<0,6	2	<13		16,9	13,4
3	F	6	8,7	141,5	12	10,7	2,3	33,2	4	4	153,5	1,2	3,7	19,8			
4	F	0	2,7	100,5	6,8	4	ND	18,3	3	2	168,7	2,6	4,5	26		41	28
5	F	0,7	1,6	83	2	1,7	0	12,4	3	3	144,5	1,1	4,3	60,4	<14	21*	13,1
6	F	3,1	3,4	106	7,6	5	2,26	19,1	4	1	149	5	9,8	<13		89.7	
7	F	6,25	6,66	124	10	8	1,43	25,7	2	1	?	0,7		45		7,5	
8	F	2,33	7,25	136,4	11	10	3,13	37,7	3	2	155,5	0,9		<13			
9	F	2,33	4,75	118,8	8,8	7	3,3	24,7	4	1	160	0,7	1,5	19,1		18,8	
10	F	6	6,42	123,1	8,8	7,2	0,73	26,6	2	2	adotiva	<0,6	5,5	<13		9,5	
11	F	5,8	9,66	134	12	9,7	0,08	38,5	4	3	153,5	<0,6	1,7	<13			13,2
12	F	6,5	8,08	136,8	12	10	2,05	33,6	3	3	159	<0,6	3	45		7,5	31
13	F	6,4	7,83	141,5	11	10,5	3,05	32,8	3	4	161,5	1	5,9	15		12	
14	F	3,2	5,17	129,4	12	8,8	3,5	30	4	3	148	4,9*		14*		23,7*	
15	F	6,8	7,3	125,5	10	9,5	0,9	35,4	3	2	156,5	1,4	1,8	<13		20	23
16	F	6,8	7,8	125,5	8,8	8,2	-0,1	27,9	3	3	153,5	3,8*	1,6	<10*		41*	
17	F	4	6,8	136	12	9,5	3,22	31,3	4	3	153	6,1	4,7	62			
18	F	2,3	7,6	140,3	12	10,5	3,23	34,4	2	3	161,5	2,2	6	21		9,8	
19	F	2	4,8	115	8	5,7	2,4	23,3	3	1	?	3,8*	16.3*	23*		28,8*	
20	M	2,3	5,1	129	13	8,5	4,36	27,9	4	4	178,5	1,1	1,1		92		17,7
21	F	6	8,7	157,2	12	10,5	1,86	39,7	5	4	157,2	1,5	5,9	62,2		13,5	
22	F	6	8,25	128,6	12	8,7	-1,5	30,7	3	2	152,2	<0,6	2,7	13,4		5,3	12
23	F	7	8	136	12	10	1,9	35	4	3	157,5	1,2	4,1	20,5			50,4
24	F	7	8,7	135,4	11	9,8	0,9	32,6	4	4	154,5	1,2	1,8	13,1		19	
25	F	7	8,9	135,3	11	9,8	0,78	29	3	4	155,5	<0,6	2	40		8	
26	F	6,8	7,1	130,8	8,8	9	1,9	33,8	2	2	167	0,9	3	<13			
27	F	7	8,4	146,7	12	11,8	2,1	51,5	4	5	155,5	5,4	4,4	53,4			
28	f	2,8	4,25	106,6	6,8	4,8	1,16	19,5	4	1	156,2	0,6	4,2	18,2		13,5	
29	f	6	9,8	129	11	8,8	-1	27	4	3	147	0,8	3,5	22,2			
30	f	7,5	8,5	141,8	12	10,8	2,38	42	3	3	adotiva	1,1	5,6	35			10,3
31																	
32	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	

continua

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

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
33	f	5	7,5	133,7	11,5	9,5	2,1	27,1	4	1	148,5	1,6	2,8	26,8		29,4	
34	f	6	7,8	143	11	11	3,5	30,2	3	3	168	<0,6	1,2	<13		6,9	7,7
35	m	8	10,8	150	13,5	12,5	1,4	43,2	3	4	166,5	1,7	1,8		312		
36&	f	6	6,7	120,1	8,8	7,2	0,5	27,1	3	2	156,5	1,6	4,6	20			
37	f	7	9,7	135	11	9,8	0	28,9	4	3	160	3,7	3,6	16			
38	f	6	8,25	142,6	12	11	2,7	36,5	3	3	174,5	2,1	1,2	15			
39	f	5	9,1	143,2	12	11,1	1,92	39,6	3	3	170,5	0,9	4,1	22			27,8
40	f	6	8,5	141	10	10,8	2,24	30	4	3	158,2	<0,6	3	<13		24	
41	f	6	7,5	129	11	8,5	0,32	28,6	3	2	149	<0,6	<1,0	14,4		3,3	4,4
42	f	7,6	7,75	132,2	8,8	9,3	1,42	33,6	3	2	163,5	1	5,3	69,9			
43	f	3	7,5	133,3	11,5	9,5	2	33,3	2	2	160,5	0,8	5,4	33		4,1	8,6
44	f	8	8,5	121	7,8	7,3	-1,1	24	3	1	149,2	<0,6	3,1	24,2			16,3
45	f	7	9,1	142,5	11	11	1,8	43,6	4	2	163,2	0,7	3,6	30		5,1	9,7
46	f	7,4	8,1	129,5	11,5	8,8	0,7	27,8	3	1	?	0,6	3,5	46			
47	f	0	7,4	126	7,8	8,2	0,74	24,1	4	1	158,5	1,3	3	14,6		15,1	
48	f	6,5	10,2	151	12	12,7	2,1	42,2	4	4	163,5	2,6	2,4	92			
49	f	7,9	7,9	139,3	11	10,5		42,2	3	1	160,5	<0,6	2,8	22		20,4	8,3
50	f	2,5	3,9	106,1	6			20,8	3	1	?	3,8	7,8	<13		15,3	
51	f	7,3	7,8	142	11	10,9	3,14	40,7	3	3	160,5	2	6,8	13			
52	f	6	7,9	137,5	11	10,2	2,3	27,8	2	3	161	<0,6	1,4	<13		11,3	
53	f	7,2	7,9	138,5	11	10,3	2,52	41	3	3	166,5	1,2	3,4	35,2			
54	f	0	5,1	113,7	4,1	6	1,14	18	4	1	149	0,57	4,5	15,9		11,37	
55	f	5,5	7,4	135,1	11	9,8	2,3	33,2	4	3	160,5	2,1	4,8	16			
56	f	1,3	2,3	92,7	2,5	3	1,5	13,2	4	1	168	1,7	2,3	12		8,8	
57	f	6,5	6,9	125,6	7,8	8,1	1,15	26,8	4	3	160,5	0,7	4,2	34,6		6,9	15
58	f	6	7,6	144	10	11,2	3,7	32	4	4	157,5	2,07*	4,5	14,6			36,2
59	f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
60	f	5	7,6	135,5	11	9,8	2,19	33	3	3	?	0,1	1	<13		9,4	
61&	F	7,4	8,9	125,8	8,8	8,1	-0,6	23	4	4	152,5	0,4	3,6	18		15,3	13
62	F	6	9	146	11	11,5	2,56	38	3	3	153	3,9	6,2	38			
63	F	5	7	126,5	7,8	8,2		28	2	2	153	<0,6	1,6	13		21,1	
64	F	8,4	9,9	145	12	11,3	1,8	48	4	4	163	2,8	6,1	17			
65	F	7,5	9,6	137,1	11	10		30,6	4	3	163	ND	ND	42			19,6
66	F	6	9	133	11	9,3	0,4	35,5	4	3	158	ND	ND	24		6,5	

continua

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

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
67	F	8	8,8	137,8	10,5	10,1	1,36	33,3	3	3	152,5	1,5	5,5	69			30,1
68	F	1	5,3	126,2	8,8	8,3	3,47	30,6	3	3	167	4	8	ND			45,3
69	F	7,9	8,4	131,5	10	9,1	0,6	30,4	3	1	160,5	0,7	6,7	46		40,6	
70	F	6,7	7,8	133	12	9,5	1,75	37,3	3	3	ND	1	5,8	50		5	18
71&	F	1	2,8	94	3,5	3,2	ND	13	3	1	ND	0,2	6,9	15		9,1	
72	F	6	ND	ND	8	ND	ND	ND	4	4	146,5	1,8	6,4	41,6		11,5	
73	F	6,5	7,2	ND	11,5	ND	ND	ND	2	2	152	2	4,3	ND			
74	F	3	4,9	126,6	8,3	7,8	3,72	25	3	3	160	5,8	8,8	ND			
75	F	5,9	7,5	132,2	10,8	8,7	1,24	37,3	3	3	153	6,5	1,4	47		16,3	
76	F	2	4	ND	6,8	ND	ND	ND	3	1	158,6	ND	ND	ND		35,1	
77	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
78	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
79	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND			
80	F	7,5	8,5	135	10	9,7	1,22	27,8	4	1	164,5	0,4	4,4	32,5			
81	F	6	7,7	129,6	11	8,8	1,15	30	4	3	155	2,4	9,2	53		26,9	
82	F	6	6,1		8,8				3	1				30,3		13,2	
83	F	6,5	7		10				3	2				48		37,5	
84	F	6,2	7		11				3	1				20		48,4	
85	F	7,1	7,8		11				3	2				23,6		25,7	
86	F	7,5	7,9		9				3	1				14,3		18,9	
87	f	5	5,3	119	7	7	2,25	25,5	3	2	159,5	2,9	5,7	34			30
88	F	7	7,6	125,5	9		0,58	25	2	1	174	0,13	0,85	0,99		9,3	
89	F	5,6	5,8	116,6	6,7	6,7	0,72	21,7	3	1	159,5	<0,1#	1,5	<15			
90	F	6	9,5		12	11,7	2,19	37,3	4	4	158,5	1,2	2,1	<15			
91	F	7	8,5	134,4	11	9,7	1	36,7	4	4	152,5	0,5	2,4	70		12,1	
92	F	7,1	8	130	8,8	9	0,86	40,8	3	1	160	3,6	6,3	45,7			
93	F	1	5,3	126,2	8,8	8,3	3,47	30,6	3	3	167	4	8			40,6	
94	f	7,5	8,6	136	11	10	1,39	40,7	3	4	160	2,7	4,5	46			
95	f	7	8	128,2	12	8,7	0,71	41,1	5	4	161	6,6	5,6	17			
96	f	7,5	8,9	147	11	12	2,57	40,7	3	3	168,5	1,8	6,4	49		13,7	
97	f	6,1	6,2	119	9,8			22,3	2	1	164,5	0,69	1,75	20			

IC: idade cronológica; E: estatura; IO: idade óssea; IE: idade estatural; DP: desvio padrão de estatura; PP: pelos pubianos (estádio segundo critérios de Tanner); EA: estatura alvo; E2: estradiol, T: testosterona, # mamas: estádio segundo critérios de Tanner, pênis: comprimento em cm; ND: não disponível; &: Pacientes com características sindrômicas. * Exames realizados por radioimunoensaio (RIE). Os demais exames foram realizados por IFMA ou ECLIA

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

Paciente	Sexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP (E)	peso (kg)	Mamas/ pênis#	PP	EA (cm)	LH (mU/mL)	FSH (mU/mL)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
1	F	4,8	5,2		9		1,6		2	1		0,1	2,2	<20		8
2	F	7,9	8,1		10		0,5		2	3		1	4,2	<20		26,3
3	F	7,8	8,4		10		1,6		3	1		0,1	5,8	131		23,3
4	F	7,5	8,5				2,2		4	3			2,7			9,4
5	F	2	5,8		8,8		1,1		4	1		1	1,6	24		
6	F	7	8,5		12		1,6		3	3		1	2,3	<20		
7	F	7	8		10		0,8		3	2		0,4		26,8		17,2
8	F	7	9		12		1,7		3	2		2,2	5	23,3		10,3
9	F	6,8	6,9		9		2,1		2	2		4,8	3,4	66,1		
10	F	5	6,1		11		3		3	1		0,1	4	<20		21
11	F	6	8,2		11		1		4	2			5	39,9		42
12	F	0,5	0,8				-0,3		3	2		0,1	2	33,6		5,5
13	F	6,9	7,2		7,8		-0,4		3	3		1,9	3	<20		
14	F	6	7,9		11		1,2		4	1		1,7	3,2	139		
15	F	6,4	7,1		8,8		0,5		3	2						4,7
16	F	6	7		10		2,1		4	1		0,1	2,5	24,5		8
17	F	1,2	1,9		2,5				3	1		0,1	4,7	25		4,7
18	F	7,5	8,5		12		0,5		3	3			5,7			11,9
19	F	7,5	8		11		0,7		3	1		0,1	1,2	57,5		5,6
20	F	4	5,1		ND		2		2	2		0,9	1,9	48,9		3,2
21	F	7,5	7,9		9,8		1,2		3	2		0,7		<20		7,9
22	F	5,4	6,1		ND		1,6		3	1		1,3	5	36,4		
23	F	3	4,2		5,7		3,5		3	1		0,1	2	78		3,7
24	F	7,3	8,3		13		1,5		4	2		1,2	1,1	48		
25	F	7	8,9		12		1,1		3	3		2,7	5,5	<20		
26	F	6	7,5		8,8				4	1			3,4			17,2
27	F	7,3	8,3		8,8		-2		2	1		0,7	1,2	<20		
28	F	7,8	8,6		11		0,2		3	3		0,3	7,6	47,3		6,5
29	F	7	8,7		11		2,7		4	3		3,5	8,5	147		
30	F	7,2	7,6		10		-0,1		3	1		0,5	4,6	22		14
31	F	7,3	7,4		8,8		2,1		3	3		0,1	1	108		5,6
32	F	7,5	8		8,8		0,9		3	3			4,9	41,2		23,8

continua

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

Paciente	fSexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP (E)	peso (kg)	Mamas/ pênis#	PP	EA (cm)	LH (mU/mL)	FSH (mU/mL)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
33	F	5,8	6,3		7		0,8		3	1		2,2	6	73		13,4
34	F	7,7	8,7		11		0,8		3	3		5,6	7,4	43,9		
35	F	5,5	8		10		0,2		3	2		0,1	1,2	61,6		17,7
36	F	5	5,4		8,8		1,7		2	4		25,9*	17			48,5*
37	F	7,5	8,2		11		1,7		2	1		0,9	9,3	<20		7,5
38	M	9	9,8		ND		0,7		2	3		0,7	1		75,7	18
39	F	0,4	3,3		7		2,7		4	4		1,3*	4	52,4		200,9
40	F	6,7	7		11		2,4		2	2		1,5	2	78,4		
41	F	6	7,1		ND		0,9		3	1		0,2	4,4	42,9		6,9
42	F	6	7,9		8,8		-0,4		2	2		0,3	3,9	25		23,7
43	F	2	2,7		2,5		-0,4		3	1		1,3	3,8	52		6,7
44	F	6,5	7		11		2,1		3	2		2,9	4	45		48,5
45	M	8	10,4		13		0,6		3	4		2,5	1,3			
46	F	1	3		ND		-0,5		3	1		2,8	8	<20		17,1
47	F	6,5	7,5		8,8		1,7		4	2		1,7	2,8	30,9		
48	F	6	6,5		7,8		1,4		2	1		1,3	2	76,1		3,3
49	F	7	7,7		10		1,5		3	2		0,7	5,7	42,2		6
50	F	7	11,7		ND		-0,5		4	4						
51	F	8	7,1		7,8		0,9		1	2		0,6	2	<20		6,7
52	F	6,7	7		8,8		2		3	1		1,3	3	29,2		
53	F	5,5	7,2		8,8		-0,5		3	1		0,3	5,6	29,6		13
54	F	8	8,8		11		0,9		3	3		0,6	5,4	33		42,8
55	F	0,7	4,2		5		2,2		2	2		0,7	0,6	<20		7
56	F	8	9,3		10		1,8		4	4		3,4	4,1	28,6		
57	F	4	8,3		10				3	4						7,5
58	F	6	7,9		ND		2,3		4	3		3,4	10	80		
59	F	7,4	7,8		ND		0,4		2	2		0,1	8,9	27,7		29,6
60	F	5	8,4		12		2,1		4	3		7	6,0	131,5		
61	F	7,5	8,5		11		0,6		3	2		0,6	7,5	<20		10
62	F	1,0	1,6		2,5		1,1		3	1		0,1	3	33,8		6,8
63	F	7	9,2		11		0,6		4	3		1,4	3,4	31		14,8
64	F	7,4	8,1		11		0,3		1	2		0,1	2,8	<20		9,3

continua

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

Paciente	fSexo	IC início puberdade	IC início tratamento	E (cm)	IO (anos)	IE (anos)	DP (E)	peso (kg)	Mamas/ pênis#	PP	EA (cm)	LH (mU/mL)	FSH (mU/mL)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	LH pós GnRH
65	F	7,5	7,7		10		3,4		2	2		0,6	7,9			14,8
66	F	6	8,5		11		1,4		3	3		0,6	3,2	56,2		3,9
67	F	7	9,5		13		1,5		4	4		4,5	7,3	105		
68	F	5	8		11		1,1		3	2		2	7,2	43,7		
69	F	6	8,9		11,5		1,4		4	3		1,9	1,4	40,4		
70	F	6,8	7,2		8,8		1,2		3	2		1	4,2	<20		9,4
71	F	8	8,4		11		0,8		2	1		1,5	3	20		
72	F	8	8,7		ND		0		4	3		29,7*	6,2	20,7		47,9*
73	F	2	5,1		6,8		1,1		3	1		0,2	2,3	31,3		14,6
74	F	5,4	6,3		9,5		0		2	1		0,1	4,5	<20		9
75	F	8	10,4		13,5		0,3		4	5		2,9	2,9	69,7		
76	F	5,9	6,9		7,8		-0,2		3	3		0,7	1,3	50,9		39,2
77	f	6,5	8,7		11		2,3		4	1		1,7	2,3	31,6		
78	f	7	8,3		11		1,3		3	2		0,1	2,5	38,1		10,6
79	f	7,4	7,2		7,8		0,1		2	3		0,1	3,2	<20		32
80	f	6,9	7,9		10		0,9		3	2		0,1	4	36,1		17,8
81	f	5	8,4		11		1,6		3	3		0,4	2,5	32,7		33
82	f	6,1	6,3		5,7		0,3		2	1		0,2	4,5	64,7		9,5
83	m	7	8,7		8		2,4		2	1		1,2	2,5		91	33,4
84	f	5	8,5		12		1,5		4	2				<20		16
85	F	6	6,2		8,8		1,5		2	3		2,4	1,2	39,9		22
86	F	7,8	8		10		2,5		4	1		0,1	2	29,1		6,6
87	F	3	6,7		ND		1,6		3	2		1,8	4,9	59,6		62,5
88	F	0,7	1,7		2,5				2	1		0,8	2,5	38,4		23,4
89	F	6	7,9		11		2,7		3	4		0,2	2	20,5		

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

C 3 - Medical Faculty Skopje (Macedônia)

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
1	F	6,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		6,1
2	F	6,4	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		
3	F	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		9,9
4	F	5,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		9,4
5	F	4,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	1	ND	ND	ND	ND		
6	F	4,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		13,5
7	F	7,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		10,6
8	F	6,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		
9	F	8,8	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	2	ND	ND	ND	ND		13,8
10	F	0,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	1	ND	ND	ND	ND		13,6
11	m	6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		
12	f	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	2	ND	ND	ND	ND		17,4
13	f	6,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	2	ND	ND	ND	ND		4,1
14	f	1,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	2	ND	ND	ND	ND		
15	f	4,1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	1	ND	ND	ND	ND		
16	f	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		6,1
17	f	6,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		10,3
18	f	6,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		27,6
19	f	1,6	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		
20	f	2,3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		
21	f	6,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		5,1
22	f	7,7	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	2	ND	ND	ND	ND		
23	f		ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		
24	f	8,9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	1	ND	ND	ND	ND		
25	f	6,2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	2	ND	ND	ND	ND		13,1
26	f	8,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3	1	ND	ND	ND	ND		
27	f	9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2	2	ND	ND	ND	ND		

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

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

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

2. Plant TM, Barbier-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. Hum Reprod Update. 2004;10(1):67-77.

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

4. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? Endocrinology. 2006;147(3):1166-74.

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

6 Fernandez-Fernandez R, Martini AC, Navarro VM, Castellano JM, Dieguez C, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. Mol Cell Endocrinol. 2006; 254-255:127-32.

7 Rosenbaum M, Leibel RL. Leptin: a molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. Trends Endocrinol Metab. 1998;9(3):117-24.

8 Casanueva FF, Dieguez C. Neuroendocrine regulation and actions of leptin. Front Neuroendocrinol. 1999;20(4):317-63.

9 Tena-Sempere M, Barreiro ML. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. Mol Cell Endocrinol. 2002;188(1-2):9-13.

10 Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocr Rev. 2003;24(5):668-93.

11 de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(4):1794-800.

12 He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Paré G, Hankinson SE, Chanock SJ, Ridker PM, Hunter DJ, Chasman DI. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. Nat Genet. 2009;41(6):724-8.

13 Ong KK, Elks CE, Li S, Zhao JH, Luan J, Andersen LB, Bingham SA, Brage S, Smith GD, Ekelund U, Gillson CJ, Glaser B, Golding J, Hardy R, Khaw KT, Kuh D, Luben R, Marcus M, McGeehin MA, Ness AR, Northstone K, Ring SM, Rubin C, Sims MA, Song K, Strachan DP, Vollenweider P, Waeber G, Waterworth DM, Wong A, Deloukas P, Barroso I, Mooser V, Loos RJ, Wareham NJ. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. Nat Genet. 2009;41(6):729-33.

14 Perry JR, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, Smith AV, Aspelund T, Bandinelli S, Boerwinkle E, Cherkas L, Eiriksdottir G, Estrada K, Ferrucci L, Folsom AR, Garcia M, Gudnason V, Hofman A, Karasik D, Kiel DP, Launer LJ, van Meurs J, Nalls MA, Rivadeneira F, Shuldiner AR, Singleton A, Soranzo N, Tanaka T, Visser JA, Weedon MN, Wilson SG, Zhuang V, Streeten EA, Harris TB, Murray A, Spector TD, Demerath EW, Uitterlinden AG, Murabito JM. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. Nat Genet. 2009;41(6):648-50.

15 Sulem P, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Holm H, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, Jonsson T, Alexandersen P, Feenstra B, Boyd HA, Aben KK, Verbeek AL, Roeleveld N, Jonasdottir A, Styrkarsdottir U, Steinthorsdottir V, Karason A, Stacey SN, Gudmundsson J, Jakobsdottir M, Thorleifsson G, Hardarson G, Gulcher J, Kong A, Kiemeney LA, Melbye M, Christiansen C, Tryggvadottir L, Thorsteinsdottir U, Stefansson K. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. Nat Genet. 2009;41(6):734-8.

16 Partsch CJ, Sippell WG. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. Hum Reprod Update. 2001;7(3):292-302.

17 Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. Arch Dis Child. 1969;44(235):291-303.

18 Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch Dis Child. 1970;45(239):13-23.

19 Wyshak G, Frisch RE. Evidence for a secular trend in age of menarche. N Engl J Med. 1982;306(17):1033-5.

20 Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GG, Hasemeier CM. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. Pediatrics. 1997;99(4):505-12.

21 Euling SY, Herman-Giddens ME, Lee PA, Selevan SG, Juul A, Sørensen TI, Dunkel L, Himes JL, Teilmann G, Swan SH. Examination of US puberty-timing data from 1940 to 1994 for secular trends: panel findings. Pediatrics 2008;121 Suppl 3:S172-91.

22 Herman-Giddens ME, Steffes J, Harris D, Slora E, Hussey M, Dowshen SA, Wasserman R, Serwint JR, Smitherman L, Reiter EO. Secondary sexual characteristics in boys: data from the Pediatric Research in Office Settings Network. Pediatrics. 2012;130(5):e1058-68.

23 Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, Wareham NJ, Ong KK Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. J Clin Endocrinol Metab. 2009;94(12): 4953-60..

24 Elks CE, Ong KK, Scott RA, van der Schouw YT, Brand JS, Wark PA, Amiano P, Balkau B, Barricarte A, Boeing H, Fonseca-Nunes A, Franks PW, Grioni S, Halkjaer J, Kaaks R, Key TJ, Khaw KT, Mattiello A, Nilsson PM, Overvad K, Palli D, Quirós JR, Rinaldi S, Rolandsson O, Romieu I, Sacerdote C, Sánchez MJ, Spijkerman AM, Tjonneland A, Tormo MJ, Tumino R, van der A DL, Forouhi NG, Sharp SJ, Langenberg C, Riboli E, Wareham NJ; InterAct Consortium. Age at menarche and type 2 diabetes risk: the EPIC-InterAct study. Diabetes Care. 2013;36(11):3526-34.

25 Velie EM, Nechuta S, Osuch JR. Lifetime reproductive and anthropometric risk factors for breast cancer in postmenopausal women. Breast Dis. 2005-2006;24:17-35.

26 Golub MS, Collman GW, Foster PM, Kimmel CA, Rajpert-De Meyts E, Reiter EO, Sharpe RM, Skakkebaek NE, Toppari J. Public health implications of altered puberty timing. Pediatrics. 2008;121 Suppl 3:S218-30.

27 Carel JC, Eugster EA, Rogol A, Ghizzoni L, Palmert MR; ESPE-LWPES GnRH Analogs Consensus Conference Group, Antoniazzi F, Berenbaum S, Bourguignon JP, Chrousos GP, Coste J, Deal S, de Vries L, Foster C, Heger S, Holland J, Jahnukainen K, Juul A, Kaplowitz P, Lahlou N, Lee MM, Lee P, Merke DP, Neely EK, Oostdijk W, Phillip M, Rosenfield RL, Shulman D, Styne D, Tauber M, Wit JM. Consensus statement on the use of

gonadotropin-releasing hormone analogs in children. Pediatrics. 2009;123(4):e752-62.

28 Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. Pediatrics. 2005;116(6): 1323-8.

29 Carel JC, Léger J. Precocious Puberty. N Engl J Med. 2008;358(22): 2366-77.

30 Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonça BB. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52(1):18-31.

31 Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. Clin Endocrinol (Oxf). 2002;56(2):129-488.

32 Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. Lancet Diabetes Endocrinol. 2016;4(3):254-64.

33 Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. Lancet Diabetes Endocrinol. 2016;4(3):265-74.

34 Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med. 2003;349(17):1614-27.

35 Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med. 2008;358(7):709-15.

36 Luan X, Yu H, Wei X, Zhou Y, Wang W, Li P, Gan X, Wei D, Xiao J. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. Neuroendocrinology. 2007;86(2):77-83.

37 Ko JM, Lee H, Hwang JS. KISS1 gene analysis in Korean girls with central precocious puberty: a polymorphism, p.P110T, suggested to exert a protective effect. Endocr J. 2010;57(8):701-9.

38 Silveira LG. Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Bianco SD, Kuohung W, Xu S, Gryngarten M, Escobar ME, Arnhold IJ, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(5):2276-80.

39 Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode Caenorhabditis elegans. Science. 1984;226(4673):409-16.

40 Silveira-Neto AP, Leal LF, Emerman AB, Henderson KD, Piskounova E, Henderson BE, Gregory RI, Silveira LF, Hirschhorn JN, Nguyen TT, Beneduzzi D, Tusset C, Reis AC, Brito VN, Mendonça BB, Palmert MR, Antonini SR, Latronico AC. Absence of functional LIN28B mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. Horm Res Paediatr. 2012;78(3):144-50.

41 Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. Nat Genet. 2009;41(3):354-8.

42 Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, Cukier P, Seminara SB, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2012;56(9):646-52.

43 Cukier P, Wright H, Rulfs T, Silveira LF, Teles MG, Mendonça BB, Arnhold IJ, Heger S, Latronico AC, Ojeda SR, Brito VN. Molecular and gene network analysis of thyroid transcription factor 1 (TTF1) and enhanced at puberty (EAP1) genes in patients with GnRH-dependent pubertal disorders. Horm Res Paediatr. 2013;80(4):257-66.

44 Dewald GW, Schad CR, Christensen ER, Tiede AL, Zinsmeister AR, Spurbeck JL, Thibodeau SN, Jalal SM. The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbcr/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. Cancer Genet Cytogenet. 1993;71(1):7-14.

