DANIELLE DE SOUZA BESSA

**Análise de metilação global em pacientes
com puberdade precoce central familiar**

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

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bessa, Danielle de Souza

Análise de metilação global em pacientes com
puberdade precoce central familiar / Danielle de
Souza Bessa. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Claudia Latronico.

Descritores: 1.Puberdade 2.Puberdade precoce
3.Epigenética 4.Metilação de DNA 5.Impressão genômica
6.Receptores estrogênicos 7.Dedos de zinco

USP/FM/DBD-251/18

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

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 Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Dedicatória

A meus pais, pelo incentivo ao estudo e
a meu esposo Samuel, por seu cuidadoso amor.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS

É com muita felicidade e gratidão que divido esta conquista com várias pessoas. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus, por ter abençoado minha trajetória nos estudos e à Nossa Senhora, por ter iluminado meus passos.

A meus pais, Cristovão e Fátima, pelo amor e apoio incondicionais. Agradeço, em especial, à minha mãe, pelas orações para que tudo desse certo em minha vida e por me ajudar a cuidar da minha filha Leticia, que nasceu durante o período do doutorado. Sem a sua ajuda eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora Dra. Ana Claudia Latronico, por quem tenho enorme carinho e admiração, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e por ter confiado na minha capacidade. Obrigada pela amizade, pela compreensão no exercício da maternidade e pelas palavras sábias nas horas difíceis. Costumo afirmar que fui abençoada por tê-la como mentora durante os anos do doutorado. Serei eternamente grata por tudo.

À Profa. Ana Krepischi, pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos em metilação e pelo auxílio na execução dos procedimentos laboratoriais do metiloma. Sou muito agradecida pela parceria e amizade construídas.

À bióloga Mariana Maschietto, pela paciência e pela segurança nas análises de bioinformática. Sua ajuda foi essencial para a conclusão deste trabalho. Muito obrigada.

Ao Dr. Vinícius Nahime Brito, pelo ótimo convívio nas manhãs de ambulatório durante três anos e por ter compartilhado seu legado de conhecimentos em puberdade.

À Dra. Berenice Bilharinho Mendonça, pelo exemplo de amor à profissão e pelo estímulo à pesquisa.

À equipe da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Dra. Heloísa Palhares, Dra. Elisabete Resende e Dra. Maria de Fátima Borges, pela importante colaboração na construção do grupo controle.

Às amigas do grupo da puberdade, Delanie Macedo, Marina Cunha e Carolina Ramos, pela boa convivência, pelo aprendizado mútuo e pelos sentimentos partilhados.

Às Dras. Ana Canton e Irene Netchine, pelo estudo de metilação específico de duas regiões genômicas de interesse, realizado em Paris, na Universidade de Sorbonne.

Aos nossos pacientes, por serem o motivo principal deste trabalho, sem a colaboração dos quais não seria possível esta conquista.

A meu esposo Samuel, companheiro desde a faculdade, por ser uma pessoa tranquila, compreensível e otimista.

À minha filha Leticia, por ter me dado a alegria dos seus sorrisos em momentos de angústia.

À minha irmã Cristhiane, por estar ao meu lado, vibrando comigo, em cada momento de vitória.

À toda minha família, avós (*in memoriam*), tios, madrinha, primos, cunhados, sogro e sogra, pela eterna torcida. Lembrança especial da minha avó Berenice (*in memoriam*), que com sua grandiosa fé muito rezou por mim.

Às secretárias do LIM/42, Nildinha e Rosângela, pelo carinhoso acolhimento.

Às funcionárias do LIM/42, Cidinha, Cris, Miriam, Mariana, Luciana e Monica, pela orientação e apoio na bancada.

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

A todos os colegas da pós-graduação, em especial Delanie Macedo, Marina Cunha, Gabriela Resende, Leticia Vilela e Priscila Sales, pelos momentos vividos juntas nos congressos e pelas palavras de apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro.

Epígrafe

*"Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota".*

(Madre Teresa de Calcutá)

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Puberdade fisiológica	2
1.2 Puberdade precoce central	3
1.3 A genética na PPC	5
1.4 Epigenética - metilação do DNA	8
1.5 A epigenética na puberdade	12
1.6 Hipótese	14
2 OBJETIVOS	15
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Considerações éticas	18
3.2 Grupos estudados	18
3.3 Avaliação hormonal	27
3.4 Avaliação do metiloma	28
3.4.1 Extração do DNA genômico de leucócitos de sangue periférico	28
3.4.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	29
3.4.3 Plataforma HM450K	29
3.4.4 Análise de bioinformática	31
3.4.5 Análises <i>in silico</i>	32
3.5 Avaliação da metilação de regiões genômicas relacionadas à expressão dos genes <i>MKRN3</i> e <i>DLK1</i>	32
3.6 Avaliação estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Alterações na metilação do DNA associadas com a puberdade fisiológica	35

4.2 Alterações na metilação do DNA associadas com a PPC	46
4.3 Ausência de alterações na metilação dos genes <i>MKRN3</i> e <i>DLK1</i>	50
5 DISCUSSÃO	52
6 CONCLUSÕES	59
7 ANEXOS	61
8 REFERÊNCIAS	77
9 APÊNDICES	96

Listas

Abreviaturas

CI	Centro de <i>imprinting</i>
CpG	Citosina que precede uma guanina (5'-CG-3')
DMR	Região diferencialmente metilada
DMS	Sítio diferencialmente metilado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA metiltransferase
DP	Desvio-padrão
DUPmat14	Dissomia uniparental materna do cromossomo 14
E2	Estradiol
ECLIA	Ensaio por eletroquimioluminescência
FDR	<i>False discovery rate</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HM450K	Plataforma <i>Infinium HumanMethylation450 BeadChip</i> da <i>Illumina</i>
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorimétrico
IG	Intergênica
IMC	Índice de massa corpórea
IO	Idade óssea
kb	Kilobase (1000 pares de base)
K-mers	Sequência de K nucleotídeos
LH	Hormônio luteinizante
N_	Localização 5' em relação à ilha CpG
ng	Nanograma (1 x 10 ⁻⁹ grama)
NKB	Neurocinina B
PAR	Região pseudoautossômica
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PPC	Puberdade precoce central
RM	Ressonância magnética

RNA	Ácido ribonucleico
S_	Localização 3' em relação à ilha CpG
SNC	Sistema nervoso central
SPW	Síndrome de Prader Willi
TET	<i>Ten-eleven translocating enzymes</i>
TSS	Sítio de início de transcrição
TSS200	A 200 pares de base do sítio de início de transcrição
UTR	Região não traduzida
ZNF	<i>Zinc finger</i>

Figuras

Figura 1 -	Relação entre metilação do DNA e silenciamento gênico	11
Figura 2 -	Heredogramas das 10 famílias com PPC estudadas	24
Figura 3 -	Ensaio químicos da plataforma HM450k	30
Figura 4 -	Etapas do estudo do metiloma com a plataforma HM450k	31
Figura 5 -	Distribuição das regiões diferencialmente metiladas entre os controles pré-púberes e púberes por cromossomo	44
Figura 6 -	<i>Volcano plot</i> das diferenças na metilação do DNA entre as pacientes com PPC e as meninas saudáveis pré-púberes (A) e púberes (B)	47
Figura 7 -	Resumo das análises comparativas entre os metilomas dos três grupos estudados	50

Tabelas

Tabela 1 -	Impacto da alteração da metilação do DNA sobre a puberdade em fêmeas de roedores	14
Tabela 2 -	Dados clínicos e hormonais das pacientes com PPC	22
Tabela 3 -	Caracterização clínico-laboratorial do grupo de pacientes com PPC	23
Tabela 4 -	Caracterização clínica das pacientes com PPC na época da coleta do DNA	24
Tabela 5 -	Caracterização clínico-laboratorial das meninas do grupo controle	25
Tabela 6 -	Dados clínicos e hormonais do grupo controle pré-púbere	25
Tabela 7 -	Dados clínicos e hormonais do grupo controle púbere	26
Tabela 8 -	Interpretação dos valores de LH para o diagnóstico de PPC	27
Tabela 9 -	Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes	36
Tabela 10 -	Ontologia dos genes relacionados às regiões diferencialmente metiladas entre as meninas pré-púberes e púberes	43
Tabela 11 -	Descrição de fatores transcricionais atuantes nas regiões diferencialmente metiladas entre os controles pré-púberes e púberes identificados com o programa GSEA	45
Tabela 12 -	Descrição dos genes <i>zinc finger</i> contendo sítios CpGs hipermetilados na PPC	48
Tabela 13 -	Estudo de metilação das regiões <i>MKRN3:TSS-DMR</i> e <i>DLK1-MEG3:IG-DMR</i> nas pacientes com PPC e no grupo controle usando a técnica ASMM RTQ PCR	51
Tabela 14 -	Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas pré-púberes e púberes que foram previamente identificadas no estudo dinamarquês	58

Resumo

Bessa DS. *Análise de metilação global em pacientes com puberdade precoce central familiar* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

A idade normal para início da puberdade em meninas varia bastante, de 8 a 13 anos, e os genes envolvidos nesse controle são parcialmente conhecidos. Fatores ambientais, como alimentação e exposição a disruptores endócrinos, contribuem para essa variabilidade, de modo que genes modulados epigeneticamente podem justificar parte da complexidade desse processo. O termo epigenética se refere às modificações na expressão gênica que não são causadas por alterações na sequência do DNA. A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais bem estudado. Na última década surgiram evidências demonstrando a relação entre metilação do DNA e desenvolvimento puberal. Em fêmeas de roedores, a hipermetilação do DNA levou à puberdade precoce. Em humanos, a puberdade precoce central (PPC) familiar causada por mutações nos genes *MKRN3* e *DLK1* é considerada um defeito do *imprinting*, fenômeno epigenético no qual apenas um dos alelos parentais é expresso, estando o outro metilado e inativo. Além disso, um conceito atual propõe que o início da puberdade requer a repressão epigenética de fatores inibidores do eixo gonadotrófico. Recentemente, genes *zinc finger (ZNF)* foram relacionados ao processo puberal, e muitos deles codificam repressores transcricionais. Neste trabalho, estudamos a metilação do DNA do sangue periférico de 10 pacientes do sexo feminino com PPC familiar (casos índices) e 33 meninas com desenvolvimento puberal normal (15 pré-púberes e 18 púberes), usando a plataforma *Human Methylation 450 BeadChip*. Duas pacientes tinham PPC de causa genética (uma com mutação no *MKRN3* e outra com deleção no *DLK1*) e oito tinham PPC idiopática, sem mutações identificadas pelo sequenciamento exômico global. Cento e vinte regiões diferencialmente metiladas foram identificadas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes, estando 74% delas no cromossomo X. Apenas uma região mostrou-se hipometilada no grupo púbere e, de maneira importante, contém a região promotora do *ZFP57*, fator necessário para manutenção do *imprinting*. Uma vez que a hipermetilação nas regiões promotoras dos genes é relacionada à inibição transcricional, o achado de hipermetilação global do DNA na puberdade sugere que haja inibição de fatores inibidores do eixo gonadotrófico, o que resultaria no início do processo puberal. O receptor estrogênico destacou-se como um fator transcricional que se liga a sete genes diferencialmente metilados entre os controles pré-púberes e púberes. As pacientes com PPC apresentaram mais sítios CpG hipermetilados tanto na comparação com as meninas pré-púberes (81%) quanto púberes (89%). Há doze genes *ZNF* contendo sítios CpG hipermetilados na PPC. Não foram encontradas anormalidades de metilação nos genes *MKRN3* e *DLK1* nem em suas regiões regulatórias. Em conclusão, este estudo evidenciou hipermetilação global do DNA em meninas com puberdade normal e precoce, sugerindo que esse padrão é uma marca epigenética da puberdade. Pela primeira vez, mudanças no metiloma de pacientes com PPC foram descritas. Modificações na metilação de vários genes *ZNF*

parecem compor a complexa rede de mecanismos que leva ao início da puberdade humana.

Descritores: puberdade; puberdade precoce; epigenética; metilação de DNA; impressão genômica; receptores estrogênicos; dedos de zinco.

Summary

Bessa DS. *Global methylation analysis of patients with familial central precocious puberty* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2018.

Normal puberty initiation varies greatly among girls, from 8 to 13 years, and the genetic basis for its control is partially known. Environmental factors, such as nutrition and exposure to endocrine disruptors, contribute to this variance, and epigenetically modulated genes may justify some of the complexity observed in this process. Epigenetics refers to alterations in gene expression that are not caused by changes in DNA sequence itself. DNA methylation is the best studied epigenetic mechanism. In the last decade, evidence has emerged showing the relationship between DNA methylation and pubertal development. In female mice, DNA hypermethylation led to precocious puberty. In humans, familial central precocious puberty (CPP) caused by mutations in the *MKRN3* and *DLK1* genes is considered a disorder of imprinting, an epigenetic phenomenon in which only one parental allele is expressed, and the other allele is methylated and inactive. In addition, animal studies indicated that pubertal timing requires epigenetic repression of inhibitory factors of the gonadotrophic axis. Recently, *zinc finger* genes (*ZNF*) were related to pubertal development, many of which encode transcriptional repressors. In the present study, we analyzed the DNA methylation of peripheral blood samples from 10 female patients with familial CPP (index cases) and 33 girls with normal pubertal development (15 pre-pubertal and 18 pubertal), using the Human Methylation 450 BeadChip assay. Genetic CPP was diagnosed in two patients (one with a *MKRN3* mutation and the other with a *DLK1* deletion). The remaining eight cases with idiopathic CPP were previously evaluated by whole exome sequencing and no causative mutations were identified so far. We evidenced 120 differentially methylated regions between pre-pubertal and pubertal healthy girls, and 74% of them were located at the X chromosome. Only one genomic region was hypomethylated in the pubertal group. Of note, it contains the promoter region of *ZFP57*, an important factor for imprinting maintenance. As DNA hypermethylation in gene promoters is related to gene silencing, the finding of global DNA hypermethylation in puberty suggests inhibition of inhibitory factors of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis that results in puberty onset. Importantly, the estrogen receptor was identified as a transcriptional factor that binds to seven differentially methylated genes associated with pubertal process. Patients with CPP exhibited more hypermethylated CpG sites compared to both pre-pubertal (81%) and pubertal (89%) controls. Twelve *ZNF* genes were recognized as having hypermethylated CpG sites in CPP. The methylation analyses of *MKRN3* and *DLK1* genes showed no abnormalities. In conclusion, this study revealed a widespread DNA

hypermethylation in girls with normal and precocious puberty, suggesting that this pattern can be an epigenetic signature of puberty. For the first time, changes in the methylome of patients with CPP were described. We highlight that alterations in methylation levels of several *ZNF* genes may impact the onset of human puberty.

Descriptors: puberty; puberty, precocious; epigenomics; DNA methylation; genomic imprinting; receptors, estrogen; zinc fingers.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 PUBERDADE FISIOLÓGICA

A puberdade é o período de transição entre a infância e a fase adulta, caracterizada pela ocorrência de alterações endócrinas e psicológicas, resultando em maturação sexual e desenvolvimento da capacidade reprodutiva ^[1]. Entre as modificações observadas nesse período destacam-se o aparecimento dos caracteres sexuais secundários, a produção dos gametas maduros e o estirão do crescimento ^[2]. Na maioria dos casos, a primeira manifestação clínica da puberdade nas meninas é o surgimento das mamas (telarca), seguida pelo aparecimento dos pêlos pubianos (pubarca) e pela menstruação (menarca).

Uma significativa secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo é evidenciada nos primeiros meses após o nascimento, seguida de uma fase de quiescência hormonal até o início da adolescência, quando a reativação da secreção pulsátil do GnRH e consequente ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal marcam o início da puberdade ^[3, 4]. Os pulsos de GnRH estimulam a produção das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), pela hipófise anterior, as quais promovem a produção dos gametas maduros e a síntese dos esteroides gonadais, estradiol (E2) nas meninas e testosterona nos meninos.

Os mecanismos envolvidos na supressão da secreção do GnRH durante a infância e subsequente ativação puberal ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que o início da puberdade seja dependente de um mecanismo central, marcado pelo aumento de estímulos excitatórios e concomitante redução dos aferentes inibitórios sobre a secreção pulsátil do GnRH ^[4-6].

Estudos das décadas de 1980 e 1990 identificaram vários neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos no controle da secreção do GnRH. O ácido gama-amino butírico, neuropeptídeo Y, opióides endógenos, β -endorfinas, hormônio liberador de corticotrofina e melatonina são os principais neurotransmissores inibitórios, enquanto kisspeptina, neurocinina B (NKB), glutamato, norepinefrina, dopamina, prostaglandinas, serotonina e fatores de crescimento derivados da glia são primariamente excitatórios [1, 5]. A leptina, um hormônio secretado pelos adipócitos, diminui a sinalização dos neurônios secretores de neuropeptídeo Y e atua como um fator permissivo na secreção do GnRH [7, 8].

Algumas evidências demonstram o importante papel da genética na regulação do início da puberdade: correlação da idade do aparecimento dos caracteres sexuais entre mãe e filhas; estudos populacionais demonstrando variação de início da puberdade entre diferentes grupos raciais; estudos revelando que os eventos puberais ocorrem com maior concordância em gêmeos monozigóticos do que nos dizigóticos [3, 9]. Entretanto, a idade normal para início da puberdade em meninas varia muito, de 8 a 13 anos, e os genes que determinam esse momento são parcialmente conhecidos. Fatores ambientais, como alimentação, estresse, exposição a disruptores endócrinos e condições intrauterinas podem contribuir com até 20% dessa variabilidade [10, 11]. Genes modulados epigeneticamente por fatores ambientais podem justificar parte da complexidade desse processo. Desse modo, a puberdade resulta provavelmente de uma complexa interação entre fatores genéticos e epigenéticos. Um conceito atual sobre o início da puberdade postula que esse momento requer a repressão epigenética de fatores inibidores do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal [12-15].

1.2 PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A puberdade precoce é definida como o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos em meninas e antes dos 9

anos em meninos ^[3, 9]. A menarca antes dos nove anos também pode ser considerada como um critério adicional de precocidade sexual. Clinicamente, caracteriza-se pelo desenvolvimento precoce e progressivo dos caracteres sexuais secundários, aceleração do crescimento linear e avanço da idade óssea, com consequente prejuízo da estatura final ^[16, 17].

A puberdade precoce resulta, mais comumente, de uma ativação prematura do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, de forma semelhante ao desenvolvimento fisiológico, porém em idade cronológica inadequada, sendo classificada como puberdade precoce dependente de gonadotrofinas ou puberdade precoce central (PPC) ^[11]. A PPC tem incidência estimada de 1:5.000-1:10.000, sendo mais frequente no sexo feminino, em uma proporção de 3 a 23:1 ^[16-18].

Classicamente, o diagnóstico de PPC requer a demonstração da ativação do eixo gonadotrófico através de valores púberes de LH basal e/ou após testes de estímulo com GnRH de ação curta ou com análogo de GnRH de ação prolongada ^[16]. A sensibilidade do LH basal em diagnosticar PPC no sexo feminino é em torno de 62% ^[17]. Se o valor do LH basal for pré-púbere, condição laboratorial observada em 30% dos pacientes com PPC, deve-se realizar o teste de estímulo com GnRH ^[19]. Na prática, observamos dissociação entre a clínica e a avaliação hormonal em alguns casos, devendo prevalecer o diagnóstico clínico, desde que bem caracterizado. Nesse contexto, medidas antropométricas e a radiografia de mão e punho não dominantes para determinar a idade óssea (avaliada com o atlas de Greulich & Pyle) ganham importância ^[11, 17, 20]. Os valores de E2 no sexo feminino não são utilizados para o diagnóstico de PPC, visto que apresentam baixa sensibilidade, com grande sobreposição entre crianças normais pré-púberes e púberes ^[19].

Na presença de anormalidades do sistema nervoso central (SNC), como hamartoma hipotalâmico, defeitos do desenvolvimento cerebral, tumores e infecções do SNC, a PPC é denominada orgânica. Entretanto, a

maioria (80-90%) dos casos de PPC nas meninas permanece como idiopática ^[11, 17].

De Vries e cols. ^[21], analisando uma grande coorte de pacientes israelenses com PPC idiopática, constataram uma prevalência de 27,5% de casos familiares. A análise de segregação nessas famílias sugeriu um modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo-dependente. A existência de mais de um membro acometido na mesma família demonstra a relevância dos fatores genéticos na patogênese da PPC ^[21].

1.3 A GENÉTICA NA PPC

Ao longo dos últimos anos, alguns genes foram implicados na regulação e função do eixo reprodutivo, mas poucos foram os defeitos moleculares que mostraram associação com o fenótipo de PPC ^[22-25]. As primeiras descobertas nessa área estão relacionadas ao sistema da kisspeptina ^[24-26]. Esse sistema tem sido implicado na patogênese da PPC desde 2008, quando Teles e cols. ^[24] descreveram uma mutação (p.R386P) no gene que codifica o receptor da kisspeptina, *GPR54* ou *KISS1R*, resultando em ativação não constitutiva do receptor, em uma menina brasileira com PPC. Posteriormente, Silveira e cols. ^[25] identificaram uma mutação ativadora (p.P74S) no gene que codifica a kisspeptina, *KISS1*, em um menino brasileiro com PPC. O estudo funcional dessa variante demonstrou maior resistência da kisspeptina à degradação *in vitro* e consequente aumento da biodisponibilidade dessa proteína, sugerindo uma correlação entre a variante encontrada e o fenótipo do paciente.

Em 2009, diferentes estudos de associação do genoma identificaram variantes genéticas no cromossomo 6q21, envolvendo o gene *LIN28B* ou região próxima ao seu *locus*, associadas à idade precoce da menarca ^[27-29]. Em 2010, Silveira-Neto e cols. ^[30] descreveram uma variante no *LIN28B* (p.H199R), em heterozigose, em uma menina brasileira com PPC

esporádica, porém o estudo funcional *in vitro* demonstrou que essa variante não alterava a função do gene na regulação da expressão dos let-7 miRNAs, microRNAs expressos de forma tempo-específica e que participam do controle do início da puberdade.

Outro sistema implicado na regulação do eixo reprodutivo foi o sistema da NKB, membro da família das taquicininas, que são peptídeos neurotransmissores excitatórios. Em humanos, a NKB e seu receptor são codificados pelos genes *TAC3* e *TACR3*, respectivamente. O papel da 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 ^[31]. Em 2010, estudando o papel desses genes na PPC, Tusset e cols. ^[32] identificaram uma nova variante (p.A63P) no gene *TAC3*, em heterozigose, em uma menina brasileira com PPC. Entretanto, sua mãe, também heterozigota para a mutação, apresentou desenvolvimento puberal em idade cronológica adequada, sugerindo que essa variante isoladamente não seria responsável pelo quadro de puberdade precoce.

Cukier e cols. ^[33] estudaram dois fatores de transcrição que modulam a expressão do GnRH, codificados pelos genes *TTF1* e *EAP1*, em um grupo de pacientes com PPC idiopática, e nenhuma mutação germinativa foi identificada. 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.

Em 2013, Abreu e cols. ^[34] estudaram famílias com PPC por sequenciamento exômico global e descreveram mutações inativadoras no gene *MKRN3* (*makorin ring finger 3*) como causa de PPC em humanos. Desde então, diversas outras mutações nesse gene têm sido descritas em populações de diferentes etnias com PPC, confirmando o papel do *MKRN3* no controle do início da puberdade ^[35-41]. Atualmente, mutações no *MKRN3* representam a causa mais frequente de PPC de origem familiar (até 45%

dos casos) ^[40, 42]. O gene *MKRN3* é acometido pelo fenômeno do *imprinting*, sendo expresso apenas o alelo paterno ^[43]. A segregação familiar indicou um padrão de herança autossômica dominante de transmissão paterna ^[34].

Macedo e cols. ^[44] mostraram que casos de PPC aparentemente esporádicos eram causados por mutação no *MKRN3*, enfatizando a dificuldade em se caracterizar a natureza familiar da PPC. Isso é ainda mais relevante quando se trata de pacientes do sexo masculino, pois comumente não conseguem precisar o início da puberdade e recordam apenas eventos tardios da puberdade, como a idade da mudança da voz ^[21, 45]. De fato, o aumento do volume testicular é mais difícil de ser notado do que o aumento das mamas ^[46]. Nós evidenciamos uma alta frequência de mutações no *MKRN3* em um grupo de meninos com PPC previamente classificada como idiopática, demonstrando a importância da análise genética no grupo masculino ^[47].

A análise da expressão do gene *Mkrn3* no hipotálamo de camundongos mostrou seu aumento no período pré-puberal e sua diminuição antes do início da puberdade, sugerindo um papel inibitório sobre o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ^[34]. O produto do *MKRN3* é uma proteína *zinc finger* que participa da ubiquitinação protéica (degradação de proteínas), mas o mecanismo exato pelo qual sua inativação leva ao início da puberdade ainda não é conhecido ^[48, 49]. Especula-se que ele possa atuar como fator de transcrição, regulando diretamente a secreção de GnRH ou indiretamente pela inibição da kisspeptina. Recentemente foi demonstrada a coexpressão do *Mkrn3* em neurônios secretores de kisspeptina e GnRH no núcleo arqueado de camundongos ^[50].

Em 2017, Dauber e cols. ^[51] identificaram uma deleção paternalmente herdada em outro gene imprintado, o *DLK1* (*Delta-like 1 homolog*), como causa de PPC em uma família brasileira. O *DLK1* também é caracterizado pelo *imprinting* materno, sendo expresso apenas o alelo paterno. O produto desse gene é uma proteína transmembrana que participa da inibição da diferenciação dos adipócitos e, possivelmente, interfere na sinalização da

kisspeptina^[51, 52]. Até o momento, não há relato na literatura de outros casos de PPC causados por mutação no *DLK1*. Entretanto, a puberdade precoce descrita em cerca de 90% dos pacientes com Síndrome de Temple provavelmente é decorrente da inativação do *DLK1*^[51, 53].

1.4 EPIGENÉTICA - METILAÇÃO DO DNA

O termo epigenética se refere ao estudo das modificações na expressão gênica que não são causadas por alterações na sequência do DNA em si, sendo a metilação do DNA a marca epigenética mais bem estudada^[54, 55]. Nos mamíferos, é caracterizada pela adição do grupo metil (-CH₃) no carbono 5 das citosinas e ocorre predominantemente no contexto dos dinucleotídeos CpG, forma que corresponde à cerca de três quartos do conteúdo total da metilação nas células humanas^[56, 57]. Por outro lado, a metilação em sítios não-CpG (CpA, CpT e CpC, onde A = adenina, T = timina e C = citosina) é a forma prevalente em células pluripotentes, porém pouco se sabe sobre o seu papel^[57]. O dinucleotídeo CpG pode estar isolado no genoma ou localizado na ilha CpG, tradicionalmente definida como uma região maior que 200 pares de base (pb), com conteúdo de C+G maior que 50% e elevada concentração de CpGs^[58, 59]. Em geral, as ilhas CpG abrangem 1% do genoma humano e estão em regiões de 1000 pb com aproximadamente 1 CpG a cada 10 pb^[60]. Cerca de 50% delas estão localizadas em sítios de início de transcrição (TSS = *transcription start site*, do inglês), na região promotora do gene^[59]. Em relação à ilha CpG, a região que dista até 2 kb é denominada *shore*, a que dista entre 2 e 4 kb é chamada *shelf*, e fora desse contexto descrito a região é dita *open sea*.

A metilação do DNA é realizada por enzimas DNA metiltransferases (DNMT), que transferem o grupo metil de uma S-adenosilmetionina para a citosina^[61]. Originalmente, as DNMT 3A e 3B foram reconhecidas como DNMT *de novo*, pois adicionam a marca no DNA, enquanto a DNMT1 mantém a metilação durante a replicação do DNA^[62]. Atualmente, sabe-se

que as enzimas DNMT 3A e 3B também atuam na manutenção da metilação^[63]. Trata-se de um mecanismo epigenético passível de reversão. A desmetilação do DNA pode ocorrer de forma passiva, por meio da perda da manutenção da metilação ao longo das sucessivas divisões celulares, ou de forma ativa, por meio de reações de oxidação pelas enzimas TET (*ten-eleven translocating*)^[55, 64]. A atuação dessa maquinaria enzimática possibilita dois momentos de reprogramação epigenética ao longo da vida dos mamíferos, caracterizados por desmetilação seguida de remetilação global^[64]. A primeira onda de desmetilação ocorre nas células germinativas primordiais. A remetilação que se segue ocorre de modo distinto conforme o sexo, determinando um perfil de metilação específico nos gametas. As regiões imprintadas são estabelecidas durante essa remetilação sexo-específica. Uma segunda onda de desmetilação acontece após a fertilização, no zigoto, mas nem todo o genoma é desmetilado. De fato, as regiões diferencialmente metiladas (DMRs = *differentially methylated regions*, do inglês) imprintadas são mantidas e transmitidas a cada geração^[64].

Desde 1975, quando a metilação do DNA foi reconhecida como uma marca epigenética nos vertebrados, ela foi associada à repressão gênica^[65-67]. Em humanos, cerca de 70% dos genes apresentam ilhas CpG em sua região promotora^[68]. Em regra, o aumento da metilação na ilha CpG da região promotora resulta na inativação do gene (**Figura 1**)^[67, 69]. Os modelos propostos para o controle transcricional postulam que a marca afeta o recrutamento de proteínas específicas, incluindo fatores de transcrição, além de interagir com modificações em histonas^[61]. A interação com outras marcas epigenéticas, como as pós-traducionais em histonas, promove alteração da estrutura da cromatina para uma forma mais condensada e, portanto, inativa^[70]. Entretanto, a metilação do DNA também pode acontecer em outras regiões do genoma, como por exemplo no corpo do gene e em outros elementos regulatórios (reforçadores e silenciadores), e a funcionalidade disso ainda é pouco conhecida^[67]. Interessantemente, a metilação no corpo do gene foi relacionada à transcrição gênica^[67].

A metilação do DNA é essencial para a ocorrência do *imprinting* genômico, fenômeno epigenético que distingue os alelos parentais e resulta em expressão progenitor-específica de um gene ou grupo de genes ^[71]. O *imprinting* materno (alelo materno metilado) resulta na expressão apenas do alelo paterno (desmetilado), enquanto o *imprinting* paterno (alelo paterno metilado) resulta na expressão apenas do alelo materno (desmetilado). Apesar de apenas 1% do genoma dos mamíferos ser imprintado, o que corresponde a cerca de 100-150 genes nos seres humanos, é bem estabelecida a importância do *imprinting* para o desenvolvimento embrionário, e também para processos biológicos após o nascimento, como metabolismo, sono, neurogênese e comportamento social ^[72, 73]. Várias doenças humanas são relacionadas a defeitos do *imprinting*, como a Síndrome de Prader-Willi, Síndrome de Angelman, Pseudohipoparatiroidismo tipo 1a e 1b, Síndrome de Silver-Russell e a dissomia uniparental materna do cromossomo 14 (DUPmat14) ^[73]. Recentemente, a PPC familiar causada por mutações nos genes imprintados *MKRN3* e *DLK1* passou a fazer parte dessa lista ^[74].

Os genes imprintados geralmente se apresentam agrupados nas regiões cromossômicas e possuem sua expressão modulada por DMRs germinativas que funcionam como regiões de controle de *imprinting* ^[72]. O *MKRN3* está localizado no cromossomo 15q11-13, em uma região que contém diversos genes imprintados. A expressão monoalélica diferencial do *MKRN3* é controlada pelo centro de *imprinting* da síndrome de Prader-Willi (CI-SPW), que é formado por uma sequência de nucleotídeos envolvendo a região promotora e o exon 1 do gene *SNRPN* ^[75]. A deleção do CI-SPW no alelo paterno resulta na metilação anormal da região que contém os genes imprintados e na inativação de todos os genes paternalmente expressos ^[75]. Há uma DMR germinativa no TSS do *MKRN3* (TSS-DMR) e é possível que ela funcione como uma região regulatória própria, também modulando a expressão do *MKRN3* ^[61]. O *DLK1* está localizado no cromossomo 14q32.2, onde há duas DMRs que atuam como CI, a DMR intergênica *DLK1-MEG3* (IG-DMR) germinativa e a *MEG3-DMR* somática ^[76]. De maneira importante,

há uma interação hierárquica entre elas no cromossomo materno das células corporais, sendo que a IG-DMR regula o padrão de metilação da *MEG3*-DMR [76]. A IG-DMR é elemento essencial para o *imprinting* da região 14q32.2, sendo inexistente nos mamíferos que não possuem esse domínio imprintado [77].

Alterações na metilação do DNA podem estar relacionadas a defeitos genéticos [54]. Obviamente, mutações em genes que controlam mecanismos epigenéticos podem ocasionar metilação aberrante, uma vez que as funções de adição do grupo metil ou manutenção desta marca são frequentemente comprometidas nestes casos [78]. Contudo, a metilação anormal também pode ser decorrente de mutações em genes não relacionados ao controle epigenético [79].

Figura 1 - Relação entre metilação do DNA e silenciamento gênico

1.5. A EPIGENÉTICA NA PUBERDADE

Na última década têm surgido várias evidências demonstrando que o processo de metilação do DNA interfere no início da puberdade. Em 2013, estudo de metilação do DNA no hipotálamo médio-basal de macacos mostrou redução da metilação na ilha CpG do gene *GnRH* concomitante ao aumento de sua expressão ^[80]. Desde então, a epigenética foi proposta como parte do sistema regulatório que controla a secreção do GnRH.

Estudos em fêmeas de roedores evidenciaram que alterações na metilação do DNA no tecido hipotalâmico estão associadas com o início da puberdade ^[13]. Em ratas, observou-se aumento da metilação nas regiões promotoras de dois genes do complexo *Polycomb*, *Eed* e *Cbx7*, e consequente redução da expressão hipotalâmica deles, como eventos antecedendo a puberdade ^[13]. O grupo *Polycomb* consiste em um complexo sistema formado por proteínas que participam do silenciamento transcricional ^[81]. De modo significativo, a ativação do gene *Kiss1* foi associada à perda do efeito repressor da proteína EED ^[13]. Esses achados mostraram a existência de um mecanismo epigenético de inibição transcricional que ocorre durante a fase pré-puberal, sugerindo uma nova teoria sobre o início da puberdade, segundo a qual é necessária a repressão epigenética de fatores inibidores do eixo gonadotrófico para o início do desenvolvimento puberal ^[82]. De fato, o tratamento de ratas com azacitidina, um inibidor de DNMT, resultou em inibição da metilação do DNA e atraso puberal ^[13]. Por outro lado, o tratamento de fêmeas de camundongo com L-Met (metionina), ocasionando hipermetilação do DNA, levou à puberdade precoce ^[82]. A **Tabela 1** resume o impacto da manipulação farmacológica da metilação do DNA sobre a puberdade de fêmeas de roedores.

Em humanos, a PPC familiar causada por defeitos genéticos com perda de função do *MKRN3* e *DLK1* é atualmente considerada um defeito do *imprinting* ^[74]. Em 2014, uma elegante metanálise de estudos de associação com o genoma humano mostrou relação entre a idade da menarca e três

genes imprintados (*MKRN3*, *DLK1* e *KCNK9*) [83]. Além disso, acredita-se que a expressiva ocorrência de puberdade precoce na Síndrome de Temple, síndrome genética relacionada à DUPmat14, pode estar relacionada ao *DLK1* [84, 85]. Em conjunto, esses dados ilustram a interação entre *imprinting* e puberdade humana.

Recentemente, os genes *zinc finger* (*ZNF*) foram relacionados com o desenvolvimento puberal [14]. Estudos de associação com o genoma humano mostraram que polimorfismos de nucleotídeo único localizados próximos aos genes *ZNF131*, *ZNF462* e *ZNF483* estavam associados à uma idade de menarca antecipada [14, 29, 83, 86]. Em 2015, um robusto estudo em macacos sugeriu que genes *ZNF* participam do mecanismo epigenético repressor da puberdade [14]. A expressão hipotalâmica de oito genes *ZNF* diminuiu no início da puberdade em macacos orquiectomizados, e dois desses genes, *GATAD1* e *ZNF573*, apresentaram o mesmo padrão nas macacas. Quando ambos foram hiperexpressos no núcleo arqueado de ratas pré-púberes, ocorreu puberdade atrasada. Notavelmente, *GATAD1* inibe a transcrição dos genes *KISS1* e *TAC3*, ambos codificadores de fatores estimuladores da secreção de GnRH, e reduz a ligação de marcas de histona ativadoras nas regiões promotoras deles. Esse estudo demonstra a complexidade dos mecanismos epigenéticos envolvidos com o processo puberal.

Em 2016, Almstrup e cols. [87] estudaram o padrão da metilação do DNA do sangue periférico de 51 crianças (20 meninas e 31 meninos) dinamarquesas saudáveis. Amostras de sangue colhidas antes e após o início da puberdade foram analisadas utilizando a plataforma *Infinium HumanMethylation 450 Beadchip* (HM450k). Mudanças na metilação de determinados CpGs foram associadas com o estadiamento puberal e com dosagens hormonais, e uma região genômica diferencialmente metilada no cromossomo 7, a qual contém a região promotora do gene *TRIP6* (*thyroid hormone receptor interactor 6*), foi relacionada com o início da puberdade. Por imunohistoquímica, marcação para TRIP6 foi evidenciada no testículo adulto, mas não no testículo pré-púbere. Além disso, aumento dos níveis circulantes de TRIP6 foi constatado na puberdade. Esse foi o primeiro

estudo em humanos mostrando que o sangue periférico é um tecido válido para avaliar a maturidade sexual durante a transição para a puberdade.

Tabela 1 - Impacto da alteração da metilação do DNA sobre a puberdade em fêmeas de roedores

Tratamento	5'-Azacitidina (inibidor de DNMT)	L-Met (Met + ATP -> S-adenosilmetionina)
Mecanismo de ação	↓ Metilação do DNA	↑ Metilação do DNA
Efeito na transcrição	Permite a expressão gênica	Inibe a expressão gênica
Efeito no início puberal	Puberdade atrasada	Puberdade precoce
Interpretação	O início da puberdade requer a repressão dos repressores	

Adaptado de *Neuroendocrinology*, 2014 ^[82].