45 Ward BE, Gersen SL, Carelli MP, McGuire NM, Dackowski WR, Weinstein M, Sandlin C, Warren R, Klinger KW. Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence in situ hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. Am J Hum Genet. 1993;52(5):854-65.

46 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. Science. 1992;258(5083):818-21.

47 Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, Nickolenko J, Benner A, Döhner H, Cremer T, Lichter P. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. Genes Chromosomes Cancer. 1997;20(4):399-407.

48 Bruder CE, Hirvelã C, Tapia-Paez I, Fransson I, Segraves R, Hamilton G, Zhang XX, Evans DG, Wallace AJ, Baser ME, Zucman-Rossi J, Hergersberg M, Boltshauser E, Papi L, Rouleau GA, Poptodorov G, Jordanova A, Rask-Andersen H, Kluwe L, Mautner V, Sainio M, Hung G, Mathiesen T, Möller C, Pulst SM, Harder H, Heiberg A, Honda M, Niimura M, Sahlén S, Blennow E, Albertson DG, Pinkel D, Dumanski JP. High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. Hum Mol Genet. 2001;10(3):271-82.

49 Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. Nat Rev Genet. 2011;12(11):745-55.

50 Biesecker LG, Green RC. Diagnostic clinical genome and exome sequencing. N Engl J Med. 2014;371(12):1170.

51 Biesecker LG, Shianna KV, Mullikin JC. Exome sequencing: the expert view. Genome Biol. 2011;12(9):128.

52 de Bruin C, Dauber A. Insights from exome sequencing for endocrine disorders. Nat Rev Endocrinol. 2015;11(8):455-64.

53 Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, Shaffer T, Wong M, Bhattacharjee A, Eichler EE, Bamshad M, Nickerson DA, Shendure J. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature. 2009;461(7261):272-6.

54 Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford: Stanford University Press; 1959.

55 Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, Jorge BH, Arnhold IJ, Mendonça BB. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84(10):3539-44.

56 Pasternak Y, Friger M, Loewenthal N, Haim A, Hershkovitz E. The utility of basal serum LH in prediction of central precocious puberty in girls. Eur J Endocrinol. 2012;166(2):295-9.

57 Jong MT, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM, Nicholls RD. Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. Hum Mol Genet. 1999;8(5):795-803.

58 Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A. Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. Nucleic Acids Res. 2005;33(14):e128.

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

60 Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. Genet Test. 2007;11(4):467-75.

61 Lakshman R, Forouhi N, Luben R, Bingham SA, Khaw K, Wareham N, Ong KK Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: results from the EPIC-Norfolk cohort study. Diabetologia. 2008;51(5):781-6.

62 Widén E, Silventoinen K, Sovio U, Ripatti S, Cousminer DL, Hartikainen AL, Laitinen J, Pouta A, Kaprio J, Järvelin MR, Peltonen L, Palotie A. Pubertal timing and growth influences cardiometabolic risk factors in adult males and females. Diabetes Care. 2012;35(4):850-6.

63 Gajdos ZK, Hirschhorn JN, Palmert MR. What controls the timing of puberty? An update on progress from genetic investigation. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2009;16(1):16-24.

64 Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonça BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. N Engl J Med. 2013;368(26): 2467-75.

65 Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LF, Teles MG, Carroll RS, Guerra Junior G, Guaragna Filho G, Gucev Z, Arnhold IJ, de Castro M, Moreira AC, Martinelli CE Jr, Hirschhorn JN, Mendonça BB, Brito VN, Antonini SR, Kaiser UB, Latronico AC. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(6):E1097-103.

66 Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(4):E647-E51.

67 Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. Horm Res Paediatr. 2014; 82(2):122-6.

68 de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. Hum Reprod 2014;29(12):2838-43.

69 Lee HS, Jin HS, Shim YS, Jeong HR, Kwon E, Choi V, Kim MC, Chung IS, Jeong SY, Hwang JS. Low frequency of MKRN3 mutations in central precocious puberty among Korean girls. Horm Metab Res. 2016; 48(2):118-22.

70 Neocleous V, Shammas C, Phelan MM, Nicolaou S, Phylactou LA, Skordis N. In silico analysis of a novel MKRN3 missense mutation in familial central precocious puberty. Clin Endocrinol (Oxf). 2016;84(1):80-4.

71 Kansäkoski J, Raivio T, Juul A, Tommiska J. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. Pediatr Res. 2015;78(6):709-11.

72 Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, Houang M, Jesuran Pereiroizen M, de Filippo GP, Salerno M, Simonin G, Reynaud R, Carel JC, Léger J, de Roux N. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. Eur J Endocrinol. 2016;174(1):1-8.

73 Grandone A, Cantelmi G, Cirillo G, Marzuillo P, Luongo C, Miraglia del Giudice E, Perrone L. A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the makorin RING finger protein 3 gene. BMC Endocr Disord. 2015;15:60.

74 Perry JR, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. Nature. 2014;514(7520):92-7.

75 Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. J Mol Endocrinol. 2015;54(3):R131-9.

76 Lalande M. Parental imprinting and human disease. Annu Rev Genet. 1996;30:173-95.

77 Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B. Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. Trends Genet. 1998;14(5):194-200.

78 Rodriguez-Jato S, Shan J, Khadake J, Heggestad AD, Ma X, Johnstone KA, Resnick JL, Yang TP. Regulatory elements associated with paternally-expressed genes in the imprinted murine Angelman/Prader-Willi syndrome domain. PLoS One. 2013;8(2):e52390.

79 Kanber D, Giltay J, Wieczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. Eur J Hum Genet. 2009;17(5):582-90.

80 Hershko A, Razin A, Shemer R. Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse Zfp127 gene. Gene. 1999;234(2):323-7.

81 Reik W, Walter J. Genomic imprinting: parental influence on the genome. Nat Rev Genet. 2001;2(1):21-32.

82 Rabinovitz S, Kaufman Y, Ludwig G, Razin A, Shemer R. Mechanisms of activation of the paternally expressed genes by the Prader-Willi imprinting center in the Prader-Willi/Angelman syndromes domains. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(19):7403-8.

83 Bressler J, Tsai TF, Wu MY, Tsai SF, Ramirez MA, Amstrong D, Beaudet AL. The SNRPN promoter is not required for genomic imprinting of the Prader-Willi/Angelman domain in mice. Nat Genet. 2001;28(3):232-40.

84 Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T. Krajewska-Walasek M, Horsthemke B, Brannan CI. De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. Nat Genet. 2000;25(1):74-8.

85 Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Leisti H, Driscoll DJ, Cassity SB, Horsthemke B, Nicholls RD. Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. Am J Hum Genet. 1999;64(2):385-96.

86 Shemer R, Hershko AY, Perk J, Mostoslavsky R, Tsuberi B, Cedar H, Buiting K, Razin A. The imprinting box of the Prader-Willi/Angelman syndrome domain. Nat Genet 2000;26(4):440-3.

87 Rodriguez-Jato S, Nicholls RD, Driscoll DJ, Yang TP. Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. Nucleic Acids Res. 2005;33(15):4740-53.

88 Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, Knoll JG, Wright H, Pfeifer GP, Ojeda SR. Epigenetic control of female puberty. Nat Neurosci. 2013;16(3):281-9.

89 Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rus K, Marshall Graves JA, Stewart CL, Nicholls RD. The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system Genomics. 2000;66(1):76-86.

90 Böhne A, Darras A, D'Cotta H, Baroiller JF, Galiana-Arnoux D, Volff JN. The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. BMC Genomics. 2010;11:721.

91 Leclerc GM, Boockfor FR. Calcium influx and DREAM protein are required for GnRH gene expression pulse activity. Mol Cell Endocrinol. 2007;267(1-2):70-9.

92 Murray MV, Turnage MA, Williamson KJ, Steinhauer WR, Searles LL. The Drosophila suppressor of sable protein binds to RNA and associates with a subset of polytene chromosome bands. Mol Cell Biol. 1997;17(4):2291-300.

93 Barabino SM, Hubner W, Jenny A, Minvielle-Sebastia L, Keller W. The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. Genes Dev. 1997;11(13):1703-16.

94 Schwabe JW, Klug A. Zinc mining for protein domains. Nat Struct Biol. 1994;1(6):345-9.

95 Deshaies RJ, Joazeiro CA. RING domain E3 ubiquitin ligases. Annu Rev Biochem. 2009;78:399-434.

96 Abreu AP, Navarro VM, Bosch MA, Liang JN, Macedo DB, Simavli S, Noel SD, Thompson JR, Carroll RS, Ronnekleiv OK, Latronico AC, Kaiser UB. Deciphering the functional mechanisms by which MKRN3 regulates puberty initiation. In: Endocrine Society's 96th Annual Meeting and Expo, ESPE Meeting 2014, June 21-24, 2014 - Chicago.

9 Apêndices

Abreu AP, Dauber A, **Macedo DB**, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonça BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. N Engl J Med. 2013;368(26): 2467-75.

Abreu et al. N Engl J Med. 2013;368(26):2467-75.

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

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

Ana Paula Abreu, M.D., Ph.D., Andrew Dauber, M.D., Delanie B. Macedo, M.D., Sekoni D. Noel, Ph.D., Vinicius N. Brito, M.D., Ph.D., John C. Gill, Ph.D., Priscilla Cukier, M.D., Iain R. Thompson, Ph.D., Victor M. Navarro, Ph.D., Priscila C. Gagliardi, M.D., Tânia Rodrigues, M.D., Cristiane Kochi, M.D., Carlos Alberto Longui, M.D., Dominique Beckers, M.D., Francis de Zegher, M.D., Ph.D., Luciana R. Montenegro, Ph.D., Berenice B. Mendonca, M.D., Ph.D., Rona S. Carroll, Ph.D., Joel N. Hirschhorn, M.D., Ph.D., Ana Claudia Latronico, M.D., Ph.D., and Ursula B. Kaiser, M.D.

ABSTRACT

BACKGROUND

The onset of puberty is first detected as an increase in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Early activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis results in central precocious puberty. The timing of pubertal development is driven in part by genetic factors, but only a few, rare molecular defects associated with central precocious puberty have been identified.

METHODS

We performed whole-exome sequencing in 40 members of 15 families with central precocious puberty. Candidate variants were confirmed with Sanger sequencing. We also performed quantitative real-time polymerase-chain-reaction assays to determine levels of messenger RNA (mRNA) in the hypothalami of mice at different ages.

RESULTS

We identified four novel heterozygous mutations in *MKRN3*, the gene encoding makorin RING-finger protein 3, in 5 of the 15 families; both sexes were affected. The mutations included three frameshift mutations, predicted to encode truncated proteins, and one missense mutation, predicted to disrupt protein function. *MKRN3* is a paternally expressed, imprinted gene located in the Prader–Willi syndrome critical region (chromosome 15q11–q13). All affected persons inherited the mutations from their fathers, a finding that indicates perfect segregation with the mode of inheritance expected for an imprinted gene. Levels of Mkrn3 mRNA were high in the arcuate nucleus of prepubertal mice, decreased immediately before puberty, and remained low after puberty.

CONCLUSIONS

Deficiency of MKRN3 causes central precocious puberty in humans. (Funded by the National Institutes of Health and others.)

From the Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School (A.P.A., S.D.N., J.C.G., I.R.T., V.M.N., R.S.C., U.B.K.), and the Divisions of Endocrinology (A.D., J.N.H.) and Genetics (J.N.H.), Boston Children's Hospital, Boston; the Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute, Cambridge, MA (A.D., J.N.H.); Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (A.P.A., D.B.M., V.N.B., P.C., L.R.M., B.B.M., A.C.L.), Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (C.K., C.A.L.), São Paulo, and the Division of Pediatric Endocrinology, Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte (T.R.) — all in Brazil; the Division of Endocrinology, Diabetes, and Metabolism, Nemours Children's Clinic, Jacksonville, FL (P.C.G.); and the Department of Pediatrics, University Hospital Gasthuisberg, University of Leuven, Leuven, Belgium (D.B., F.Z.). Address reprint requests to Dr. Latronico at Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255–7° andar, sala 7037, 05403-900, São Paulo, Brazil, or at anacl@usp.br.

Drs. Abreu, Dauber, Latronico, and Kaiser contributed equally to this article.

This article was published on June 5, 2013, at NEJM.org.

N Engl J Med 2013;368:2467-75.
DOI: 10.1056/NEJMoa1302160

Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society.

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

The onset of puberty is first detected as an increase in the amplitude and frequency of pulses of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) after a quiescent period during childhood. The reemergence of pulsatile GnRH secretion leads to increases in the secretion of the gonadotropins, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone (FSH), by the pituitary gland and the consequent activation of gonadal function.[1] Early activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis results in gonadotropin-dependent precocious puberty, also known as central precocious puberty, which is clinically defined by the development of secondary sexual characteristics before the age of 8 years in girls and 9 years in boys. Pubertal timing is influenced by complex interactions among genetic, nutritional, environmental, and socioeconomic factors.[2,3] The timing of puberty is associated with risks of subsequent disease; earlier age of menarche in girls is associated with increased risks of breast cancer, endometrial cancer, obesity, type 2 diabetes, and cardiovascular disease.[4] Central precocious puberty has also been associated with an increased incidence of conduct and behavior disorders during adolescence.[5]

Compelling evidence of the influence of genetic factors on pubertal timing has been provided by population studies.[6] The role of genetic factors is also illustrated by the similar age at menarche in mothers and daughters and among members of an ethnic group and by a greater concordance of pubertal timing in monozygotic than in dizygotic twins.[7-9] Familial segregation analysis has shown that 27.5% of cases of central precocious puberty are familial and suggests autosomal dominant transmission with incomplete sex-dependent penetrance.[10] Despite the data suggesting that age at the onset of pubertal development is primarily driven by genetic factors, the genetic determinants of the timing of human pubertal development and, in particular, central precocious puberty are largely unknown.

Extensive efforts have been made to elucidate the mechanisms that reactivate pulsatile GnRH secretion at the time of puberty. In the past decade, several genes have been identified in the complex network of inhibitory, stimulatory, and permissive neuroendocrine factors involved in the control of puberty onset. Studies in rodents and primates have shown that an enhancement of excitatory inputs and a reduction in inhibitory factors contribute to GnRH secretion and the initiation of puberty.[1,11] On the basis of this knowledge, several studies in humans have used a candidate-gene approach in an attempt to detect genes associated with pubertal disorders. However, although an increasing number of genes have been implicated in congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism and the Kallmann syndrome,[12,13] only a few, rare molecular defects have been identified in patients with central precocious puberty, and no strong association has been proved.[14-18] Only two mutations — one mutation in the gene encoding kisspeptin-1 (*KISS1*) and one in the gene encoding its receptor (*KISS1R*) — have been associated with central precocious puberty, despite screening of a relatively large cohort of patients for mutations in these genes, indicating that isolated mutations in *KISS1* and *KISS1R* genes are uncommon causes of central precocious puberty.[19,20] We therefore sought to identify genetic causes of central precocious puberty by performing an exome sequence analysis in 15 families with central precocious puberty.

METHODS

PATIENTS

We selected for our study 15 probands with central precocious puberty and their affected and unaffected family members (Fig. 1; and Fig. S1 in the Supplementary Appendix, available with the full text of this article at NEJM.org). Whole-exome sequencing was performed for 40 members of these families, 32 with central precocious puberty (27 females and 5 males) and 8 with normal pubertal timing (5 females and 3 males). Central precocious puberty was diagnosed on the basis of clinical signs of progressive pubertal development before the age of 8 years in girls and 9 years in boys; pubertal basal luteinizing hormone levels, GnRH-stimulated luteinizing hormone levels, or both; advanced bone age (determined with the use of the Greulich and Pyle method[21]), and normal results on magnetic resonance imaging of the central nervous system (Table 1, and Table S1 in the Supplementary Appendix). The ancestries of the families with *MKRN3* defects were established by means of verbal report to clinical investigators (Table 1). The protocol was approved by the ethics committee of Sao

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Abreu et al. N Engl J Med. 2013;368(26):2467-75.

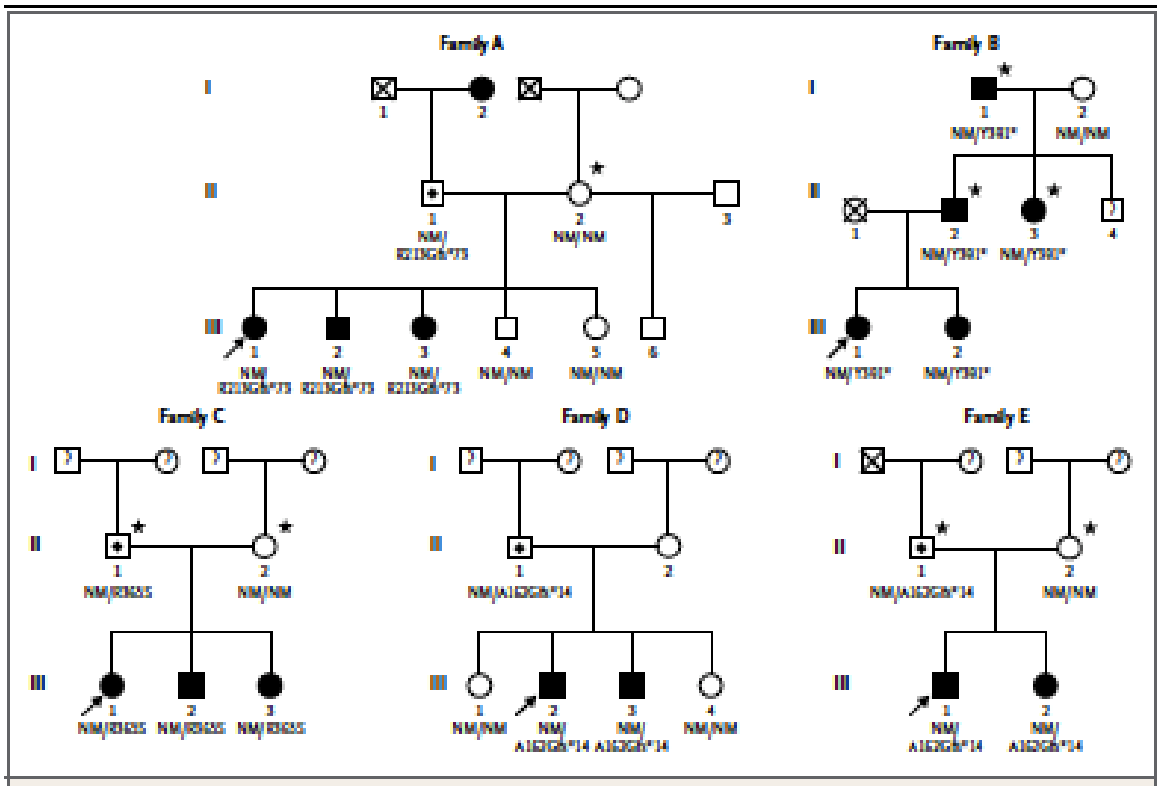


Figure 1. Pedigrees of the Families with *MKRN3* Mutations.

Squares indicate male family members, circles female family members, black symbols clinically affected family members, symbols with black circles asymptomatic carriers, symbols with an X deceased family members, symbols with a question mark family members whose phenotype is unknown, and arrows the proband in each family. The *MKRN3* genotype is shown for family members whose DNA was available for genetic studies. A star indicates that the patient was screened by means of Sanger sequencing only. NM denotes nonmutated.

Paulo University. Written informed consent was obtained from all participants. The last two authors vouch for the accuracy and completeness of the data and the fidelity of the study to the protocol.

HORMONE ASSAYS

Serum levels of luteinizing hormone, FSH, testosterone, and estradiol were determined with the use of immunochemiluminometric assays.[22] The interassay coefficient of variation was 5% or less for all assays.

During the GnRH stimulation test, serum levels of luteinizing hormone and FSH were measured 15 minutes before the intravenous administration of 100 μg of GnRH, at the time of administration, and 15, 30, 45, and 60 minutes after administration. In both sexes, basal luteinizing hormone levels higher than 0.15 U per liter were considered to be pubertal levels, and peak GnRH-stimulated luteinizing hormone levels higher than 5.0 U per liter were considered to be pubertal responses.[22] Basal estradiol levels higher than 15 pg per milliliter and basal testosterone levels higher than 12 ng per deciliter were considered to be pubertal levels.

GENETIC ANALYSIS

Genomic DNA was extracted from peripheral-blood leukocytes. Whole-exome sequencing was performed for selected patients (at the Broad Institute), as previously described[23] (see the Supplementary Appendix for details). We confirmed the identification of variants in the coding region of *MKRN3* with the use of polymerase-chain-reaction (PCR) amplification followed by sequencing of the products with the use of the conventional Sanger method. For comparisons of the prevalence of truncating variants in the families and

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Abreu et al. N Engl J Med. 2013;368(26):2467-75.

Table 1. Clinical and Hormonal Features of 12 Patients with Central Precocious Puberty and *MKRN3* Mutations in Five Families.*

Patient No.	Sex	*MKRN3* Mutation		Initial Clinical Presentation	Time of Diagnosis				LH†		FSH†		Estradiol†	Testosterone†
		DNA	Protein	Condition	Age	Age	Tanner Stage	Bone Age	Basal	After GnRH Stimulation	Basal	After GnRH Stimulation		
					yr	*yr*		*yr*	*IU/liter*		*IU/liter*		*pg/ml*	*ng/dl*
Family A														
II-1	Female	637delC	Arg213Glyfs*73	Thelarche	5.7	6.5	2	7.7	0.8	13.6	3.8	—	25	—
II-2	Male	637delC	Arg213Glyfs*73	Testicular enlargement	8.0	8.7	3	11.0	2.9	20.0	2.5	—	—	78
II-3	Female	637delC	Arg213Glyfs*73	Thelarche	6.5	6.7	2	7.8	1.1	16.7	4.5	—	<1.5	—
Family B														
II-1	Female	1171_1172insA	Tyr391*	Thelarche	6.2	7.0	3	7.0	<0.6	36.0	1.13	17.9	13.2	—
II-2	Female	1171_1172insA	Tyr391*	Thelarche	5.7	6.0	3	6.0	<0.6	37.3	1.13	27.9	11	—
Family C														
II-1	Female	1095G→T	Arg365Ser	Thelarche	6.2	6.4	2	9.4‡	<0.1	7.3	7	7.3	49	—
III-2	Male	1095G→T	Arg365Ser	Testicular enlargement and pubarche	Unknown	9.7	3	12.0	2.0	19.5	4.4	19.5	—	67
III-3	Female	1095G→T	Arg365Ser	Thelarche and pubarche	5.4	5.7	2	8.5	0.5	12.3	3.6	14.5	<1.5	—
Family D														
III-2	Male	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Testicular enlargement and pubarche	5.9	8.1	3	10.0	1.18	6.7	1.53	2.6	—	116
III-3	Male	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Testicular enlargement and pubarche	Unknown	9.7	3	9.7	1.6	10.9	0.8	2.6	—	548
Family E														
III-1	Male	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Testicular enlargement and pubarche	8.5	8.8	3	11.5	4.1	—	3.1	—	—	236
III-2	Female	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Thelarche	5.0	6.5	2	8.3	—	7.4	13	—	13	—

* The available information on family ancestry is as follows: Family A reported Northwest European ancestry (from Wales, living in the United States); Family B reported living in Brazil, but their ancestry was not reported; Family C reported Northwest European ancestry (from Belgium and living in Belgium); Family D reported living in Brazil, but their ancestry was not reported; and Family E reported European ancestry (the ancestry of the proband's father is Italian, and the mother reported European ancestry; specific details of the mother's country of origin in Europe are not available). FSH denotes follicle-stimulating hormone, and LH luteinizing hormone. Dashes indicate that data are not available.

† Normal prepubertal levels of testosterone and estradiol are less than 12.0 ng per deciliter and less than 15.0 pg per milliliter, respectively; the normal prepubertal basal level of LH is less than 0.15 IU per liter, with a peak level below 5.0 IU per liter in both girls and boys. Levels were measured at the time of diagnosis. Normal pubertal levels of FSH have not been established because the normal ranges for pubertal and prepubertal FSH overlap.

‡ This was the patient's bone age when she was 7.4 years old.

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Abreu et al. N Engl J Med. 2013;368(26):2467-75.

the exome variant server (hosted by the National Heart, Lung, and Blood Institute), we used Fisher's exact test to compare the number of frameshift or nonsense mutation carriers, counting each family member in the exome variant server once and counting both parents in each family to account for mutation searches across multiple offspring. For the analysis of unique variants, we included only one person (or one pair of parents) per variant in the analysis.

ASSAYS IN MICE

RNA was extracted from the arcuate nucleus of the hypothalamus of three male and three female mice at postnatal days 10, 12, 15, 18, 22, 26, 30, and 45. Pubertal development occurred between days 15 and 30 in these mice, as indicated by the increase in the expression of hypothalamic *Tac2* (or neurokinin B) messenger RNA (mRNA).[24] RNA was reverse-transcribed, and quantitative real-time PCR analysis was then performed to measure *Mkrn3* mRNA levels, normalized to ribosomal protein L19 (see the Supplementary Appendix).

RESULTS

SEQUENCE ANALYSIS

Whole-exome sequencing performed in 40 members of 15 families with central precocious puberty identified 304,980 variants. Rigorous criteria were used to filter the variants and identify the mutations likely to be causative of the phenotype for central precocious puberty. We first analyzed exome-sequence data from a total of 15 members of the 3 largest families with pedigrees that were consistent with a dominant mode of inheritance (i.e., those families having affected members in multiple generations). Among the persons who underwent exome sequencing, we identified heterozygous nonsynonymous variants that were present in affected family members and absent in unaffected family members. Given the dominant inheritance pattern and rarity of presentation of familial precocious puberty, we excluded all variants with a minor allele frequency of more than 0.01% in either the 1000 Genomes database[25] or the exome variant server.[26] In addition, we excluded all putative variants that were also present in 50 of the 1000 Genomes control samples included in the variant calling process. In applying these criteria, we identified candidate genes within each family (4 in Family A, 65 in Family B, and 3 in Family F). The reason why a larger number of candidate genes were identified in Family B was that exome data were available for only 3 members of this family, as compared with 6 members each for Families A and F. One gene, *MKRN3* (ENSG00000179455, gene identification number 7681), was identified in 2 families. No single gene was identified in all 3 families. Families A and B had novel frameshift mutation variants in *MKRN3* (p.Arg213Glyfs*73 and p.Tyr391fs*, respectively) (Fig. 1 and 2).

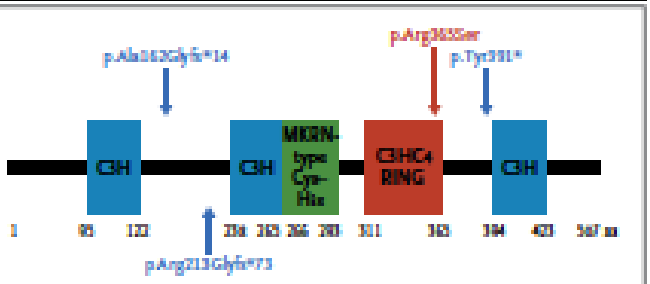


Figure 2. MKRN3 Domains and the Mutations Identified in the Study Families.

MKRN3 has four zinc-finger domains: three C3H motifs (blue) and one C3HC4 RING motif (red), which is responsible for ubiquitin ligase activity. The MKRN-specific Cys–His domain (green) is of uncertain function. The numbers correspond to the amino acid positions in the protein. Blue mutation labels and arrows indicate the location of frameshift mutations; the red mutation and arrow indicate the location of a missense mutation.

We then examined exome data from the additional 25 members of the other 12 families in the study and found another novel frameshift mutation in *MKRN3* (p.Ala162Glyfs*14) in Families D and E. A novel missense variant (p.Arg365Ser) was identified in Family C (Fig. 1 and 2). This missense variant is predicted to be "probably damaging" (likely to disrupt protein function) on the basis of a Polymorphism Phenotyping, version 2 (PolyPhen2), score of 1.0 and a Protein Analysis through Evolutionary Relationship (PANTHER) score of 0.95 for the probability of being deleterious. (The range for both scores is 0 to 1.0, with 0 indicating that a change is predicted to be neutral and 1.0 indicating that it is most likely to be deleterious.) We confirmed all variants with the use of Sanger sequencing and tested for cosegregation between the variant and central precocious puberty in an additional 8 members from Families A through E who did not undergo

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

exome sequencing. *MKRN3* is an imprinted gene that is expressed only from the paternal allele.[37] All affected family members inherited their mutations from their fathers, indicating perfect segregation in accordance with the imprinted mode of inheritance. The one heterozygous carrier known to have inherited his mutation from his mother (Patient II-1 in Family A) was unaffected, as expected. The remaining 10 families did not have any detectable rare coding variants in *MKRN3*. The prevalence of truncating variants (4 variants, 3 of which were unique, in 15 families) is much greater than that seen in population-based databases (5 variants, 4 unique, in approximately 6500 persons in the exome variant server) ($P<5.0\times10^{-8}$ for the prevalence of all variants, and $P<2.6\times10^{-4}$ for the prevalence of unique variants). Furthermore, the segregation with precocious puberty in the precise manner predicted for this imprinted gene provides additional strong and independent evidence that the *MKRN3* frameshift mutations identified lead to precocious puberty in these families.

GENOTYPE–PHENOTYPE CORRELATION

In total, we identified 15 patients (8 female patients and 7 male patients) with central precocious puberty who carried mutations in *MKRN3* that are predicted to be loss-of-function or damaging mutations. Each of these patients had clinical and hormonal features that are typical of premature activation of the reproductive axis, including early pubertal signs, such as breast development or testicular enlargement and pubic hair, advanced linear growth and bone age, and elevated basal luteinizing hormone levels, elevated GnRH-stimulated luteinizing hormone levels, or both. The median age at the onset of puberty in the girls was 5.75 years, ranging from 5.0 to 6.5 years (Table 1). In boys with mutations in *MKRN3*, the median age at the onset of puberty was 8.1 years, ranging from 5.9 to 8.5 years (Table 1). The precise time of onset of puberty was not clear in two boys, but clinical and laboratory assessment confirmed the diagnosis of central precocious puberty. The proband in Family A and her brother (Patients III-1 and III-2 in Fig. 1) have esotropia, which is a minor diagnostic criterion for the Prader–Willi syndrome.[38] The boy also has a renal cyst. Neither child has any other features of the syndrome, nor do any of the other affected patients. Additional details are available in the Supplementary Appendix.

MKRN3 mRNA LEVELS IN THE MURINE ARCUATE NUCLEUS

The hypothalamic arcuate nucleus is the site of expression of several genes known to be important for puberty, including *Kiss1* and *Tac2*.[39,40] To assess *Mkrn3* mRNA levels in the arcuate nucleus of mice, we performed quantitative real-time PCR (Fig. 3). In both male and female mice, *Mkrn3* mRNA levels were highest on postnatal days 10 and 12, began to decline on day 15, and reached a nadir by days 18 to 22, at which time *Mkrn3* expression was 10 to 20% of the levels detected at 10 days. The timing of the decline in *Mkrn3* expression correlated with the ages at which arcuate *Kiss1* and *Tac2* expression have been shown to increase, heralding the onset of puberty.[39,40] The expression of *Mkrn3* remained low through day 45, the oldest age at which the mice were tested (Fig. 3).

DISCUSSION

How puberty is initiated is an enigma that still captivates scientists. Many of the recent advances in our understanding of the mechanisms involved in reactivation of the hypothalamic–pituitary–gonadal, or reproductive, axis at puberty have been based on the characterization of genetic mutations associated with reproductive disorders in humans. The majority of the mutations to date were identified in patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism, a disorder that is much less common than central precocious puberty.[32,33] Genomewide association studies have identified multiple loci associated with pubertal timing,[4] but aside from *LIN28B* (a heterochronic regulator of developmental timing),[34] it has been difficult to implicate specific novel genes within these associated loci. Despite numerous efforts to identify genes associated with the premature activation of puberty, only two rare mutations in candidate genes have been identified in patients with central precocious puberty.[19,20] To our knowledge, no strong evidence for additional causal mutations has been presented.

In our analysis of whole-exome–sequencing data in 40 members of 15 families with central

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Abreu et al. N Engl J Med. 2013;368(26):2467-75.

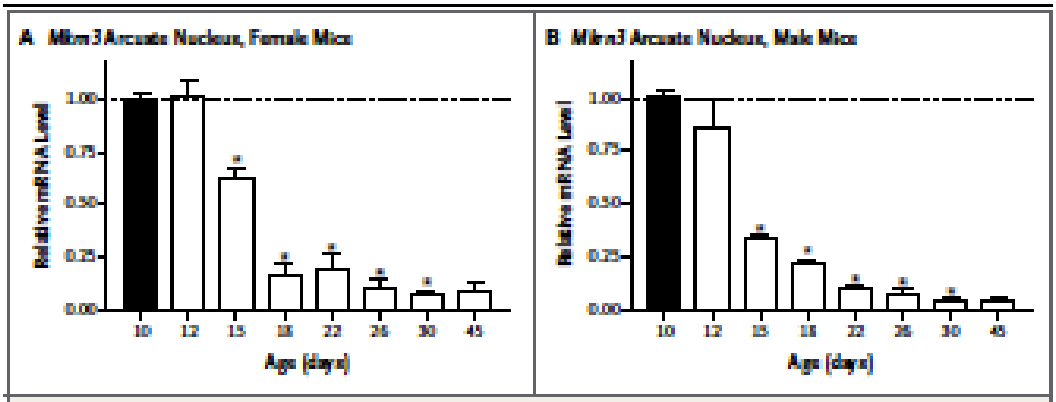


Figure 3. Mkrn3 Messenger RNA (mRNA) Levels in the Hypothalamic Arcuate Nucleus of Male and Female Mice during Postnatal Development.

Total RNA was extracted from the hypothalamic arcuate nucleus of male and female mice at the ages indicated (number of days after birth), and *Mkrn3* mRNA was quantified with the use of real-time polymerase-chain-reaction assay. The bar graphs show the relative change in mRNA levels in female mice and male mice, as compared with the level on postnatal day 10 (black bars), normalized to levels of endogenous ribosomal protein L19 mRNA. Mean (±SE) values are shown for three different mice at each age, with each measurement performed in triplicate. Significant differences ($P<0.05$) were measured by means of a one-way analysis of variance with a post hoc Tukey multiple-comparison test. Asterisks indicate $P<0.001$.

precocious puberty, we identified a single gene, *MKRN3*, encoding the makorin RING-finger protein 3, with variants predicted to be deleterious in 5 families. *MKRN3* is an intronless gene located on chromosome 15q11.2, in the Prader–Willi syndrome critical region.[35] This gene is maternally imprinted, and only the paternal allele is expressed.[35] The makorin protein family is distinguished by a characteristic combination of zinc-finger motifs; these proteins include two or three copies of a C3H motif in the N-terminal, followed by a novel Cys–His configuration, a C3HC4 RING zinc finger, and a final C3H motif.[36] C3H zinc-finger motifs have been implicated in RNA binding, whereas the RING zinc-finger motif is found in most E3 ubiquitin ligases and is responsible for ubiquitin-ligase activity.[37] The widespread species conservation of the makorin protein family suggests that it plays one or more vital roles in cells, with high levels of expression in the developing nervous system.[36] *MKRN3*, on the other hand, is conserved only in therian mammals, and its precise function has not yet been determined.[37]

The deletion of chromosome 15q11-q13, which encompasses *MKRN3*, contributes to the Prader–Willi syndrome, but it is not yet known which specific genes in this region are related to the syndrome.[38] Analyses of balanced translocations in patients with the Prader–Willi syndrome have implicated the *SNURF–SNRPN* locus, which is telomeric to *MKRN3*. One report described 2 patients with all the features of the Prader–Willi syndrome who did not have a deletion of *MKRN3*, suggesting that *MKRN3* deletion is not necessary to cause the syndrome.[38] This report also described a patient with a paternal deletion of *MKRN3*, *MAGEL2*, and *NDN* who had only a few features of the Prader–Willi syndrome: obesity, developmental delay, and a high pain threshold. This patient also had signs of puberty at the age of 7 years 6 months, with advanced bone age. The patient received a diagnosis of central precocious puberty, which was supported by her response to treatment with triptorelin.[39] Given our data, the deletion of *MKRN3* is probably the cause of early puberty in this patient.[38] It is uncertain whether the obesity, developmental delay, and high pain threshold in this patient were attributable to the *MKRN3* deletion. We have detailed clinical and hormonal data from 12 of the 15 persons with loss-of-function mutations in *MKRN3*. In this series of 12 patients, 2 had esotropia, which is a minor diagnostic criterion for the Prader–Willi syndrome.[38] Other features of the syndrome were not reported. The esotropia can-

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

not be definitively attributed to *MKRN3* deletion, because esotropia can be present in up to 5% of the population.[39]

Three of the four mutations identified in *MKRN3* in our series were frameshift mutations resulting in premature stop codons, whereas the fourth, a missense variant (p.Arg365Ser), is predicted to interfere with protein function (Fig. 2). The arginine at position 365 is located in the C3HC4 RING domain responsible for the ubiquitin ligase activity and is evolutionarily highly conserved (Fig. 2). Definitive confirmation that this missense variant causes loss of function awaits the availability of a functional assay. Although the function of MKRN3 is not well understood, and the mechanism by which *MKRN3* mutations result in early activation of the central reproductive axis are not yet known, our genetic data are sufficiently compelling and statistically strong to invoke a causative role for MKRN3 in central precocious puberty.

The inheritance pattern in the affected families is consistent with the expression of *MKRN3* from the paternally inherited allele only. For example, Patient II-1 in Family A inherited the mutant *MKRN3* allele from his mother; because this allele was silenced, he did not have the central precocious puberty phenotype. Patients II-1 in Families C, D, and E were apparently asymptomatic heterozygous carriers of deleterious *MKRN3* mutations, but since we were unable to obtain reliable pubertal histories or DNA from their parents, the parental source of their mutations is unknown. Of the 15 patients with central precocious puberty and *MKRN3* mutations, 7 were male; this nearly equal sex distribution contrasts with the striking predominance of central precocious puberty in girls that has been reported previously.[10] The similar incidence of central precocious puberty in association with *MKRN3* mutations in the two sexes in the affected families is consistent with the autosomal pattern of inheritance. In contrast, in the 10 families without mutations in *MKRN3*, all affected members were female, an incidence that is similar to that reported previously[10] (Fig. S1 and Table S1 in the Supplementary Appendix). Screening for mutations of *MKRN3* in sporadic cases of central precocious puberty, which affects primarily girls, will add information about the role of this gene in pubertal timing. The identification of mutations in *MKRN3* in families of diverse ancestry shows that the effects of *MKRN3* mutations in central precocious puberty are generalizable and are not restricted to a specific ethnic group. It is possible that Families D and E are distantly related; we have neither confirmed nor excluded this possibility.

MKRN3 is associated with protein ubiquitination, in which a ubiquitin moiety is attached to a protein, thus tagging it for movement to the proteasome, where it is degraded. Ubiquitination can also be an indicator for signal transduction, cell-cycle regulation, differentiation and morphogenesis, and other nonproteolytic fates. The precise mechanism by which the deletion of *MKRN3* leads to the early reactivation of pulsatile GnRH secretion remains to be elucidated. We found increased levels of *Mkrn3* mRNA at young ages in the arcuate nucleus of male and female mice, with a striking reduction in levels immediately before puberty and low levels in adulthood (Fig. 3). The arcuate nucleus is considered to play a key role in puberty control in mice,[39] and the pattern of *Mkrn3* mRNA expression correlates with an inhibitory effect on the initiation of puberty in these animals. These data are in agreement with the identification of a loss-of-function mutation in patients with central precocious puberty, corroborating the view that the mutation has an inhibitory effect on the secretion of GnRH. The initiation of puberty is thought to result from a decrease in factors that inhibit the release of GnRH combined with an increase in stimulatory factors. Studies of hypogonadotropic hypogonadism have led to the identification of genes encoding factors that have stimulatory input.[12,13] In contrast, MKRN3 seems to have an inhibitory role in humans.

Supported by grants from the National Institutes of Health (1K23HD073351, to Dr. Dauber), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (1806-13-1, to Dr. Abreu), the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development (1R01HD072773-01, to Dr. Abreu, U54HD28138, as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research, and R21HD066495, to Dr. Kaiser), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (302125/2013-8, to Dr. Latronico, and 305743/2013-2, to Dr. Mendonca), and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2009/54726-0, to Dr. Latronico).

Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at NEJM.org.

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Abreu et al. N Engl J Med. 2013;368(26):2467-75.

REFERENCES

1. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endocr Rev 2001;22:111-51.
2. Gajdos ZK, Hirschhorn JN, Palmert MR. What controls the timing of puberty? An update on progress from genetic investigation. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009;16:16-24.
3. Palmert MR, Hoepffner PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:2364-8.
4. Elks CE, Perry JR, Sulem P, et al. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. Nat Genet 2010;42:1077-85.
5. Golub MS, Collman GW, Foster PM, et al. Public health implications of altered puberty timing. Pediatrics 2008;121:Suppl 3:S218-S230.
6. Palmert MR, Hirschhorn JN. Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. Mol Genet Metab 2003;80:1-10.
7. Buchholz S. Intra-pair similarity in physical growth of monozygotic and of dizygotic twins during puberty. Ann Hum Biol 1977;4:417-30.
8. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocr Rev 2003;24:668-91.
9. Sklad M. The rate of growth and maturing of twins. Acta Genet Med Gemellol (Roma) 1977;26:223-37.
10. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1799-800.
11. Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. Hum Reprod Update 2004;10:67-77.
12. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Nat Rev Endocrinol 2009;5:569-76.
13. Semple RK, Topaloglu AK. The recent genetics of hypogonadotrophic hypogonadism — novel insights and new questions. Clin Endocrinol (Oxf) 2010;72:423-35.
14. Freitas RG, Ryan G, Brito VN, et al. Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. Fertil Steril 2007;87:627-34.
15. Zhao Y, Chen T, Zhou Y, Li K, Xiao J. An association study between the genetic polymorphisms within GnRHR, LHβ and FSHβ genes and central precocious puberty in Chinese girls. Neurosci Lett 2010;486:188-92.
16. Parent AS, Matagne V, Westphal M, Heger S, Ojeda S, Jung H. Gene expression profiling of hypothalamic hamartomas: a search for genes associated with central precocious puberty. Horm Res 2008;69:134-23.
17. Luan X, Bu H, Wei X, et al. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. Neuroendocrinology 2007;86:73-81.
18. Nakayama Y, Wondisford FE, Lash RW, et al. Analysis of gonadotropin-releasing hormone gene structure in families with familial central precocious puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab 1990;70:1273-8.
19. Tenoi MG, Bianco SD, Brito VN, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med 2008;358:709-15.
20. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:2276-80.
21. Greulich WW, Pyle S. I. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford, CA: Stanford University Press, 1959.
22. Mody EK, Hintz RL, Wilson DM, et al. Normal ranges for immunochemiluminometric gonadotropin assays. J Pediatr 1995;127:40-6.
23. Dauber A, Saiter J, Hechter E, Saiter J, Hirschhorn JN. Whole exome sequencing reveals a novel mutation in CUL7 in a patient with an undiagnosed growth disorder. J Pediatr 2013;162(1):202.e1-204.e1. [Erratum, J Pediatr 2013;162:217.]
24. Gill JC, Navarro VM, Kwong C, et al. Increased neurokinin B (Tac2) expression in the mouse arcuate nucleus is an early marker of pubertal onset with differential sensitivity to sex steroid-negative feedback than Kiss1. Endocrinology 2012;153:4683-91.
25. San Lucas FA, Wang G, Scheet P, Peng B. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. Bioinformatics 2012;28:421-2.
26. Exome variant server. Seattle: National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project, 2013 (http://evs.gs.washington.edu/EVS).
27. Buiting K, Walter AM, Singer-Sam J. Novel paternally expressed intergenic transcripts at the mouse Prader-Willi/Angelman syndrome locus. Mamm Genome 2005;16:219-27.
28. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. Genet Med 2012;14:10-26.
29. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. J Neurosci 2009;29:11859-66.
30. Navarro VM, Castellano JM, McConkey SM, et al. Interactions between kisspeptin and neurokinin B in the control of GnRH secretion in the female rat. Am J Physiol Endocrinol Metab 2011;300:E202-10.
31. Gill JC, Wang O, Kakar S, Martinelli E, Carroll RS, Kaiser UB. Reproductive hormone-dependent and -independent contributions to developmental changes in kisspeptin in GnRH-deficient hypogonadal mice. PLoS One 2010;5(7):e11911.
32. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003;349:1614-27.
33. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100:10972-6.
34. Zhu H, Shah S, Shyh-Chang N, et al. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. Nat Genet 2010;42:626-30.
35. Jong MT, Gray TA, Ji Y, et al. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. Hum Mol Genet 1999;8:783-93.
36. Gray TA, Hernandez L, Carey AH, et al. The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H(1) zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. Genomics 2000;66:76-86.
37. Rihner A, Darras A, D'Costa H, Bassilier JE, Gallinaro-Arnoux D, Wolff JN. The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. BMC Genomics 2010;11:721.
38. Ramsay D, Gilbay J, Wieczorek D, et al. A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. Eur J Hum Genet 2009;17:582-90.
39. Friedman DS, Repka MX, Katz J, et al. Prevalence of decreased visual acuity among preschool-aged children in an American urban population: the Baltimore Pediatric Eye Disease Study, methods, and results. Ophthalmology 2008;115:1786-95.

Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society.

The New England Journal of Medicine
Downloaded from nejm.org at USP on January 7, 2016. For personal use only. No other uses without permission.
Copyright © 2013 Massachusetts Medical Society. All rights reserved.

Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LF, Teles MG, Carroll RS, Guerra Junior G, Guaragna Filho G, Gucev Z, Arnhold IJ, de Castro M, Moreira AC, Martinelli CE Jr, Hirschhorn JN, Mendonça BB, Brito VN, Antonini SR, Kaiser UB, Latronico AC. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99(6):E1097-103.

Macedo et al. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99:E1097-103.

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

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

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Disciplina de Endocrinologia (D.B.M., A.P.A., L.R.M., D.B., P.C., L.F.G.S., M.G.T., I.J.P.A., B.B.M., V.N.B., A.C.L.), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 05403-900; Departamento de Puericultura e Pediatria (A.C.S.R., M.C., A.C.M., C.E.M., S.R.A.), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil, 14049900; Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension (A.P.A., R.S.C., U.B.K.), Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School and Division of Endocrinology, (A.D., J.N.H.) Boston Children's Hospital, Boston, Massachusetts 02115, Program in Medical and Population Genetics Broad Institute (A.D., J.N.H.), Cambridge, Massachusetts 02142; Unidade de Endocrinologia Pediátrica (G.G.J., G.G.F.), Universidade de Campinas, SP, Brasil, 13084-970; and Medical Faculty Skopje (Z.G.), 50 Divizija BB, 1000 Skopje, Macedonia

Context: Loss-of-function mutations in makorin ring finger 3 (*MKRN3*), an imprinted gene located on the long arm of chromosome 15, have been recognized recently as a cause of familial central precocious puberty (CPP) in humans. *MKRN3* has a potential inhibitory effect on GnRH secretion.

Objectives: The objective of the study was to investigate potential *MKRN3* sequence variations as well as copy number and methylation abnormalities of the 15q11 locus in patients with apparently sporadic CPP.

Setting and Participants: We studied 215 unrelated children (207 girls and eight boys) from three university medical centers with a diagnosis of CPP. All but two of these patients (213 cases) reported no family history of premature sexual development. First-degree relatives of patients with identified *MKRN3* variants were included for genetic analysis.

Main Outcome Measures: All 215 CPP patients were screened for *MKRN3* mutations by automatic sequencing. Multiplex ligation-dependent probe amplification was performed in a partially overlapping cohort of 52 patients.

Results: We identified five novel heterozygous mutations in *MKRN3* in eight unrelated girls with CPP. Four were frame shift mutations predicted to encode truncated proteins and one was a missense mutation, which was suggested to be deleterious by in silico analysis. All patients with *MKRN3* mutations had classical features of CPP with a median age of onset at 6 years. Copy number and methylation abnormalities at the 15q11 locus were not detected in the patients tested for these abnormalities. Segregation analysis was possible in five of the eight girls with *MKRN3* mutations; in all cases, the mutation was inherited on the paternal allele.

Conclusions: We have identified novel inherited *MKRN3* defects in children with apparently sporadic CPP, supporting a fundamental role of this peptide in the suppression of the reproductive axis. (*J Clin Endocrinol Metab* 99: E1097–E1103, 2014)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2014 by the Endocrine Society
Received August 12, 2013. Accepted March 4, 2014.
First Published Online March 14, 2014

* D.B.M. and A.P.A. contributed equally to this study, as did U.B.K. and A.C.L.
Abbreviations: CPP, central precocious puberty; ICMA, immunochemiluminometric assay; IFMA, immunofluorometric assay; MKRN3, makorin ring finger 3; MLPA, multiplex ligation-dependent probe amplification.

Macedo et al. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99:E1097-103.

Gonadotropin-dependent precocious puberty, also known as central precocious puberty (CPP), is clinically defined by the development of secondary sexual characteristics before age 8 years in girls and 9 years in boys. CPP has a striking predominance in girls. It results from premature reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with pubertal levels of gonadotropins and consequent gonadal stimulation (1, 2). Affected children have premature and progressive sexual development associated with acceleration in linear growth and advancement in bone age. No hypothalamic tumors or lesions are detected in the great majority of CPP patients, suggesting a different underlying mechanism such as genetic, epigenetic, and/or environmental factors (1, 3).

Despite efforts to establish a genetic cause for CPP, only rare genetic variants had been demonstrated until recently (4–8). Gene selection in previous studies was based mainly on a candidate gene approach, including genes involved in physiological processes regulating GnRH secretion in animal studies as well as genes implicated in the etiology of congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism. To date, mutations associated with CPP have been identified in only two genes, *KISS1* and *KISS1R* (4, 5). Very recently, using whole exome sequencing as a hypothesis-free approach to identify genetic variants, we were able to identify loss-of-function mutations in a single gene, *MKRN3*, encoding the makorin ring finger protein 3, in 5 of 15 families with CPP (9). These findings suggest that MKRN3 mutations may be a cause of familial CPP in humans, establishing a clear genetic component to this reproductive condition.

MKRN3 is an intronless gene located on chromosome 15q11.2, in the Prader Willi syndrome critical region. The maternal allele of this gene is silenced, and only the paternal allele is expressed (10), which is consistent with the paternal inheritance pattern in families with CPP due to *MKRN3* defects (9). The makorin ring finger 3 (MKRN3) protein structure suggests an association with protein ubiquitination, but the precise mechanism by which its inactivation leads to precocious puberty remains to be elucidated (11).

Genomic imprinting is an epigenetic process that involves DNA methylation to achieve monoallelic gene expression without altering the genetic sequence (12). DNA methylation usually takes place on cytosine nucleotides located within CpG islands in the promoter sequences of genes, resulting in transcriptional silencing. Imprinted genes play an etiological role in several human diseases, such as Prader Willi syndrome, Angelman syndrome, and Beckwith-Wiedemann syndrome (13). To date, it is unknown whether CPP could arise from the loss of *MKRN3* expression by the paternal allele due to a de novo deletion, maternal uniparental disomy, or an imprinting defect, mechanisms recognized in the pathogenesis of Prader Willi syndrome (14). In the present study, we investigated potential *MKRN3* sequence variations in 215 patients with CPP as well as copy number and methylation abnormalities of the 15q11 locus in a partially overlapping cohort of 52 patients.

Patients and Methods

In this study, we analyzed 215 consecutive unrelated children (207 girls and eight boys) with idiopathic CPP from three different university medical centers: Sao Paulo University (Brazil), Sao Paulo campus (96 cases), and Ribeirao Preto campus (87 cases); Campinas University (four cases); and Medical Faculty Skopje, Macedonia (28 cases). When available, family members of patients with *MKRN3* mutations were invited to participate in the study. Fourteen relatives of five probands agreed to participate in the genetic analyses. No family history of premature sexual development was reported in 213 cases, whereas two female patients had first-degree relatives who were found to have precocious puberty.

CPP was diagnosed by clinical signs of pubertal development before age 8 years in girls and 9 years in boys, pubertal basal and/or GnRH-stimulated LH levels, advanced bone age (Greulich and Pyle method), and normal central nervous system magnetic resonance imaging (15–17). Each medical center had its own protocol that was approved by local ethics committees. Written informed consent was obtained from all participants or their parents/guardians. Clinical and hormonal data from all patients are summarized in http://press.endocrine.org/doi/suppl/10.1210/jc.2013-3126/suppl_file/JC-13-3126.pdf Supplemental Appendix Table 1.

The single exon of *MKRN3* was sequenced in all 215 patients. For gene dosage and methylation analysis, 40 patients from this cohort were randomly selected, together with 12 children with familial CPP from the previous study in whom no *MKRN3* mutations were described (9). *KISS1* and *KISS1R* genes were previously sequenced in 206 of 215 patients (96%) with CPP in this cohort, and the *LIN28B* gene was sequenced in 178 of 215 patients (83%). Only two mutations (one in *KISS1* and one in *KISS1R*) were identified in the patients with sporadic and familial CPP in the previous studies (4–6).

Hormone assays

Serum LH, FSH, T, and estradiol concentrations were measured by immunofluorometric assay (IFMA) and immunochemiluminometric assay (ICMA). The interassay coefficient of variation was 5% or less for all assays. For the acute GnRH stimulation test, serum LH and FSH were measured at −15, 0, 15, 30, 45, and 60 minutes after iv administration of 100 μg GnRH. Basal LH greater than 0.6 U/L (IFMA) or greater than 0.15 U/L (ICMA) were considered as pubertal levels for both sexes, and a GnRH-stimulated LH peak greater than 6.9 U/L for girls and greater than 9.6 U/L for boys (IFMA) or greater than 5.0 U/L for both sexes (ICMA) were considered as a pubertal response (15, 16). Basal estradiol levels higher than 21 pg/mL and basal T levels higher than 19 ng/dL were considered as pubertal.

Macedo et al. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99:E1097-103.

Genetic analysis

PCR amplification and sequencing of MKRN3

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes from all patients using standard procedures. The entire coding region of *MKRN3* (GenBank accession number NC_000015.9) was amplified by PCR followed by automatic sequencing of the products using the Sanger method (see Supplemental Table 2 for more details). Two databases (1000 Genomes and NHLBI EVS) were used to exclude all common variants (minor allele frequency >1%) (18, 19). Computational algorithms (PolyPhen, SIFT, Panther, and MutationTaster) were used to predict the pathogenicity of the missense variants (20).

Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)

Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (SALSA methylation-specific MLPA Kit ME028; MRC Holland) was used to detect potential copy number changes as well as to analyze CpG island methylation of chromosome 15q11 in a semiquantitative manner. The Angelman/Prader Willi syndrome locus at 15q11–13 contains at least eight imprinted genes, including the *MKRN3* gene, which are regulated by a bipartite imprinting center associated with the small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N (*SNRPN*) gene (21). The MLPA commercial assay includes 32 probes for nucleotide sequences in or near the Prader Willi syndrome critical region of chromosome 15q11, including a specific *MKRN3* probe (172 bp in exon 1). These probes were used to test for deletions and duplications of one or more sequences of the 15q11 region in the DNA samples. Five of these probes are specific for imprinted sequences, four for *SNRPN* and one for the necdin (*NDN*) gene, and contain one recognition site each for the methylation-sensitive restriction enzyme *Hha*I. Digestion with *Hha*I after hybridization of the DNA samples with these probes, followed by PCR amplification, was used to test for the presence of aberrant methylation patterns in the 15q11 locus, caused by either uniparental disomy or by imprinting defects, as previously described (13) (see Supplemental Appendix for additional details).

Statistical analyses

Statistical and computational analyses were performed using the software SigmaStat3.5. To compare clinical and hormonal data between patients with and without *MKRN3* mutations, the nonparametric Mann-Whitney *U* test was used. Statistical significance was set at $P < .05$.