1.6 HIPÓTESE

Os fatores genéticos certamente contribuem para o início da puberdade, porém poucos defeitos moleculares foram implicados na patogênese da PPC e a maioria dos casos ainda permanece como idiopática. Diante dos recentes estudos relacionando metilação do DNA com desenvolvimento puberal, consideramos a hipótese de que alterações na metilação do DNA estejam implicadas na etiopatogenia da PPC.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Investigar a associação do padrão de metilação do genoma (metiloma) com o desenvolvimento puberal normal e precoce:

2.1A - Analisar possíveis alterações no metiloma de pacientes com PPC;

2.1B - Reconhecer sítios CpG ou regiões genômicas metiladas que sejam relacionadas com o desenvolvimento puberal humano.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 45533215.9.0000.0068). Consentimento livre e esclarecido, por escrito, foi obtido de todos os participantes ou responsáveis.

3.2 GRUPOS ESTUDADOS

Estudamos 10 pacientes do sexo feminino com diagnóstico de PPC familiar (casos índices), que foram selecionadas dentre os casos de PPC referenciados para avaliação clínica ou molecular no Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os critérios para inclusão das pacientes foram: início do desenvolvimento puberal antes dos 8 anos, valores de LH basal e/ou após teste de estímulo com GnRH ou com análogo de GnRH *depot* em níveis puberais, e ressonância magnética (RM) do SNC normal. A descrição clínica e hormonal das pacientes encontra-se na **Tabela 2**. A idade cronológica (IC) média no início da puberdade foi de 6,4 anos, variando de 3 a 8 anos. Na primeira avaliação (idade média de $7,7 \pm 1,1$ anos), o exame das mamas classificou 50% delas no estágio 3 e a outra metade no estágio 4, de acordo com os critérios de Tanner e Marshall ^[88]. A idade óssea (IO) média foi de $9,9 \pm 1,3$ anos, conforme os critérios de Greulich e Pyle ^[20]. As pacientes apresentavam em média um avanço de IO de 2,2 anos em relação à IC. Peso normal foi uma característica do grupo, sendo a média do desvio padrão (DP) do índice de massa corpórea (IMC) de $0,7 \pm 0,6$. Na época do diagnóstico de PPC, a média da concentração de LH em condição basal foi

de $1,4 \pm 1,4$ U/L e após estímulo com GnRH foi de $18,9 \pm 14$ U/L, a média do FSH basal foi de $3,4 \pm 1,7$ U/L e a mediana do E2 foi 13 pg/mL. A **Tabela 3** contém a caracterização clínico-laboratorial do grupo de pacientes com PPC.

A presença de mais de um membro na família com história de desenvolvimento sexual precoce caracterizou a forma familiar de PPC. Os heredogramas das 10 famílias estudadas estão ilustrados na **Figura 2**. Notavelmente, apenas membros do sexo feminino foram afetados pela PPC nessas famílias. Com exceção da Família 10 (argentina), as demais famílias eram brasileiras. Duas pacientes tinham PPC de causa genética. Mutaço inativadora no gene *MKRN3* (p.R328H) foi identificada na Família 10, no caso ndice e em sua irm, por sequenciamento automtico (Sanger). Defeito inativador no *DLK1* (grande deleço da regio 5' no traduzida e do xon 1) foi identificado na Famlia 1 utilizando sequenciamento genmico global ^[51]. As outras oito pacientes foram estudadas por sequenciamento exmico global e nenhuma variante patognica associada ao fentipo de PPC foi identificada at o momento ^[34].

Dados clnicos das pacientes na poca da coleta do DNA tambm foram avaliados (**Tabela 4**). A IC mdia no momento da coleta de sangue foi de 9 anos. Seis pacientes estavam em tratamento com anlogo de GnRH na poca.

O grupo controle foi constitudo por 33 meninas com desenvolvimento puberal normal, sendo 15 pr-pberes e 18 pberes. Para sua formaço, contamos com a colaboraço das Dras. Helisa Palhares, Elisabete Resende e Maria de Ftima Borges, do Departamento de Endocrinologia da Universidade Federal do Tringulo Mineiro (UFTM). As criançs e adolescentes pertenciam a uma creche localizada na cidade de Uberda chamada Casa do Menor Coraço de Maria, que tem uma parceria com a UFTM. Todas as meninas foram examinadas por endocrinologistas e submetidas avaliaço hormonal, com resultados compatveis com o estadiamento puberal (**Tabela 5**). As criançs pr-pberes tinham IC mdia de 6,7 anos, mamas com classificaço de Tanner 1 e dosagem de LH basal

< 0,1 U/L (**Tabela 6**). As meninas do grupo púbere tinham IC média de 13,1 $\pm$ 1,9 anos, concentração média de LH basal de 5,2 $\pm$ 2,4 U/L e classificação de Tanner para o desenvolvimento mamário variando de 3 a 5, estando a maioria (61%) com mamas Tanner 4 (**Tabela 7**).

Tabela 2 - Dados clínicos e hormonais das pacientes com PPC

Família caso índice	Manifestação clínica inicial (idade em anos)	Idade na 1 ^a avaliação (anos)	IO (anos)	DP altura	DP IMC	Tanner mamas	Tanner pêlos pubianos	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	LH pós- GnRH (U/L)	LH pós- Lupron® (U/L)
1	Telarca (5,8)	6,7	11	2,5	1,2	4	2	1,9	6,2	53,3	31,5	ND
2	Telarca (7,7)	8,2	11	1,1	0,1	3	3	<0,6	4,2	31,0	ND	17,6
3	Telarca (5,5)	8,1	11	1,2	0,2	3	4	1,0	1,9	17,4	ND	8,8
4	Telarca (7,5)	10,2	11	-0,1	1,3	4	5	4,2	ND	98,8	ND	ND
5	Telarca (7,3)	8,0	11	4,0	1,3	3	3	1,5	2,7	<13	ND	45,8
6	Telarca (6,6)	7,3	9,5	2,2	1,4	4	2	0,1	ND	<13	16,9	16,0
7	Telarca (5,5)	7,1	7,8	1,5	0,1	3	1	<0,6	1,5	<13	ND	6,5
8	Telarca (3,0)	6,5	8,8	4,0	0,6	4	3	<0,6	3,7	<13	4,2	9,8
9	Telarca (8,0)	8,0	10	2,0	-0,1	4	1	0,1	2,0	<13	6,9	4,6
10	Telarca (6,9)	6,9	7,8	1,2	0,85	3	1	3,5	5,2	<10	35	ND

DP = desvio-padrão, E2 = estradiol, IMC = índice de massa corpórea, IO = idade óssea, ND = não disponível

Tabela 3 - Caracterização clínico-laboratorial do grupo de pacientes com PPC

	Média ± DP
Idade no início da puberdade (anos)	6,4 ± 1,5
Idade na 1ª avaliação (anos)	7,7 ± 1,1
Idade óssea (anos)	9,9 ± 1,3
Avanço de idade óssea (anos)	2,2 ± 1,1
DP altura	2,0 ± 1,3
DP IMC	0,7 ± 0,6
LH basal (U/L)	1,4 ± 1,4
LH pós-GnRH (U/L)	18,9 ± 14
LH 2hs após 3,75 mg de acetato de leuprorrelina (U/L)	15,6 ± 14,1
FSH (U/L)	3,4 ± 1,7
E2 (pg/mL)	27,5 ± 28,3

DP = desvio-padrão, E2 = estradiol, IMC = índice de massa corpórea

Os círculos indicam indivíduos do sexo feminino, os quadrados indivíduos do sexo masculino, símbolos em branco indivíduos não afetados, símbolos em preto indivíduos com PPC, as setas os probandos

Figura 2 - Heredogramas das 10 famílias com PPC estudadas

Tabela 4 - Caracterização clínica das pacientes com PPC na época da coleta do DNA

Família caso índice	Coleta de DNA em tratamento com análogo de GnRH	Idade cronológica (anos)	Tanner mamas	Tanner pêlos pubianos	Idade óssea (anos)	DP IMC
1	não	7	3	2	11	0,9
2	sim	8,4	3	2	11	0
3	sim	9,8	3	4	12	0,3
4	sim	11	4	4	11	1,6
5	sim	8,4	3	3	12	1,5
6	não	7,3	4	2	9,5	1,4
7	não	17,3	ND	ND	ND	1,5
8	sim	7,3	3	3	11	1,2
9	não	6,8	4	1	8	0,2
10	sim	6,9	3	1	7,8	0,85

DP = desvio-padrão, IMC = índice de massa corpórea, ND = não disponível

Tabela 5 - Caracterização clínico-laboratorial das meninas do grupo controle

	Pré-púberes (n = 15)	Púberes (n = 18)
IC (anos)	6,7 ± 1,6	13,1 ± 1,9
Tanner mamas	Todas M1	17% M3, 61% M4, 22% M5
DP IMC	0,2 ± 0,6	0,1 ± 0,7
LH (U/L)	<0,1	5,2 ± 2,4
FSH (U/L)	2,7 ± 1,9	5,4 ± 1,8
E2 (pg/mL)	<15*	67,6 ± 42,7

As variáveis numéricas estão mostradas como média ± DP; DP = desvio-padrão, E2 = estradiol, IC = idade cronológica; *Exceto um caso com dosagem de 15,7 pg/mL

Tabela 6 - Dados clínicos e hormonais do grupo controle pré-púbere

Controle pré- púbere	Idade cronológica (anos)	DP IMC	Tanner mamas	Tanner pêlos pubianos	LH basal (U/L)	FSH basal (U/L)	E2 (pg/mL)
1	6,1	0,55	1	1	<0,1	3	<15
2	8,1	-0,16	1	1	<0,1	1,4	<15
3	7,2	-0,73	1	1	<0,1	0,7	<15
4	6,6	1,12	1	1	<0,1	3,1	<15
5	6,2	0,61	1	1	<0,1	1,4	<15
6	5,2	0,63	1	1	<0,1	1,5	<15
7	5,7	0,99	1	1	<0,1	2,4	<15
8	7,2	0,44	1	1	<0,1	1,6	<15
9	9	-0,02	1	1	<0,1	2,9	<15
10	5,4	-0,86	1	1	<0,1	8,9	<15
11	8,6	0,07	1	1	<0,1	1,8	<15
12	7,2	-0,47	1	1	<0,1	2,2	<15
13	7,9	0,90	1	1	<0,1	2,4	<15
14	7,5	0,32	1	1	<0,1	3,3	15,7
15	2,6	-0,6	1	1	<0,1	3,5	<15

DP = desvio-padrão, E2 = estradiol, IMC = índice de massa corpórea

Tabela 7 - Dados clínicos e hormonais do grupo controle púbere

Controle púbere	Idade cronológica (anos)	DP IMC	Tanner mamas	Tanner pêlos pubianos	LH basal (U/L)	FSH basal (U/L)	E2 (pg/mL)
1	14,4	-0,55	4	5	12	9,1	58
2	12,5	0,06	4	4	1,3	2,5	37,9
3	11,2	-0,5	3	3	5,7	6,9	68,9
4	12	0,44	4	4	4,3	4,7	35,7
5	16,3	0,56	5	5	4,9	6,5	39,1
6	12,7	0,03	4	4	8,8	6,7	135,4
7	16	1,06	5	5	3,8	2,5	<15
8	15,7	1,35	5	5	7,2	4,6	56,6
9	11,3	0,99	4	5	5,8	3,1	30,9
10	11,9	-0,65	4	4	3,3	6,2	57,1
11	11,3	-0,22	3	2	5,1	5,4	32,2
12	15,7	0,71	5	4	6,7	6,8	76
13	12,2	0,04	4	4	4,2	6,5	36,9
14	9,5	-0,03	3	2	3,3	6,6	62,6
15	14,3	-1,7	4	5	3,5	6,5	59,9
16	12,2	0,39	4	5	2,8	3	119,2
17	13,8	0,3	4	5	5,9	5,7	122,5
18	13,1	0,01	4	5	5,2	4,7	173,6

DP = desvio-padrão, E2 = estradiol, IMC = índice de massa corpórea

3.3 AVALIAÇÃO HORMONAL

A avaliação hormonal incluiu as dosagens das gonadotrofinas, LH e FSH, e do E2. Foram utilizados dois tipos de ensaio: imunofluorimétrico - IFMA (*AutoDELFIA, Perkin Elmer, Turku, Finland*) para avaliação do grupo de pacientes com PPC, e eletroquimioluminométrico - ECLIA (*Cobas e601, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA*) para avaliação do grupo controle, ambos métodos ultrasensíveis, com boa correlação entre eles.

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 foi realizado pela administração de 3,75 mg de acetato de leuprorrelina (Lupron®), intramuscular ou subcutâneo, no tempo zero e coleta de sangue após 2 horas.

Foram consideradas concentrações puberais no sexo feminino: LH basal > 0,6 U/L ou após estímulo com GnRH > 6,9 U/L e E2 > 13 pg/mL pelo método IFMA ^[19]; e LH basal > 0,2 U/L ou após estímulo com GnRH > 5 U/L e E2 > 15 pg/mL pelo método ECLIA ^[17, 89]. Alternativamente, LH > 10 U/L (IFMA) ou > 5,0 U/L (ECLIA), dosado 2 horas após a aplicação da primeira ampola do acetato de leuprorrelina também foi considerado como resposta puberal ^[17, 90]. Os valores de LH utilizados como referência para o diagnóstico de PPC estão descritos na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Interpretação dos valores de LH para o diagnóstico de PPC

Ensaio	IFMA	ECLIA
LH basal	>0,6 U/L	>0,2U/L
LH pico (teste com GnRH)	>6,9 U/L	>5 U/L
LH 2hs após 3,75 mg de acetato de leuprorrelina	>10 U/L	>5 U/L

3.4 AVALIAÇÃO DO METILOMA

Estudo de metilação do DNA genômico de leucócitos do sangue periférico foi realizado utilizando a plataforma da *Illumina* HM450k, a qual proporciona uma avaliação quantitativa da metilação dos dinucleotídeos CpG e fornece resultados de alta qualidade para o entendimento das alterações epigenéticas (www.illumina.com). O procedimento laboratorial foi executado no laboratório Deoxi Biotecnologia (www.deoxi.com.br).

3.4.1 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE LEUCÓCITOS DO SANGUE PERIFÉRICO

DNA genômico foi extraído de 12 mL de sangue periférico colhido em tubo com EDTA. O sangue foi incubado em solução para lise de glóbulos vermelhos (114 mM cloreto de amônia; 1 mM carbonato de amônia) durante 30 minutos a 4°C. Após esse 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: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*) e 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. Todas as amostras foram consideradas com

boa qualidade. As amostras foram armazenadas a 4°C até sua utilização. Antes dos experimentos, a quantidade de DNA em cada amostra foi checada utilizando os sistemas *NanoDrop* e *Qubit* (*Thermo Fisher Scientific*).

3.4.2 TRATAMENTO DO DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO

Cada amostra de 500 a 1.000 ng de DNA genômico foi tratada com bissulfito de sódio, utilizando o ensaio *EZ DNA Methylation-Gold Kit* (*Zymo*). Nesse processo, as citosinas não metiladas são convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas.

3.4.3 PLATAFORMA HM450K

A HM450k contém 485.764 sondas para análise de metilação das citosinas do genoma humano, sendo a maioria (482.421; 99,3%) em dinucleotídeos CpG ^[91]. A plataforma permite avaliar 99% dos genes conhecidos e 96% das ilhas CpG do genoma ^[91]. Há dois tipos de ensaio químico na HM450k: *Infinium I*, no qual para cada sonda há duas *beads*, uma metilada e outra não metilada; e *Infinium II*, no qual para cada sonda existe uma única *bead*, metilada ou não (**Figura 3**).

As amostras tratadas com bissulfito foram submetidas à desnaturação e neutralização, com posterior amplificação e fragmentação do DNA por processo enzimático controlado. Após precipitação com isopropanol, o DNA fragmentado foi isolado por centrifugação a 4°C e ressuspenso em tampão, etapa seguida pela hibridização com as *beads* magnéticas, quando o DNA se liga covalentemente a sondas específicas de 50-mers por complementaridade de sequência. Realizou-se uma lavagem para retirada dos fragmentos não anelados. Na fase de extensão, o DNA hibridizado foi usado como fita molde para extensão de bases alelo-específicas, incorporando nucleotídeos marcados com fluoróforo, nas cores verde ou

vermelha. Uma imagem foi gerada a partir da excitação do fluoróforo com laser. A **Figura 4** ilustra resumidamente as etapas do procedimento. As especificações de cada passo podem ser consultadas na íntegra no guia do fabricante (*Illumina's Infinium HD Assay Methylation Protocol Guide*).

O escâner *iScan SQ scanner* (*Illumina*) forneceu a intensidade do sinal obtido para cada sonda, baseada na fluorescência emitida. Esses dados foram convertidos em arquivos IDAT e utilizados nas análises de metilação.

O valor da metilação foi estimado como beta, sendo calculado a partir da fórmula: $\text{beta} = \frac{\text{intensidade do alelo metilado}}{(\text{intensidade do alelo não metilado} + \text{intensidade do alelo metilado} + 100)}$. O valor de beta pode variar de 0 (não metilado) a 1 (totalmente metilado).

As coordenadas hg19 da UCSC (*University of California, Santa Cruz*) foram utilizadas para registrar as posições genômicas.

Fonte: Adaptada de *HumanMethylation450 BeadChip Data Sheet* (www.illumina.com)

Figura 3 - Ensaios químicos da plataforma HM450k

Figura 4 - Etapas do estudo do metiloma com a plataforma HM450k

3.4.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

As análises do metiloma foram realizadas no Ambiente R, utilizando pacotes depositados no *Bioconductor* (www.bioconductor.org).

Inicialmente, os dados foram avaliados usando o pacote *RnBeads* ^[92]. Sondas não específicas ($n = 28.076$) foram retiradas das análises devido à alta probabilidade de hibridização cruzada. Normalização dos valores de metilação detectados pelas sondas tipo I e tipo II foi realizada usando o método *SWAN* ^[93]. Além disso, houve correção para a heterogeneidade celular do sangue e variáveis técnicas, como dados do *chip* e do experimento ^[94]. O tratamento da PPC com análogo de GnRH não atuou como co-variável. Não efetuamos correção para a idade na época da coleta do DNA, pois essa era uma variável relacionada ao desenho do estudo.

Após a fase de pré-processamento, 443.042 sondas foram analisadas nas seguintes comparações: controles pré-púberes *versus* controles

púberes, pacientes com PPC familiar *versus* controles pré-púberes e pacientes com PPC familiar *versus* controles púberes.

Para identificar sítios CpG diferencialmente metilados (DMSs = *differentially methylated sites*, do inglês) utilizamos o pacote *limma*, no qual são avaliados os valores M (log de beta) ^[95]. As DMRs, definidas como sequências de 300 nucleotídeos com, no mínimo, sete sítios CpG apresentando metilação no mesmo sentido, foram identificadas usando o *DMRcate* ^[96].

3.4.5 ANÁLISES *IN SILICO*

Os genes relacionados às regiões e sítios diferencialmente metilados foram analisados em programas computacionais, em busca de um significado biológico. Utilizamos o *WebGestalt (WEB-based GENE Set Analysis Toolkit)* para análises de enriquecimento funcional e ontologia genética e o GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) para avaliar associações significativas entre um determinado grupo de genes e a atuação de fatores transcricionais ^[97, 98].