Results

DNA sequencing

Automatic sequencing of *MKRN3* in 215 patients with CPP revealed five novel heterozygous mutations in eight unrelated girls, including four indel variants (ie, insertions or deletions) and one missense variant (Table 1 and Supplemental Appendix Figure 1). These five variants were absent in two databases (1000 Genomes and NHLBS EVS). All indel variants (p.Pro161Argfs*10, p.Pro161Argfs*16, p.Gln226Thrfs*6, p.Glu256Glyfs*36) were located in the N-terminal region of the MKRN3 protein. The missense mutation (p.Phe417Ile), located within a zinc finger, was predicted to be deleterious by four different *in silico* prediction programs (Mutation Taster, PolyPhen-2, SIFT, and Panther). The remaining patients did not have any detectable rare coding variants (minor allele frequency < 1%) in *MKRN3*.

Clinical features of CPP patients with *MKRN3* defects

Patients with CPP due to *MKRN3* mutations had typical clinical and hormonal features of premature activa-

Table 1. Clinical and Hormonal Features of Eight Girls With CPP Associated With *MKRN3* Mutations

Patient Number	Initial Clinical Manifestation (Age, y)	Initial Diagnosis: Age, y	Initial Diagnosis: Breast Tanner Stage	Initial Diagnosis: Pubic Hair Tanner Stage	Initial Diagnosis: BMI (z)	Initial Diagnosis: BA, y	LH, IU/L: Basal	LH, IU/L: After GnRH	FSH, IU/L Basal	E2, pg/mL	Mutation cDNA and Protein	Additional Family Members With *MKRN3* Mutations[a]
1	Thelarche and pubarche (6.4)	7.8	3	4	0.4	11	1.0	12	5.9	15	c.482delC p.Pro161Argfs*10	Father and sister (20 y)
2	Thelarche (5.4)	6.1	3	1	0.2	8.8	1.3		5	36	c.482_483insC p.Pro161Argfs*16	Father and sister (4 y)
3	Thelarche (6.0)	7.9	4	3	2.0	11	3.4		10	80	c.482_483insC p.Pro161Argfs*16	NA
4	Thelarche (3.0) and pubarche (6.0)	6.7	3	1	1.5	8.8	1.8	62.5	4.9	60	c.482delC p.Pro161Argfs*10	Father
5	Thelarche (4.0)	6.8	4	3	1.3	12	6.1		4.7	62	c.675_676insA p.Gln226Thrfs*6	NA
6	Thelarche and pubarche (6.0)	6.6	3	2	1.4	7.8	1.6		4.6	20	c.766_767delA p.Glu256Glyfs*36	NA
7	Thelarche (6.0)	7.1	3	1	0.2	8.8	0.3	7.5	4.4	44	c.1249T>A p.Phe417Ile	Father
8	Thelarche (6.0) and pubarche (6.3)	6.9	3	2	0.5	9.3	2.7	16.6	6.5	47	c.482_483insC p.Pro161Argfs*16	Father

Abbreviations: BA, bone age; BMI, body mass index; E2, estradiol; NA, not available. Normal values are as follows: E2, prepubertal levels less than 21 pg/mL; LH, prepubertal basal levels less than 0.6 (IU/L), peak less than 6.9 (IU/L) in girls. Breast and pubic hair Tanner stage and bone age were assessed at the time of diagnosis.

[a] The familial segregation analysis is illustrated in Figure 1.

Macedo et al. J Clin Endocrinol Metab. 2014;99:E1097-103.

tion of the reproductive axis, including early pubertal signs, such as breast and pubic hair development, accelerated linear growth, advanced bone age, and elevated basal and/or GnRH-stimulated LH levels (Table 1 and Supplemental Data). Patient 6 had mild nonspecific syndromic features, such as high-arched palate, dental abnormalities, clinodactyly, and hyperlordosis.

The age of pubertal onset in these girls ranged from 3.0 to 6.4 years (mean 5.3 y and median 6.0 y). Simultaneous development of breasts and pubic hair, as the initial clinical manifestations, were observed in four of eight patients, whereas the remaining four patients initially presented only with thelarche. Bone age was advanced in all cases. Median basal and GnRH-stimulated LH levels were 1.7 U/L (ranging from 0.3 to 6.1 U/L) and 14.3 U/L (ranging from 7.5 to 62.5 U/L), respectively. All affected girls were treated with GnRH analogs for a mean period of 3.4 years. Satisfactory clinical and hormonal control was obtained in six of eight patients, who had menarche at an appropriate age, and they reached a near predicted final height. The two other patients were noncompliant with treatment (Supplemental Data). Except for the significantly ($P = .016$) higher levels of basal FSH in patients with *MKRN3* mutations (median 4.9, ranging from 4.4 to 10) compared with those without *MKRN3* mutations (median 3.6, ranging from 1.0 to 9.8), no other clinical or hormonal differences were identified between these groups (Supplemental Appendix Table 2).

Familial segregation analysis

Genetic analysis was carried out in 14 first-degree relatives of five of eight children with *MKRN3* mutations (Figure 1 and Table 1). Among these five families, genomic DNA from all parents (10 individuals), three siblings (families 1, 2, and 4), and one son (family 7) was available for *MKRN3* analysis. Family members of patients 3, 5, and 6 were not accessible for genetic studies. Except for the older sister of patient 1 and the father and paternal aunt of patient 8, who had histories of premature sexual development, indicating familial CPP, all other relatives studied reported normal onset of pubertal development. Segregation analysis demonstrated that the mutant allele was paternally inherited in all five families because the fathers were carriers of the same mutation as their affected daughters, whereas the mothers were wild type for *MKRN3* (Figure 1). Patient 2 has a younger sister (aged 4 y) who carries the same mutation (p.Pro161Argfs*16) but has not yet shown signs of puberty.

Gene dosage and methylation analysis of the 15q11-13 locus

No abnormalities in gene copy number or methylation pattern were detected by methylation-specific MLPA in the chromosome 15q11 locus in any of the 52 patients studied (Supplemental Appendix Figure 2 and data not shown).

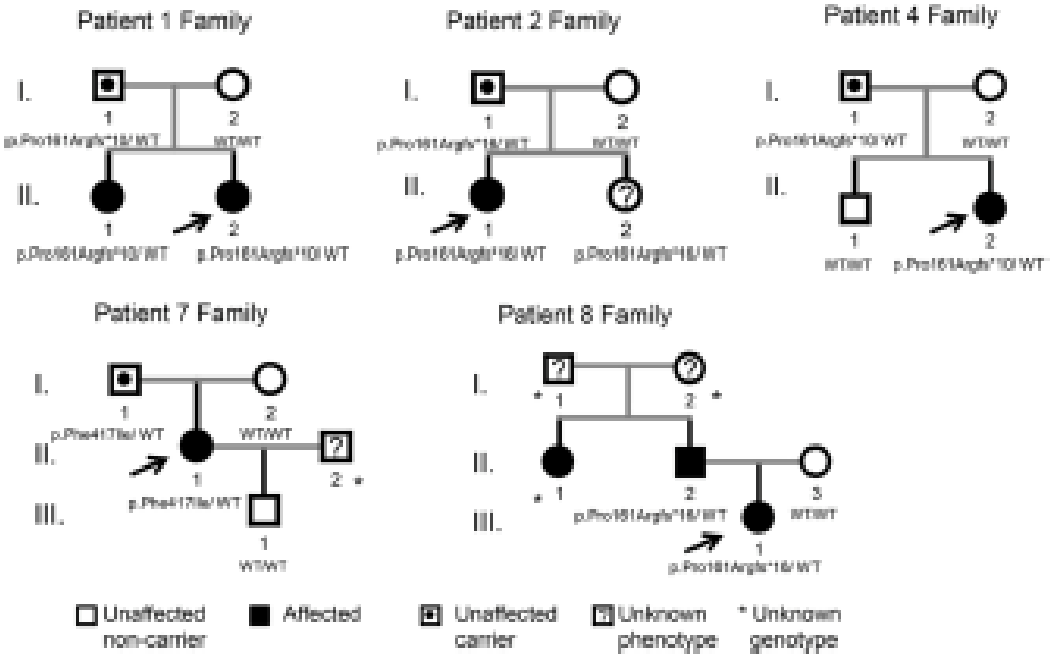


Figure 1. Pedigrees of the patients with *MKRN3* mutations. Squares indicate male family members, circles female members, black symbols clinically affected family members, symbols with black circles unaffected carriers, and question mark unknown phenotype. *, Unknown genotype. Arrows the proband in each family. The *MKRN3* genotypes are shown for family members whose DNA was available for genetic studies. WT, wild-type. Families 1 and 8 are typical familial CPP cases. Patient II.2 from family 2 (4 y old) has not yet shown signs of puberty.

Discussion

The estimated incidence of CPP in American girls is 1:5000–1:10 000 (3). Among Danish girls, the prevalence of precocious puberty was 1:500, based on national registries over a 9-year period (22). Precocious puberty can result in short stature and psychological and behavioral disorders in untreated patients (1). Accumulating evidence suggests an association between early timing of puberty and adverse health outcomes in later life (23). Early age at menarche has been associated with increased risk of obesity, hypertension, type 2 diabetes, ischemic heart disease and stroke, cancer, and cardiovascular mortality (24–27).

In the present study, we identified five novel *MKRN3* defects, including four frame shift mutations and one missense variant, in eight unrelated patients with idiopathic CPP (Table 1 and Supplemental Appendix Figure 1). Notably, frame shift mutations are generally loss-of-function mutations. However, they could potentially affect regulatory regions, promoting overexpression or having other consequences. Therefore, definitive confirmation that these indels and the missense variant cause loss of function awaits the availability of a MKRN3 functional assay. Nevertheless, the absence of the missense variant in databases such as 1000 Genomes and NHLBI EVS, and the in silico predictions of a deleterious effect on protein function suggest that this variant is related to the patient's phenotype. The identification of these novel variants in *MKRN3* strengthens previous evidence that mutations in this gene are linked to CPP (9).

Two indel mutations of *MKRN3*, p.Pro161Argfs*10 and p.Pro161Argfs*16 described in the current study, recurred in apparently unrelated girls with CPP, patients 1 and 4 and patients 2, 3, and 8, respectively, suggesting a mutational hot spot codon (Table 1). Interestingly, these mutations affect a poly-C region of *MKRN3*, a potential hypermutable site.

Combining the previous (familial CPP) and current patients with *MKRN3* defects, the mean age of puberty onset was 6.0 years in both sexes (9). The youngest case (patient 4) was a 3-year-old girl with Tanner stage 3 breast development and advanced bone age. This mean age of pubertal onset contrasts with those reported in the two patients with activating mutations involving the kisspeptin system, who started pubertal development in the first year of life (4, 5). No difference was observed in the median age of pubertal onset between patients with and without *MKRN3* mutations: 6.0 years (range 3.0–6.4 y) vs 6.0 years (range 0.1–9.0 y), respectively ($P = .44$) (Supplemental Appendix Table 2). Given the median age of pubertal onset of affected children with *MKRN3* mutations, we speculate that the prepubertal inhibitory tonus on GnRH secretion apparently took place normally but was lost prematurely. This clinical observation suggests that MKRN3 is not crucial for GnRH suppression after the minipuberty of early infancy but that its down-regulation plays a relevant role for the reemergence of GnRH pulses in the pubertal phase. Interestingly, down-regulation of *Mkrn3* was recently demonstrated in the arcuate nucleus of mice prior to the onset of puberty (9).

The basal and GnRH-stimulated LH levels as well as the LH to FSH peak ratio are the major hormonal parameters for the diagnosis of activation of reproductive axis in children with central precocious puberty. CPP patients with *MKRN3* mutations had significantly higher basal FSH levels than patients without mutations (Supplemental Appendix Table 2). Although statistically significant, this result must be interpreted with caution because it is based on a small number of *MKRN3* mutation carriers. There is no definitive explanation for this difference at this time. However, it is possible that MKRN3 could play distinct roles in the release of the two pituitary gonadotropins, LH and FSH.

All patients with *MKRN3* mutations had typical clinical features of pubertal development and hormonal profiles compatible with hypothalamic-pituitary-gonadal axis activation. In contrast to the near equal distribution of boys and girls with familial CPP due to *MKRN3* loss-of-function mutations, *MKRN3* mutations were identified only in girls in the current study (9). This finding may be explained by the smaller proportion of boys in the present cohort (one male and 26 females) compared with the previous study (one male and five females) (9). However, the exact reason for this sexual dimorphism is not well understood (28–30).

Familial segregation analysis was conducted in five of eight patients with *MKRN3* abnormalities and paternal inheritance was shown in all five, indicating that the familial nature of CPP is likely underrecognized. Notably, most children with CPP present for medical consultation accompanied by their mothers and the paternal family history is often unknown. Another limitation to the detection of familial cases is in determining the precise onset of puberty in boys and in their fathers because testicular enlargement is not as obvious as breast development and menarche in girls (31). Another point to consider is the age of the proband's siblings at the first medical visit. Because the median age of pubertal onset in patients with *MKRN3* mutations is 6 years, it is important to follow up the younger siblings of patients with *MKRN3* mutations carefully, such as the youngest, currently asymptomatic sister of patient 2, who harbors a p.Pro161Argfs*16 mutation of MKRN3 to detect signs of precocious puberty and to implement treatment as early as possible.

Interestingly, genes located on the long arm of chromosome 15 have been involved in human pubertal development based on clinical and genetic studies (32–34). It is well known that patients with Prader Willi syndrome typically have incomplete sexual development, but, paradoxically, some begin to exhibit signs of puberty much earlier than expected (35). No major signs of Prader Willi syndrome were detected in any patient with CPP in the present study. The incidence of CPP in Prader Willi syndrome is not entirely clear, but it is evident that normal onset and progression of puberty is frequently disrupted. To date, few cases (14 patients) of children with Prader Willi syndrome and precocious puberty have been reported (35). Here we hypothesized that deletions and imprinting abnormalities of chromosome 15 could be implicated in the pathogenesis of CPP in those patients without identified *MKRN3* mutations. Therefore, gene dosage and the DNA methylation pattern of the chromosome 15q locus were analyzed in 52 patients without *MKRN3* mutations. However, no interstitial deletion or methylation abnormalities were identified in these analyses. Due to the limitations of the technique performed (only five probes were available to detect aberrant methylation patterns) and because the mechanisms by which imprinting and expression of paternal genes within the Prader Willi syndrome domain, such as MKRN3 and necdin, are regulated by the Prader Willi syndrome-imprinting center are unclear (21), we cannot rule out defects located outside the target sequences of the methylation-specific MLPA probes.

To date, *MKRN3* defects represent the most frequent known genetic cause of familial CPP. We have demonstrated novel *MKRN3* mutations in children with and without a family history of CPP, supporting a role of MKRN3 in the control of puberty initiation. Because of the imprinting pattern of *MKRN3*, the CPP phenotype can be inherited from an apparently asymptomatic father, highlighting the importance of obtaining a detailed family history, especially from the paternal side, in children with apparently idiopathic CPP. *MKRN3* gene analysis may provide an additional tool for the diagnosis of familial CPP, allowing early diagnosis and adequate treatment of children with CPP.

Acknowledgments

Address all correspondence and requests for reprints to: Ana Claudia Latronico., MD, PhD, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Avenue Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7° Andar, Sala 7037, 05403-900, São Paulo, Brasil. E-mail: anacl@usp.br.

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 2013/06391-1 (to D.B.M.); National Institutes of Health (NIH) Grant 1F05HD072773-01 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Grant 3806-11-1 (to A.P.A.); NIH Grant 1K23HD073351 (to A.D.); *Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development/NIH through Cooperative Agreement U54HD028138 as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research and Grant R21HD066495 (to U.B.K.); Brazilian Grant 302825/2011-8 (to A.C.L.), Grant 300982/2009-7 (to I.J.P.A.), and Grant 305743/2011-2 (to B.B.M.) from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico; and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 2005/04726-0 (to A.C.L.).

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

1. Carel JC, Léger J. Precocious Puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(22):2366–2377.
2. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res*. 2002;57:2–14.
3. Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56:129–148.
4. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(7):709–715.
5. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2276–2280.
6. Silveira-Neto AP, Leal LF, Emerenan AB, et al. Absence of functional LIN28B mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2012;78:144–150.
7. Zhao Y, Chen T, Zhou Y, Li K, Xiao J. An association study between the genetic polymorphisms within GnRHI, LHβ, FSHβ genes and central precocious puberty in Chinese girls. *Neurosci Lett*. 2010;486:188–192.
8. Luan X, Yu H, Wei X, et al. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty. *Neuroendocrinology*. 2007;86:77–83.
9. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene *MKRN3*. *N Engl J Med*. 2013;368(26):2467–2475.
10. Jong MT, Gray TA, Ji Y, et al. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet*. 1999;8:783–793.
11. Bohne A, Darras A, D'Cotta H, Baroiller JF, Galiana-Arnoux D, Volff JN. The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. *BMC Genomics*. 2010;11:721.
12. Swain JL, Stewart TA, Leder P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. *Cell*. 1987;50(5):719–727.
13. Bittel DC, Kibiryeva N, Butler MG. Methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification analysis of subjects with chromosome 15 abnormalities. *Genet Test*. 2007;11(4):467–475.
14. Cassidy SB, Schwartz S, Miller JL, Driscoll DJ. Prader-Willi syndrome. *Genet Med*. 2012;14(1):10–26.
15. Brito VN, Batista MC, Borges MF, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3539–3544.

16. Neely EK, Hintz RL, Wilson DM, et al. Normal ranges for immunochemiluminometric gonadotropin assays. *J Pediatr*. 1995;127(1):40–46.
17. Greulich WW, Pyle S. *Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist*. 2nd ed. Stanford, CA: Stanford University Press; 1971.
18. San Lucas FA, Wang G, Scheet P, Peng B. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. *Bioinformatics*. 2012;28:421–422.
19. National Heart, Lung, and Blood Institute. Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). 2013. http://evs.gs.washington.edu/EVS/.
20. Frousios K, Iliopoulos CS, Schlitt T, Simpson MA. Predicting the functional consequences of non-synonymous DNA sequence variants—evaluation of bioinformatics tools and development of a consensus strategy. *Genomics*. 2013;102(4):223–228.
21. Rodriguez-Jato S, Shao J, Khadake J, et al. Regulatory elements associated with paternally expressed genes in the imprinted murine Angelman/Prader-Willi syndrome domain. *PLoS One*. 2013;8(2):e52390.
22. Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. *Pediatrics*. 2005;116:1323–1328.
23. Widén E, Silventoinen K, Sovio U, et al. Pubertal timing and growth influences cardiometabolic risk factors in adult males and females. *Diabetes Care*. 2012;35:850–857.
24. Lakshman R, Forouhi N, Luben R, et al. Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: results from the EPIC-Norfolk cohort study. *Diabetologia*. 2008;51:781–786.
25. Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, et al. Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:4953–4960.
26. He C, Zhang C, Hunter DJ, et al. Age at menarche and risk of type 2 diabetes: results from two large prospective cohorts. *Am J Epidemiol*. 2009;171(3):334–344.
27. Elks CE, Perry J, Sulem P, et al. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet*. 2010;42:1077–1085.
28. Bianco SDC. A potential mechanism for the sexual dimorphism in the onset of puberty and incidence of idiopathic central precocious puberty in children: sex-specific kisspeptin as an integrator of puberty signals. *Front Endocrinol*. 2012;3:1–15.
29. Hrabovszky E, Ciofi P, Vida B, et al. The kisspeptin system of the human hypothalamus: sexual dimorphism and relationship with gonadotropin-releasing hormone and neurokinin B neurons. *Eur J Neurosci*. 2010;31:1984–1998.
30. Klein KO. Precocious puberty: who has it? Who should be treated? *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(2):411–414.
31. Pignour B, Trivin C, Brauner R. Idiopathic central precocious puberty in 28 boys. *Med Sci Monit*. 2008;14(1):CR10–CR14.
32. Benedetti D, Iyer A, Traebach HB, et al. Mutational analysis of the necdin gene in patients with congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*. 2011;165(1):145–150.
33. Miller NL, Wevrick R, Mellon PL. Necdin, a Prader-Willi syndrome candidate gene, regulates gonadotropin-releasing hormone neurons during development. *Hum Mol Genet*. 2009;18(2):248–260.
34. Kanber D, Giltay J, Wieczorek D, et al. A paternal deletion of MKRN3, *MAGEL2* and *NDN* does not result in Prader–Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(5):582–590.
35. Lee HS, Hwang JS. Central precocious puberty in a girl with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocr Metab*. 2013;30:1–4.

ENDOCRINE SOCIETY

Renew your Society membership by Dec. 31
to maintain access to your Society member benefits.

www.endocrine.org/renew

Macedo DB, Cukier P, Mendonça BB, Latronico AC, Brito VN. Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2014;58(2):108-17.

revisão

http://dx.doi.org/10.1590/0004-2730000002931

Avanços na etiologia, no diagnóstico e no tratamento da puberdade precoce central

Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty

Delania B. Macedo[1], Priscilla Cukier[1], Beronica B. Mendonca[1], Ana Claudia Latronico[1], Vinicius Nahime Brito[1]

[1] Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Departamento de Clínica Médica, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC/FMUSP), São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

O início da puberdade caracteriza-se pelo aumento de amplitude e frequência dos pulsos do hormônio secretor de gonadotrofinas (GnRH) após um período de relativa supressão hormonal durante a infância. A reemergência da secreção pulsátil do GnRH resulta em aumento na secreção de gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), pela hipófise anterior e consequente ativação gonadal. A ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal resulta em puberdade precoce dependente de gonadotrofinas, também conhecida como puberdade precoce central (PPC), e se caracteriza pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos nas meninas e 9 anos nos meninos. O início do desenvolvimento puberal provém da interação complexa de fatores genéticos, nutricionais, ambientais e socioeconômicos. O diagnóstico clínico da PPC baseia-se em reconhecimento de desenvolvimento puberal progressivo, concentrações púberes de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH e avanço de idade óssea. A ressonância magnética de encéfalo é útil no estabelecimento de diagnóstico diferencial entre as formas orgânica ou idiopática. Os análogos de GnRH de ação prolongada representam o tratamento de escolha da PPC. O componente genético da PPC foi recentemente fortalecido pela evidência de mutações no gene *MKRN3*, localizado no braço longo do cromossomo 15, em crianças com PPC familial. Nessa revisão, dados clínicos e terapêuticos da PPC serão amplamente discutidos, visando à atualização e à conduta criteriosa dessa condição clínica de grande relevância na endocrinologia pediátrica. Arq Bras Endocrinol Metab. 2014;58(2):108-17

Descritores
Puberdade precoce central; hamartomas; mutação genética; gonadotrofinas; análogos de GnRH

Correspondência para:
Vinicius Nahime Brito
Hospital das Clínicas,
Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo,
Departamento de Clínica Médica,
Disciplina de Endocrinologia e Metabologia
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255,
7º andar, sala 7007
05403-900 – São Paulo, SP, Brasil
vinicius.brito@hc.fm.usp.br

Recebido em 13/Ago/2013
Aceito em 26/Nov/2013

ABSTRACT

The onset of puberty is first detected as an increase in the amplitude and frequency of pulses of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) after a quiescent period during childhood. The reemergence of pulsatile GnRH secretion leads to increases in the secretion of the gonadotropins, luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) by the pituitary gland, and the consequent activation of gonadal function. Early activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis results in gonadotropin-dependent precocious puberty, also known as central precocious puberty (CPP), which is clinically defined by the development of secondary sexual characteristics before the age of 8 years in girls and 9 years in boys. Pubertal timing is influenced by complex interactions among genetic, nutritional, environmental, and socioeconomic factors. CPP is diagnosed on the basis of clinical signs of progressive pubertal development before the age of 8 years in girls and 9 years in boys, pubertal basal and/or GnRH-stimulated LH levels, and advanced bone age. Magnetic resonance imaging of the central nervous system is essential for establishing the CPP form as organic or idiopathic. Depot GnRH-analogues represent the first-line of therapy in CPP. Very recently, the genetic component of CPP was demonstrated by the evidence that the deficiency of the *MKRN3* gene, located on long arm of chromosome 15, causes familial CPP in humans. In this current review, clinical and therapeutic aspects of the CPP will be discussed, contributing to adequate diagnosis and criterious approach of this relevant condition of pediatric endocrinology. Arq Bras Endocrinol Metab. 2014;58(2):108-17

Keywords
Central precocious puberty; hamartomas; genetic mutations; gonadotropins; GnRH analogues

INTRODUÇÃO

Puberdade é a transição entre infância e fase adulta, caracterizada por uma série de alterações endócrinas e psicológicas, o que resulta em maturação sexual e desenvolvimento da capacidade reprodutiva (1,2). Entre as modificações observadas nesse período, destacam-se o aparecimento dos caracteres sexuais secundários, a produção dos gametas maduros e o estirão do crescimento linear.

No período pós-natal, uma significativa secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) de origem hipotalâmica é evidenciada, seguida de uma fase de relativa quiescência hormonal até o início da puberdade em humanos. A reativação da secreção pulsátil do GnRH com consequente ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal marca o início da puberdade (2,3). Os pulsos de GnRH estimulam a produção das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), pela hipófise anterior, que, por sua vez, promovem a produção dos gametas maduros e a síntese dos esteroides sexuais pelas gônadas (testosterona pelas células de Leydig testiculares e estradiol pelos folículos ovarianos).

Os mecanismos envolvidos na supressão relativa da secreção de GnRH durante a infância, mantida pelo predomínio de fatores inibitórios, e a subsequente ativação puberal ainda não são totalmente compreendidos. Estudos experimentais e clínicos das décadas de 1980 e 1990 identificaram vários neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no controle da secreção de GnRH. Ácido gama-aminobutírico (GABA), neuropeptídeo Y (NPY), opioides endógenos, β-endorfinas, hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e melatonina são os principais neurotransmissores inibitórios, enquanto glicina, glutamato, norepinefrina, dopamina, prostaglandinas, serotonina, fatores de crescimento derivados da glia, tais como fator transformador de crescimento (TGF-α) e fator de crescimento epidermal (EGF), que são primariamente excitatórios (1,4).

O início da puberdade decorre de um mecanismo central, marcado pelo aumento de estímulos excitatórios e concomitante redução dos aferentes inibitórios sobre a secreção pulsátil de GnRH hipotalâmico, sendo esse processo independente da inibição exercida pelos esteroides sexuais (2-5). Além dos moduladores neuronais, diversos fatores endógenos, ambientais, étnicos, nutricionais e genéticos interagem para determinar o início preciso da puberdade.

PUBERDADE PRECOCE

Classicamente, a puberdade precoce é definida como o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos em meninas e 9 anos nos meninos (6-8). No entanto, o limite cronológico do início da puberdade tem sido objeto de intensa discussão, uma vez que um estudo americano com 17 mil meninas demonstrou que 27,3% das meninas afro-americanas e 6,7% das meninas caucasianas apresentaram início da puberdade aos 7 anos de idade, sugerindo um ajuste na média de idade de início da puberdade (9). A menarca antes dos 9 anos em meninas pode ser considerada um critério adicional de precocidade sexual.

A puberdade precoce pode ocorrer como resultado da secreção de esteroides sexuais, independentemente da ativação do eixo gonadotrófico (puberdade precoce independente de gonadotrofinas ou puberdade precoce periférica) ou, mais comumente, por uma ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, de forma semelhante ao desenvolvimento fisiológico, porém em idade cronológica inadequada (puberdade precoce dependente de gonadotrofinas ou puberdade precoce central – PPC).

Na PPC, os caracteres sexuais secundários são concordantes com o sexo do paciente (isossexual). Ao contrário, a puberdade precoce periférica pode levar ao padrão isossexual ou heterossexual (feminização de meninos ou virilização de meninas), além da progressão desordenada dos caracteres sexuais secundários, podendo a menarca ser a primeira manifestação. Em ambas as formas de puberdade precoce, iso ou heterossexual, os esteroides sexuais determinam aceleração da velocidade de crescimento e da maturação esquelética, culminando com a fusão prematura das epífises ósseas e comprometimento da estatura final. A avaliação laboratorial é útil no diagnóstico diferencial das formas de precocidade sexual.

ETIOLOGIA DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A PPC é uma condição rara, com incidência estimada de 1:5.000 a 1:10.000, mais frequente no sexo feminino, em uma proporção de 3-23 meninas: 1 menino (8,10). As principais etiologias da PPC estão descritas na tabela 1. A forma idiopática representa a maioria dos casos de PPC em meninas (90% dos casos) (8,10).

Diversas evidências apontam para uma influência da genética no início da puberdade: idade semelhante da menarca entre mães e filhas, entre membros de um

mesmo grupo étnico e maior concordância cronológica dos eventos puberais entre gêmeos monozigóticos comparados aos dizigóticos (3,6). Uma análise de 156 pacientes com PPC idiopática identificou uma prevalência de 27,5% de casos familiares, ou seja, mais de um membro acometido na mesma família, sugerindo a relevância dos fatores genéticos na patogênese da PPC. A análise de segregação nessas famílias sugeriu que a PPC apresenta modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo-dependente (11). Posteriormente, quatro estudos independentes de associação do genoma (GWAS) identificaram dois *loci* associados com a variação na idade da menarca: 6q21 (incluindo o gene *LIN28B*) e 9q31.2 (12-15).

Tabela 1. Etiologia da puberdade precoce central (PPC)

Sem anormalidade no SNC
Idiopática
Causas genéticas: Mutações ativadoras nos genes *KISS1R* e *KISS1* Mutações inativadoras no gene *MKRN3*
Secundária à exposição crônica a esteroides sexuais (por exemplo, tratamento tardio das formas virilizantes simples da hiperplasia adrenal congênita, após ressecção de tumores secretores de esteroides sexuais, testotoxicose, síndrome McCune Albright)
Após exposição a desreguladores endócrinos
Com anormalidade no SNC
Hamartoma hipotalâmico
Tumores: astrocitoma, craniofaringioma, ependimoma, glioma óptico ou hipotalâmico, adenoma secretor de LH, pinealoma, neurofibroma, disgerminoma
Malformações congênitas: cisto supraselar, cisto aracnóide, displasia septo-óptica, hidrocefalia, espinha bífida, malformação vascular, mielomeningocele, neuro-hipófise ectópica, duplicação hipofisária
Doenças adquiridas: infecções e processos inflamatórios no SNC (abscesso, meningite, encefalite, sarcoidose, tuberculose), radiação do SNC, quimioterapia, asfixia perinatal, trauma craniencefálico

SNC: sistema nervoso central.

Diversos genes envolvidos na modulação da secreção de GnRH (*GABRA1, NPY-Y1R, TAC3, TAC3R, KISS1, KISS1R, LIN28B, EAP1, TTF1*), neuropeptídeos e fatores metabólicos (leptina) foram, nos últimos dez anos, estudados como possíveis candidatos envolvidos no início da puberdade (16-20). Ao contrário do hipogonadismo hipogonadotrófico, apenas alguns raros defeitos moleculares foram identificados em pacientes com PPC, principalmente relacionados ao sistema KISS1/KISS1R (16,17). Uma mutação ativadora (p.R386P) em heterozigose, no gene que codifica o receptor da kisspeptina (*KISS1R*), foi descrita em uma menina adotada com diagnóstico de PPC idiopática aos 7 anos e outras duas mutações no gene da kisspeptina (*KISS1*). Nenhuma alteração genética associada fortemente ao fenótipo de PPC foi encontrada em um número grande de pacientes observados, indicando que mutações isoladas nos genes *KISS1* e *KISS1R* são causas raras de PPC (16,17).

Mais recentemente, Abreu e cols. (21) identificaram mutações inativadoras no gene *MKRN3 (makorin ring finger 3)* em cinco das 15 famílias com PPC, estudadas por sequenciamento exômico global. O gene *MKRN3* está localizado no braço longo do cromossomo 15, em uma região de *imprinting* relacionada à síndrome de Prader-Willi (21). O estudo de segregação dessas famílias demonstrou uma herança autossômica dominante de transmissão paterna (apenas o alelo paterno é expresso), uma vez que o alelo materno é silenciado (21). O produto do gene *MKRN3* participa da degradação de proteínas por processo de ubiquitinação, mas o mecanismo exato pelo qual sua inativação leva ao início da puberdade ainda não é conhecido (22).

Ao contrário do sexo feminino, aproximadamente 75% dos meninos com PPC apresentam uma causa orgânica, sendo que o hamartoma hipotalâmico (HH) é a causa orgânica mais comum em ambos os sexos (3,6). Os HH são malformações congênitas não neoplásicas, compostas por massa heterotópica de tecido hipotalâmico, localizada na base do crânio, no assoalho do III ventrículo, próximo ao *infundibulo* cinéreo ou aos corpos mamilares (23). Quando sintomáticos, os HH cursam com PPC em 80% dos casos, geralmente de início antes dos 3 anos de idade e mais associada aos hamartomas para-hipotalâmicos ou pedunculados, enquanto as formas intra-hipotalâmicas e sésseis maiores que 10 mm apresentam maior risco de manifestações neurológicas (epilepsia gelástica, crises focais ou generalizadas, distúrbios cognitivos e comportamentais) (23,24). O mecanismo pelo qual os hamartomas levam à PPC não é totalmente esclarecido. Algumas hipóteses incluem a presença de neurônios secretores de GnRH no tecido do HH ou a produção intrínseca do fator de crescimento de transformação-α (TGF-α), que são estimuladores da secreção de GnRH, demonstrados em estudos anteriores de imuno-histoquímica em modelos animais (24).

Outra causa importante de PPC é a exposição aos desreguladores endócrinos. Os desreguladores endócrinos são substâncias exógenas com ação estrogênica ou antiandrogênica, presentes em plásticos, solventes, pes-

ticidas (DDT), cosméticos, poluentes industriais, que interagem com a sinalização de hormônios esteroides, causando efeitos adversos sobre a fisiologia neuroendócrina (25).

DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A PPC é sempre isossexual, manifestando-se inicialmente pelo desenvolvimento das mamas no sexo feminino e o aumento do volume testicular no sexo masculino. A idade de aparecimento dos caracteres sexuais secundários e sua velocidade de progressão devem ser questionadas na história clínica dos pacientes com desenvolvimento sexual prematuro. Outras questões importantes incluem a presença de casos semelhantes na família, idade de menarca ou desenvolvimento puberal dos familiares mais próximos, uso de medicamentos, principalmente aqueles contendo esteroides, história de trauma craniano, infecções e outras lesões em sistema nervoso central, presença de cefaleia, alterações visuais e convulsões.

O exame físico geral deve ser detalhado, incluindo características faciais (oleosidade da pele, acne, presença de comedões e estigmas sindrômicos), presença de odor e pelos axilares, palpação de tireoide, palpação abdominal, desenvolvimento muscular, exame antropométrico (peso e altura), cálculo da idade estatural e do desvio-padrão da altura em relação à idade cronológica, utilizando tabelas apropriadas. Os caracteres sexuais secundários (mamas e pelos pubianos) devem ser classificados segundo os critérios de Marshall e Tanner (26,27). Volume testicular > 4 mL ou maior diâmetro > 2,5 cm é considerado púbere. Os pelos pubianos são decorrentes da adrenarca (aumento da secreção dos andrógenos adrenais – DHEA e DHEAS). No entanto, em meninas, a presença de pelos pubianos na ausência de telarca (pubarca precoce isolada) exige diagnóstico diferencial entre a forma idiopática da pubarca precoce e as doenças envolvendo a glândula suprarrenal (defeitos enzimáticos de síntese e processos neoplásicos) ou gonadais, bem como a exposição a andrógenos exógenos.

No sexo masculino, o tamanho testicular pode auxiliar no diagnóstico da causa de puberdade: na PPC, o volume testicular é aumentado, assim como na puberdade normal. Na puberdade precoce periférica, o volume testicular é geralmente reduzido, exceto nos casos de testotoxicose, tumores testiculares secretores de testosterona, presença de restos adrenais e tumores produtores de hCG. Manifestações cutâneas mais específicas, tais como manchas café com leite, podem sugerir os diagnósticos da síndrome de McCune Albright ou neurofibromatose (28).

O raio X de punho e mão não dominantes é utilizado para determinar a idade óssea, que é avaliada por comparação com atlas de idade óssea de Greulich & Pyle (29). A idade óssea pode ser utilizada para predição da estatura adulta pelo método de Bayley-Pinneau, apesar de pouco preciso (intervalo de confiança de 95%, com variação de mais ou menos 8 cm da altura predita e com tendência a superestimar a altura final) (30).

A ultrassonografia pélvica em meninas auxilia a avaliação dos volumes uterino e ovarianos, além de possibilitar a análise de cistos e processos neoplásicos no diagnóstico diferencial de puberdade precoce. São considerados púberes o volume ovariano > 1,5 mL e comprimento uterino > 3,4 cm (8,28). Outro exame de imagem importante é a ressonância magnética do sistema nervoso central, com ênfase na região hipotálamo-hipofisária, visando à detecção de tumores e malformações, tais como os hamartomas hipotalâmicos, geralmente localizados na base do hipotálamo, preenchendo a cisterna supraseclar (*infer cinerium*) (Figura 1) (23,31).

A avaliação laboratorial das gonadotrofinas, principalmente do LH, em condição basal e/ou após estímulo com GnRH de ação curta ou com análogos de GnRH de ação prolongada é utilizada para determinar a ativação do eixo gonadotrófico, sendo útil no diagnóstico diferencial das formas de puberdade precoce. A sensibilidade do LH basal em diagnosticar PPC no sexo feminino é em torno de 62%, dispensando a necessidade de realização do teste de estímulo com GnRH nessas pacientes. De acordo com métodos mais sensíveis de dosagem laboratorial, o valor de LH basal > 0,6 U/L (método imunofluorométrico – IFMA) ou > 0,2 U/L (método quimioluminescência – ICMA) em ambos os sexos é considerado puberal (32,33). Se o valor de LH basal for pré-púbere, condição laboratorial observada em 30% dos pacientes com PPC (32), deve-se realizar o teste de estímulo com GnRH agudo (100 µg,iv) ou, alternativamente, a dosagem de LH 30 a 120 minutos após a primeira aplicação de análogo de GnRH *depot* (34).

Vários métodos laboratoriais de detecção de gonadotrofinas, mais sensíveis do que os antigos radioimunoensaios, podem ser utilizados, tais como IFMA,

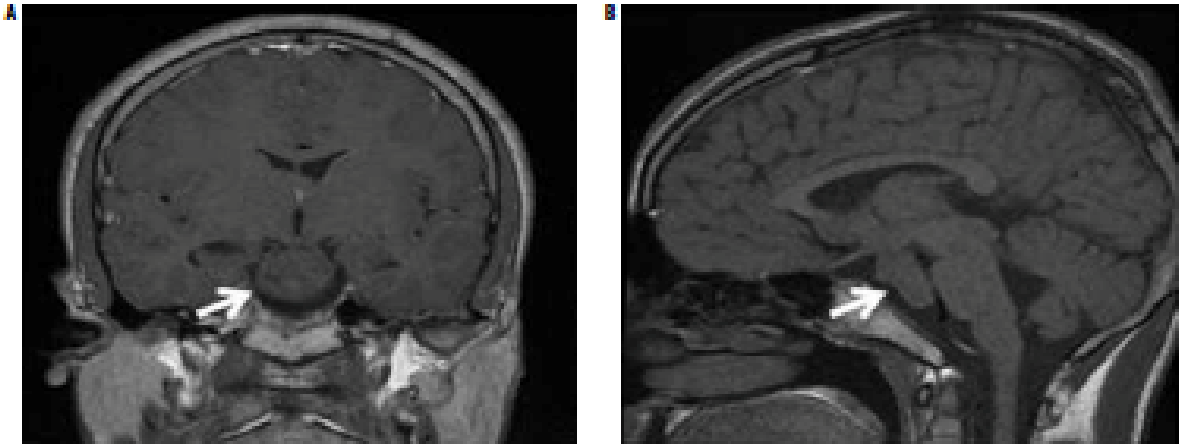


Figura 1. Ressonância magnética de encéfalo de uma criança com PPC, a qual demonstra imagem isointensa em T1, medindo 30 mm no maior diâmetro, e envolve corpos mamilares e infundíbulo, compatível com hamartoma hipotalâmico. (**A**) Corte coronal; (**B**) corte sagital.

Tabela 2. Valores de corte do pico de LH para diagnóstico de puberdade precoce central

Autor	Protocolo	Tempo (min)	Método	Valor de corte
Neely e cols., 1995 (48)	LH após GnRH (100 mcg)	30	ICMA	> 5 UI/L (ambos os sexos)
Cavallo e cols., 1995 (49)	LH após GnRH (100 mcg)	30,45 ou 60	IRMA	> 15 UI/L
Eckert e cols., 1996 (50)	LH após GnRH (100 mcg)	40	ICMA	> 8 UI/L
Brito e cols., 1999 (32)	LH após GnRH (100 mcg)	30-45	IFMA	> 6,9 UI/L (meninas) > 9,6 UI/L (meninos)
Brito e cols., 2004 (34)	LH 2h após 3,75 mg de leuprolida depot	120	IFMA	> 10 UI/L (meninas)
Resende e cols., 2007 (33)	LH após GnRH (100 mcg)	30-45	ICMA	> 3,3 UI/L (meninas) > 4,1 UI/L (meninos)
		30-45	IFMA	> 4,2 UI/L (meninas) > 3,3 UI/L (meninos)

ICMA: imunoquimioluminescência, IRMA: imunorradiométrico, IFMA: imunofluorométrico.

ICMA e eletroquimioluminescência (ECLIA), sendo o último mais sensível que os anteriores. Os valores de normalidade de cada método devem ser estabelecidos pelo laboratório clínico. Alguns valores de corte do LH em condição basal ou após estímulo, que indicam ativação do eixo gonadotrófico, são demonstrados na tabela 2 (28,32).

Os valores de estradiol no sexo feminino não são utilizados para diagnóstico de PPC, visto que apresentam baixa sensibilidade com grande sobreposição entre crianças normais pré-púberes e púberes (32). Ao contrário, os valores de testosterona no sexo masculino são sensíveis para o diagnóstico de PPC. A dosagem de FSH basal ou após estímulo com GnRH não é útil para o diagnóstico de PPC; porém, quando seus valores são baixos ou suprimidos, sugerem o diagnóstico de puberdade precoce periférica (32). Deve-se ter atenção especial na avaliação de crianças abaixo de 2 anos, pois os valores de gonadotrofinas nessa faixa etária são normalmente elevados (minipuberdade).

TRATAMENTO DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

Uma vez que a PPC resulta da ativação prematura do eixo gonadotrófico com secreção aumentada de LH e,

consequentemente, dos esteroides sexuais, a base do tratamento é o bloqueio da secreção de gonadotrofinas. Desde 1981, com a síntese dos análogos agonistas de GnRH de ação prolongada ou *depot* (a-GnRH), tais agentes tornaram-se o tratamento de escolha da PPC (8,28,35). A partir de modificações em aminoácidos específicos do decapeptídeo GnRH, foi constituído um peptídeo sintético que se liga de forma mais estável e duradoura ao receptor hipofisário de GnRH, quando comparado ao GnRH endógeno, e mais resistente à degradação pelas proteases, com consequente aumento da meia-vida. Esses compostos atuam na hipófise anterior, ligando-se aos receptores de GnRH de forma competitiva, e promovem a dessensibilização e redução no número de receptores de GnRH (*down-regulation*).

Os a-GnRH provocam um estímulo inicial da síntese e secreção de gonadotrofinas (LH e FSH), porém sua administração crônica resulta na supressão da produção destas com consequente supressão da produção dos esteroides sexuais pelas gônadas (8,28,35). O tratamento da puberdade precoce tem como principais objetivos detectar e tratar as lesões expansivas intracranianas, interromper a maturação sexual até a idade normal para o desenvolvimento puberal, promover a regressão ou estabilização dos caracteres sexuais secundários, desacelerar a maturação esquelética, preservar o potencial de estatura normal (dentro do intervalo da estatura alvo), evitar desproporções corporais, prevenir os problemas emocionais da criança, aliviar a ansiedade dos pais, reduzir o risco de abuso sexual e o início precoce da atividade sexual, prevenir a ocorrência de gestação em idade precoce, preservar a fertilidade, diminuir o risco de câncer de mama e endométrio que está relacionado à ocorrência de menarca precoce (8,28).

As indicações para o bloqueio puberal são puberdade precoce progressiva de qualquer etiologia, desenvolvimento puberal acelerado, potencial de altura final inadequada, alterações psicossociais como distúrbios comportamentais, imaturidade emocional e retardo mental. A indicação de uso de a-GnRH, pelos aspectos psicossociais da puberdade precoce ou para retardar a menarca, deve ser cuidadosamente avaliada (36).

Dentre os análogos de GnRH *depot* disponíveis, o acetato de leuprolide e triptorrelina são os mais utilizados, e diversos estudos comprovam sua eficácia e segurança. A dose utilizada para tratamento da PPC é 75-100 mcg/kg, o que, na prática, representa uma ampola de 3,75 mg a cada 28 dias, via intramuscular ou subcutânea, nas crianças acima de 20 kg, e meia ampola naquelas abaixo desse peso. A via subcutânea é a preferida, visto que a aplicação intramuscular está associada à queixa maior de dor local. Alguns grupos americanos sugerem doses mais elevadas (200 mcg/kg-300 mcg/kg), iniciando o bloqueio puberal com a dose de 7,5 mg a cada 28 dias; no entanto, nenhum estudo demonstrou vantagem adicional quando se utilizam doses mais elevadas de a-GnRH. Os trabalhos com os a-GnRH de aplicação mensal apresentaram grande eficácia e segurança para o tratamento da PPC nesses 30 anos de experiência clínica (8). Atualmente, posologias mais cômodas, como a-GnRH de uso trimestral (11,25 mg e 22,5 mg), e os implantes subdérmicos (histrelina) foram propostos. Estudos recentes revelaram a mesma eficácia e segurança dos a-GnRH de uso mensal, trimestral e anual (8,28,35-37). O regime terapêutico da PPC com análogos de aplicação trimestral, aprovado no Brasil, permite a redução do número das aplicações anuais, favorecendo a adesão ao tratamento da PPC (8,38).

A monitorização do tratamento da PPC com os a-GnRH é realizada pela avaliação clínica e laboratorial. O bloqueio puberal adequado resulta em estabilização ou regressão do estadiamento puberal das mamas, redução da velocidade de crescimento e da maturação óssea, com melhora da previsão de estatura final (8,28,35).

Do ponto de vista laboratorial, o objetivo do tratamento é a supressão dos valores de gonadotrofinas e esteroides sexuais para valores dentro da faixa pré-puberal (8,28,35). Em ambos os sexos, a dosagem de esteroides sexuais (testosterona nos meninos e estradiol nas meninas) deve estar suprimida.

Há controvérsias quanto à utilidade dos valores basais de LH na monitorização do tratamento da PPC, sendo os valores estimulados (após GnRH de curta duração ou após a aplicação do a-GnRH) o melhor parâmetro para controle laboratorial (36). Os valores de LH obtidos após teste clássico de estímulo com GnRH de ação curta são significativamente correlacionados aos obtidos após o estímulo com os a-GnRH *depot* (34). A dosagem de LH pode ser realizada no intervalo de 30 a 120 minutos após a aplicação do a-GnRH. Os valores de corte que indicam bom controle hormonal, quando dosados por métodos laboratoriais sensíveis, variam de 4 U/L a 6,6 U/L (34,37).

Os pacientes que apresentam controle clínico e laboratorial inadequados, mesmo com o aumento da dose do análogo de GnRH *depot*, devem ser cuidadosa-

mente reavaliados quanto ao diagnóstico etiológico da puberdade precoce (28).

Os a-GnRH são geralmente bem tolerados nas crianças e nos adolescentes. Os efeitos colaterais incluem reação alérgica local, cefaleia, sangramento vaginal após a primeira dose do a-GnRH, náuseas, sintomas vasomotores devido ao hipoestrogenismo e hiperprolactinemia. Tais efeitos podem ser de intensidade leve a severa. A reação alérgica local constitui um efeito colateral de particular importância, pois, sendo caracterizada pela formação de um abscesso estéril, resultando em hiperemia, dor local e formação de nodulação, leva a prejuízo na absorção do a-GnRH, o que resulta em falha na supressão hormonal (8,28,39). A ocorrência de reação local, caracterizada por formação de nodulação causada por alergia ao veículo (ácido glicólico) do análogo, possui uma frequência de 5% a 9% com uso de análogos de uso mensal, e um pouco maior com uso de a-GnRH de aplicação trimestral, de acordo com as maiores séries da literatura (8,39). A substituição do a-GnRH por uma terapia alternativa, como acetato de ciproterona ou medroxiprogesterona, é necessária.

Badaru e cols. (37) demonstraram que a supressão dos valores de gonadotrofinas obtida com doses de análogo de GnRH *depot* 3,75 mg mensalmente e 11,25 mg trimestralmente foi menor quando comparada com doses de 7,5 mg mensalmente, embora em todas as posologias os valores de estradiol se mantivessem suprimidos e o controle clínico, adequado.

O tratamento da PPC devido ao hamartoma hipotalâmico é preferencialmente clínico com uso dos a-GnRH *depot* mensal ou trimestral, e o tratamento cirúrgico está reservado para os hamartomas volumosos, com sintomatologia de ordem neurológica de difícil controle, ou nos raros casos de crescimento tumoral (39).

Por fim, outra modalidade de tratamento da PPC são os implantes subdérmicos de a-GnRH (histrelina) com liberação lenta e contínua por 12 meses (40). Estudos recentes revelam efetividade e segurança na supressão do eixo gonadotrófico e adequado controle clínico e hormonal da PPC. No entanto, não é uma opção indicada para todos os pacientes com PPC. As crianças com idade cronológica mais avançada são mais cooperativas e a aplicação pode ser realizada sob anestesia local. Além do custo elevado, os efeitos colaterais incluem infecção no local da aplicação e extrusão espontânea, e poucos são os trabalhos disponíveis e com curto período de avaliação (40).

Quando a velocidade de crescimento se reduz acentuadamente (abaixo de 4 cm/ano) durante o bloqueio puberal com a-GnRH, uma alternativa inclui a associação do hormônio de crescimento recombinante humano (rGH). Essa conduta objetiva aumentar a velocidade de crescimento promovendo ganho estatural. Nessa situação, a dose recomendada de rGH é 0,15 U/kg/dia, via subcutânea. Entretanto, poucos estudos avaliaram o impacto do uso de GH na estatura final de pacientes com PPC (41,42). Nos pacientes com terapia combinada (a-GnRH e rGH), a estatura final alcançada foi aproximadamente 7 cm maior do que a estatura predita antes do tratamento, enquanto no grupo controle, tratado somente com análogo de GnRH *depot*, o ganho foi ao redor de 4 cm na estatura adulta (41,42).

Na ocasião da suspensão do tratamento, os seguintes fatores devem ser considerados: idade cronológica, adequação psicossocial e desejo do paciente, além da idade óssea. Na menina, a idade óssea em torno de 12,5 anos indica o melhor momento de suspensão para alcançar uma estatura final normal, dentro do potencial genético (28). Alguns estudos sugerem que a suspensão do tratamento com idade cronológica de 11 anos e idade óssea de 12 anos tem sido associada a melhor resultado na estatura final. É importante ressaltar que cautela deve ser usada para estimar a estatura adulta, no momento da suspensão do tratamento com a-GnRH. O método de Bayley Pinneau de previsão de estatura adulta, mais utilizado na prática clínica, superestima em até 13 cm a estatura final. A aplicação das tabelas de Bayley-Pinneau para idade óssea média, em vez daquelas para idade óssea acelerada, resulta em previsão mais acurada da estatura final (43).

Diversos parâmetros são de interesse no seguimento de longo prazo de pacientes com PPC tratados com a-GnRH: estatura final, composição corporal, densidade mineral óssea, função reprodutiva e aspectos psicológicos (36). Inúmeros fatores determinaram a aquisição de estatura final normal nos pacientes com PPC tratados com a-GnRH. Em um estudo com 45 meninas brasileiras com PPC tratadas com a-GnRH de uso mensal, os fatores determinantes de estatura adulta normal (definida como estatura dentro do intervalo normal do potencial genético) foram: o menor intervalo de tempo entre o início dos sinais puberais e o início do tratamento, o maior desvio-padrão da altura no início e no final do tratamento, assim como maior estatura alvo (43). Logo, a instituição precoce do tratamento é crucial para obter estatura adulta normal.

O tratamento com a-GnRH não indica aparente efeito deletério sobre o índice de massa corporal (IMC). Aproximadamente 42% das pacientes mostram

Copyright © Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia

sobrepeso antes do início do tratamento (43). A análise da composição corporal de 20 pacientes com PPC tratados com triptorelina demonstrou aumento da massa gorda total no seguimento longitudinal, avaliada por DEXA (*dual-energy x-ray absorptiometry*), mesmo sem efeitos significativos sobre o IMC (36,44). Dessa forma, sugere-se que a composição corporal seja monitorada até a vida adulta.

Os estudos longitudinais avaliando a densidade mineral óssea (DMO) dos pacientes com PPC tratados com a-GnRH resultam em conclusões distintas (36). No entanto, há consenso que, no momento do diagnóstico da PPC, a DMO está normal ou aumentada para a idade cronológica e o pico de massa óssea não é prejudicado pelo tratamento com a-GnRH (45).

Com relação à função reprodutiva, os estudos revelam que a menstruação ocorre em média 16 meses após a suspensão do tratamento da PPC. Ciclos ovarianos regulares ocorreram em 60% a 96% das pacientes (36,46). A reversibilidade completa do eixo gonadotrófico após a interrupção do tratamento com a-GnRH foi demonstrada em alguns estudos (46). No sexo feminino, uma prevalência elevada de 30% a 32% de síndrome de ovários policísticos foi evidenciada em estudo italiano composto de 46 pacientes com seguimento por três anos após a menarca (47). O padrão dos ciclos menstruais foi normal na maioria dessas pacientes e o fenótipo caracterizou-se por hiperandrogenismo bioquímico e/ou clínico, associado à morfologia de ovários multipolicísticos. Esses dados sugerem que a monitorização clínica e laboratorial dessas pacientes é mandatória para estabelecer possíveis implicações na fertilidade ou nas complicações metabólicas.

Poucos estudos que avaliaram o impacto psicossocial de pacientes com PPC preconizam que o comportamento antissocial seja limitado ao período da adolescência, sem diferença no ajuste psicossocial entre essas pacientes e indivíduos normais na vida adulta, embora tenha sido observado menor nível educacional na vida adulta em quem apresentou menarca precoce. Não há estudos controlados sobre os efeitos da intervenção terapêutica com a-GnRH sobre os aspectos psicossociais (35,36).

PERSPECTIVAS

A puberdade precoce central é considerada idiopática na maioria das crianças do sexo feminino. A recente descoberta de mutações deletérias no gene *MKRN3* em casos de PPC de origem familial estabelece de forma definitiva a importância do componente genético na fisiopatologia dessa condição e abre uma perspectiva para identificar outros defeitos genéticos no entendimento do desenvolvimento puberal prematuro. Mutações no gene *MKRN3* representam uma nova causa de PPC na faixa etária entre 3 anos e 6 anos de idade, sugerindo que a supressão da secreção de GnRH após o período denominado minipuberdade ocorra na idade esperada, enquanto a reativação do eixo reprodutivo acontece em idade prematura nesses casos. É possível que outros fatores, tais como kisspeptina e outros não conhecidos, expliquem o desenvolvimento puberal em idades precoces. Além disso, a interação de fatores ambientais e evolutivos é fortemente sugerida pelo envolvimento de um gene acometido pelo fenômeno de *imprinting* e revela a complexidade do sistema regulatório do eixo reprodutivo.

Agradecimentos: à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp #2013/06391-1 para Delanie B. Macedo) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq# 302825/2011-8 para Ana Claudia Latronico e #305743/2011-2 para Berenice B. Mendonca).

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico nesse estudo.

REFERÊNCIAS

1. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. Horm Res. 2002;57:2-14.
2. Plant TM, Barker-Gibb M. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. Human Reprod Update. 2004;10:67-77.
3. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86:2364-68.
4. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endocr Rev. 2001;22:111-51.
5. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent A-S, et al. The neuroendocrine regulation of puberty: is the time for a systems biology approach? Endocrinology. 2006;147:1168-74.
6. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The Timing of normal puberty and age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends and changes after migration. Endocrinol Rev. 2003;24:668-93.
7. Partsch CJ, Sippell WG. Pathogenesis and epidemiology of precocious puberty. Effects of exogenous oestrogens. Hum Reprod Update. 2001;7:292-302.
8. Carel JC, Léger J. Precocious puberty. N Engl J Med. 2008;358:2366-77.
9. Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GG, et al. Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office settings network. Pediatrics. 1997;99:505-12.
10. Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. Clin Endocrinol (Oxf). 2002;58:129-48.