3.5 AVALIAÇÃO DA METILAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS RELACIONADAS À EXPRESSÃO DOS GENES *MKRN3* E *DLK1*

Estudo de metilação das regiões *MKRN3*:TSS-DMR e *DLK1*-*MEG3*:IG-DMR foi realizado usando a técnica *TaqMan Allele-Specific Methylated Multiplex Real-Time Quantitative PCR* - ASMM RTQ PCR (colaboração da Dra. Ana Canton e da Dra. Irene Netchini) ^[99]. Resumidamente, após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio, duas sondas foram usadas para reconhecer os alelos, uma específica para o metilado e outra específica para o não metilado. As sondas marcadas com

diferentes fluorocromos permitiu a distinção dos alelos após uma excitação com laser. Na fase de reação em cadeia da polimerase (PCR = *polymerase chain reaction*, do inglês), esta enzima delimita a sonda hibridizada com a sequência alvo, liberando a parte marcada com os fluorocromos, processo que ocorre a cada PCR, resultando no aumento da fluorescência emitida. O índice de metilação (IM) foi calculado a partir da fórmula: $IM = \frac{\text{quantidade do alelo metilado} \times 100}{\text{quantidade do alelo metilado} + \text{quantidade do alelo não metilado}}$. Em condições normais, esperam-se quantidades iguais dos dois alelos, o que fornece um índice de metilação em torno de 50%.

3.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas referentes aos dados clínicos e hormonais foram mostradas como média $\pm$ DP, cálculo estabelecido pelo programa *Sigmastat for Windows 3.5*.

Os sítios CpG que apresentaram diferenças de metilação maiores que 10% e FDR (*false discovery rate*) menor que 0,05 foram considerados os mais significativos. Na análise das DMRs, aquelas com diferenças de metilação maiores que 5% e FDR menor que 0,05 foram consideradas as mais significativas.

Valorizamos os achados do *WebGestalt* com valor de p ajustado $< 0,05$ (teste múltiplo de *Benjamini-Hochberg*).

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 ALTERAÇÕES NA METILAÇÃO DO DNA ASSOCIADAS COM A PUBERDADE FISIOLÓGICA

A comparação do metiloma das meninas saudáveis pré-púberes com o das meninas saudáveis púberes evidenciou 120 DMRs, estando a maioria (119; 99%) hipermetilada nas meninas em puberdade (**Tabela 9**). Um grupo de 127 genes foi relacionado às DMRs. A ontologia genética mostrou enriquecimento em processos biológicos como via de sinalização mediada por receptor intracelular, transcrição de RNA mensageiro (RNAm), modificação de histona e *imprinting* genômico (**Tabela 10**). A única DMR hipometilada no grupo púbere inclui a região promotora do gene *ZFP57* (*zinc finger protein 57*). A maior diferença de metilação (10,5%) foi observada numa região que inclui o promotor do gene *RP11-313J2.1* (*LOC441666*), também chamado *zinc finger protein 91 pseudogene*. Além disso, as regiões promotoras de nove outros *ZNF* (*ZNF597*, *ZSCAN12P1*, *ZNF707*, *ZNF331*, *ZC4H2*, *ZNF182*, *ZNF41*, *ZIC3*, *RNF113A*) foram relacionadas às 120 DMRs.

A maioria das DMRs (89 de 120 DMRs; 74%) está localizada no cromossomo X (**Figura 5**).

Utilizando o programa GSEA, vinte fatores de transcrição foram identificados como atuantes nas 120 DMRs. Os dez mais relevantes estão ilustrados na **Tabela 11**. Notavelmente, um deles foi o receptor estrogênico. Sete genes diferencialmente metilados (*SMARCA1*, *POU5F1*, *HTATSF1*, *ELF4*, *HMGB3*, *KLHL34*, *FGFR2*) têm sítio de ligação para o receptor estrogênico numa região que dista até 4 kb do TSS.

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_1372	10	42862876-42863594	9	-0,105162452	<i>RP11-313J2.1</i>
DMR_8814	4	81117647-81119473	11	-0,089040315	<i>PRDM8</i>
DMR_4264	16	1583810-1584516	8	-0,084174074	<i>IFT140, TMEM204</i>
DMR_11738	X	48814205-48815856	16	-0,08181042	<i>OTUD5, RNU6-722P</i>
DMR_9935	6	31148332-31148748	14	-0,078236383	<i>POU5F1</i>
DMR_12001	X	153671800-153672898	8	-0,076624259	<i>FAM50A, GDI1</i>
DMR_11933	X	132090860-132092772	7	-0,075099028	<i>HS6ST2</i>
DMR_11979	X	152066221-152066735	7	-0,073224659	ND
DMR_11993	X	153598742-153600494	7	-0,072362363	<i>FLNA</i>
DMR_11972	X	149861526-149862363	7	-0,070984952	<i>MTMR1</i>
DMR_9959	6	31650735-31651362	18	-0,070185244	<i>LY6G5C</i>
DMR_10023	6	33047185-33049505	22	-0,069255178	<i>HLA-DPB1, HLA-DPA1, RPL32P1</i>
DMR_11751	X	49643431-49644706	7	-0,067077238	<i>USP27X-AS1, USP27X</i>
DMR_11804	X	71130538-71131891	7	-0,066738144	<i>NHSL2</i>
DMR_11950	X	135578793-135580181	18	-0,063932352	<i>HTATSF1</i>
DMR_7255	20	5485144-5485511	8	-0,062564433	<i>LINC00654</i>
DMR_3109	12	130823570-130824831	8	-0,062155177	<i>PIWIL1</i>
DMR_11802	X	70712403-70713213	8	-0,0621177	<i>INGX, Y_RNA.73, TAF1</i>

continua

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes (continuação)

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_11934	X	133118088-133119961	11	-0,061748623	<i>GPC3</i>
DMR_12006	X	153774721-153776358	18	-0,061612111	<i>IKBKG, G6PD</i>
DMR_5381	17	78865087-78865755	7	-0,061329072	ND
DMR_11732	X	48554185-48555977	7	-0,061177896	<i>SUV39H1</i>
DMR_11995	X	153605635-153607981	9	-0,061083719	<i>EMD</i>
DMR_11921	X	129114238-129118953	19	-0,060957678	<i>BCORL1</i>
DMR_11500	8	144789164-144790772	9	-0,060451112	<i>ZNF707, CCDC166</i>
DMR_9283	5	77145356-77147141	8	-0,060227285	ND
DMR_11790	X	68723670-68725815	13	-0,06007949	<i>FAM155B, AL158069.1</i>
DMR_11669	X	21391817-21393898	12	-0,059401453	<i>CNKSR2</i>
DMR_11823	X	79590789-79591032	8	-0,059246208	<i>FAM46D</i>
DMR_11821	X	77358961-77360510	14	-0,059121003	<i>PGK1</i>
DMR_11666	X	19533022-19534066	10	-0,058953271	<i>MAP3K15</i>
DMR_11670	X	21674815-21677134	14	-0,058921343	<i>KLHL34</i>
DMR_11678	X	24482846-24484361	10	-0,058918654	<i>PDK3</i>
DMR_11711	X	46432770-46434442	9	-0,058894854	<i>CHST7</i>
DMR_9843	6	28601271-28601519	11	-0,05882722	<i>RP11-373N24.2</i>
DMR_11966	X	147581562-147583550	15	-0,058723364	<i>AFF2, AC002368.4</i>
DMR_11659	X	17392798-17393584	7	-0,058571815	<i>NHS</i>

continua

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes (continuação)

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_11900	X	119005413-119006837	14	-0,058548975	<i>NDUFA1, RNF113A</i>
DMR_11742	X	48931388-48932122	11	-0,058333756	<i>PRAF2, WDR45</i>
DMR_12004	X	153718691-153719406	10	-0,058126507	<i>SLC10A3</i>
DMR_11999	X	153656860-153657411	7	-0,058031895	<i>BX936347.1, ATP6AP1</i>
DMR_11748	X	49056505-49057013	9	-0,058008258	<i>SYP, SYP-AS1</i>
DMR_2557	12	9217079-9217907	11	-0,057945682	<i>A2M-AS1, LINC00612</i>
DMR_11970	X	149529976-149534258	17	-0,057730577	<i>MAMLD1</i>
DMR_5006	17	37123638-37124558	10	-0,057306128	<i>FBXO47</i>
DMR_6288	19	54040774-54041856	10	-0,057304041	<i>ZNF331</i>
DMR_11944	X	134232157-134233109	7	-0,057092491	<i>LINC00087</i>
DMR_11957	X	138285393-138287900	17	-0,056982737	<i>FGF13</i>
DMR_11888	X	118107540-118110766	16	-0,056978196	<i>LONRF3</i>
DMR_11764	X	54383906-54385662	7	-0,056970851	<i>WNK3</i>
DMR_12003	X	153713930-153715426	10	-0,05672695	<i>UBL4A</i>
DMR_11994	X	153602509-153603503	11	-0,056715308	<i>FLNA</i>
DMR_11991	X	153284899-153285934	7	-0,056647889	<i>IRAK1, MIR718</i>
DMR_11693	X	38420326-38421503	11	-0,056490464	<i>TSPAN7</i>
DMR_11668	X	20283423-20286779	12	-0,056376843	<i>RPS6KA3</i>
DMR_11672	X	21958416-21959700	10	-0,056271754	<i>SMS, LLOXNC01-39B3.1</i>

continua

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes (continuação)

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_1702	10	123355268-123358317	17	-0,056225675	<i>FGFR2</i>
DMR_11974	X	150150670-150153136	17	-0,056110647	<i>HMGB3</i>
DMR_11919	X	128977299-128978347	14	-0,055916881	<i>ZDHHC9</i>
DMR_11770	X	55187242-55187903	10	-0,055775168	<i>FAM104B</i>
DMR_7483	20	57425157-57428473	65	-0,05557006	<i>GNAS, GNAS-AS1</i>
DMR_9132	5	23507030-23507656	7	-0,055437765	<i>PRDM9</i>
DMR_11978	X	151999239-152000347	12	-0,055139575	<i>NSDHL, CETN2</i>
DMR_12000	X	153664475-153665799	9	-0,055090146	<i>GDI1</i>
DMR_11729	X	48432279-48433876	12	-0,054825597	<i>RBM3, AC115618.1</i>
DMR_10691	7	50849168-50851503	9	-0,054780529	<i>GRB10</i>
DMR_11873	X	107334429-107335227	11	-0,054776826	<i>PSMD10, ATG4A</i>
DMR_11984	X	152906667-152910369	14	-0,054741445	<i>DUSP9</i>
DMR_11642	X	11774782-11777794	18	-0,054708295	<i>MSL3</i>
DMR_1209	1	240656217-240657329	8	-0,054513802	ND
DMR_11894	X	118707913-118709261	14	-0,054314233	<i>UBE2A</i>
DMR_11684	X	30326328-30327819	14	-0,053883806	<i>NR0B1</i>
DMR_4794	17	6898738-6899888	15	-0,053689222	<i>ALOX12, RP11-589P10.5</i>
DMR_11998	X	153639287-153640967	12	-0,053584581	<i>DNASE1L1, TAZ</i>
DMR_11725	X	47862977-47863707	8	-0,05357646	<i>SPACA5, ZNF182</i>

continua

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes (continuação)

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_11648	X	15353254-15354150	12	-0,053561291	<i>PIGA</i>
DMR_11911	X	122993419-122994594	14	-0,053524318	<i>XIAP</i>
DMR_11743	X	48957691-48958509	12	-0,053409715	<i>WDR45</i>
DMR_11741	X	48900948-48901982	9	-0,053374186	<i>TFE3</i>
DMR_11915	X	128656725-128657893	11	-0,053357781	<i>SMARCA1</i>
DMR_7894	22	51016501-51017151	12	-0,053231588	<i>CPT1B, CHKB-CPT1B, CHKB</i>
DMR_11942	X	134165954-134166347	7	-0,053015868	<i>FAM127A</i>
DMR_11720	X	47478591-47479662	11	-0,052859687	<i>SYN1</i>
DMR_11777	X	62974433-62975657	10	-0,052826713	<i>ARHGEF9</i>
DMR_11903	X	119148809-119150375	8	-0,052776664	<i>GS1-421I3.2</i>
DMR_11918	X	128913578-128913980	7	-0,052666423	<i>SASH3</i>
DMR_11923	X	129243062-129246153	12	-0,05258674	<i>ELF4</i>
DMR_10704	7	56515510-56516504	10	-0,052581782	<i>RP13-492C18.2</i>
DMR_11996	X	153625785-153628595	17	-0,052516898	<i>RPL10, SNORA70</i>
DMR_12002	X	153707029-153708103	8	-0,052282548	<i>LAGE3</i>
DMR_11892	X	118601891-118603378	9	-0,052141155	<i>SLC25A5, SLC25A5-AS1</i>
DMR_11890	X	118369571-118370873	12	-0,05200566	<i>PGRMC1</i>
DMR_11977	X	151806225-151807197	11	-0,051997479	<i>GABRQ</i>

continua

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes (continuação)

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_11781	X	64254409-64255552	7	-0,051933195	<i>ZC4H2</i>
DMR_9869	6	29629187-29631447	10	-0,051487467	ND
DMR_11852	X	101966398-101967643	8	-0,051470117	<i>GPRASP2</i>
DMR_11718	X	47341740-47343198	13	-0,051358132	<i>ZNF41, CXorf24</i>
DMR_11677	X	23925454-23927284	12	-0,051200853	<i>CXorf58, APOO</i>
DMR_9823	6	28058715-28059208	9	-0,051119312	<i>ZSCAN12P1</i>
DMR_11703	X	41781891-41783785	10	-0,05111124	<i>CASK</i>
DMR_11675	X	23760460-23762372	13	-0,051058352	<i>ACOT9</i>
DMR_11714	X	47003362-47004911	16	-0,051047155	<i>NDUFB11, RBM10</i>
DMR_11834	X	99661860-99667528	23	-0,051019999	<i>PCDH19</i>
DMR_9036	4	174421114-174422908	9	-0,050942397	ND
DMR_11955	X	136647133-136649808	10	-0,050903123	<i>ZIC3, RP1-137H15.2</i>
DMR_11909	X	119763444-119764469	11	-0,050899975	<i>C1GALT1C1</i>
DMR_10849	7	100463206-100465221	11	-0,050845841	<i>TRIP6</i>
DMR_4309	16	3493133-3494155	12	-0,050709712	<i>ZNF597, NAA60</i>
DMR_11695	X	38662279-38665168	16	-0,050532132	<i>MID1IP1, MID1IP1-AS1</i>
DMR_11785	X	67653156-67653925	10	-0,050494689	<i>OPHN1</i>
DMR_12009	X	154032629-154034184	11	-0,050494431	<i>MPP1</i>
DMR_11922	X	129193893-129194982	7	-0,050454357	ND

continua

Tabela 9 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes (conclusão)

DMR (identificação)	Cromossomo	Posição genômica	Número de CpGs	Diferença de metilação (média)	Genes com região promotora na DMR
DMR_5488	18	14747888-14748439	10	-0,050398645	<i>ANKRD30B</i>
DMR_11851	X	101905837-101907254	8	-0,050370988	<i>GPRASP1</i>
DMR_12011	X	154299274-154300204	8	-0,050341015	<i>BRCC3, MTCP1, CMC4</i>
DMR_4813	17	7311030-7312081	9	-0,05032058	<i>NLGN2</i>
DMR_11673	X	23350093-23353620	13	-0,050150411	<i>PTCHD1</i>
DMR_11763	X	54209148-54209968	8	-0,050134574	<i>FAM120C</i>
DMR_11902	X	119133852-119135074	7	-0,050060465	ND
DMR_9870	6	29648161-29649084	22	0,08795856	<i>ZFP57</i>

DMR = região diferencialmente metilada, ND = não disponível

Tabela 10 - Ontologia dos genes relacionados às regiões diferencialmente metiladas entre as meninas pré-púberes e púberes

Ontologia genética (identificação)	Processo biológico	Genes relacionados	Valor de <i>p</i>
GO:0007224	Via de sinalização da proteína transmembrana <i>smoothed</i>	<i>PTCHD1, FGFR2, GPC3, NSDHL, IFT140</i>	1,4e-03
GO:0090287	Regulação da resposta celular ao estímulo com fator de crescimento	<i>FGFR2, GPC3, GRB10, XIAP, TMEM204, CASK</i>	4,81e-03
GO:1904888	Desenvolvimento do sistema esquelético craniano	<i>FGFR2, GNAS, IFT140</i>	7,89e-03
GO:0030522	Via de sinalização mediada por receptor intracelular	<i>NR0B1, XIAP, IRAK1, PDK3, TAF1, IKBKG</i>	8,61e-03
GO:0010257	Formação do complexo NADH desidrogenase	<i>NDUFA1, NDUFB11, TAZ</i>	8,64e-03
GO:0097031	Biogênese do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial	<i>NDUFA1, NDUFB11, TAZ</i>	8,64e-03
GO:0016570	Modificação de histona	<i>MSL3, USP27X, PRDM9, SUV39H1, TAF1, UBE2A, BRCC3, NAA60</i>	9,05e-03
GO:0009299	Transcrição de RNAm	<i>FLNA, POU5F1</i>	9,69e-03
GO:0071514	<i>Imprinting</i> genômico	<i>GNAS, ZFP57</i>	1,24e-02
GO:0042157	Metabolismo de lipoproteínas	<i>WDR45, ATG4A, ZDHHC9, PIGA</i>	1,46e-02

GO = ontologia genética (*gene ontology*, do inglês)

Figura 5 - Distribuição das regiões diferencialmente metiladas entre os controles pré-púberes e púberes por cromossomo

Tabela 11 - Descrição de fatores transcricionais atuantes nas regiões diferencialmente metiladas entre os controles pré-púberes e púberes identificados com o programa GSEA

Fator transcricional símbolo do gene	Genes com sítio de ligação para o fator transcricional	Valor de <i>p</i>
GGGCGGR_SP1	SMARCA1, POU5F1, PTCHD1, GPC3, PRDM8, SUV39H1, CASK, FLNA, OTUD5, TFE3, TAF1, CPT1B, HTATSF1, SLC25A5, RPS6KA3, C1GALT1C1, LONRF3, NDUFB11, RBM10, NHS, XIAP, PGRMC1, UBE2A, SYN1, ALOX12, ATP6AP1, GPRASP2, LAGE3	2,15E-9
GGGAGGRR_MAZ	SMARCA1, POU5F1, PTCHD1, GPC3, PRDM8, SUV39H1, CASK, TEF3, TAF1, CPT1B, FAM155B, OPHN1, ELF4, TSPAN7, FGF13, DUSP9, GNAS, CNKSR2, MSL3, NLGN2, SASH3	5,04E-7
TGACCTY_ERR1	SMARCA1, POU5F1, HTATSF1, SLC25A5, FAM155B, OPHN1, ELF4, TSPAN7, TAZ, HMGB3, HS6ST2, PGK1, PRDM9, NR0B1	7,04E-7
CAGGTG_E12	PTCHD1, HTATSF1, SLC25A5, RPS6KA3, C1GALT1C1, LONRF3, FLNA, FAM155B, OPHN1, FGF13, DUSP9, GNAS, CNKSR2, TAZ, LY6G5C, GABRQ, ZIC3, KLHL34, RBM3, SMS, DNASE1L1	2,08E-6
GATTGGY_NFY	GPC3, PRDM8, SUV39H1, OTUD5, NDUFB11, RBM10, GABRQ, ZIC3, MSL3, PIGA, ZNF597, FGFR2, CETN2, NSDHL	2,43E-6
ER	SMARCA1, POU5F1, HTATSF1, ELF4, HMGB3, KLHL34, FGFR2	5,09E-6
CTGCAGY_UNKNOWN	PTCHD1, GPC3, CASK, RPS6KA3, ELF4, TSPAN7, FGF13, DUSP9, NLGN2, SASH3, GABRQ	6,16E-6
TGGAAA_NFAT	PTCHD1, CASK, TEF3, RPS6KA3, C1GALT1C1, OTUD5, ELF4, FAM155B, OPHN1, FGF13, GNAS, TAZ, HS6ST2, GABRQ, FAM120C, GRB10, PDK3	1,02E-5
GCCATNTTG_YY1	RPS6KA3, NDUFB11, RBM10, RBM3, FAM120C, IRAK1, ZNF41, RPL10	1,87E-5
ZF5	HTATSF1, NDUFB11, RBM10, NHS, TSPAN7, FGF13	4,34E-5

4.2 ALTERAÇÕES NA METILAÇÃO DO DNA ASSOCIADAS COM A PPC

A comparação entre o metiloma das pacientes com PPC e o metiloma dos controles pré-púberes identificou uma única DMR (FDR < 0,05), discretamente mais metilada na PPC (diferença de metilação média de 0,003391969). Trata-se de uma região no cromossomo 6 contendo o promotor do gene *CUTA* (*homolog of Escherichia coli cutA*). A análise comparativa entre as pacientes com PPC e as meninas saudáveis púberes não identificou DMRs (FDR < 0,05). Devido à pequena diferença de metilação em termos de DMRs entre as pacientes com PPC e as meninas do grupo controle, nós exploramos os níveis de metilação dos sítios CpG isolados.