11. De Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:1794-800.
12. He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Paré G, Hankinson SE, et al. Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. Nat Genet. 2009;41:724-8.
13. Ong KK, Elks CE, Li S, Zhao JH, Luan J, Andersen LB, et al. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. Nat Genet. 2009;41:729-33.
14. Perry JR, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. Nat Genet. 2009;41:648-50.
15. Sulem P, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Holm H, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, et al. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. Nat Genet. 2009;41:734-8.
16. Teles MG, Bianco SC, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-Activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med. 2008;358:709-15.
17. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95:2276-80.
18. Silveira-Neto AP, Leal LF, Emerman AB, Henderson KD, Plakounova E, Henderson BE, et al. Absence of functional LIN28B mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. Horm Res Paediatr. 2012;78:144-50.
19. Silveira LF, Trarbach EB, Latronico A. Genetic basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. Mol Cell Endocrinol. 2010;324:30-8.
20. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2012;56:646-52.
21. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. N Engl J Med. 2013;368:2467-75.
22. Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rus K, et al. The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RINGand C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. Genomics. 2000;68:76-86.
23. Cukier P, Castro LH, Banaskiwitz N, Teles LR, Ferreira LR, Adde CC, et al. The benign spectrum of hypothalamic hamartomas: infrequent epilepsy and normal cognition in patients presenting with central precocious puberty. Seizure. 2013;22:28-32.
24. Soriano-Guillén L, Argente J. Pubertad precoz central: aspectos epidemiológicos, etiológicos y diagnóstico-terapéuticos. An Pediatr (Barc). 2011;74:336.e1-.e13.
25. Patisaul HB. Effects of environmental endocrine disruptors and phytoestrogens on the kisspeptin system. Adv Exp Med Biol. 2013;784:455-79.
26. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. Arch Dis Child. 1969;44:291-303.
27. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. Arch Dis Child. 1970;45:13-23.
28. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonça BB. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52:18-31.
29. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed Stanford, CA: Stanford University Press; 1971.
30. Bar A, Linder B, Sobel EH, Seanger P, DiMartino-Nardi J. Bayley-Pinneau method of height prediction in girls with central precocious puberty: correlation with adult height. J Pediatr. 1995;126:955-8.
31. Freeman JL. The anatomy and embryology of the hypothalamus in relation to hypothalamic hamartomas. Epileptic Disord. 2003;5:177-88.
32. Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MBF, Thirone AC, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab. 1999;84:3539-44.
33. Resende EA, Lara BH, Reis JD, Ferreira BP, Pereira GA, Borges MF. Assessment of basal and gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropins by immunochemiluminometric and immunofluorometric assays in normal children. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:1424-9.
34. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Mendonca BB. A single luteinizing hormone determination 2 hours after depot leuprolide is useful for therapy monitoring of gonadotropin-dependent precocious puberty in girls. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89:4338-42.
35. Heger S, Sippell WG, Partsch CJ. Gonadotropin-releasing hormone analogue treatment for precocious puberty: twenty years of experience. Endocr Dev. 2005;8:94-125.
36. Carel JC, Eugster EA, Rogol A, Ghizzoni L, Palmert MR; ESPE-LWPES GnRH Analogs Consensus Conference Group, et al. Consensus statement on the use of gonadotropin-releasing hormone analogs in children. Pediatrics. 2009;123:e752-62.
37. Badaru A, Wilson DM, Bachrach LK, Fechner P, Gandrud LM, Durham E, et al. Sequential comparisons of one-month and three-month depot leuprolide regimens in central precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91:1882-7.
38. Carel JC, Blumberg J, Seymour C, Adamsbaum C, Lahlou N. Triptorelin 3-month CPP Study Group.Three-month sustained-release triptorelin (11.25 mg) in the treatment of central precocious puberty. Eur J Endocrinol. 2006;154:119-24.
39. Brito VN, Latronico AC, Arnhold IJ, Lo LS, Domenice S, Albano MC, et al. Treatment of gonadotropin dependent precocious puberty due to hypothalamic hamartoma with gonadotropin releasing hormone agonist depot. Arch Dis Child. 1999;80:231-4.
40. Eugster EA, Clarke W, Klutter GB, Lee PA, Neely EK, Reiter EO, et al. Efficacy and safety of histrelin subdermal implant in children with central precocious puberty: a multicenter trial. J Clin Endocrinol Metab. 2007;92:1967-704.
41. Pasquino AM, Municchi G, Pucarelli I, Segni M, Mancini MA, Troiani S. Combined treatment with gonadotropin-releasing hormone analog and growth hormone in central precocious puberty. J Clin Endocrinol Metab. 1996;81:948-51.
42. Pucarelli I, Segni M, Ortona M, Arcadi E, Pasquino AM. Effects of combined gonadotropin-releasing hormone agonist and growth hormone therapy on adult height in precocious puberty: a further contribution. J Pediatr Endocrinol Metab. 2003;16:1005-10.
43. Brito VN, Latronico AC, Cukier P, Teles MG, Silveira LF, Arnhold IJ, et al. Factors determining normal adult height in girls with gonadotropin-dependent precocious puberty treated with depot gonadotropin-releasing hormone analog. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93:2882-9.
44. Chiocca E, Dati E, Baroncelli GI, Mora S, Perrini D, Erba P, et al. Body mass index and body composition in adolescents treated with gonadotropin-releasing hormone analogue triptorelin depot for central precocious puberty: data at near final height. Neuroendocrinology. 2009;89:441-7.
45. Antoniazzi F, Zamboni G, Bertoldo F, Lauriola S, Mengarda F, Pietrobelli A, et al. Bone mass at final height in precocious puberty after gonadotropin-releasing hormone agonist with

Abreu AP, **Macedo DB**, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. J Mol Endocrinol. 2015;54(3):R131-9.

Review | A P Abreu and others | MKRN3 deficiency causes CPP | 54:3 R131–R139

A new pathway in the control of the initiation of puberty: the *MKRN3* gene

Ana Paula Abreu, Delanie B Macedo[1], Vinidius N Brito[1], Ursula B Kaiser and Ana Claudia Latronico[1]

Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, USA

[1]Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM 42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Avenida Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7° andar, sala 7037, CEP: 05403-900, São Paulo, Brasil

Correspondence should be addressed to A C Latronico
Email
anacl@usp.br

Abstract

Pubertal timing is influenced by complex interactions among genetic, nutritional, environmental, and socioeconomic factors. The role of *MKRN3*, an imprinted gene located in the Prader–Willi syndrome critical region (chromosome 15q11–13), in pubertal initiation was first described in 2013 after the identification of deleterious *MKRN3* mutations in five families with central precocious puberty (CPP) using whole-exome sequencing analysis. Since then, additional loss-of-function mutations of *MKRN3* have been associated with the inherited premature sexual development phenotype in girls and boys from different ethnic groups. In all of these families, segregation analysis clearly demonstrated autosomal dominant inheritance with complete penetrance, but with exclusive paternal transmission, consistent with the monoallelic expression of *MKRN3* (a maternally imprinted gene). Interestingly, the hypothalamic *Mkrn3* mRNA expression pattern in mice correlated with a putative inhibitory input on puberty initiation. Indeed, the initiation of puberty depends on a decrease in factors that inhibit the release of GnRH combined with an increase in stimulatory factors. These recent human and animal findings suggest that *MKRN3* plays an inhibitory role in the reproductive axis to represent a new pathway in pubertal regulation.

Key Words

- hypothalamus and neuroendocrinology
- gonadotropins
- mutations
- secretion

Journal of Molecular Endocrinology
(2015) 54, R131–R139

Introduction

Puberty, a complex biological process involving sexual maturation and accelerated linear growth, is initiated when the pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) increases after a quiescent period during childhood. The regulation of puberty initiation remains as one of the great mysteries of human biology and it is thought that a conjunction of factors plays a role to initiate puberty.

Environmental and metabolic factors are important regulators of pubertal development, but these influences are superimposed upon substantial genetic control. Similar timing of puberty shared by mothers and her children, and within racial groups, suggests a genetic component to the onset of puberty (Zacharias & Wurtman 1969, Herman-Giddens *et al.* 1997). Substantial efforts have been made to identify genes that are responsible for the initiation of puberty (Ojeda & Lomniczi 2014). The identification of these genes is critical for advancing the understanding of the neuroendocrine regulation of puberty initiation.

http://jme.endocrinology.journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0215
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

Journal of Molecular Endocrinology

In an attempt to identify genes operating within the neuroendocrine brain that ultimately regulate the reproductive axis, researchers have been studying patients with pubertal disorders. The hypothalamic–pituitary–gonadal axis regulates puberty initiation and reproduction. GnRH is produced and secreted by the hypothalamus in a pulsatile manner during the embryonic and neonatal phases of life. GnRH secretion is actively inhibited during infancy and puberty begins with the reactivation of its secretion. GnRH deficiency results in hypogonadotropic hypogonadism, in which patients fail to develop puberty and are usually infertile. Conversely, early reactivation of GnRH secretion results in central precocious puberty (CPP). While several genes have been detected in association with GnRH deficiency and have contributed to the current knowledge of GnRH regulation (Bianco & Kaiser 2009, Semple & Topaloglu 2010), genes linked to CPP have until recently only been identified subsequent to their association with hypogonadotropic hypogonadism, such as *KISS1* and *KISS1R*. However, only rare genetic defects in KISS1 and its receptor have been identified in patients with CPP (Teles *et al.* 2008, Silveira *et al.* 2010).

The advances in sequencing methods permitted the detection of new genes implicated in the neuroendocrine regulation of puberty. Using exome sequencing analysis and studying familial cases of CPP, genetic defects in a gene with no previous link to the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, Makorin ring finger 3 (*MKRN3*), were identified as the cause of premature sexual development in one-third of the families (Abreu *et al.* 2013). *MKRN3* is located on the long arm of chromosome 15 in the Prader–Willi syndrome (PWS) critical region and is maternally imprinted (discussed later). Subsequently, we showed that mutations in *MKRN3* are also the cause of CPP in apparently sporadic cases (Macedo *et al.* 2014). These findings were significant contributions to the field and will advance the understanding of the pubertal process. We will review the genetic defects identified in patients with CPP and their clinical implications, and discuss herein the possible role of MKRN3 within the reproductive axis.

Loss-of-function mutations of *MKRN3* cause familial CPP

The role of *MKRN3* in pubertal initiation was first described in 2013 after a comprehensive genetic study of several families with CPP (Abreu *et al.* 2013). In this study, the authors investigated 40 members of 15 families with CPP from different ethnic groups (12 Brazilian, two American, and one Belgian families), and applying whole-exome sequencing four deleterious *MKRN3* mutations – three frameshift and a missense mutation (Fig. 1) – were detected in five of these families (33%). Both sexes were equally affected by *MKRN3* mutations (eight girls and seven boys) (Table 1).

More recently, Macedo *et al.* (2014) studied 215 unrelated children (207 girls and eight boys) with CPP from three different University Medical Centers and identified five novel heterozygous mutations in eight unrelated Brazilian girls, including four frameshift variants and one missense variant (Fig. 1 and Table 1). No family history of premature sexual development was

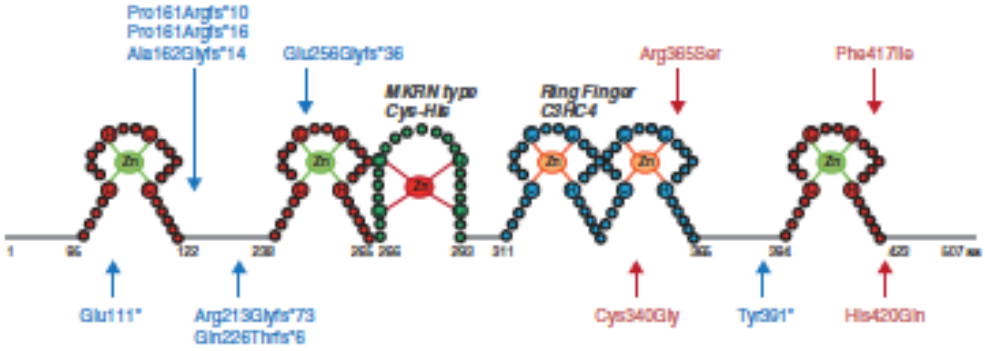


Figure 1

MKRN3 protein structure and mutations identified in patients with central precocious puberty. Zn, zinc; H, histidine; C, cysteine. The three C3H zinc finger motifs are shown in red, the C3HC4 RING finger motif is in blue, and the MKRN-specific Cys–His domain is shown in green. The numbers correspond to the amino acid positions in the protein. Blue mutation labels and arrows indicate the location of frameshift mutations; red mutation labels and arrows indicate the location of the missense mutations.

http://jme.endocrinology-journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0015
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

Table 1 *MKRN3* mutations identified in children with CPP. (Gonadarche or testicular enlargement. Breast/Genital development according to Tanner stage and bone age assessed at the time of diagnosis)

					Characteristics at time of diagnosis			MKRN3 mutation		
Family number	Origin	Patient number	Sex	Initial clinical manifestation (age in years)	Age (years)	Breast/Genital development Tanner stage	Bone age (years)	DNA	Protein	References
1	USA	I	F	Thelarche (5.7)	6.5	2	7.7	637delC	Arg213Glyfs*73	Abreu et al. (2013)
		II	M	Gonadarche (8.0)	8.7	3	11	637delC	Arg213Glyfs*73	
		III	F	Thelarche (6.5)	6.7	2	7.8	637delC	Arg213Glyfs*73	
2	Brazil	I	F	Thelarche (6.2)	7.0	3	7.0	1171_1172insA	Tyr391*	Abreu et al. (2013)
		II	F	Thelarche (5.7)	6.0	3	6.0	1171_1172insA	Tyr391*	
3	Brazil	I	M	Gonadarche and pubarche (5.9)	8.1	3	10	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Abreu et al. (2013)
		II	M	Gonadarche and pubarche unknown	9.7	3	9.7	475_476insC	Ala162Glyfs*14	
4	USA	I	M	Gonadarche and pubarche (8.5)	8.8	3	11	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Abreu et al. (2013)
		II	F	Thelarche (5.0)	6.5	2	8.3	475_476insC	Ala162Glyfs*14	
5	Belgium	I	F	Thelarche (6.2)	6.4	2	9.4*	1095G>T	Arg365Ser	Abreu et al. (2013)
		II	M	Gonadarche and pubarche unknown	9.7	3	12	1095G>T	Arg365Ser	
		III	F	Thelarche and pubarche (5.4)	5.7	2	8.5	1095G>T	Arg365Ser	
6	Brazil	I	F	Thelarche and pubarche (6.4)	7.8	3	11	482delC	Pro161Argfs*10	Macedo et al. (2014)
7	Brazil	I	F	Thelarche (5.4)	6.1	3	8.8	482_483insC	Pro161Argfs*16	Macedo et al. (2014)
8	Brazil	I	F	Thelarche (6.0)	7.9	4	11	482_483insC	Pro161Argfs*16	Macedo et al. (2014)
9	Brazil	I	F	Thelarche (3.0) and pubarche (6.0)	6.7	3	8.8	482delC	Pro161Argfs*10	Macedo et al. (2014)
10	Brazil	I	F	Thelarche (4.0)	6.8	4	12	675_676insA	Gln226Thrfs*6	Macedo et al. (2014)
11	Brazil	I	F	Thelarche and pubarche (6.0)	6.6	3	7.8	766_767delA	Glu256Glyfs*36	Macedo et al. (2014)
12	Brazil	I	F	Thelarche (6.0) and pubarche (6.3)	6.9	3	9.3	482_483insC	Pro161Argfs*16	Macedo et al. (2014)
13	Brazil	I	F	Thelarche (6.0)	7.1	3	8.8	1249T>A	Phe417Ile	Macedo et al. (2014)
14	Greece	I	F	Thelarche (6.0)	7.1	3	10	1018T>G	Cys340Gly	Settas et al. (2014)
		II	M	Gonadarche unknown	9.2	2	10	1018T>G	Cys340Gly	
15	Germany	I	M	Gonadarche and pubarche (9.0)	10	3	–	331G>T	Glu111*	Schreiner et al. 2014
		II	F	Thelarche (6.1)	7.5	3	–	331G>T	Glu111*	
16	Germany	I	F	Thelarche (7.5)	–	–	–	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Schreiner et al. (2014)
		II	F	Thelarche (6.8)	7.1	2	–	475_476insC	Ala162Glyfs*14	
17	Israel	I	F	Thelarche and pubarche (5.5)	5.8	3	6.8	1260T>G	His420Gln	de Vries et al. (2014)
		II	M	Gonadarche and pubarche unknown	9.8	3	11	1260T>G	His420Gln	
		III	F	Thelarche and pubarche (5.5)	6.3	3	8.8	1260T>G	His420Gln	
		IV	F	Thelarche (4.5)	4.5	2	6.0	1260T>G	His420Gln	

F, female; M, male.
*Bone age at 7.4 years.

© 2015 Society for Endocrinology Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

reported in the majority of these studied patients. However, segregation analysis was performed for five of these eight girls, and in all cases it has been demonstrated that the mutant allele was paternally inherited in all families with *MKRN3* mutations.

In order to investigate whether the CPP phenotype could arise from loss of *MKRN3* expression by the paternal allele due to a *de novo* deletion, maternal uniparental disomy, or an imprinting defect, Macedo *et al.* (2014) investigated 52 patients with familial and sporadic CPP, without known *MKRN3* sequence defects, by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA) of chromosome 15q11. No copy number changes or methylation abnormalities were detected in the 15q11 locus, suggesting that epigenetic defects involving this locus are likely rare mechanisms in this disorder (Macedo *et al.* 2014).

Recently, other investigators have also reported *MKRN3* defects associated with familial CPP. Settas *et al.* (2014) described a novel heterozygous missense mutation (p.Cys340Gly) in *MKRN3* in two Greek siblings, a girl with CPP and a boy with early puberty. Soon thereafter, Schreiner *et al.* (2014) identified two heterozygous *MKRN3* mutations (p.Glu111* and p.Ala162Glyfs*14) in affected members of two German families. Finally, de Vries *et al.* (2014) identified a novel missense mutation (p.His420Gln) in four siblings, including a boy, from an Ashkenazi–Sephardic Jewish family (Fig. 1 and Table 1). These studies further expanded the *MKRN3* mutational spectrum.

Clinical features of CPP associated with *MKRN3* mutations

All patients with CPP carrying loss-of-function mutations in *MKRN3* exhibited typical clinical and hormonal features of premature activation of the reproductive axis, including early pubertal signs, such as breast, testes, and pubic hair development, accelerated linear growth, advanced bone age, and elevated basal and/or GnRH-stimulated LH levels (Table 1). Except for two related patients (one girl and her brother) who presented with esotropia (Abreu *et al.* 2013), which is a minor criterion for PWS, no other signs of PWS were detected in any patient with CPP caused by *MKRN3* defects. Another female patient had mild nonspecific syndromic features, including a high-arched palate, dental abnormalities, clinodactyly, and hyperlordosis (Macedo *et al.* 2014). Regarding the therapeutic response of CPP patients with *MKRN3* defects, six of eight patients have demonstrated adequate responses to conventional treatment with depot GnRH agonists to date (Macedo *et al.* 2014).

In patients with CPP due to *MKRN3* defects, the median age of puberty onset was 6.0 years in girls (ranging from 3.0 to 7.5 years) and 8.25 years in boys (ranging from 5.9 to 9.0 years) (Abreu *et al.* 2013, Macedo *et al.* 2014, Schreiner *et al.* 2014, Settas *et al.* 2014, de Vries *et al.* 2014), suggesting that the *MKRN3* mutations may affect girls more severely than boys (Table 1). Given the median age of pubertal onset of affected patients with *MKRN3* mutations, it is speculated that the prepubertal inhibitory tonus on GnRH secretion took place normally, but was lost prematurely in patients with *MKRN3* mutations. This clinical observation suggests that MKRN3 may not be crucial for GnRH suppression after the mini-puberty of early infancy, but that the downregulation of MKRN3 plays a relevant role for the re-emergence of GnRH pulses in the pubertal onset (Macedo *et al.* 2014).

MKRN3 mutations and polymorphisms

Currently, 12 distinct loss-of-function mutations of *MKRN3* have been described in 30 patients (22 girls and eight boys) with CPP from 17 families from different ethnicities (Fig. 1 and Table 1). Remarkably, eight of these mutations encode either premature stop codons or frameshift mutations (Table 1). The four missense mutations (p.Cys340Gly, p.Arg365Ser, p.Phe417Ile, and p.His420Gln) were located within a zinc finger motif or a RING finger motif (Fig. 1), regions predicted to be involved in RNA binding and ubiquitin ligase activity of the protein respectively, and essential for protein function. All missense mutations are predicted to be pathogenic by *in silico* analysis. Additionally, *ab initio* modeling of the mutations p.Arg365Ser and p.Cys340Gly predicts that these mutations lead to significant structural perturbations in the 3D structure of the RING finger motif (Settas *et al.* 2014). The substitution of histidine 420 with glutamine in the MKRN3 protein is predicted to reduce the affinity between the Zn ion-binding site and the relevant Zn, disrupting the binding pocket leading to unfolding of the finger (de Vries *et al.* 2014). Interestingly, most of the *MKRN3* mutations (64%) were located in the amino-terminal region of the protein, which is encoded by a poly-C-rich sequence, suggesting that this area may be a potential hotspot.

The important role of MKRN3 in human puberty initiation has been reinforced recently by large genome-wide and custom-genotyping arrays in up to 182 416 women of European descent (57 studies) (Perry *et al.* 2014).

http://jme.endocrinology-journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0015
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

There was evidence of 123 signals at 106 genomic *loci* associated with age at menarche. Three of these *loci* were located in imprinted regions, including the *MKRN3 locus*, demonstrating parent-of-origin-specific associations concordant with known parental expression patterns (Perry *et al.* 2014). This study suggests that not only are rare variants in *MKRN3* associated with CPP, but also more common variants/polymorphisms may be associated with changes in the timing of puberty (as reflected by the age of menarche) within the normal range and within the general population. This was a remarkable extension of the findings of rare variants in a disease such as CPP to more common variants in a polygenic trait such as age of menarche. The lack of parent-of-origin-specific analysis in previous GWAS studies may explain why *MKRN3* has not been previously associated with the age of menarche (He *et al.* 2009, Ellis *et al.* 2010).

MKRN3 gene and protein structure and expression

MKRN3 was first cloned in 1999 by Jong *et al.* (1999*a*) during a study of the Prader–Willi/Angelman syndrome (PW/AS) critical region. They identified a cDNA in the PW/AS region encoding a zinc finger protein, initially named zinc finger protein 127 (*ZNF127*) and later renamed *MKRN3*. The functional and physiological relevance of MKRN3 is not known and despite its location in the PWS critical region, its role in this syndrome is also unclear. An antisense transcript was concomitantly identified and named *ZNF127AS* (*MKRN3-AS1*). The antisense gene is not translated and is expressed weakly during fetal development and at very low levels in adult brain regions (Jong *et al.* 1999*a*). Similar to other antisense genes, *ZNF127AS* may regulate the expression of the 'sense' gene (*MKRN3*).

MKRN3 is located on human chromosome 15q11–13 (chromosome 7C in mouse) in a region that contains a cluster of imprinted genes associated with two different neurobehavioral disorders (Lalande 1996, Nicholls *et al.* 1998). Mutations or loss of expression of the maternally expressed gene *UBE3A* lead to Angelman syndrome (AS), while PWS is thought to be a contiguous gene syndrome arising from the loss of expression of multiple paternally expressed genes, including *MKRN3*. The report of two patients with PWS with a deletion of the 15q11–13 *locus* that did not include *MKRN3* suggested that this gene is not required for the development of the syndrome, but we still cannot rule out a role for *MKRN3* in some of the clinical features of PWS (Kanber *et al.* 2009).

MKRN3 differential allele expression occurs through silencing of the *MKRN3* maternal allele, which is associated with 5′ CpG island methylation (Hershko *et al.* 1999, Jong *et al.* 1999*b*). Methylation of *MKRN3* and the other imprinted genes located within the PW/AS region of chromosome 15 is coordinately regulated by a bipartite imprinting control center (IC), composed of a sequence around the *SNRPN* promoter, the PWS-IC, and an 880 bp sequence located 35 kb upstream, the AS-IC (Rabinovitz *et al.* 2012). The molecular mechanisms of IC function are not well understood, but it has been postulated, based on studies in humans and mouse models, that the PWS-IC is a positive regulatory element and activates paternal-specific gene expression (Bielinska *et al.* 2000, Bressler *et al.* 2001), whereas the AS-IC functions in the maternal imprint by allele-specific repression of the PWS-IC to prevent the paternal imprinting program (Jong *et al.* 1999*b*, Ohta *et al.* 1999, Shemer *et al.* 2000, Rodriguez-Jato *et al.* 2005).

MKRN3 is an intronless gene, and probably arose by germline retrotransposition from the Makorin ring finger protein 1 gene (*MKRN1*), a highly transcribed, intron-containing gene, 80–90 million years ago (Rapkins *et al.* 2006). *MKRN1* is the ancestral founder of the Makorin gene family (Gray *et al.* 2000). Several other retrocopies of *MKRN1* have been identified in mammalian genomes, most of them probably corresponding to pseudogenes. Nine *MKRN* family *loci* distributed throughout the human genome have been identified thus far, with only three functional genes – *MKRN1*, *MKRN2*, and *MKRN3* – identified in vertebrates (Gray *et al.* 2000, Bohne *et al.* 2010).

The MAKORIN family

The *MKRN* gene family encodes putative ribonucleoproteins with a distinctive array of zinc-finger motifs including several C3H zinc fingers, a makorin-specific Cys–His arrangement, and a RING zinc finger (Jong *et al.* 1999*a*,*b*). In particular, MKRN3 has a centrally located RING finger motif (C3HC4), two amino-terminal C3H zinc finger motifs followed by the unique pattern of conserved Cys–His residues called a Makorin zinc finger motif, and a carboxy-terminal C3H zinc finger motif (Jong *et al.* 1999*a*; Fig. 1). *MKRN3* is highly conserved among species, and the mouse and human MKRN3 amino acid sequences share 69% identity and 82% similarity (Jong *et al.* 1999*a*). Mice and humans usually do not have conserved UTRs, yet the MKRN3 3′-UTR has 90% identity between these two species, implying a functional significance to this region of *MKRN3*. *MKRN3* is ubiquitously expressed in

http://jme.endocrinology-journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0015
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

adult human tissue, with the highest expression levels in the testis. In the fetus, it is highly expressed in the CNS and is expressed in post-meiotic sperm germ cells, particularly in round spermatids (Jong *et al.* 1999*a*).

The characteristic arrangement of cysteine (Cys or C) and histidine (His or H) residues in the zinc finger proteins in MKRN3 can allow some predictions of its function. C3H zinc fingers have been identified in RNA-binding proteins (Barabino *et al.* 1997, Murray *et al.* 1997). RING zinc fingers have been shown to mediate protein:protein interactions (Schwabe & Klug 1994). More recent evidence suggests that the RING zinc finger is a signature domain for E3 ligases, a category of enzymes mediating the transfer of ubiquitin from an E2 ubiquitin-conjugating enzyme to target protein substrates (Deshaies & Joazeiro 2009). Ubiquitination can have diverse effects on the protein substrate, varying from proteasome-dependent proteolysis to modulation of protein function and/or localization (Deshaies & Joazeiro 2009, Behrends & Harper 2011). The multiple types and number of zinc finger motifs in makorin proteins suggest possible multiple cellular functions for this protein.

Makorin proteins share a highly homologous amino acid sequence, particularly in the zinc finger domains (Fig. 2), suggesting that they may share similar functions or regulatory mechanisms. Although there are not many studies on MKRN3 function to date, MKRN1 function has been better explored. A possible important cellular function for MKRN1 is supported by the high identity (92%) between the human and murine orthologs and the ubiquitous protein expression in human and mouse tissues (Gray *et al.* 2000). MKRN1 acts as an E3 ubiquitin ligase, inducing degradation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), viral capsid proteins, p53 and p21 cell cycle regulators, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARγ) (Kim *et al.* 2005, 2014, Lee *et al.* 2009).

An alternative mechanism of action for MKRN1 was described when it was identified as a repressor of c-Jun transcriptional activity using a yeast assay. Through regulation of RNA polymerase II-dependent transcription, MKRN1 can have either negative or positive effects on gene expression (Omwancha *et al.* 2006). Interestingly, it has been demonstrated that the disruption of ubiquitin ligase activity of MKRN1 did not affect its inhibitory transcriptional activity, suggesting that this function is independent of protein ubiquitination (Omwancha *et al.* 2006).

MKRN2 is also ubiquitously expressed (Gray *et al.* 2000). Similar to other members of this family, MKRN2 is highly conserved throughout evolution. It has been shown that mkrn2 negatively regulates neurogenesis via PI3K/Akt signaling in *Xenopus* embryos; however, the detailed molecular mechanisms of this effect and the potential functions of mammalian MKRN2 remain yet to be studied (Yang *et al.* 2008).

MKRN3 presumptively possesses ubiquitin-protein isopeptide ligase (E3) activity, intimated by the presence of the highly conserved C3HC4 RING finger domain. The tandem repeat of C3H zinc fingers may provide

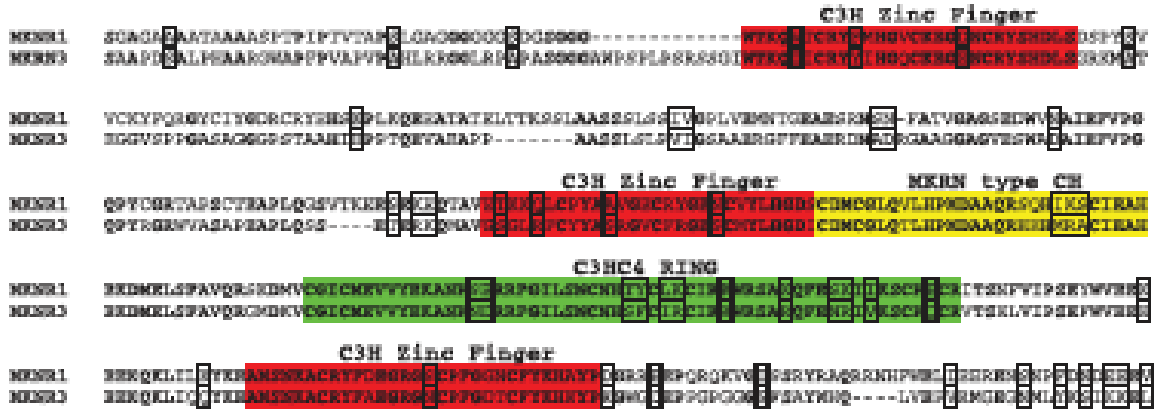


Figure 2

MKRN1 and MKRN3 protein sequence alignment. The two protein sequences share high homology and similarity, especially in the RING finger domains. Bold letters represent conserved amino acids, and squares similar amino acids. Sections highlighted in red represent the three zinc fingers C3H motifs, in yellow the MKRN-specific Cys–His motif, and in green the RING finger domain. MKRN1 NCBI Reference Sequence NP_038474, UniProtKB/Swiss-Prot: Q9UHC7.3. MKRN3 NP_005655.1 and UniProtKB/Swiss-Prot Q13064.1.

http://jme.endocrinology-journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0215
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

high-specificity RNA binding (Hudson *et al.* 2004), and the unique Cys–His makorin motif has been suggested to be a DNA-binding domain. Taken together, the studies of MKRN1 and MKRN2 imply that MKRN3 can similarly act as an E3 ligase, based on the high homology of the RING finger domain (Fig. 2). A previous study on mice demonstrated that *Mkrn3* is highly expressed in the hypothalamic arcuate nucleus during the infantile and early juvenile periods, with a reduction in expression at postnatal days 12–15, before puberty initiation (Abreu *et al.* 2013). The arcuate nucleus is the site of expression of critical regulators of GnRH secretion, such as kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin (Navarro *et al.* 2011). Puberty is initiated with a loss of inhibitory inputs and a gain in excitatory inputs (Ojeda & Lomniczi 2014). The *Mkrn3* expression pattern in the hypothalamic arcuate nucleus suggests that this peptide plays a role in the inhibition of GnRH secretion during the prepubertal quiescent period (Fig. 3). The decrease in *Mkrn3* expression is hypothesized to be associated with an increase in GnRH stimulatory factors and/or GnRH expression, and it can be postulated that MKRN3 may be acting at the hypothalamic level as an E3 ligase to inhibit stimulatory inputs, so that loss-of-function mutations of MKRN3 result in early activation of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis, expressed phenotypically as CPP. It is also possible that MKRN3 can act as a transcriptional regulator, as has been demonstrated for MKRN1. Data from the Human Protein Atlas indicate that MKRN3 is located primarily in the plasma membrane and cytoplasm, and also in the nucleus (www.proteinatlas.org). Based on its location in the plasma membrane, we can speculate that MKRN3 may also be involved in endocytosis and downregulation of receptors, as has been demonstrated for some other E3 ligases (Hershko & Ciechanover 1998). The genetic findings from patients with CPP are in agreement with the hypothesis that MKRN3 may act as a 'brake' or inhibitor of GnRH secretion during childhood (Hughes 2013). Further studies are needed to elucidate the precise mechanism(s) of action of MKRN3.

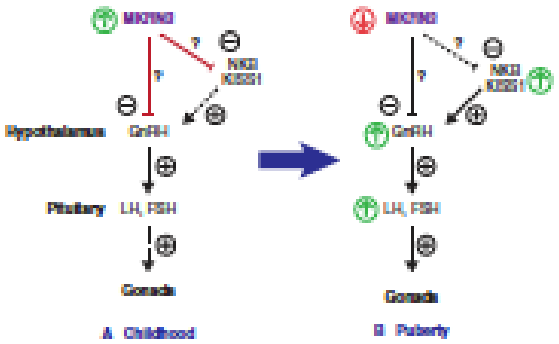


Figure 3
Schematic representation of MKRN3 mechanism of action. Human and mouse studies suggest that MKRN3 acts as an inhibitor of GnRH secretion during childhood (diagram on A), and that a decrease in *MKRN3* expression is associated with an increase in GnRH stimulatory factors and/or GnRH resulting in puberty initiation (diagram on B). NKB, neurokinin B; − inhibition, + stimulation. ↑ increase ↓ decrease.

Conclusion

Age of puberty initiation is associated with causes of substantial morbidity and mortality. Early age of menarche is associated with breast cancer and cardiovascular disease (Kvale 1992, Lakshman *et al.* 2009). Therefore, it is important to understand the mechanisms controlling puberty initiation. In an attempt to identify genes that will broaden the knowledge on GnRH regulation to bring new genetic screening, and diagnostic and treatment tools, researchers have been trying to identify genes associated with CPP for several years. By studying individuals with hypogonadotropic hypogonadism, a genetic disorder caused by absence or deficiency of GnRH secretion, we learned about important stimulators of GnRH secretion (Blanco & Kaiser 2009, Semple & Topaloglu 2010). Owing to the complexity of the mechanisms involved in puberty initiation and the initial failure to identify genes associated with CPP, it has been hypothesized that CPP was not caused by mutations in a single gene, but rather was a consequence of complex interactions among environment, metabolic factors, and polygenic defects. However, with the development of new sequencing methodologies, the combination of whole-exome sequencing analysis with detailed phenotypic characterization and the careful selection of the correct cohort of patients led to the identification of *MKRN3* as an important regulator of pubertal development. *MKRN3* is the first gene with a probable inhibitory effect on GnRH secretion, with mutations identified within humans. To date, *MKRN3* is the most common genetic defect associated with CPP. The identification of loss-of-function mutations in this gene can contribute to the diagnosis of CPP, especially in boys in whom the signs of puberty initiation are not easily detectable, thereby helping to make the diagnosis earlier and facilitating treatment decisions. In addition, the presence of *MKRN3* mutations can contribute to early diagnosis of CPP in familial cases and guide genetic counseling. It is not clear if there is a sex difference in the effect of *MKRN3* mutations, but it

http://jme.endocrinology-journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0215
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

is evident that mutations in this gene accelerate puberty initiation in both sexes. Although the precise mechanism of regulation of GnRH secretion by MKRN3 is not yet understood, its importance in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis is indisputable. The studies of *Mkrn3* expression in the hypothalamic arcuate nucleus of mice support the findings that loss-of-function mutations in humans lead to early puberty initiation and strengthen the hypothesis that MKRN3 acts as an inhibitor of GnRH secretion during childhood (Fig. 3). Ultimately, the recent GWAS findings linking *MKRN3* with the age of menarche have consolidated the involvement of this gene in pubertal timing.

The identification of a putative inhibitory factor in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis has opened an exciting new arena in the neuroendocrine field. Further studies will elucidate the precise mechanism of action of this important regulator of GnRH secretion.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of this review.

Funding

This work was supported by FAPESP grant numbers 2013-06391-1 to DBM and 2013-03236-5 to ACL; Eunice Kennedy Shriver NICHD/NIH through cooperative agreement U54HD28138 as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research and Eunice Kennedy Shriver NICHD/NIH R01HD019038, to UC; and 1F05HD072773-03, to APA.

References

Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC *et al.* 2013 Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *New England Journal of Medicine* **368** 2467–2475. (doi:10.1056/NEJMoa1302160)

Barabino SM, Hübner W, Jenny A, Minvielle-Sebastia L & Keller W 1997 The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homologue RNA-binding zinc finger proteins. *Genes and Development* **11** 1703–1716. (doi:10.1101/gad.11.13.1703)

Behrendt C & Harper JW 2011 Constructing and decoding unconventional ubiquitin chains. *Nature Structural & Molecular Biology* **18** 520–528. (doi:10.1038/nsmb.2066)

Bianco SD & Kaiser UB 2009 The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nature Reviews. Endocrinology* **5** 569–576. (doi:10.1038/nrendo.2009.177)

Bielinska B, Blaydes SM, Buiting K, Yang T, Krajewska-Walasek M, Horsthemke B & Brannan CI 2000 De novo deletions of SNRPN exon 1 in early human and mouse embryos result in a paternal to maternal imprint switch. *Nature Genetics* **25** 74–78. (doi:10.1038/75629)

Bohne A, Darras A, D'Costa H, Baroiller JF, Callanan-Arnoux D & Volff JN 2010 The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. *BMC Genomics* **11** 721. (doi:10.1186/1471-2164-11-721)

Bressler J, Tsai TF, Wu MY, Tsai SF, Ramirez MA, Armstrong D & Beaudet AL 2001 The SNRPN promoter is not required for genomic imprinting of the Prader–Willi/Angelman domain in mice. *Nature Genetics* **28** 232–240. (doi:10.1038/90067)

Deshaies RJ & Joazeiro CA 2009 RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annual Review of Biochemistry* **78** 399–434. (doi:10.1146/annurev.biochem.78.101807.093809)

Ellis CE, Perry JR, Solomon P, Chasman DI, Franceschini N, He C, Lunetta KL, Visser JA, Byrne EM, Cousminer DL *et al.* 2010 Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nature Genetics* **42** 1077–1085. (doi:10.1038/ng.714)

Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rus K, Marshall Graves JA, Stewart CL & Nicholls RD 2000 The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H1 zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics* **66** 76–86. (doi:10.1006/geno.2000.6199)

He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Paz G, Hankinson SE, Chanock SJ, Ridker PM, Hunter DJ & Chasman DI 2009 Genome-wide association studies identify loci associated with age at menarche and age at natural menopause. *Nature Genetics* **41** 724–728. (doi:10.1038/ng.385)

Herman-Giddens ME, Slora EJ, Wasserman RC, Bourdony CJ, Bhapkar MV, Koch GG & Hasemeier CM 1997 Secondary sexual characteristics and menses in young girls seen in office practice: a study from the Pediatric Research in Office Settings network. *Pediatrics* **99** 505–512. (doi:10.1542/peds.99.4.505)

Hershko A & Ciechanover A 1998 The ubiquitin system. *Annual Review of Biochemistry* **67** 425–479. (doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.425)

Hershko A, Razin A & Shemer R 1999 Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse Zfp127 gene. *Gene* **234** 323–327. (doi:10.1016/S0378-1119(99)00192-4)

Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ & Wright PE 2004 Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nature Structural & Molecular Biology* **11** 257–264. (doi:10.1038/nsmb738)

Hughes IA 2013 Releasing the brake on puberty. *New England Journal of Medicine* **368** 2513–2515. (doi:10.1056/NEJMe1306743)

Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ & Nicholls RD 1999a A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader–Willi syndrome critical region. *Human Molecular Genetics* **8** 783–793. (doi:10.1093/hmg/8.5.783)

Jong MT, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM & Nicholls RD 1999b Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader–Willi syndrome genetic region. *Human Molecular Genetics* **8** 795–803. (doi:10.1093/hmg/8.5.795)

Kanber D, Gillessen-Kaesbach G, Ohashi H, Horsthemke B & Buiting K 2009 Paternal deletions of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader–Willi syndrome. *European Journal of Human Genetics* **17** 582–590. (doi:10.1038/ejhg.2008.232)

Kim JH, Park SM, Kang MR, Oh SY, Lee TH, Muller MT & Chung IK 2005 Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes and Development* **19** 776–781. (doi:10.1101/gad.1289405)

Kim JH, Park KW, Lee EW, Jang WS, Seo J, Shin S, Hwang KA & Song J 2014 Suppression of PPARγ through MKRN1-mediated ubiquitination and degradation prevents adipocyte differentiation. *Cell Death and Differentiation* **21** 594–603. (doi:10.1038/cdd.2013.181)

Kvale G 1992 Reproductive factors in breast cancer epidemiology. *Acta Oncologica* **31** 187–194. (doi:10.3109/02841869209088901)

© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, Wareham NJ & Ong KK 2009 Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **94** 4953–4960. (doi:10.1210/jc.2009-1789)

Lalande M 1996 Parental imprinting and human disease. *Annual Review of Genetics* **30** 173–195. (doi:10.1146/annurev.genet.30.1.173)

Lee EW, Lee MS, Camus S, Ghim J, Yang MR, Oh W, Ha NC, Lane DP & Song J 2009 Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO Journal* **28** 2100–2113. (doi:10.1038/emboj.2009.164)

Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LG, Teles MG, Carroll RS *et al.* 2014 Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **99** E1097–E1103. (doi:10.1210/jc.2013-3126)

Murray MV, Turnage MA, Williamson RJ, Steinhauser WR & Searles LL 1997 The *Drosophila* suppressor of mable protein binds to RNA and associates with a subset of polytene chromosome bands. *Molecular and Cellular Biology* **17** 2291–2300.

Navarro VM, Gottsch ML, Wu M, Garcia-Galiano D, Hobbs SJ, Bosch MA, Pinilla L, Clifton DK, Dearth A, Ronnekleiv OK *et al.* 2011 Regulation of NKB pathways and their roles in the control of Kiss1 neurons in the arcuate nucleus of the male mouse. *Endocrinology* **152** 4265–4275. (doi:10.1210/en.2011-1143)

Nicholls RD, Saitoh S & Horsthemke B 1998 Imprinting in Prader–Willi and Angelman syndromes. *Trends in Genetics* **14** 194–200. (doi:10.1016/S0168-9525(98)01432-2)

Ohta T, Buiting K, Kokkonen H, McCandless S, Heeger S, Lalatta F, Driscoll DJ, Cassidy SB, Horsthemke B & Nicholls RD 1999 Molecular mechanism of angelman syndrome in two large families involves an imprinting mutation. *American Journal of Human Genetics* **64** 385–396. (doi:10.1086/302232)

Ojeda SR & Lomniczi A 2014 Puberty in 2013: unravelling the mystery of puberty. *Nature Reviews Endocrinology* **10** 67–69. (doi:10.1038/nrendo.2013.233)

Ozawa-Inoue J, Zhou XF, Chen SY, Barlan T, Baker CJ, Zhang Z, Cai C & Shemshedini L 2006 Makorin RING finger protein 1 (MKRN1) has negative and positive effects on RNA polymerase II-dependent transcription. *Endocrine* **29** 363–373. (doi:10.1385/ENDO:29:2:363)

Perry JR, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, He C, Chasman DI, Esko T, Thorleifsson G *et al.* 2014 Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature* **514** 92–97. (doi:10.1038/nature13545)

Rabinovitz S, Kaufman Y, Ludwig G, Razin A & Shemer R 2012 Mechanisms of activation of the paternally expressed genes by the Prader–Willi imprinting center in the Prader–Willi/Angelman syndromes domains. *PNAS* **109** 7403–7408. (doi:10.1073/pnas.1116611109)

Rapicavoli RV, Hore T, Smithwick M, Ager E, Park AJ, Renfree MB, Rohn M, Hamilton H, Nicholls RD, Deakin JE *et al.* 2006 Recent assembly of an imprinted domain from non-imprinted components. *PLoS Genetics* **2** e82. (doi:10.1371/journal.pgen.0020082)

Rodriguez-Jato S, Nicholls RD, Driscoll DJ & Yang TP 2005 Characterization of cis- and trans-acting elements in the imprinted human SNURF-SNRPN locus. *Nucleic Acids Research* **33** 4740–4753. (doi:10.1093/nar/gki766)

Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E & Woelfle J 2014 MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. *Hormone Research in Paediatrics* **82** 122–126. (doi:10.1159/000362815)

Schwabe JW & Klug A 1994 Zinc mining for protein domains. *Nature Structural Biology* **1** 345–349. (doi:10.1038/nsb0694-345)

Semple RK & Topaloglu AK 2010 The recent genetics of hypogonadotrophic hypogonadism – novel insights and new questions. *Clinical Endocrinology* **72** 427–435. (doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03687.x)

Sertan N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP & Voutetakis A 2014 Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **99** E647–E651. (doi:10.1210/jc.2013-4094)

Shemer R, Hershko AY, Perk J, Mostoslavsky R, Tsuberi B, Cedar H, Buiting K & Razin A 2000 The imprinting box of the Prader–Willi/Angelman syndrome domain. *Nature Genetics* **26** 440–443. (doi:10.1038/82571)

Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Blanco SD, Kuohung W, Xu S, Geyngarten M *et al.* 2010 Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95** 2276–2280. (doi:10.1210/jc.2009-2421)

Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB & Latronico AC 2008 A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *New England Journal of Medicine* **358** 709–715. (doi:10.1056/NEJMoa073443)

de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A & Phillip M 2014 A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Human Reproduction* **29** 2838–2843. (doi:10.1093/humrep/deu256)

Yang PH, Cheung WK, Peng Y, He ML, Wu GQ, Xie D, Jiang BH, Huang QH, Chen Z, Lin MC *et al.* 2008 Makorin-2 is a neurogenesis inhibitor downstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt (PI3K/Akt) signal. *Journal of Biological Chemistry* **283** 8486–8495. (doi:10.1074/jbc.M706476200)

Zacharias L & Wurtman RJ 1969 Age at menarche. Genetic and environmental influences. *New England Journal of Medicine* **280** 868–875. (doi:10.1056/NEJM196904172801606)

Received in final form 10 February 2015
Accepted 6 March 2015

http://jme.endocrinology-journals.org
DOI: 10.1530/JME-14-0015
© 2015 Society for Endocrinology
Printed in Great Britain
Published by Bioscientifica Ltd

Bulcão Macedo D, Nahume Brito V, Latronico AC. New causes of central precocious puberty: the role of genetic factors. Neuroendocrinology. 2014;100(1):1-8.

At the Cutting Edge

Neuro-endocrinology

Neuroendocrinology 2014;100:1–8
DOI: 10.1159/000366282

Received: May 30, 2014
Accepted after revision: August 4, 2014
Published online: August 9, 2014

New Causes of Central Precocious Puberty: The Role of Genetic Factors

Delanie Bulcao Macedo Vinicius Nahime Brito Ana Claudia Latronico

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Key Words
Central precocious puberty · Genetics · Gonadotropin-releasing hormone · Kisspeptin · MKRN3

Abstract
A pivotal event in the onset of puberty in humans is the reemergence of the pulsatile release of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from hypothalamic neurons. Pathways governing GnRH ontogeny and physiology have been discovered by studying animal models and humans with reproductive disorders. Recent human studies implicated the activation of kisspeptin and its cognate receptor (KISS1/KISS1R) and the inactivation of MKRN3 in the premature reactivation of GnRH secretion, causing central precocious puberty (CPP). *MKRN3*, an imprinted gene located on the long arm of chromosome 15, encodes makorin ring finger protein 3, which is involved in ubiquitination and cell signaling. The MKRN3 protein is derived only from RNA transcribed from the paternally inherited copy of the gene due to maternal imprinting. Currently, *MKRN3* defects represent the most frequent known genetic cause of familial CPP. In this review, we explored the clinical, hormonal and genetic aspects of children with sporadic or familial CPP caused by mutations in the kisspeptin and MKRN3 systems, essential genetic factors for pubertal timing.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

The onset of puberty is first detected as an increase in the amplitude and frequency of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) pulses after a quiescent period during childhood. The reemergence of pulsatile GnRH secretion leads to increases in the secretion of the gonadotropins and of the luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) by the anterior pituitary gland and to the consequent activation of the gonadal function [1].

Pubertal timing is influenced by complex interactions of genetic, nutritional, environmental and socioeconomic factors [2, 3]. Compelling evidence supporting genetic effects on pubertal timing has mainly been provided by population-based studies [4]. The role of genetic factors is also illustrated by the strong correlation between age of menarche in mothers and daughters, among members of an ethnic group, and by a greater concordance of pubertal timing between monozygotic as compared to dizygotic twins [5–7]. In addition, the pubertal pattern may be influenced by familial trends, such that families with a member with precocious or delayed puberty have a higher probability of having another affected member [8].

Central precocious puberty (CPP), also known as gonadotropin-dependent precocious puberty, is clinically defined by the development of secondary sexual characteristics before the age of 8 years in girls and 9 years in

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/ncn

© 2014 S. Karger AG, Basel
0028–3835/14/1001–0001$39.50/0

Ana Claudia Latronico
Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas
Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7º andar, sala 7037
São Paulo 05403-900 (Brasil), E-Mail anacl@usp.br

boys [9]. It results from the premature reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis with pubertal levels of gonadotropins and consequent gonadal stimulation [10, 11]. Affected children have premature and progressive sexual development associated with an acceleration in linear growth and advancement in bone age. No hypothalamic tumors or lesions are detected in the great majority of CPP patients, suggesting a different underlying mechanism, such as genetic, epigenetic and/or environmental factors [9, 10].

It is noteworthy that CPP has a striking predominance in girls. The estimated incidence of CPP in American girls is 1:5,000 to 1:10,000 [9]. Among Danish girls, the prevalence of CPP was 1:500 based on national registries over a 9-year period [12]. Precocious puberty can result in short stature and psychological and behavioral disorders in untreated patients [10]. Accumulating evidence suggests an association between early timing of puberty and adverse health outcomes in later life [13]. Early age at menarche has been associated with increased risks of obesity, hypertension, type 2 diabetes, ischemic heart disease, stroke, cancer and cardiovascular mortality [14–17].

In this review, we explored the recent human genetic findings described in patients with CPP that have shed light on the mechanisms involved in premature GnRH secretion.

Familial CPP

Familial CPP is usually defined by the existence of more than 1 affected member either in the proband generation or in the pedigree [8]. A proportion of children presenting with precocious or early puberty may have a positive family history. In an elegant observational study of children with early puberty, de Vries et al. [8] described 43 (42 girls and 1 boy) out of 156 children with idiopathic CPP who met the criteria for familial CPP (27.5%). Segregation analysis suggested an autosomal dominant inheritance pattern with incomplete sex-dependent penetrance. Among the children with a family history of early puberty, a parent was affected in 47.8% and a first-degree relative in 93.5% of cases. Interestingly, precocious puberty was inherited maternally in 21 families and paternally in 10 families. In only 4 families, precocious puberty was inherited both maternally and paternally. Comparison between the familial and sporadic cases revealed a significantly lower maternal age at menarche (mean: 11.47 ± 1.96 vs. 12.66 ± 1.18 years) and a more advanced puberty in the familial CPP group [8].

Rare Gain-of-Function Mutations in *KISS1* and *KISS1R*

In the last decade, the kisspeptin system was revealed as a major gatekeeper of puberty onset [18, 19]. Several recessive loss-of-function mutations in KISS1R, a G-protein-coupled receptor, previously known as GPR54, were described in patients with congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism [20]. In 2008, the kisspeptin system was also implicated in the pathogenesis of CPP in humans. Teles et al. [21] identified the first heterozygous activating mutation in the KISS1R (p.Arg386Pro) in an adopted Brazilian girl with CPP. This patient had thelarche from birth that progressed at 7 years of age and was associated with accelerated growth velocity, advanced bone age (11 years) and borderline pubertal GnRH-stimulated LH peak levels. In vitro studies revealed that the p.Arg386Pro mutation in KISS1R led to prolonged activation of intracellular signaling pathways in response to kisspeptin, resulting in a significant reduction in the desensitization rate [22]. Later, Silveira et al. [23] described a rare heterozygous missense mutation in KISS1 (p.Pro74Ser) in a boy with very early idiopathic CPP (1 year of age). He had very high basal LH and testosterone levels in the absence of brain lesions or tumors. His mother and maternal grandmother, who had normal pubertal development, also carried the p.Pro74Ser mutation in the heterozygous state, suggesting incomplete sex-dependent penetrance. The p.Pro74Ser mutation showed significantly greater capacity to stimulate signal transduction compared to the wild type after incubation with human serum in vitro, reproducing in vivo potential conditions. These findings suggested that the KISS1 variant might be more resistant to degradation, leading to greater kisspeptin bioavailability [23]. Although these case reports expanded the genotype-phenotype correlations for the kisspeptin pathways, no other CPP cases with gain-of-function mutations in *KISS1R* or *KISS1* have been reported, suggesting that these genetic abnormalities are very rare. Other candidate genes implicated in the regulatory mechanism of GnRH secretion have also been screened (*GABRA1*, *NPY-Y1R*, *LIN28B*, *TAC3*, *TACR3*, *TTF1* and *EAP1*), but no pathogenic variants were identified until recently [24–28].

Loss-of-Function Mutations in *MKRN3*

In 2013, applying whole exome sequencing, Abreu et al. [29] were able to identify 4 loss-of-function mutations in a single gene, *MKRN3*, in 5 out of 15 families (33%)

Table 1. *MKRN3* mutations described in children with typical clinical and hormonal CPP

Family No. (origin)	Patient No.	*MKRN3* mutation		Initial clinical manifestation (age, years)	Diagnosis			LH, IU/l		Basal FSH, IU/l	E2, pg/ml	T, ng/dl
		DNA	protein		age, years	breast/genital development Tanner stage	bone age, years	basal	peak after LHRH			
1 (USA)	I	637delC	Arg213Glyfs*73	Thelarche (5.7)	6.5	2	7.7	0.8	14	3.8	25	–
	II	637delC	Arg213Glyfs*73	Gonadarche (8.0)	8.7	3	11	2.9	20	2.5	–	78
	III	637delC	Arg213Glyfs*73	Thelarche (6.5)	6.7	2	7.8	1.1	17	4.5	<15	–
2 (Brazil)	I	1171_1172insA	Tyr391*	Thelarche (6.2)	7.0	3	7.0	<0.6	36	1.1	13	–
	II	1171_1172insA	Tyr391*	Thelarche (5.7)	6.0	3	6.0	<0.6	37	1.1	11	–
3 (Brazil)	I	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Gonadarche and pubarche (5.9)	8.1	3	10	1.2	6.7	1.5	–	116
	II	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Gonadarche and pubarche unknown	9.7	3	9.7	1.6	11	0.8	–	548
4 (USA)	I	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Gonadarche and pubarche (8.5)	8.8	3	11	4.1	–	3.1	–	216
	II	475_476insC	Ala162Glyfs*14	Thelarche (5.0)	6.5	2	8.3	–	7.4	13	13	
5 (Brazil)	I	482delC	Pro161Argfs*10	Thelarche and pubarche (6.4)	7.8	3	11	1.0	12	5.9	16	–
6 (Brazil)	I	482_483insC	Pro161Argfs*16	Thelarche (5.4)	6.1	3	8.8	1.3	–	5	36	–
7 (Brazil)	I	482_483insC	Pro161Argfs*16	Thelarche (6.0)	7.9	4	11	3.4	–	10	80	
8 (Brazil)	I	482delC	Pro161Argfs*10	Thelarche (3.0) and pubarche (6.0)	6.7	3	8.8	1.8	62	4.9	60	–
9 (Brazil)	I	675_676insA	Gln226Thrfs*6	Thelarche (4.0)	6.8	4	12	6.1	–	4.7	62	–
10 (Brazil)	I	766_767delA	Glu256Glyfs*36	Thelarche and pubarche (6.0)	6.6	3	7.8	1.6	–	4.6	20	–
11 (Brazil)	I	482_483insC	Pro161Argfs*16	Thelarche (6.0) and pubarche (6.3)	6.9	3	9.3	2.7	17	6.5	47	–
12 (Belgium)	I	1095G>T	Arg365Ser	Gonadarche and pubarche unknown	9.7	3	12	2.0	19	4.4	–	67
	II	1095G>T	Arg365Ser	Thelarche (6.2)	6.4	2	9.4*	<0.1	7.3	7.0	49	–
	III	1095G>T	Arg365Ser	Thelarche and pubarche (5.4)	5.7	2	8.5	0.5	12	3.6	<15	–
13 (Brazil)	I	1249T>A	Phe417Ile	Thelarche (6.0)	7.1	3	8.8	0.3	7.5	4.4	44	–
14 (Greece)	I	1018T>G	Cys340Gly	Thelarche (6.0)	7.1	3	10	1.3	39	3.8	23	
	II	1018T>G	Cys340Gly	Gonadarche unknown	9.2	2	10	0.7	14	1.3	–	41

Gonadarche or testicular enlargement, breast/genital development Tanner stage and bone age assessed at the time of diagnosis [29, 31, 32]. E2 = Estradiol; T = testosterone.