A comparação entre o grupo de pacientes e o grupo controle pré-púbere evidenciou 417 DMSs, estando a maioria (338; 81%) hipermetilada na PPC (**Figura 6A**). Dentre os sítios CpG hipermetilados na PPC, 33% estavam em ilhas CpG, 20% em *shores*, 9% em *shelves* e 38% em regiões *open sea*. A análise funcional de 199 genes relacionados aos 338 DMSs mostrou enriquecimento em processos biológicos como vias de sinalização envolvidas com a comunicação celular (70 genes) e metabolismo (10 genes).

A comparação entre o grupo de pacientes e o grupo controle púbere evidenciou 605 DMSs, estando a maioria (539; 89%) hipermetilada na PPC (**Figura 6B**). Dentre os sítios CpG hipermetilados na PPC, 22% estavam em ilhas CpG, 21% em *shores*, 11% em *shelves* e 46% em regiões *open sea*. A análise funcional de 308 genes relacionados aos 539 DMSs mostrou enriquecimento em processos biológicos como carcinomas (13 genes), vias metabólicas (13 genes), transporte de vesículas (10 genes) e associação com doenças do sistema endócrino (10 genes).

Há 12 genes *ZNF* contendo sítios CpG hipermetilados no grupo de pacientes com PPC quando comparado ao grupo controle (**Tabela 12**).

As análises comparativas entre os metilomas dos três grupos estudados estão resumidas na **Figura 7**.

Cada ponto representa um sítio CpG ($n = 443.042$) com a média da diferença de metilação no eixo X e $-\log_{10}$ do FDR no eixo Y.

Diferença de metilação negativa indica hipometilação, enquanto diferença de metilação positiva indica hipermetilação no grupo de pacientes com PPC.

Os pontos verdes representam os sítios CpG diferencialmente metilados mais significativos ($n = 417$ em A, $n = 605$ em B, $FDR < 0,05$, diferença de metilação média $> 10\%$).

Figura 6 - *Volcano plot* das diferenças na metilação do DNA entre as pacientes com PPC e as meninas saudáveis pré-púberes (**A**) e púberes (**B**)

Tabela 12 - Descrição dos genes *zinc finger* contendo sítios CpGs hipermetilados na PPC

Gene	Cromossomo	Número de CpGs	Localização no gene	Localização em relação à ilha CpG	Alteração de metilação identificada
<i>ZDBF2</i> <i>Zinc finger, DBF-type containing 2</i>	2	1	Corpo	<i>Open Sea</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle pré-púbere
		1	Corpo	<i>Open Sea</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere
<i>ZDHC9</i> <i>Zinc finger, DHHC-type containing 9</i>	X	1	TSS200	Ilha CpG	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle pré-púbere
<i>ZNF135</i> <i>Zinc finger protein 135</i>	19	1	Corpo	<i>Open Sea</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle pré-púbere
<i>ZNF251</i> <i>Zinc finger protein 251</i>	8	1	Corpo	<i>S shore</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle pré-púbere
<i>ZNF183</i> <i>Zinc finger protein 183</i>	X	1	5'UTR	Ilha CpG	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle pré-púbere
<i>LOC441666</i> <i>Zinc finger protein 91 pseudogene</i>	10	2	Corpo	<i>S shore</i> (1 CpG); ilha CpG (1 CpG)	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle pré-púbere
		7	Corpo (5 CpGs); TSS200 (2 CpGs)	<i>S shore</i> (3 CpGs); <i>N shore</i> (1 CpG); ilha CpG (3 CpGs)	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere

continua

Tabela 12 - Descrição dos genes *zinc finger* contendo sítios CpGs hipermetilados na PPC familiar (conclusão)

Gene	Cromossomo	Número de CpGs	Localização no gene	Localização em relação à ilha CpG	Alteração de metilação identificada
<i>ZBTB12</i> <i>Zinc finger and BTB domain containing 12</i>	6	1	Corpo	Ilha CpG	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere
<i>ZDHHC11</i> <i>Zinc finger, DHHC-type containing 11</i>	5	1	Corpo	<i>Open Sea</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere
<i>ZFP42</i> <i>Zinc finger protein 42</i>	4	1	Corpo	<i>Open Sea</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere
<i>ZNF167</i> <i>Zinc finger protein 167</i>	3	1	Corpo	Ilha CpG	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere
<i>ZNF787</i> <i>Zinc finger protein 787</i>	19	1	5'UTR	Ilha CpG	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere
<i>ZSWIM5</i> <i>Zinc finger, SWIM-type containing 5</i>	1	1	Corpo	<i>N shore</i>	Hipermetilação na PPC comparando com o grupo controle púbere

Figura 7 - Resumo das análises comparativas entre os metilomas dos três grupos estudados

4.3 AUSÊNCIA DE ALTERAÇÕES NA METILAÇÃO DOS GENES *MKRN3* E *DLK1*

As análises de metilação diferencial não evidenciaram alteração na metilação dos genes *MKRN3* e *DLK1*, como também não mostraram alteração na metilação das regiões genômicas sabidamente envolvidas com o controle do *imprinting* desses genes. Adicionalmente, o estudo de metilação específico das regiões *MKRN3*:TSS-DMR e *DLK1*-*MEG3*:IG-DMR não mostrou qualquer anormalidade (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Estudo de metilação das regiões *MKRN3*:TSS-DMR e *DLK1*-*MEG3*:IG-DMR nas pacientes com PPC e no grupo controle usando a técnica ASMM RTQ PCR

	Índice de metilação (%)	
	<i>DLK1-MEG3</i> :IG-DMR	<i>MKRN3</i> :TSS-DMR
Grupo controle pré-púbere		
Média (DP)	52 ($\pm 1,7$)	48 ($\pm 4,7$)
Variação normal	49-55	39-57
Grupo controle púbere		
Média (DP)	51 ($\pm 1,4$)	50 ($\pm 7,3$)
Variação normal	48-54	35-65
Grupo de pacientes com PPC		
Caso índice		
1	54	46
2	51	51
3	51	51
4	52	37
5	52	38
6	49	41
7	51	48
8	51	56
9	49	36
10	49	44

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O que determina o início da puberdade humana é um mistério que fascina os estudiosos do assunto. Há evidências crescentes de que mecanismos epigenéticos estão envolvidos na complexa rede de fatores que controlam o início puberal ^[14, 15, 82]. Neste trabalho, nós demonstramos que as meninas em puberdade fisiológica apresentam um padrão de hipermetilação global do DNA quando comparadas às crianças pré-púberes. De fato, estudos em animais sugerem que o início da puberdade requer a repressão de fatores inibidores do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Nesse contexto, como a hipermetilação das regiões promotoras é relacionada à inibição da expressão gênica, nosso resultado sugere que haja hipermetilação de genes inibidores do eixo gonadotrófico, o que deflagaria o processo puberal. Do mesmo modo, Chen e cols. também descreveram um aumento dos níveis de metilação durante a transição para a puberdade ^[100].

O gene *ZFP57* está localizado no cromossomo 6p22.1 e codifica uma proteína com 516 aminoácidos que atua como potente repressor transcricional. Cerca de 40% dos fatores transcricionais no genoma humano são repressores transcricionais contendo dedos de zinco ^[14]. Esses domínios se ligam a sequências de DNA específicas nas regiões promotoras dos genes e são fundamentais para que a proteína ZNF module a expressão gênica. O tipo mais comum de dedo de zinco é o C2H2, também chamado Krüppel ^[101]. Cerca de 1/3 das proteínas contendo dedos de zinco tipo C2H2 contém o domínio KRAB (*Krüppel associated-box*), um potente repressor transcricional ^[14, 102]. O KRAB se liga à proteína KAP-1 (*KRAB associated protein 1*) formando um complexo cuja atividade culmina com a formação da heterocromatina, forma condensada e inativa da cromatina ^[102]. Notavelmente, o produto do *ZFP57* é uma proteína KRAB-ZNF que é necessária para manutenção do *imprinting* genômico, impedindo a desmetilação das DMRs germinativas ^[61, 103]. O *Zfp57* exerce sua função ao

interagir com a proteína Trim28, formando um complexo proteico que inclui a Dnmt1 ^[61]. Estudando embriões de camundongos, observou-se que a ausência do *Zfp57* resultou em metilação anormal de várias regiões controladoras de *imprinting* e um dos genes mais afetados foi o *Dlk1* ^[104]. Na falta do *Zfp57* não ocorreu a metilação diferencial da DMR *Dlk1-Dio3*. Além disso, tal fator é necessário para a metilação da DMR do *Snrpn* ^[104]. Esses dados indicam que o ZFP57 é importante para a manutenção do *imprinting* de dois genes relacionados à puberdade, o *DLK1* e o *MKRN3*. Em humanos, mutações em homozigose no *ZFP57* foram identificadas em pacientes com Diabetes neonatal transitório que apresentavam hipometilação em múltiplas regiões imprintadas ^[105]. Nós identificamos hipometilação na região promotora do *ZFP57* nas meninas em puberdade fisiológica. Consequentemente, é provável que haja expressão do *ZFP57* no início da puberdade e, portanto, inibição transcricional decorrente. Nós propomos que a expressão do *ZFP57* leve à inibição de fatores repressores do eixo gonadotrófico, fatores esses que ainda precisam ser elucidados.

A região genômica com a maior diferença de metilação (10,5%) entre os controles pré-púberes e púberes está localizada no cromossomo 10 e contém a região promotora do *zinc finger protein 91 pseudogene*, que é expresso no hipotálamo. Interessantemente, 2 a 20% dos pseudogenes humanos são transcritos, processo tecido-específico para parte deles e que vem se mantendo ao longo dos anos, sugerindo uma funcionalidade nas células ^[106]. Além disso, RNAs não codificadores produzidos a partir de pseudogenes podem modular a expressão de genes ^[106]. Nove outros *ZNF* foram relacionados às DMRs identificadas na comparação entre os grupos controles. Em conjunto, nossos resultados mostram que a metilação de alguns genes *ZNF* passa por modificação durante a transição para puberdade e essas alterações podem contribuir para o início da puberdade. Está em andamento o estudo da expressão de alguns genes *ZNF* em hipotálamo de macacos *Rhesus* (colaboração do Prof. Alejandro Lomniczi e do Prof. Sergio Ojeda).

A análise em busca de fatores de transcrição que se ligam nas DMRs entre os controles pré-púberes e púberes evidenciou enriquecimento significativo para o receptor do estrógeno. Sete genes diferencialmente metilados foram identificados como alvos do receptor estrogênico. Recentemente, um grupo americano estudou o metiloma de 30 meninas quando pré-púberes (8 anos) e púberes (14 anos) e evidenciou 347 DMSs associados à puberdade ^[107]. Estes DMSs foram relacionados a 312 genes, sendo que 20,2% deles eram responsivos ao estrógeno, demonstrando que as modificações epigenéticas que ocorrem na puberdade feminina podem ser moduladas pela exposição ao estrógeno ^[107].

Um achado interessante do nosso estudo foi a maior prevalência de DMRs associadas com o desenvolvimento puberal normal localizadas no cromossomo X (74%). As 89 DMRs identificadas no cromossomo X encontram-se fora das regiões pseudoautosômicas (PAR = *pseudoautosomal region*, do inglês), que são segmentos com homologia de sequência entre os cromossomos X e Y situados nas extremidades dos braços curto (PAR1) e longo (PAR2) ^[108]. Genes localizados nas regiões PAR escapam do padrão de inativação do X ^[108]. Nas mulheres, um dos dois cromossomos X é inativado (unissomia funcional), sendo aleatória a escolha do cromossomo X a ser inativado (em média, o materno é inativado em 50% das células e o paterno é inativado em 50% das células) ^[109]. O silenciamento do cromossomo X resulta de uma sequência de modificações epigenéticas que leva à formação da heterocromatina na maior parte do cromossomo inativado ^[109]. De fato, cerca de 85% dos genes do cromossomo X inativado são silenciados como um mecanismo compensatório de dosagem gênica entre os sexos ^[109]. Entretanto, 15-20% dos genes escapam da inativação do X, apresentando ambos os alelos expressos, e 80% deles encontram-se no braço curto ^[109, 110]. Além disso, alguns genes que escapam da inativação do X apresentam expressão variável, tanto entre os diversos tecidos de uma mulher quanto entre mulheres diferentes, podendo estar expressos em uma mulher e silenciados em outra ^[110, 111]. A associação entre alterações cromossômicas do X e

puberdade precoce já foi observada. Existem relatos na literatura de meninas com trissomia do X (cariótipo 47,XXX) que apresentaram puberdade precoce ^[112, 113]. Nesses casos, a reativação precoce do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal foi atribuída ao cromossomo X adicional, sendo a expressão de genes que escapam da inativação do X considerada como a possível causa. Antecipação do desenvolvimento puberal também foi descrita em meninas com duplicação na região Xp.11.22-p11.23 e, da mesma maneira, a expressão de genes duplicados foi proposta como a possível causa da precocidade sexual ^[114]. No presente estudo, algumas DMRs localizadas no cromossomo X afetam sequências de genes que escapam da inativação do X, como os genes *MSL3*, *NR0B1*, *RBM3* e *HS6ST2*, além de outros que apresentam padrão variável de escape da inativação, como o *FGF13* e o *SLC25A5* ^[110]. Mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo pelo qual a alteração na metilação desses genes que escapam da inativação do X pode contribuir para o desenvolvimento da puberdade, mas desde já colocamos esses genes como possíveis atores do processo puberal.

O grupo dinamarquês, ao estudar o metiloma humano na puberdade, identificou DMRs onde a metilação do DNA estava associada com a idade do início puberal ^[87]. Uma região no cromossomo 7, contendo o promotor do gene *TRIP6*, foi a mais significativa ^[87]. De modo importante, comparando nossos resultados com os desse estudo, nós observamos uma sobreposição de dez DMRs, sendo que sete delas apresentam as mudanças de metilação no mesmo sentido, incluindo a relacionada ao *TRIP6* (**Tabela 14**).

Nossos dados demonstraram um padrão de hipermetilação global do DNA nas meninas com PPC, o que está de acordo com os estudos em animais que mostraram puberdade antecipada quando se induziu hipermetilação do DNA ^[82]. Observamos 63 genes, incluindo 12 *ZNF*, contendo sítios CpG hipermetilados nas pacientes com PPC ao compará-las com as meninas saudáveis pré-púberes e púberes. Esse achado pode refletir modificações epigenéticas que contribuem para a ocorrência da PPC ou que são secundárias à doença em si. Apesar do nosso estudo não

permitir a distinção entre o que é causa e efeito da PPC, consideramos que genes *ZNF* podem ser interessantes para futuros estudos de associação com PPC.

Enfatizamos que não foram encontradas DMRs significativas entre as meninas saudáveis púberes e as pacientes com PPC. Provavelmente, as principais alterações epigenéticas que controlam a expressão gênica na puberdade normal e precoce são semelhantes, afinal a PPC é como a puberdade fisiológica, porém começando em uma idade antecipada. Por outro lado, uma DMR, contendo a região promotora do gene *CUTA*, mostrou-se mais metilada no grupo com PPC do que no grupo controle pré-púbere. Esse gene, localizado no cromossomo 6p21.32, codifica uma proteína com 136 aminoácidos necessária para ancoragem da acetilcolinesterase na membrana plasmática dos neurônios humanos e que parece participar da proliferação das células da glia [115, 116]. Não há descrição, até o presente momento, da participação do *CUTA* no desenvolvimento puberal.

Nossas análises incluíram dois casos de PPC genética e oito classificados como PPC idiopática. É provável que esses casos de PPC familiar idiopática sejam causados por algum defeito genético ainda não descoberto, de modo que as alterações de metilação encontradas podem estar relacionadas às mutações. O desenho do estudo incluindo famílias com PPC visava comparar o metiloma delas entre si, o que estatisticamente não foi possível devido ao número limitado de pacientes com DNA disponível para análise em cada família. Realizaremos novos estudos para contemplar esse objetivo. Por enquanto, permanece a curiosidade de saber se as famílias com mutação no *MKRN3* e no *DLK1* apresentam alterações no metiloma em relação às famílias com PPC idiopática. É importante destacar que, no presente estudo, não foram encontradas anormalidades de metilação nos genes *MKRN3* e *DLK1* nem nas regiões que controlam a expressão deles.

Sabemos que o tipo de tecido é um forte determinante do padrão de metilação do DNA. Todavia, na impossibilidade de obter amostra de hipotálamo das crianças, nós analisamos a metilação do DNA de leucócitos do sangue periférico para estudar a puberdade, processo de origem hipotalâmica. Felizmente, pesquisas têm mostrado que é cientificamente aceitável usar o sangue como material para estudo da metilação do DNA no contexto de eventos do SNC, incluindo a puberdade [87, 117, 118].