* Bone age at 7.4 years.

with CPP. From a total of 40 members studied, 15 patients from both sexes (8 girls and 7 boys) with CPP carried *MKRN3* mutations. *MKRN3* is an imprinted gene located on the long arm of chromosome 15q11.2 in the Prader-Willi syndrome critical region and encodes the makorin ring finger protein 3. The 5 affected families were originated from North America, Brazil and Belgium, indicating that the *MKRN3* mutations in patients with CPP were not restricted to a specific ethnic group (table 1). Their genotypes included 3 *MKRN3* frameshift mutations predicted to encode truncated proteins and 1 missense mutation (p.Arg365Ser) predicted to disrupt protein function.

Downloaded by
Universidade de São Paulo - USP
IP: 143.107.252.1 - 07/02/14 7:16:33 PM

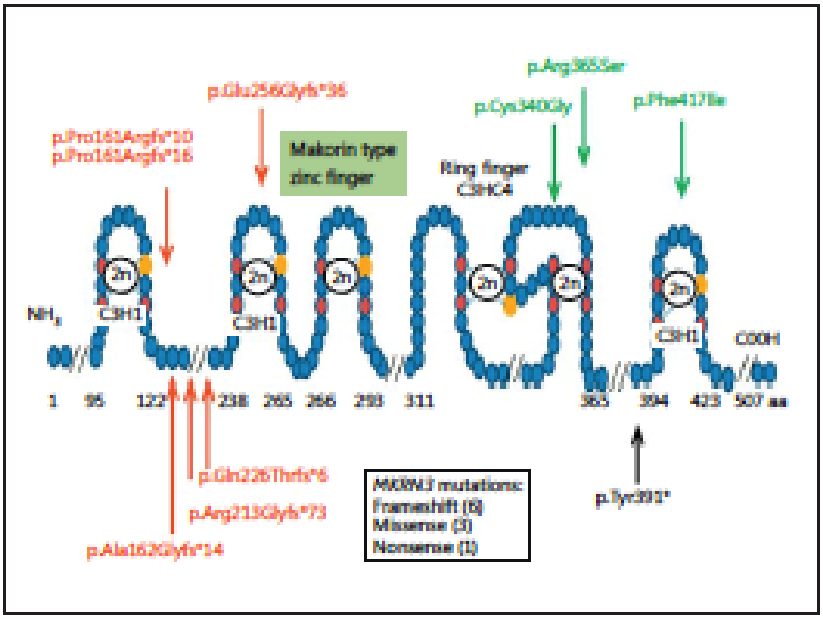


Fig. 1. Schematic illustration of MKRN3 domains and the mutations identified in patients with CPP. The protein has 5 zinc finger domains: 3 C3H motifs, 1 C3HC4 RING motif with presumed ubiquitin ligase activity and 1 MKRN-specific Cys-His domain (green square). The numbers correspond to the amino acid positions in the protein. Frameshift mutations are shown in red, the nonsense mutation in black and the 3 missense mutations in green.

All affected individuals inherited their *MKRN3* mutations from their fathers, demonstrating a perfect segregation with the mode of inheritance expected for a maternal imprinted gene.

Later, Settas et al. [30] reported a novel heterozygous MKRN3 mutation (p.Cys340Gly) in 2 Greek siblings, 1 girl with CPP and 1 boy with early puberty, further expanding the *MKRN3* mutational spectrum. In accordance with the maternal imprinted pattern of *MKRN3*, these 2 patients with CPP also received the mutated gene from their asymptomatic father. The p.Cys340Gly mutation was located in the C3HC4 RING motif of MKRN3 and it was predicted to disrupt the protein function in distinct in silico prediction programs.

More recently, Macedo et al. [31] analyzed 215 unrelated children (207 girls and 8 boys) with idiopathic CPP from 3 different university medical centers. No family history of premature sexual development was reported in the great majority of these patients (213 cases). Automatic sequencing of *MKRN3* in this sporadic CPP cohort revealed 5 novel heterozygous mutations in 8 unrelated girls, including 4 frameshift variants and 1 missense variant (p.Phe417Ile). Segregation analysis demonstrated that the mutant allele was paternally inherited in all studied families. This finding confirmed a previous suspicion that the familial nature of CPP is frequently underrecognized [31]. Indeed, most children with CPP present for medical consultation accompanied by their mothers, and their paternal family history is often unknown or unavailable. Another limitation to the detection of familial CPP cases is to determine the precise onset of puberty in boys and in their fathers, since testicular enlargement is not as obvious as breast development and menarche in girls [32].

Currently, 10 different loss-of-function mutations of MKRN3 have been described in 22 patients with CPP from 14 multiplex families, including 6 frameshift defects, 3 missense mutations and 1 nonsense mutation (table 1). Interestingly, the frameshift mutations were largely located in the amino-terminal region of the protein which is codified by a rich poly C site, suggesting that this area can be a potential hot spot (fig. 1). These recent findings indicated that *MKRN3* loss-of-function mutations are a cause of familial CPP in humans, establishing a clear and strong genetic component of this reproductive condition.

Clinical Phenotype of Patients with *MKRN3* Mutations

Patients with CPP due to *MKRN3* mutations had typical clinical and hormonal features of premature activation of the reproductive axis, including early pubertal signs, such as breast, testis and pubic hair development, accelerated linear growth, advanced bone age and elevat-

ed basal and/or GnRH-stimulated LH levels. Only 3 patients (2 girls and 1 boy) with loss-of-function mutations in *MKRN3* had mild nonspecific syndromic features, in-

10 U/l) compared to those without *MKRN3* mutations (median: 3.6 U/l, ranging from 1.0 to 9.8 U/l) were demonstrated in one study [31]. No definitive explanation for

tion immediately before puberty, suggesting that the *Mkrn3* mRNA expression pattern correlates with an inhibitory input in puberty initiation in these animals.

Proteins of the MAKORIN family have a highly distinctive zinc finger motif composition with 2 or 3 copies of a C3H motif in the N-terminal portion of the protein followed by a novel Cys-His configuration, a C3HC4 RING zinc finger and a final C3H motif [37]. C3H zinc finger motifs have been implicated in RNA binding, while the RING zinc finger motif is found in most E3 ubiquitin ligases and is responsible for the ubiquitin ligase activity [38]. The widespread species conservation of the MAKORIN protein family points to vital cellular roles, with abundant expression in the developing brain, including the arcuate nucleus, where there is a group of genes whose expression is relevant to puberty [39]. Ubiquitination can also be a signal for transduction, cell cycle regulation, differentiation and morphogenesis, and other nonproteolytic fates [29].

The dramatic reduction in *MKRN3* expression at the onset of puberty in mice in conjunction with the identification of loss-of-function mutations in humans with CPP suggested that MKRN3 might control puberty by potentially repressing downstream targets instead of activating the GnRH neuronal network [40]. Interestingly, MKRN3 is a member of the zinc finger family that can play a role as a transcriptional repressor of the human pubertal process. Indeed, this inhibitory mechanism appears to be a core component of the neuroendocrine circuitry that regulates the timing of puberty in primates [41].

Recently, the structural alignment of the native and mutant MKRN3 models predicted that the MKRN3 variant (p.Cys340Gly), identified in a Greek family with CPP, leads to significant structural perturbations in the 3-dimensional structure of the C3HC4 RING motif, supporting the functional implications of this MKRN3 missense mutation [30].

Potential Imprinting Defects in CPP

The Prader-Willi syndrome is a human imprinting disorder resulting from the disturbance of imprinted-gene expression within human chromosome 15 [42]. This genetic condition appears to be a contiguous gene syndrome caused by the loss of at least 2 of a number of genes expressed exclusively from the paternal allele, including *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN* and several snoRNAs [42], but it is not yet known which specific genes in this region are associated with this syndrome. Deletion of chromosome 15q11–q13, which encompasses *MKRN3*, contributes to the Prader-Willi syndrome. Analyses of patients with the Prader-Willi syndrome and balanced translocations have implicated the *SNURF-SNRPN* locus, telomeric to *MKRN3* [43]. Particularly, a girl with a paternal deletion in *MKRN3*, *MAGEL2* and *NDN* genes, who had few features of the Prader-Willi syndrome, had signs of puberty at the age of 7 years and 6 months with advanced bone age, leading to a diagnosis of CPP [43]. Considering that *MKRN3* loss-of-function mutations cause CPP, the deletion of these genes is likely the underlying mechanism of the early puberty in this patient.

Interestingly, genes located on the long arm of chromosome 15 have been involved in human pubertal development based on clinical and genetic studies. It is well known that patients with the Prader-Willi syndrome typically have incomplete sexual development but, paradoxically, some begin to exhibit signs of puberty much earlier than expected [44]. Few cases of children with the Prader-Willi syndrome and precocious puberty have been reported [44]. Recently, it was investigated if CPP could arise from loss of *MKRN3* expression by the paternal allele due to a de novo deletion, maternal uniparental disomy or an imprinting defect, mechanisms recognized in the pathogenesis of the Prader-Willi syndrome [31]. Using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification of chromosome 15q11, Macedo et al. [31] detected no abnormalities in the *MKRN3* copy number as well as in the methylation pattern of the 15q11 locus in 52 patients with familial and sporadic CPP and normal *MKRN3* sequence, suggesting that epigenetic defects in this chromosome region are probably rare mechanisms in this disorder.

Distinct chromosomal abnormalities have been associated with complex syndromic phenotypes, including CPP, such as 1p36 deletion [45], 1q11.23 microdeletion (Williams-Beuren syndrome) [46], 9p deletion [47], and maternal uniparental disomy of chromosomes 7 (Silver-Russell syndrome) and 14 (Temple syndrome) [34, 48]. Interestingly, chromosome 7 and 14 maternal uniparental disomies are genomic imprinting disorders like the Prader-Willi syndrome. It is unknown if the impairment of one single gene located in these affected chromosome regions could explain the premature sexual development phenotype of syndromic patients, similarly to the recent description of MKRN3 on chromosome 15 [43]. Potentially, human genomic sequence and global methylation analyses in patients with familial or sporadic CPP could establish new genetic and epigenetic alterations in the pathogenesis of this reproductive pediatric disorder.

Downloaded by
Universidade de Sao Paulo - USP = 081
08.126.66.1 - 10/20/14 7:16:30 PM

tion immediately before puberty, suggesting that the *Mkrn3* mRNA expression pattern correlates with an inhibitory input in puberty initiation in these animals.

Proteins of the MAKORIN family have a highly distinctive zinc finger motif composition with 2 or 3 copies of a C3H motif in the N-terminal portion of the protein followed by a novel Cys-His configuration, a C3HC4 RING zinc finger and a final C3H motif [37]. C3H zinc finger motifs have been implicated in RNA binding, while the RING zinc finger motif is found in most E3 ubiquitin ligases and is responsible for the ubiquitin ligase activity [38]. The widespread species conservation of the MAKORIN protein family points to vital cellular roles, with abundant expression in the developing brain, including the arcuate nucleus, where there is a group of genes whose expression is relevant to puberty [39]. Ubiquitination can also be a signal for transduction, cell cycle regulation, differentiation and morphogenesis, and other nonproteolytic fates [29].

The dramatic reduction in *MKRN3* expression at the onset of puberty in mice in conjunction with the identification of loss-of-function mutations in humans with CPP suggested that MKRN3 might control puberty by potentially repressing downstream targets instead of activating the GnRH neuronal network [40]. Interestingly, MKRN3 is a member of the zinc finger family that can play a role as a transcriptional repressor of the human pubertal process. Indeed, this inhibitory mechanism appears to be a core component of the neuroendocrine circuitry that regulates the timing of puberty in primates [41].

Recently, the structural alignment of the native and mutant MKRN3 models predicted that the MKRN3 variant (p.Cys340Gly), identified in a Greek family with CPP, leads to significant structural perturbations in the 3-dimensional structure of the C3HC4 RING motif, supporting the functional implications of this MKRN3 missense mutation [30].

Potential Imprinting Defects in CPP

The Prader-Willi syndrome is a human imprinting disorder resulting from the disturbance of imprinted-gene expression within human chromosome 15 [42]. This genetic condition appears to be a contiguous gene syndrome caused by the loss of at least 2 of a number of genes expressed exclusively from the paternal allele, including *MKRN3*, *MAGEL2*, *NDN*, *SNRPN* and several snoRNAs [42], but it is not yet known which specific genes in this region are associated with this syndrome. Deletion of chromosome 15q11–q13, which encompasses *MKRN3*, contributes to the Prader-Willi syndrome. Analyses of patients with the Prader-Willi syndrome and balanced translocations have implicated the *SNURF-SNRPN* locus, telomeric to *MKRN3* [43]. Particularly, a girl with a paternal deletion in *MKRN3*, *MAGEL2* and *NDN* genes, who had few features of the Prader-Willi syndrome, had signs of puberty at the age of 7 years and 6 months with advanced bone age, leading to a diagnosis of CPP [43]. Considering that *MKRN3* loss-of-function mutations cause CPP, the deletion of these genes is likely the underlying mechanism of the early puberty in this patient.

Interestingly, genes located on the long arm of chromosome 15 have been involved in human pubertal development based on clinical and genetic studies. It is well known that patients with the Prader-Willi syndrome typically have incomplete sexual development but, paradoxically, some begin to exhibit signs of puberty much earlier than expected [44]. Few cases of children with the Prader-Willi syndrome and precocious puberty have been reported [44]. Recently, it was investigated if CPP could arise from loss of *MKRN3* expression by the paternal allele due to a de novo deletion, maternal uniparental disomy or an imprinting defect, mechanisms recognized in the pathogenesis of the Prader-Willi syndrome [31]. Using methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification of chromosome 15q11, Macedo et al. [31] detected no abnormalities in the *MKRN3* copy number as well as in the methylation pattern of the 15q11 locus in 52 patients with familial and sporadic CPP and normal *MKRN3* sequence, suggesting that epigenetic defects in this chromosome region are probably rare mechanisms in this disorder.

Distinct chromosomal abnormalities have been associated with complex syndromic phenotypes, including CPP, such as 1p36 deletion [45], 1q11.23 microdeletion (Williams-Beuren syndrome) [46], 9p deletion [47], and maternal uniparental disomy of chromosomes 7 (Silver-Russell syndrome) and 14 (Temple syndrome) [34, 48]. Interestingly, chromosome 7 and 14 maternal uniparental disomies are genomic imprinting disorders like the Prader-Willi syndrome. It is unknown if the impairment of one single gene located in these affected chromosome regions could explain the premature sexual development phenotype of syndromic patients, similarly to the recent description of MKRN3 on chromosome 15 [43]. Potentially, human genomic sequence and global methylation analyses in patients with familial or sporadic CPP could establish new genetic and epigenetic alterations in the pathogenesis of this reproductive pediatric disorder.

Conclusions and Perspectives

The study of unique natural prototypes and deviations has helped disentangle and understand complex physiological processes. The study of patients with idiopathic familial CPP recently uncovered the role of MKRN3 in puberty initiation. Currently, *MKRN3* defects represent the most frequent known genetic causes of familial CPP, and their analysis may provide an additional tool for the diagnosis of familial CPP cases. How MKRN3, an example of a neurobiological brake, interacts with other major players of puberty, such as kisspeptin, GnRH, leptin, neurokinin and a host of neurotransmitters (excitatory and inhibitory) will certainly continue to captivate scientists interested in the reproductive axis [39].

Referencas

1 Terasawa E, Fernandez DL: Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. Endocr Rev 2001;22:111–151.

2 Gajdos ZK, Hirschhorn JN, Palmert MR: What controls the timing of puberty? An update on progress from genetic investigation. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2009;16:16–24.

3 Palmert MR, Boepple PA: Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:2364–2368.

4 Palmert MR, Hirschhorn JN: Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. Mol Genet Metab 2003;80:1–10.

5 Fischbein S: Intra-pair similarity in physical growth of monozygotic and of dizygotic twins during puberty. Ann Hum Biol 1977;4:417–430.

6 Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP: The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. Endocr Rev 2003;24:668–693.

7 Sklad M: The rate of growth and maturing of twins. Acta Genet Med Gemellol (Roma) 1977;26:221–237.

8 de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M: Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. J Clin Endocrinol Metab 2004;89:1794–1800.

9 Partsch CJ, Heger S, Sippell WG: Management and outcome of central precocious puberty. Clin Endocrinol 2002;56:129–148.

10 Carel JC, Léger J: Precocious puberty. N Engl J Med 2008;358:2366–2377.

11 Grumbach MM: The neuroendocrinology of human puberty revisited. Horm Res 2002;57:2–14.

12 Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A: Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries. Pediatrics 2005;116:1323–1328.

13 Widén E, Silventoinen K, Sovio U, Ripatti S, Cousminer DL, Hartikainen AL, Laitinen J, Pouta A, Kaprio J, Järvelin MR, Peltonen L, Palotie A: Pubertal timing and growth influences cardiometabolic risk factors in adult males and females. Diabetes Care 2012;35:850–857.

14 Lakshman R, Forouhi N, Luben R, Bingham SA, Khaw K, Wareham N, Ong KK: Association between age at menarche and risk of diabetes in adults: results from the EPIC-Norfolk cohort study. Diabetologia 2008;51:781–786.

15 Lakshman R, Forouhi N, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, Wareham NJ, Ong KK: Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. J Clin Endocrinol Metab 2009;94:4953–4960.

16 He C, Zhang C, Hunter DJ, Hankinson SE, Buck Louis GM, Hediger ML, Hu FB: Age at menarche and risk of type 2 diabetes: results from two large prospective cohorts. Am J Epidemiol 2009;171:334–344.

17 Elks CE, Perry J, Sulem P, et al: Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. Nat Genet 2010;42:1077–1085.

18 Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH: The GPR54 gene as a regulator of puberty. N Engl J Med 2003;349:1614–1627.

19 de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E: Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. Proc Natl Acad Sci USA 2003;100:10972–10976.

20 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;2:328–334.

21 Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC: A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. N Engl J Med 2008;358:709–715.

22 Bianco SD, Vandepas L, Correa-Medina M, Gereben B, Mukherjee A, Kuohung W, Carroll R, Teles MG, Latronico AC, Kaiser UB: KISS1R intracellular trafficking and degradation: effect of the Arg386Pro disease-associated mutation. Endocrinology 2011;152:1616–1626.

23 Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Bianco SD, Kuohung W, Xu S, Gryngarten M, Escobar ME, Arnhold IJ, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC: Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. J Clin Endocrinol Metab 2010;95:2276–2280.

24 Brito VN, Mendonca BB, Guilhoto LM, Freitas KC, Arnhold IJ, Latronico AC: Allelic variants of the gamma-aminobutyric acid-A receptor alpha1-subunit gene (GABRA1) are not associated with idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty in girls with and without electroencephalographic abnormalities. J Clin Endocrinol Metab 2006;91:2432–2436.

25 Freitas KC, Ryan G, Brito VN, Tao YX, Costa EM, Mendonca BB, Segaloff DL, Latronico AC: Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. Fertil Steril 2007;87:627–634.

26 Silveira-Neto AP, Leal LF, Emerman AB, Henderson KD, Pinkousova E, Henderson BE, Gregory RI, Silveira LF, Hirschhorn JN, Nguyen TT, Benedetti D, Tusset C, Reis AC, Brito VN, Mendonca BB, Palmert MR, Antonini SR, Latronico AC: Absence of functional LIN28B mutations in a large cohort of patients with idiopathic central precocious puberty. Horm Res Paediatr 2012;78:144–150.

27 Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, Cukier P, Seminara SB, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC: Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. Arq Bras Endocrinol Metabol 2012;56:646–652.

28 Cukier P, Wright H, Rulli T, Silveira LF, Teles MG, Mendonca BB, Arnhold IJ, Heger S, Latronico AC, Ojeda SR, Brito VN: Molecular and gene network analysis of thyroid transcription factor 1 (TTF1) and enhanced at puberty (EAP1) genes in patients with GnRH-dependent pubertal disorders. Horm Res Paediatr 2013;80:257–266.

Copyright by
S. Karger Basel
Fax + 41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

29 Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonca BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB: Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. N Engl J Med 2013;368:2467–2475.

30 Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A: Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. J Clin Endocrinol Metab 2014;99:E647–E651.

31 Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LF, Teles MG, Carroll RS, Guerra Junior G, Guaragna Filho G, Gusev Z, Arnhold IJ, de Castro M, Moreira AC, Martinelli CE Jr, Hirschhorn JN, Mendonca BB, Brito VN, Antonini SR, Kaiser UB, Latronico AC: Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. J Clin Endocrinol Metab 2014;99:E1097–E1103.

32 Pignatti E, Trivin C, Brauner R: Idiopathic central precocious puberty in 28 boys. Med Sci Monit 2008;14:CR10–CR14.

33 Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, Meduri G, Brailly-Tabard S, Chanson P, Lecomte P, Guiochon-Mantel A, Young J: Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. PLoS One 2011;6:e25614.

34 Butler MG: Genomic imprinting disorders in humans: a mini-review. J Assist Reprod Genet 2009;26:477–486.

35 Hershko A, Razin A, Shemer R: Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse Zfp127 gene. Gene 1999;234:323–327.

36 Jong MT, Carey AH, Caldwell KA, Lau MH, Handel MA, Driscoll DJ, Stewart CL, Rinchik EM, Nicholls RD: Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region. Hum Mol Genet 1999;8:795–803.

37 Gray TA, Hernandez L, Carey AH, Schaldach MA, Smithwick MJ, Rua K, Marshall Graves JA, Stewart CL, Nicholls RD: The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. Genomics 2000;68:76–86.

38 Bilhou A, Darras A, D'Cotta H, Baroiller JF, Galiana-Arnoux D, Volff JN: The vertebrate makorin ubiquitin ligase gene family has been shaped by large-scale duplication and retroposition from an ancestral gonad-specific, maternal-effect gene. BMC Genomics 2010;11:721.

39 Hughes IA: Releasing the brake on puberty. N Engl J Med 2013;368:2513–2515.

40 Ojeda SR, Lomniczi A: Puberty in 2013: unravelling the mystery of puberty. Nat Rev Endocrinol 2014;10:67–68.

41 Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, Knoll JG, Wright H, Pfeifer GP, Ojeda SR: Epigenetic control of female puberty. Nat Neurosci 2013;16:281–289.

42 Peery EG, Elmore MD, Resnick JL, Brannan CI, Johnstone KA: A targeted deletion upstream of Snrpn does not result in an imprinting defect. Mamm Genome 2007;18:255–262.

43 Kanber D, Giltay J, Wieczorek D, Zogel C, Hochstenbach R, Caliebe A, Kuechler A, Horsthemke B, Buiting K: A paternal deletion of MKRN3, MAGEL2 and NDN does not result in Prader-Willi syndrome. Eur J Hum Genet 2009;17:582–590.

44 Lee HS, Hwang J: Central precocious puberty in a girl with Prader-Willi syndrome. J Pediatr Endocrinol Metab 2013;30:1–4.

45 Kurosawa K, Kawame H, Okamoto N, Ochiai Y, Akatsuka A, Kobayashi M, Shimohira M, Mizuno S, Wada K, Fukushima Y, Kawawaki H, Yamamoto T, Matsuno M, Imaizumi K, Kuroki Y: Epilepsy and neurological findings in 11 individuals with 1p36 deletion syndrome. Brain Dev 2005;27:378–382.

46 Partsch CJ, Japing I, Siebert R, Gosch A, Wessel A, Sippell WG, Pankau R: Central precocious puberty in girls with Williams syndrome. J Pediatr 2002;141:441–444.

47 Cisternino M, Della Mina E, Lossa L, Madè A, Rossetti G, Bassi LA, Pieri G, Bayindir B, Messa I, Zuffardi O, Ciccone R: Idiopathic central precocious puberty associated with 11 mb de novo distal deletion of the chromosome 9 short arm. Case Rep Genet 2013;2013:978087.

48 Grosso S, Arichini C, Berardi R, Balestri P, Pucci L, Morgese G: Central precocious puberty and abnormal chromosomal patterns. Endocr Pathol 2000;11:69–75.

Downloaded by:
Universidade de Sao Paulo - USP
IP: 143.54.1.1 - 10/20/2014 7:15:32 PM

Macedo DB, Siliveira LF, Bessa DS, Brito VN, Latronico AC. Sexual precocity - Genetic bases of central precocious puberty and autonomous gonodal activation. Endocr Dev. 2016;29:50-71.

Genetic Issues

Bourguignon J-P, Parent A-S (eds): Puberty from Bench to Clinic. Lessons for Clinical Management of Pubertal Disorders. Endocr Dev. Basel, Karger, 2016, vol 29, pp 50–71 (DOI: 10.1159/000438874)

Sexual Precocity – Genetic Bases of Central Precocious Puberty and Autonomous Gonadal Activation

Delanie Bulcão Macedo · Letícia Ferreira Gontijo Silveira · Danielle Souza Bessa · Vinicius Nahime Brito · Ana Claudia Latronico

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

Abstract

Precocious puberty has been classically defined as the onset of sexual secondary characteristics in girls younger than 8 years and in boys younger than 9 years. The discovery of potential factors which trigger human puberty is one of the central mysteries of reproductive biology. Several approaches, including mutational analysis of candidate genes, large-scale genome-wide association studies, and (more recently) whole-exome sequencing, have been performed in attempt to identify novel genetic factors that modulate the human hypothalamic-pituitary-gonadal axis, resulting in premature sexual development. In the last two decades, it has been well established that autonomous gonadal activation can be caused by somatic *(GNAS)* or germline *(LHCGR)*-activating mutations of genes that encode essential elements for signal transduction of G protein-coupled receptors, resulting in peripheral precocious puberty in McCune-Albright syndrome and testotoxicosis, respectively. More recently, dominant activating and inactivating mutations of excitatory (*KISS1*/*KISS1*R) and inhibitory *(MKRN3)* modulators of gonadotropin-releasing hormone secretion, respectively, were associated with central precocious puberty phenotype. Indeed, loss-of-function mutations of *MKRN3*, a maternal imprinted gene located at chromosome 15q, currently represent a frequent cause of central precocious puberty diagnosed in families from distinct geographic origins. Here, we review the known genetic defects in central and peripheral precocious puberty. © 2016 S. Karger AG, Basel

Classically, precocious puberty is defined as the onset of pubertal signs before the age of 8 years in girls and 9 years in boys [1]. The prevalence of precocious puberty is about 10 times higher in girls than in boys, with an estimated prevalence of 0.2% among girls and less than 0.05% among boys [2].