Tabela 14 - Regiões diferencialmente metiladas entre as meninas pré-púberes e púberes que foram previamente identificadas no estudo dinamarquês

DMR (identificação)	Cromossomo	Número de CpGs	Diferença de metilação média (pré - pós-púbere)	Genes com região promotora na DMR
DMR_10849*	7	11	-0,050845841	<i>TRIP6</i>
DMR_10848*	7	8	-0,011123245	<i>SLC12A9, RP11-126L15.4</i>
DMR_4835	17	13	-0,004918456	<i>TRAPPC1, KCNAB3, CNTROB</i>
DMR_5149	17	34	-0,010869697	<i>HOXB8, HOXB7</i>
DMR_6184	19	15	-0,017502407	<i>AC011484.1, PNMAL2</i>
DMR_9947*	6	10	-0,024464641	<i>TNF</i>
DMR_5887*	19	18	-0,007917542	<i>AKAP8L</i>
DMR_1838*	11	15	0,005243223	<i>SLC22A18, SLC22A18AS</i>
DMR_9898*	6	57	-0,014466232	<i>TRIM39, HCG18</i>
DMR_2718*	12	10	-0,024084513	<i>KRT7</i>

*Regiões com mudança de metilação no mesmo sentido

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. Hipermetilação global do DNA foi evidenciada em meninas com desenvolvimento puberal normal e precoce, sugerindo que seja uma marca epigenética do início da puberdade humana;
2. Pela primeira vez, alterações no metiloma de meninas com PPC foram descritas;
3. Não foram identificadas anormalidades de metilação nos genes imprintados *MKRN3* e *DLK1* nem em suas regiões regulatórias;
4. O receptor estrogênico foi identificado como um fator transcricional atuante em sete genes diferencialmente metilados entre as meninas saudáveis pré-púberes e púberes;
5. A maioria (74%) das regiões genômicas diferencialmente metiladas que foram associadas com o desenvolvimento puberal normal estão localizadas no cromossomo X;
6. Mudanças na metilação de genes que escapam da inativação do cromossomo X foram evidenciadas na puberdade;
7. O achado de hipometilação na região promotora do *ZFP57* nas meninas saudáveis púberes sugere aumento de expressão desse potente repressor transcricional na puberdade;
8. Provavelmente, modificações na metilação de vários genes *ZNF* contribuem para o início da puberdade humana, mas estudos adicionais são necessários para elucidar o mecanismo relacionado.

7 Anexos

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DO ESTADO DE
SÃO PAULO****INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE DA PESQUISA E TERMO DE
ASSENTIMENTO****PARA 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: Análise de metilação global em pacientes com
puberdade precoce central idiopática**

PESQUISADOR: Dra Danielle de Souza Bessa

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 137130

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular / Disciplina de
Endocrinologia e Metabologia**2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:**RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐**3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses**

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão do Termo

Rubrica do responsável ou representante legal

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.

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão do Termo _____

Rubrica do responsável ou representante legal _____

Você vai coletar exames de sangue com uma agulha pequenininha na veia do seu braço ou da sua 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.

Rubrica da pessoa que conduziu a discussão do Termo _____

Rubrica do responsável ou representante legal _____

**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: **Análise de metilação global em pacientes com puberdade precoce central idiopática**

PESQUISADOR: Dra Danielle de Souza Bessa

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 137130

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

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA: 18 meses

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 de 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 da sua 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 conversar com você 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: **Análise de metilação global em pacientes com
puberdade precoce central idiopática**

PESQUISADOR: Dra Danielle de Souza Bessa

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 137130

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

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

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 a puberdade antes do tempo. Buscamos entender o porquê de você, menina, ter desenvolvido mamas e/ou pelos pubianos antes dos 8 anos e de você, menino, ter aumento dos testículos e/ou pênis e/ou aparecimento de pelos pubianos antes dos 9 anos. 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 existem outros genes envolvidos ainda não reconhecidos. Além disso, mudanças epigenéticas podem estar relacionadas à puberdade precoce. A epigenética se refere às alterações nos genes que passam das mães e dos pais para os filhos, mas que não alteram os genes em si. A metilação do gene é um fenômeno epigenético bem estudado. 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, vai realizar os exames de rotina necessários ao seu tratamento e 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 ou da mão 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 uma pequena equimose (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em menos de 7 (sete) dias. Este estudo também inclui a coleta de informações registradas no seu prontuário 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 da pesquisa e, se necessário, ao seu acompanhante, o ressarcimento de despesas como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames para fins da pesquisa.

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 (11) 26617512. Este 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, telefone (11) 2661-6442 (ramais 16, 17, 18 ou 20), FAX: 2661-6442 (ramal 26), email: cappesq@hcnnet.usp.br, horário de funcionamento: das 7:00 às 17:00h.

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, sendo que o prazo máximo é de 10 anos. 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.

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 "**Análise de metilação global em pacientes com puberdade precoce central idiopática**".

Fui bem orientado (a) pela Dra. Ana Claudia Latronico e pela Dra. Danielle de Souza Bessa e declaro a minha decisão em participar neste 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.

Assinatura do participante/ representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Pesquisador responsável

Data / /

**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: **Análise de metilação global em pacientes com
puberdade precoce central idiopática**

PESQUISADOR: Dra Danielle de Souza Bessa

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº
137130

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

2. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO x RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : 18 meses

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 algumas crianças terem desenvolvido a puberdade antes do tempo. Buscamos entender o porquê da sua amiguinha ter desenvolvido mamas e/ou pelos pubianos antes dos 8 anos e o porquê do seu amiguinho ter aumento dos testículos e/ou pênis e/ou pelos pubianos antes dos 9 anos. 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 existem outros genes envolvidos ainda não reconhecidos. Além disso, mudanças epigenéticas podem estar relacionadas à puberdade precoce. A epigenética se refere às alterações nos genes que passam das mães e dos pais para os filhos, mas que não alteram os genes em si. A metilação do gene é um fenômeno epigenético bem estudado. Por favor, leia este termo e pergunte ao seu médico qualquer dúvida que você tiver. A decisão de participar neste estudo é sua.

Este estudo requer a coleta de 3 tubos pequenos de sangue ($\pm$ 12 mL) através de uma picada na veia do antebraço ou da mão com agulha estéril e descartável para a obtenção do material genético (DNA) e para dosagens hormonais. 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 uma pequena equimose (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em menos de 7 (sete) dias. Este estudo também inclui uma avaliação médica sua, na qual conversaremos sobre o desenvolvimento da puberdade e faremos exame do seu corpo.

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. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. No entanto, este estudo assegura ao participante da pesquisa e, se necessário, ao seu acompanhante, o ressarcimento de despesas como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consulta ou exames para fins da pesquisa.

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 (11) 26617512. Este 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, telefone (11) 2661-6442 (ramais 16, 17, 18 ou 20), FAX: 2661-6442 (ramal 26), email: cappesq@hcnet.usp.br, horário de funcionamento: das 7:00 às 17:00h.

O seu material genético (DNA) poderá ser armazenado para futuras pesquisas, pois com o surgimento de novas tecnologias vamos continuar estudando o assunto. 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, sendo que o prazo máximo é de 10 anos. 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.

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 "**Análise de metilação global em pacientes com puberdade precoce central idiopática**".

Fui bem orientado (a) pela Dra. Ana Claudia Latronico e pela Dra. Danielle de Souza Bessa e declaro a minha decisão em participar neste 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. 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.

Assinatura do participante/ representante legal

Data / /

Assinatura da testemunha

Data / /

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

(Somente para o responsável do projeto)

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

Pesquisador responsável

Data / /

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

- 1 Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57 Suppl 2:2-14.
- 2 Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4:254-64.
- 3 Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: Clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2364-8.
- 4 Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update.* 2004;10:67-77.
- 5 Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 2001;22:111-51.
- 6 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;147:1166-74.
- 7 Rosenbaum M, Leibel RL. Leptin: A molecule integrating somatic energy stores, energy expenditure and fertility. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9:117-24.
- 8 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.

-
- 9 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;24:668-93.
- 10 Leka-Emiri S, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: Genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (icpp). *J Endocrinol Invest.* 2017;40:789-802.
- 11 Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;3:265-74.
- 12 Ojeda SR, Lomniczi A. Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10:67-9.
- 13 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;16:281-9.
- 14 Lomniczi A, Wright H, Castellano JM, Matagne V, Toro CA, Ramaswamy S, Plant TM, Ojeda SR. Epigenetic regulation of puberty via zinc finger protein-mediated transcriptional repression. *Nat Commun.* 2015;6:10195.
- 15 Lomniczi A, Ojeda SR. The emerging role of epigenetics in the regulation of female puberty. *Endocr Dev.* 2016;29:1-16.
- 16 Carel JC, Leger J. Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008;358:2366-77.
- 17 Macedo DB, Cukier P, Mendonca BB, Latronico AC, Brito VN. [advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58:108-17.

- 18 Partsch CJ, Heger S, Sippell WG. Management and outcome of central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;56:129-48.
- 19 Brito VN BM, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, Jorge BH, Arnhold IJ, Mendonca BB. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84:3539-44.
- 20 Greulich WW, Pyle S: Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford, CA: Stanford University Press; 1971.
- 21 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.
- 22 Banerjee I, Clayton P. The genetic basis for the timing of human puberty. *J Neuroendocrinol*. 2007;19:831-8.
- 23 Palmert MR, Hirschhorn JN. Genetic approaches to stature, pubertal timing, and other complex traits. *Mol Genet Metab*. 2003;80:1-10.
- 24 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;358:709-15.
- 25 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;95:2276-80.
- 26 Teles MG, Silveira LF, Tusset C, Latronico AC. New genetic factors implicated in human gnRH-dependent precocious puberty: The role of kisspeptin system. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;346:84-90.

- 27 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, Kiemenev 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;41:734-8.
- 28 He C, Kraft P, Chen C, Buring JE, Pare 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;41:724-8.
- 29 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;41:648-50.
- 30 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, 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;78:144-50.

- 31 Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, Abreu AP, Carroll J, Trarbach E, Silveira LF, Costa EM, de Mendonca BB, de Castro M, Lofrano A, Hall JE, Bolu E, Ozata M, Quinton R, Amory JK, Stewart SE, Arlt W, Cole TR, Crowley WF, Kaiser UB, Latronico AC, Seminara SB. Tac3/tacr3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin b in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2857-67.
- 32 Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, Cukier P, Seminara SB, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. Mutational analysis of tac3 and tacr3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56:646-52.
- 33 Cukier P, Wright H, Rulfs 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;80:257-66.
- 34 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;368:2467-75.
- 35 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:E647-51.
- 36 Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. Mkrn3 mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;82:122-6.

- 37 de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel *mkrn3* missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod*. 2014;29:2838-43.
- 38 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*. 2015;48:118-22.
- 39 Kansakoski J, Raivio T, Juul A, Tammiska J. A missense mutation in *mkrn3* in a danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. *Pediatr Res*. 2015;78:709-11.
- 40 Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, Houang M, Jesuran Perelroizen M, de Filippo GP, Salerno M, Simonin G, Reynaud R, Carel JC, Leger J, de Roux N. Mutations in the maternally imprinted gene *mkrn3* are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol*. 2015;174:1-8.
- 41 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.
- 42 Bulcao Macedo D, Nahime Brito V, Latronico AC. New causes of central precocious puberty: The role of genetic factors. *Neuroendocrinology*. 2014;100:1-8.
- 43 Hershko A, Razin A, Shemer R. Imprinted methylation and its effect on expression of the mouse *zfp127* gene. *Gene*. 1999;234:323-7.

- 44 Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LF, Teles MG, Carroll RS, Junior GG, Filho GG, Gucev 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:E1097-103.
- 45 Harries ML, Walker JM, Williams DM, Hawkins S, Hughes IA. Changes in the male voice at puberty. *Arch Dis Child*. 1997;77:445-7.
- 46 Pigneur B, Trivin C, Brauner R. Idiopathic central precocious puberty in 28 boys. *Med Sci Monit*. 2008;14:CR10-4.
- 47 Bessa DS, Macedo DB, Brito VN, Franca MM, Montenegro LR, Silva MC, Silveira LG, Hummel T, Bergada I, Braslavsky D, Abreu AP, Dauber A, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. High frequency of mkrn3 mutations in male central precocious puberty previously classified as idiopathic. *Neuroendocrinology*. 2017;195(1):17-25.
- 48 Jong MT, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD. 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.
- 49 Deshaies RJ, Joazeiro CA. Ring domain e3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem*. 2009;78:399-434.
- 50 Abreu AP, Navarro V, Bosch M, Liang J, Macedo D, Simavli S, Noel S, Thompson I, Ronnekleiv O, Carroll R, Latronico AC, Kaiser U. Deciphering the functional mechanisms by which mkrn3 regulates puberty initiation. *ESPE meeting Abstracts*. 2014:82 HA1.

-
- 51 Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, Montenegro LR, Andrew M, Kirby A, Weirauch MT, Labilloy G, Bessa DS, Carroll RS, Jacobs DC, Chappell PE, Mendonca BB, Haig D, Kaiser UB, Latronico AC. Paternally inherited *dlk1* deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102:1557-67.
- 52 Wang Y, Zhao L, Smas C, Sul HS. Pref-1 interacts with fibronectin to inhibit adipocyte differentiation. *Mol Cell Biol*. 2010;30:3480-92.
- 53 Hoffmann K, Heller R. Uniparental disomies 7 and 14. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25:77-100.
- 54 Richards EJ. Inherited epigenetic variation--revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet*. 2006;7:395-401.
- 55 Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013;14:204-20.
- 56 Holliday R, Pugh JE. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975;187:226-32.
- 57 Ziller MJ, Muller F, Liao J, Zhang Y, Gu H, Bock C, Boyle P, Epstein CB, Bernstein BE, Lengauer T, Gnirke A, Meissner A. Genomic distribution and inter-sample variation of non-cpg methylation across human cell types. *PLoS Genet*. 2011;7:e1002389.
- 58 Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol*. 1987;196:261-82.
- 59 Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*. 2011;25:1010-22.

-
- 60 Illingworth RS, Gruenewald-Schneider U, Webb S, Kerr AR, James KD, Turner DJ, Smith C, Harrison DJ, Andrews R, Bird AP. Orphan cpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* 2010;6:e1001134.
- 61 Monk D. Germline-derived DNA methylation and early embryo epigenetic reprogramming: The selected survival of imprints. *Int J Biochem Cell Biol.* 2015;67:128-38.
- 62 Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases dnmt3a and dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999;99:247-57.
- 63 Jones PA, Liang G. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet.* 2009;10:805-11.
- 64 Smallwood SA, Kelsey G. De novo DNA methylation: A germ cell perspective. *Trends Genet.* 2012;28:33-42.
- 65 Cedar H. DNA methylation and gene activity. *Cell.* 1988;53:3-4.
- 66 Schubeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature.* 2015;517:321-6.
- 67 Jones PA. Functions of DNA methylation: Islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet.* 2012;13:484-92.
- 68 Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of cpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:1412-7.
- 69 Cooper DN, Krawczak M. Cytosine methylation and the fate of cpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet.* 1989;83:181-8.

- 70 Winter S, Fischle W. Epigenetic markers and their cross-talk. *Essays Biochem.* 2010;48:45-61.
- 71 MacDonald WA, Mann MR. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. *Mol Reprod Dev.* 2013;81:126-40.
- 72 Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: An expanding view. *Nat Rev Genet.* 2014;15:517-30.
- 73 Butler MG. Genomic imprinting disorders in humans: A mini-review. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26:477-86.
- 74 Eggermann T, Perez de Nanclares G, Maher ER, Temple IK, Tumer Z, Monk D, Mackay DJ, Gronskov K, Riccio A, Linglart A, Netchine I. Imprinting disorders: A group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics.* 2015;7:123.
- 75 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;109:7403-8.
- 76 Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T. The *ig-dmr* and the *meg3-dmr* at human chromosome 14q32.2: Hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet.* 2010;6:e1000992.
- 77 da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Genomic imprinting at the mammalian *dlk1-dio3* domain. *Trends Genet.* 2008;24:306-16.

- 78 Berdasco M, Esteller M. Genetic syndromes caused by mutations in epigenetic genes. *Hum Genet.* 2013;132:359-83.
- 79 Hou P, Liu D, Xing M. Genome-wide alterations in gene methylation by the braf v600e mutation in papillary thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18:687-97.
- 80 Kurian JR, Terasawa E. Epigenetic control of gonadotropin releasing hormone neurons. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:61.
- 81 Di Croce L, Helin K. Transcriptional regulation by polycomb group proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20:1147-55.
- 82 Rzeczowska PA, Hou H, Wilson MD, Palmert MR. Epigenetics: A new player in the regulation of mammalian puberty. *Neuroendocrinology.* 2014;99:139-55.
- 83 Perry JR, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, He C, Chasman DI, Esko T, Thorleifsson G, Albrecht E, Ang WQ, Corre T, Cousminer DL, Feenstra B, Franceschini N, Ganna A, Johnson AD, Kjellqvist S, Lunetta KL, McMahon G, Nolte IM, Paternoster L, Porcu E, Smith AV, Stolk L, Teumer A, Tsernikova N, Tikkanen E, Ulivi S, Wagner EK, Amin N, Bierut LJ, Byrne EM, Hottenga JJ, Koller DL, Mangino M, Pers TH, Yerges-Armstrong LM, Hua Zhao J, Andrulis IL, Anton-Culver H, Atsma F, Bandinelli S, Beckmann MW, Benitez J, Blomqvist C, Bojesen SE, Bolla MK, Bonanni B, Brauch H, Brenner H, Buring JE, Chang-Claude J, Chanock S, Chen J, Chenevix-Trench G, Collee JM, Couch FJ, Couper D, Coviello AD, Cox A, Czene K, D'Adamo A P, Davey Smith G, De Vivo I, Demerath EW, Dennis J, Devilee P, Dieffenbach AK, Dunning AM, Eiriksdottir G, Eriksson JG, Fasching PA, Ferrucci L, Flesch-Janys D, Flyger H, Foroud T, Franke L, Garcia ME, Garcia-Closas M, Geller F, de Geus EE, Giles GG, Gudbjartsson DF, Gudnason V, Guenel P, Guo S, Hall P, Hamann U, Haring R, Hartman CA, Heath AC, Hofman A, Hoening MJ, Hopper JL, Hu FB, Hunter DJ,

Karasik D, Kiel DP, Knight JA, Kosma VM, Kutalik Z, Lai S, Lambrechts D, Lindblom A, Magi R, Magnusson PK, Mannermaa A, Martin NG, Masson G, McArdle PF, McArdle WL, Melbye M, Michailidou K, Mihailov E, Milani L, Milne RL, Nevanlinna H, Neven P, Nohr EA, Oldehinkel AJ, Oostra BA, Palotie A, Peacock M, Pedersen NL, Peterlongo P, Peto J, Pharoah PD, Postma DS, Pouta A, Pylkas K, Radice P, Ring S, Rivadeneira F, Robino A, Rose LM, Rudolph A, Salomaa V, Sanna S, Schlessinger D, Schmidt MK, Southey MC, Sovio U, Stampfer MJ, Stockl D, Storniolo AM, Timpson NJ, Tyrer J, Visser JA, Vollenweider P, Volzke H, Waeber G, Waldenberger M, Wallaschofski H, Wang Q, Willemsen G, Winqvist R, Wolffenbuttel BH, Wright MJ, Boomsma DI, Econs MJ, Khaw KT, Loos RJ, McCarthy MI, Montgomery GW, Rice JP, Streeten EA, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Alizadeh BZ, Bergmann S, Boerwinkle E, Boyd HA, Crisponi L, Gasparini P, Gieger C, Harris TB, Ingelsson E, Jarvelin MR, Kraft P, Lawlor D, Metspalu A, Pennell CE, Ridker PM, Snieder H, Sorensen TI, Spector TD, Strachan DP, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Widen E, Zygmunt M, Murray A, Easton DF, Stefansson K, Murabito JM, Ong KK. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature*. 2014;514:92-7.

84 Fokstuen S, Ginsburg C, Zachmann M, Schinzel A. Maternal uniparental disomy 14 as a cause of intrauterine growth retardation and early onset of puberty. *J Pediatr*. 1999;134:689-95.

85 Temple IK, Cockwell A, Hassold T, Pettay D, Jacobs P. Maternal uniparental disomy for chromosome 14. *J Med Genet*. 1991;28:511-4.

86 Elks CE, Perry JR, Sulem P, Chasman DI, Franceschini N, He C, Lunetta KL, Visser JA, Byrne EM, Cousminer DL, Gudbjartsson DF, Esko T, Feenstra B, Hottenga JJ, Koller DL, Kutalik Z, Lin P, Mangino M, Marongiu M, McArdle PF, Smith AV, Stolk L, van Wingerden SH, Zhao JH, Albrecht E, Corre T, Ingelsson E, Hayward C, Magnusson PK, Smith EN, Ulivi S, Warrington NM, Zgaga L, Alavere H, Amin N, Aspelund T, Bandinelli S,

Barroso I, Berenson GS, Bergmann S, Blackburn H, Boerwinkle E, Buring JE, Busonero F, Campbell H, Chanock SJ, Chen W, Cornelis MC, Couper D, Coviello AD, d'Adamo P, de Faire U, de Geus EJ, Deloukas P, Doring A, Smith GD, Easton DF, Eiriksdottir G, Emilsson V, Eriksson J, Ferrucci L, Folsom AR, Foroud T, Garcia M, Gasparini P, Geller F, Gieger C, Gudnason V, Hall P, Hankinson SE, Ferreli L, Heath AC, Hernandez DG, Hofman A, Hu FB, Illig T, Jarvelin MR, Johnson AD, Karasik D, Khaw KT, Kiel DP, Kilpelainen TO, Kolcic I, Kraft P, Launer LJ, Laven JS, Li S, Liu J, Levy D, Martin NG, McArdle WL, Melbye M, Mooser V, Murray JC, Murray SS, Nalls MA, Navarro P, Nelis M, Ness AR, Northstone K, Oostra BA, Peacock M, Palmer LJ, Palotie A, Pare G, Parker AN, Pedersen NL, Peltonen L, Pennell CE, Pharoah P, Polasek O, Plump AS, Pouta A, Porcu E, Rafnar T, Rice JP, Ring SM, Rivadeneira F, Rudan I, Sala C, Salomaa V, Sanna S, Schlessinger D, Schork NJ, Scuteri A, Segre AV, Shuldiner AR, Soranzo N, Sovio U, Srinivasan SR, Strachan DP, Tammesoo ML, Tikkanen E, Toniolo D, Tsui K, Tryggvadottir L, Tyrer J, Uda M, van Dam RM, van Meurs JB, Vollenweider P, Waeber G, Wareham NJ, Waterworth DM, Weedon MN, Wichmann HE, Willemssen G, Wilson JF, Wright AF, Young L, Zhai G, Zhuang WV, Bierut LJ, Boomsma DI, Boyd HA, Crisponi L, Demerath EW, van Duijn CM, Econs MJ, Harris TB, Hunter DJ, Loos RJ, Metspalu A, Montgomery GW, Ridker PM, Spector TD, Streeten EA, Stefansson K, Thorsteinsdottir U, Uitterlinden AG, Widen E, Murabito JM, Ong KK, Murray A. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies. *Nat Genet.* 2010;42:1077-85.

87 Almstrup K, Lindhardt Johansen M, Busch AS, Hagen CP, Nielsen JE, Petersen JH, Juul A. Pubertal development in healthy children is mirrored by DNA methylation patterns in peripheral blood. *Sci Rep.* 2016;6:28657.

88 Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child.* 1969;44:291-303.

- 89 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.
- 90 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.
- 91 Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, Esteller M. Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 cpG sites in the human genome. *Epigenetics.* 2011;6:692-702.
- 92 Assenov Y, Muller F, Lutsik P, Walter J, Lengauer T, Bock C: Comprehensive analysis of DNA methylation data with rnbeads. *Nat Methods.* 2014;11:1138-1140.
- 93 Maksimovic J, Gordon L, Oshlack A: Swan: Subset-quantile within array normalization for illumina infinium humanmethylation450 beadchips. *Genome Biol.* 2012;13:R44.
- 94 Houseman EA, Accomando WP, Koestler DC, Christensen BC, Marsit CJ, Nelson HH, Wiencke JK, Kelsey KT. DNA methylation arrays as surrogate measures of cell mixture distribution. *BMC Bioinformatics.* 2012;13:86.
- 95 Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. Limma powers differential expression analyses for rna-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:e47.

- 96 Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, R VL, Clark SJ, Molloy PL. De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics Chromatin*. 2015;8:6.
- 97 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:15545-50.
- 98 Zhang B, Kirov S, Snoddy J. Webgestalt: An integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res*. 2005;33:W741-8.
- 99 Azzi S, Steunou V, Rousseau A, Rossignol S, Thibaud N, Danton F, Le Jule M, Gicquel C, Le Bouc Y, Netchine I. Allele-specific methylated multiplex real-time quantitative pcr (asmm rtq-pcr), a powerful method for diagnosing loss of imprinting of the 11p15 region in russell silver and beckwith wiedemann syndromes. *Hum Mutat*. 2011;32:249-58.
- 100 Chen S, Mukherjee N, Janjanam VD, Arshad SH, Kurukulaarachy RJ, Holloway JW, Zhang H, Karmaus W. Consistency and variability of DNA methylation in women during puberty, young adulthood, and pregnancy. *Genet Epigenet*. 2017;9:1179237X17721540.
- 101 Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: Survey and summary. *Nucleic Acids Res*. 2003;31:532-50.
- 102 Lupo A, Cesaro E, Montano G, Zurlo D, Izzo P, Costanzo P. Krab-zinc finger proteins: A repressor family displaying multiple biological functions. *Curr Genomics*. 2013;14:268-78.

- 103 Strogantsev R, Krueger F, Yamazawa K, Shi H, Gould P, Goldman-Roberts M, McEwen K, Sun B, Pedersen R, Ferguson-Smith AC. Allele-specific binding of zfp57 in the epigenetic regulation of imprinted and non-imprinted monoallelic expression. *Genome Biol.* 2015;16:112.
- 104 Li X, Ito M, Zhou F, Youngson N, Zuo X, Leder P, Ferguson-Smith AC. A maternal-zygotic effect gene, zfp57, maintains both maternal and paternal imprints. *Dev Cell.* 2008;15:547-57.
- 105 Mackay DJ, Callaway JL, Marks SM, White HE, Acerini CL, Boonen SE, Dayanikli P, Firth HV, Goodship JA, Haemers AP, Hahnemann JM, Kordonouri O, Masoud AF, Oestergaard E, Storr J, Ellard S, Hattersley AT, Robinson DO, Temple IK. Hypomethylation of multiple imprinted loci in individuals with transient neonatal diabetes is associated with mutations in zfp57. *Nat Genet.* 2008;40:949-51.
- 106 Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DR. Pseudogenes: Pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA.* 2011;17:792-8.
- 107 Thompson EE, Nicodemus-Johnson J, Kim KW, Gern JE, Jackson DJ, Lemanske RF, Ober C. Global DNA methylation changes spanning puberty are near predicted estrogen-responsive genes and enriched for genes involved in endocrine and immune processes. *Clin Epigenetics.* 2018;10:62.
- 108 Helena Mangs A, Morris BJ. The human pseudoautosomal region (par): Origin, function and future. *Curr Genomics.* 2007;8:129-36.
- 109 Spatz A, Borg C, Feunteun J. X-chromosome genetics and human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:617-29.

- 110 Tukiainen T, Villani AC, Yen A, Rivas MA, Marshall JL, Satija R, Aguirre M, Gauthier L, Fleharty M, Kirby A, Cummings BB, Castel SE, Karczewski KJ, Aguet F, Byrnes A, Lappalainen T, Regev A, Ardlie KG, Hacohen N, MacArthur DG. Landscape of x chromosome inactivation across human tissues. *Nature*. 2017;550:244-8.
- 111 Zhang Y, Castillo-Morales A, Jiang M, Zhu Y, Hu L, Urrutia AO, Kong X, Hurst LD. Genes that escape x-inactivation in humans have high intraspecific variability in expression, are associated with mental impairment but are not slow evolving. *Mol Biol Evol*. 2013;30:2588-601.
- 112 Skordis N, Ferrari E, Antoniadou A, Phylactou LA, Fanis P, Neocleous V. GnRH-dependent precocious puberty manifested at the age of 14 months in a girl with 47,xxx karyotype. *Hormones (Athens)*. 2017;16:209-11.
- 113 Grosso S, Anichini C, Berardi R, Balestri P, Pucci L, Morgese G. Central precocious puberty and abnormal chromosomal patterns. *Endocr Pathol*. 2000;11:69-75.
- 114 Giorda R, Bonaglia MC, Beri S, Fichera M, Novara F, Magini P, Urquhart J, Sharkey FH, Zucca C, Grasso R, Marelli S, Castiglia L, Di Benedetto D, Musumeci SA, Vitello GA, Failla P, Reitano S, Avola E, Bisulli F, Tinuper P, Mastrangelo M, Fiocchi I, Spaccini L, Torniero C, Fontana E, Lynch SA, Clayton-Smith J, Black G, Jonveaux P, Leheup B, Seri M, Romano C, dalla Bernardina B, Zuffardi O. Complex segmental duplications mediate a recurrent dup(x)(p11.22-p11.23) associated with mental retardation, speech delay, and eeg anomalies in males and females. *Am J Hum Genet*. 2009;85:394-400.
- 115 Perrier AL, Cousin X, Boschetti N, Haas R, Chatel JM, Bon S, Roberts WL, Pickett SR, Massoulie J, Rosenberry TL, Krejci E. Two distinct proteins are associated with tetrameric acetylcholinesterase on the cell surface. *J Biol Chem*. 2000;275:34260-5.

- 116 Navaratnam DS, Fernando FS, Priddle JD, Giles K, Clegg SM, Pappin DJ, Craig I, Smith AD. Hydrophobic protein that copurifies with human brain acetylcholinesterase: Amino acid sequence, genomic organization, and chromosomal localization. *J Neurochem.* 2000;74:2146-53.
- 117 Edgar RD, Jones MJ, Meaney MJ, Turecki G, Kobor MS. Beacon: A tool for interpreting DNA methylation findings from blood in the context of brain. *Transl Psychiatry.* 2017;7:e1187.
- 118 Farre P, Jones MJ, Meaney MJ, Emberly E, Turecki G, Kobor MS. Concordant and discordant DNA methylation signatures of aging in human blood and brain. *Epigenetics Chromatin.* 2015;8:19.

9 Apêndices

Bessa DS, Macedo DB, Brito VN, França MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, Silveira LG, Hummel T, Bergadá I, Braslavsky D, Abreu AP, Dauber A, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. High frequency of *MKRN3* mutations in male central precocious puberty previously classified as idiopathic. *Neuroendocrinology*. 2017;105(1):17-25.

Original Paper

Neuro
endocrinologyNeuroendocrinology
DOI: 10.1159/000446963Received: February 15, 2016
Accepted after revision: May 18, 2016
Published online: May 26, 2016

High Frequency of *MKRN3* Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic

Danielle S. Bessa^a Delanie B. Macedo^a Vinicius N. Brito^a Monica M. França^a
Luciana R. Montenegro^a Marina Cunha-Silva^a Leticia G. Silveira^a
Tiago Hummel^a Ignacio Bergadá^b Debora Braslavsky^b Ana Paula Abreu^c
Andrew Dauber^d Berenice B. Mendonca^a Ursula B. Kaiser^c
Ana Claudia Latronico^a

^aUnidade 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;

^bCentro de Investigaciones Endocrinológicas "Dr. César Bergadá", Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina;

^cDivision of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Mass., and ^dDivision of Endocrinology, Cincinnati Children's Hospital Medical Center, Cincinnati, Ohio, USA

Key Words

MKRN3 gene · Male precocious puberty ·
Gonadotropin-releasing hormone · Genetics

Abstract

Background/Aims: Recently, loss-of-function mutations in the *MKRN3* gene have been implicated in the etiology of familial central precocious puberty (CPP) in both sexes. We aimed to analyze the frequency of *MKRN3* mutations in boys with CPP and to compare the clinical and hormonal features of boys with and without *MKRN3* mutations. **Methods:** This was a retrospective review of clinical, hormonal and genetic features of 20 male patients with idiopathic CPP evaluated at an academic medical center. The entire coding regions of *MKRN3*, *KISS1* and *KISS1R* genes were sequenced. **Results:** We studied 20 boys from 17 families with CPP. All of them had normal brain magnetic resonance imaging.

Eight boys from 5 families harbored four distinct heterozygous *MKRN3* mutations predicted to be deleterious for protein function, p.Ala162Glyfs*14, p.Arg213Glyfs*73, p.Arg328Qys and p.Arg365Ser. One boy carried a previously described *KISS1*-activating mutation (p.Pro74Ser). The frequency of *MKRN3* mutations among these boys with idiopathic CPP was significantly higher than previously reported female data (40 vs. 6.4%, respectively, $p < 0.001$). Boys with *MKRN3* mutations had typical clinical and hormonal features of CPP. Notably, they had later pubertal onset than boys without *MKRN3* abnormalities (median age 8.2 vs. 7.0 years, respectively, $p = 0.033$). **Conclusion:** We demonstrated a high frequency of *MKRN3* mutations in boys with CPP, previously classified as idiopathic, suggesting the importance of genetic analysis in this group. The boys with CPP due to *MKRN3* mutations had classical features of CPP, but with puberty initiation at a borderline age.

© 2016 S Karger AG, Basel

KARGER

© 2016 S Karger AG, Basel
0028-3835/16/0000-0000\$39.50/0E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/neh

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

Introduction

Normal human puberty is triggered by the pulsatile release of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) from the hypothalamus to stimulate the secretion of luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH) from the anterior pituitary, which leads to the consequent activation of gonadal function [1]. During the childhood years, neurons secreting GnRH are subjected to persistent transsynaptic inhibition by mechanisms that are not completely understood [2]. The initiation of puberty requires loss of inhibitory inputs and gain in excitatory inputs to the complex GnRH neuronal network [2, 3]. The beginning of puberty in boys is marked by testicular enlargement, assessed as testicular volume >4 ml or testicular length >2.5 cm (genital Tanner stage 2) [1]. A mean age at male pubertal onset of 11.6 years has been described in past decades, but more recent studies have suggested that boys are entering puberty earlier [4–6].

Sexual precocity in boys is defined by the development of secondary sexual characteristics before the age of 9 years [7]. The most common mechanism of progressive precocious puberty is early activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (central precocious puberty, CPP) [1]. Diagnostic confirmation of CPP relies on the demonstration of pubertal basal and/or GnRH-stimulated LH levels [1, 8]. CPP may result from a central nervous system (CNS) lesion, such as hypothalamic hamartoma, astrocytoma, arachnoid cyst or hydrocephalus [1, 9]. When no cause is identified, it is called idiopathic CPP [1]. Interestingly, idiopathic CPP is almost 10 times less frequent in boys than in girls [10, 11]. Among boys with CPP, a higher prevalence of CNS lesions has been demonstrated (40–90%), indicating the need for brain magnetic resonance imaging (MRI) in all boys with CPP [1, 9, 11, 12]. However, a recent study suggested that the number of cases of male idiopathic CPP is increasing over time [13].

The factors that regulate the onset of puberty remain a mystery. Certainly, genetic, nutritional, environmental, socioeconomic and epigenetic factors are important regulators of the initiation of puberty [2, 14–16]. The role of genetic factors in pubertal timing is illustrated by the occurrence of familial CPP, which is defined by the presence of more than one affected member in a family [16]. Currently, loss-of-function mutations in the makorin ring finger protein 3 (*MKRN3*) gene are the most frequent known genetic cause of familial CPP, affecting both sexes [17–19]. Other than mutations in *MKRN3*, only one oth-

er genetic defect in association with male idiopathic CPP has been reported, in a boy with a gain-of-function mutation in *KISS1* [20].

Limited research has been conducted in boys with CPP in the absence of CNS abnormalities. To date, little clinical and hormonal data from males with CPP or early puberty caused by *MKRN3* mutations have been reported [17, 21–23]. The aims of the present study were to describe the clinical, hormonal and genetic features of boys with CPP due to *MKRN3* mutations, to compare their phenotypes with that of boys with idiopathic CPP, and to assess the frequency of *MKRN3* mutations in boys with idiopathic CPP.

Patients and Methods

A total of 254 consecutive patients (234 girls and 20 boys) with CPP were referred for clinical and/or genetic evaluation to the Endocrinology Unit at São Paulo University from 1998 to 2015. In all of them, CNS abnormalities were excluded by MRI. Boys with idiopathic CPP had different origins (8 Brazilians, 3 Greeks, 3 Turkish, 3 Argentinians, 2 Americans and 1 Belgian). Nine of them (9/20, 45%) had first-degree relatives with a history of premature sexual development. Patients 10 and 11 were brothers from a Brazilian family, and patients 15, 16 and 17 were also brothers from an Argentinian family (table 1). Idiopathic CPP in boys was diagnosed based on the presence of genital Tanner stage 2 (testicular volume >4 ml or length >2.5 cm) before the age of 9 years, pubertal basal and/or GnRH-stimulated LH levels, and normal brain MRI [8, 24–26]. Six male cases (patients 9 to 14, table 1) have been previously reported [17, 20]. This study was approved by the local ethics committee, and written informed consent was obtained from the parents of the children.

Hormone Assays

Serum LH, FSH and testosterone concentrations were measured by ultrasensitive assays (immunofluorometric assay – IFMA, immunochemiluminometric assay – ICMA or electrochemiluminometric assay – ECLIA) with good correlation among them. The interassay and intraassay coefficients of variation were 5% or less for all assays. For IFMA, serum LH and FSH concentrations were determined by commercial, solid phase, two-site fluorimmunoassays (FIA; AutoDELFIA hLH Spec and AutoDELFIA hFSH; Wallac Oy, Turku, Finland), and serum testosterone concentrations were measured by commercial solid-phase FIAs (AutoDELFIA Testosterone; Wallac Oy). Functional sensitivity was set at 0.61 IU/l for LH, 1.01 IU/l for FSH and 14 ng/dl for testosterone. For ICMA, LH and FSH were measured using an Immulite 1000 automated system and commercial kits (Diagnostic Products Corp., Medlab, Los Angeles, Calif., USA). Sensitivity was set at 0.1 IU/l for both LH and FSH and 19 ng/dl for testosterone [26]. Finally, for ECLIA, commercial kits for LH (Ref. 11732234) and FSH (Ref. 11775863) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) were used and assessed in the modular Cobas e601 analyzer. The functional sensitivities of both LH and FSH assays were 0.1 U/l, according to the second WHO IS80/552 for LH and the sec-

Table 1. Clinical, hormonal and genetic features of 20 boys from 17 families with idiopathic CPP

Family No.	Patient No.	Origin	Initial clinical manifestation (age, years)	Time of diagnosis			BA years	LH, IU/l		Basal FSH, IU/l	T, ng/dl	Hormone assay	Familial case	Genetic analysis
				age years	genital Tanner stage	BMI Z-score		basal	after GnRH					
I	1	Turkey	Penis enlargement and pubarche (2.4)	3.4	2	4.0	5	6.7	n.a.	5.9	42	ICMA	No	–
II	2	Turkey	Penis enlargement (0.9)	1.4	2	n.a.	3	1.2	23.7	5.1	297	ICMA	No	–
III	3	Turkey	Penis enlargement and pubarche (4.0)	4.2	2	2.0	5	6.0	n.a.	3.8	160	ECLIA	No	–
IV	4	Brazil	Testicular enlargement and pubarche (8.0)	10.1	3	0.2	13	0.9	8.4	2.5	68	IFMA	No	–
V	5	Brazil	Pubarche (7.0) and testicular enlargement (9.0)	9.8	2	n.a.	n.a.	0.7	18.0	1.0	75.7	IFMA	No	–
VI	6	Brazil	Testicular enlargement and pubarche (8.0)	10.4	3	0.9	13	2.5	n.a.	1.3	163	IFMA	No	–
VII	7	Brazil	Testicular enlargement (7.0) and pubarche (9.0)	8.7	2	0.3	8	1.2	33.4	2.5	19	IFMA	No	–
VIII	8	Brazil	Pubarche (2.0), testicular and penis enlargement (3.0)	5.1	4	1.0	13	1.1	n.a.	1.1	92	IFMA	No	–
IX	9	Brazil	Pubarche and penis enlargement (1.0)	1.4	2	n.a.	3	11.5	47.2	8.3	600	RIA	No	KISS1 (p.Pro74Ser)
X	10	Brazil	Testicular enlargement and pubarche (5.9)	8.1	3	0.9	10	1.2	6.7	1.5	116	ICMA	Yes	MKRN3 (p.Ala162Glyfs*14)
	11		Testicular enlargement and pubarche (unknown)	9.7	3	1.4	9.7	1.6	10.9	0.8	548	ICMA		
XI	12	Belgium	Testicular enlargement and pubarche (unknown)	9.7	3	1.2	12	2.0	19.5	4.4	67	ICMA	Yes	MKRN3 (p.Arg365Ser)
XII	13	USA	Testicular enlargement and pubarche (8.5)	8.8	3	n.a.	11.5	4.1	n.a.	3.1	216	ICMA	Yes	MKRN3 (p.Ala162Glyfs*14)
XIII	14	USA	Testicular enlargement (8.0)	8.7	3	2.2	11	2.9	20.0	2.5	78	ICMA	Yes	MKRN3 (p.Arg213Glyfs*73)
XIV	15	Argentina	Testicular enlargement (7.5)	8.4	3	1.18	10	1.1	10.2	1.5	466	ICMA	Yes	MKRN3 (p.Arg328Cys)
	16		Testicular enlargement (8.5)	9.8	3	0.19	11	1.4	n.a.	2.4	200	ICMA		
	17		Testicular enlargement (8.6)	8.6	2	0.14	9	0.7	n.a.	1.2	<10	ICMA		
XV	18	Greece	Pubarche and testicular enlargement (unknown)	9.5	3	2.4	12	4.7	21.5	5.5	40.9	ECLIA	No	–
XVI	19	Greece	Pubarche and testicular enlargement (7.8)	8.8	2	1.7	10.5	1.2	14.2	1.9	27.7	ECLIA	Yes	–
XVII	20	Greece	Pubarche and testicular enlargement (8.0)	10	4	1.7	13	1.5	17.5	0.7	243	ECLIA	No	–

BA = Bone age; T = testosterone; n.a. = not available.

and IRP78/549 for FSH. For total testosterone, functional sensitivity was set at 12 ng/dl. For the acute GnRH stimulation test, serum LH was measured at –15, 0, 15, 30, 45 and 60 min after i.v. administration of 100 µg of GnRH. Basal LH levels >0.6 U/l (IFMA) or 0.2 U/l (ICMA and ECLIA) were considered as pubertal levels, and a GnRH-stimulated LH peak >9.6 U/l (IFMA) or 5.0 U/l (ICMA and ECLIA) was considered as a pubertal response [8, 24–26]. In only 1 case (patient 9, table 1), was the hormonal profile measured by radioimmunoassay (RIA), and a GnRH-stimulated LH peak >25 U/l was considered as a pubertal response [20]. Basal testosterone levels higher than 19 ng/dl (IFMA), 14 ng/dl (ICMA and ECLIA) or 30 ng/dl (RIA) were considered as pubertal values.

Genetic Analyses

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes from all patients using standard procedures. The single exon of *MKRN3* (GenBank accession No. NC_000015.9) was amplified by PCR followed by automated sequencing of the products in all 20 boys [27]. The boys without mutations in the coding sequence of *MKRN3* were screened for abnormalities in the promoter region of *MKRN3*. A 1,000-bp region (–750 to +350 in relation to the transcriptional start site) of the *MKRN3* gene, including putative transcription factor motifs (PEA3, SRE, SRF, C/EBP, AP2, testis-R), was amplified by PCR followed by automated sequencing.

Additionally, all patients were screened for mutations in *KISS1* and *KISS1R* genes [20, 28]. The promoter region and the three exons of the *KISS1* gene (GenBank accession No. NC_000001.10) were amplified by PCR followed by automated sequencing of the products [20]. The entire coding region and the exon-intron boundaries of *KISS1R* (GenBank accession number NC_000019.9) were also amplified by PCR and sequenced on an automated sequencer [28].

Two databases (1000 Genomes and NHLBI EVS) were used to exclude common variants (minor allele frequency >1%) [29, 30]. Computational algorithms (PolyPhen-2, SIFT, Panther and MutationTaster) were used to predict the pathogenicity of the variants [31, 32].

Statistical Analyses

Data are presented as median and range. The nonparametric Mann-Whitney U test was used to compare clinical and hormonal data between patients with and without *MKRN3* mutations.

A previously reported female cohort assembled by São Paulo University composed of 234 girls from 221 families with idiopathic CPP was used for statistical comparison between boys and girls [17, 27]. *MKRN3* mutations were identified in 15 girls (11 of them were unrelated) in this large cohort. The χ^2 test was applied to analyze the association between categorical variables, considering both the entire group and only index cases. Statistical analyses were performed using the software SigmaStat for Windows 3.5, and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

The clinical and hormonal features of the 20 boys with idiopathic CPP are described in table 1. The median age at pubertal onset in these boys was 7.5 years (ranging from 0.9 to 8.6 years). Testicular enlargement and pubarche were reported as the first signs of puberty in 45% of the boys. At the time of first evaluation (median age 8.7 years), genital Tanner stage 3 was observed in 50% of the boys. The median Δ bone age – chronological age was 1.7 years (ranging from 0 to 7.9 years). The median body mass index (BMI) Z-score was 1.2 (ranging from 0.1 to 4.0). All boys had pubertal basal LH levels (median 1.4 IU/l, ranging from 0.7 to 6.7 IU/l). The median GnRH-stimulated LH peak was 17.7 IU/l (ranging from 6.7 to 33.4 IU/l). The median testosterone level was 104 ng/dl (ranging from 19 to 548 ng/dl). One patient (patient 17, table 1) had prepubertal testosterone level despite pubertal basal LH, and he was excluded from the testosterone level analysis.

Genetic Findings

Four *MKRN3* mutations were detected in 8 boys (patients 10 to 17, table 1) from 5 families with CPP. Three mutations have been reported previously, including 2

frameshift (p.Ala162Glyfs*14 and p.Arg213Glyfs*73) and one missense (p.Arg365Ser) mutations [17]. Automated sequencing of *MKRN3* revealed one novel missense variant (p.Arg328Cys) in the Argentinean family, comprised of 3 brothers with CPP. All four *MKRN3* variants were not identified in population database (1000 Genomes and NHLBI EVS) and were predicted to be 'damaging' or 'disease causing' by four different *in silico* programs, suggesting deleterious effect. A *KISS1*-activating mutation (p.Pro74Ser) was previously identified in one boy with sporadic CPP (patient 9, table 1) [20]. The other 11 boys did not have any detectable rare coding variants (minor allele frequency <1%) in *MKRN3*, *KISS1* or *KISS1R*. The study of the promoter regions of *MKRN3* and *KISS1* revealed no rare variants in this group of boys.

Clinical Features of CPP Boys with *MKRN3* Defects

The age at puberty initiation in the 8 boys with *MKRN3* mutations ranged from 5.9 to 8.6 years (median 8.2 years). Four of them exhibited testicular enlargement and pubarche as the first signs of puberty by medical records, whereas the remaining 4 patients initially presented with only testicular enlargement. At the time of first evaluation, their ages ranged from 8.1 to 9.8 years (median 8.7 years). The Δ bone age – chronological age ranged from 0 to 2.7 years (median 1.7 years). The median BMI Z-score was 1.2 in this group, ranging from 0.1 to 2.2. Median basal and GnRH-stimulated LH levels were 1.5 IU/l (ranging from 0.7 to 4.1 IU/l) and 10.9 IU/l (ranging from 6.7 to 20 IU/l), respectively. The median testosterone level was 200 ng/dl (ranging from 67 to 548 ng/dl). Except for the significantly later pubertal onset in the boys with *MKRN3* mutations (median 8.2 years, ranging from 5.9 to 8.6 years) compared to those without *MKRN3* mutations (median 7.0 years, ranging from 0.9 to 8.0 years), there were no other differences between their clinical and hormonal features (table 2; fig. 1).

Frequency of *MKRN3* Mutations in Boys with Idiopathic CPP

Considering the entire group, the frequency of *MKRN3* mutations among the 20 boys with idiopathic CPP was significantly higher than the female data [8 of 20 boys (40%) vs. 15 of 234 girls (6.4%), $p < 0.001$, by χ^2 test]. When only index cases were considered in this analysis, 3 boys of 17 families (17.6%) versus 11 girls of 221 families (5%) carried *MKRN3* mutations ($p = 0.05$). Of note, 2 boys (patients 12 and 14, table 1) with *MKRN3* mutations belonged to two families whose index cases were females, and they were not included in the latter analysis.

Table 2. Comparison between clinical and hormonal features of boys with and without *MKRN3* mutations

	<i>MKRN3</i> mutations (n = 8)	Idiopathic CPP (n = 11)	p value
Age at pubertal onset, years	8.2 (5.9–8.6)	7.0 (0.9–8.0)	0.033
Age at first evaluation, years	8.7 (8.1–9.8)	8.7 (1.4–10.4)	0.817
BMI, Z-score	1.2 (0.14–2.2)	1.7 (0.2–4.0)	0.314
Bone age advancement, years	1.7 (0–2.7)	1.7 (0–7.9)	0.383
Basal LH, IU/l	1.5 (0.7–4.1)	1.2 (0.7–6.7)	1.000
LH after GnRH, IU/l	10.9 (6.7–20)	18 (8.4–33.4)	0.268
Basal FSH, IU/l	1.9 (0.8–4.4)	2.5 (0.7–5.9)	0.649
Testosterone, ng/dl	200 (67–548)	75.7 (19–297)	0.103

Data are represented as median (range). The boy with a *MKRN3* mutation and testosterone level <10 ng/dl (patient 17, table 1) was excluded from the testosterone level analysis.

Fig. 1. Age at puberty onset in boys with idiopathic and genetic CPP. This information was not clear in 3 of 20 cases, which were excluded from the figure. The dashed line indicates the lower age limit for normal male puberty onset (9.0 years). The one boy with a *KISS1* mutation started puberty at 1.0 year of age. The short horizontal lines indicate the median age at puberty onset (7.0 years in the boys with idiopathic CPP and 8.2 years in those with *MKRN3* mutations). The boys with *MKRN3* mutations had a significantly later pubertal onset compared to those with idiopathic CPP; p value as assessed with Mann-Whitney U test.

Discussion

This study reveals the importance of genetic analysis in boys with idiopathic CPP, especially in those with a family history of premature sexual development. Since the discovery that *MKRN3* deficiency causes familial CPP, 5 other boys with CPP or early puberty due to mutations in this gene have been described [21–23, 33, 34].

To date, there are 10 unrelated families that include boys presenting with CPP or early puberty caused by *MKRN3* defects (table 3). *MKRN3*, an imprinted gene located on the long arm of chromosome 15 (Prader-Willi critical region), encodes makorin ringfinger protein 3, which is the first factor with an inhibitory effect on GnRH secretion. The *MKRN3* protein is derived only from RNA transcribed from the paternally inherited copy of the gene due to maternal imprinting. Segregation analysis of the families with CPP due to *MKRN3* defects clearly demonstrated an autosomal dominant inheritance with complete penetrance [18].

Herein, *MKRN3* mutations were detected in 5 of 17 families (29.4%) with male idiopathic CPP cases. Four different heterozygous loss-of-function *MKRN3* mutations were identified in 8 boys from 5 families. Two of these mutations were frameshift mutations (p.Ala162-Glyfs*14 and p.Arg213Glyfs*73), resulting in premature stop codons. The other two were missense variants (p.Arg328Cys and p.Arg365Ser), located in the C3HC4 RING motif of *MKRN3*, a putative ubiquitin ligase protein domain. Both missense mutations were predicted to be deleterious to protein function. Interestingly, Sattas et al. [23] reported that two *MKRN3* missense mutations (p.Cys340Gly and p.Arg365Ser), both residing in the C3HC4 RING motif, disrupt the three-dimensional structure of the protein, emphasizing the functional effects of these defects. The p.Arg328Cys mutation is also located in the same *MKRN3* domain, suggesting a similar consequence to protein function. All current *MKRN3* loss-of-function mutations identified in CPP patients are illustrated in figure 2.

We demonstrated that boys with CPP due to *MKRN3* mutations started pubertal development at a borderline early age (median 8.2 years) when considering the lower

Table 3. MKRN3 mutations identified in boys with CPP

Family No.	Origin	MKRN3 mutation		Location of MKRN3 mutation in the protein	Affected boys, n	Age at pubertal onset, years	Reference
		DNA	protein				
1	Brazil	475_476insC	Ala162Glyfs*14	N-terminal	2	5.9 Unknown	17
2	Belgium	1095G>T	Arg365Ser	C-terminal (C3HC4 RING motif)	1	Unknown	17
3	USA	475_476insC	Ala162Glyfs*14	N-terminal	1	8.5	17
4	USA	637delC	Arg213Glyfs*73	N-terminal	1	8.0	17
5	Greece	1018T>G	Cys340Gly	C-terminal (C3HC4 RING motif)	1	Unknown	23
6	Germany	331G>T	Glu111*	N-terminal (C3H motif)	1	~9.0	21
7	Israel	1260T>G	His420Gln	C-terminal (C3H motif)	1	Unknown	22
8	Denmark	1034G>A	Arg345His	C-terminal (C3HC4 RING motif)	1	Unknown	34
9	Korea	841C>T	Gln281*	MKRN-specific Cys-His domain	1	Unknown	33
10	Argentina	982C>T	Arg328Cys	C-terminal (C3HC4 RING motif)	3	7.5 8.5 8.6	Current study

Boys from families 1, 2, 3, 4 and 10 were included in the current study. In family 10, father's DNA was not available for segregation analysis. He reported early puberty. In the other 9 families, the affected boys inherited the mutations from their fathers, as expected for the pattern of inheritance.

limit age of 9 years for normal male puberty onset. A similar chronological age at puberty onset in association with *MKRN3* mutations was reported in other recent studies [21, 23, 34]. In contrast, a median age at puberty onset of 6.0 years has been described in girls with CPP caused by *MKRN3* mutations [18, 35]. Therefore, *MKRN3* deficiency has a smaller impact on puberty onset in boys, with affected boys manifesting CPP at an older age than girls. Nevertheless, it must be noted that the determination of age at pubertal onset in boys is a challenge since testicular enlargement is not as obvious as the larche and menarche in girls [10]. The borderline early age at pubertal onset in these boys with *MKRN3* mutations can compromise the precise identification of puberty by parents and general pediatrics, and therefore leading to an underestimated incidence of CPP in this group. Commonly, male patients remember only late events of puberty, such as the age at initiation of full facial shaving and the age at voice change [16, 34, 36, 37].

The median age at puberty onset in CPP boys with *MKRN3* mutations also differs strikingly from that de-

scribed in boys with other causes of premature pubertal development. Boys with CPP due to hypothalamic hamartoma classically manifested physical signs of puberty before 2 years of age [38]. Moreover, the one boy with a gain-of-function mutation in the *KISS1* gene had very early pubertal onset (1.0 year) [20]. In addition, testotoxicosis or familial male-limited precocious puberty, a gonadotropin-independent cause of precocious puberty that exclusively affects boys, usually occurs before 4 years of age [39, 40].

The basal and GnRH-stimulated LH levels were similar in boys with and without *MKRN3* mutations. The serum testosterone levels in boys with *MKRN3* abnormalities ranged from 67 to 548 ng/dl. Notably, 1 boy who carried the p.Arg328Cys mutation (patient 17, table 1) had a prepubertal testosterone level at the first medical evaluation. This was likely because he was at a very early stage of pubertal development at the time of assessment. Treatment was initiated at genital Tanner stage 2, with testes of 4–5 ml, basal LH 0.7 IU/l and basal FSH 1.2 IU/l. At this stage, testicular enlargement is mainly due to Sertoli cell

Fig. 2. Schematic protein structure of MKRN3 and locations of loss-of-function mutations identified in patients with CPP. The three C3H zinc finger motifs are shown in yellow, the C3HC4 RING finger motif in orange, and the MKRN-specific Cys-His domain in green. The numbers correspond to the amino acid positions in the protein. Red arrows indicate the location of all described MKRN3 mutations in patients with CPP; black-red arrows indicate the mutations identified in boys with CPP.

proliferation, and there is very little Leydig cell activity (FSH predominates over LH), explaining the low testosterone level in this case.

The observation that *MKRN3* mutations represented a frequent cause of male CPP led us to hypothesize that boys were more likely than girls to carry *MKRN3* mutations. Indeed, the prevalence of *MKRN3* mutations in boys with unknown cause of CPP (8 of 20 boys, 40%) was significantly higher compared to a large cohort of CPP girls (15 of 234 girls, 6.4%) ($p < 0.001$). However, when only index cases were considered, a higher prevalence of *MKRN3* mutations in male patients (17.6%) compared to female patients (5.0%) was found with a borderline difference ($p = 0.05$). These findings might indicate that male CPP without CNS abnormalities has a greater probability of a genetic etiology.

We do not yet understand why boys with idiopathic CPP may have a higher prevalence of *MKRN3* mutations than girls. Although the mechanism by which the loss of MKRN3 results in early puberty initiation is still not fully understood, the expression pattern of *Mkln3* in the hypothalamus of mice and the ubiquitin ligase protein structure suggest that MKRN3 is inhibiting GnRH secretion during childhood [17, 19]. The similar expression pattern of *Mkln3* in the arcuate nucleus of male and female mice suggests that *Mkln3* inhibitory tonus is present in both sexes but does not entirely rule out a sex-specific action of MKRN3. It is well known that girls undergo puberty initiation at an earlier age than boys and have a higher incidence of CPP [4, 11, 41]. Conversely, boys have a higher incidence of delayed puberty [41]. Based on these observa-

tions, we can speculate that the inhibition of GnRH during childhood is weaker in girls than in boys, and that as a result girls are more prone to the consequences of disruption of the 'brake' restraining puberty initiation.

MKRN3 loss-of-function mutations have been associated with normal CNS MRI in both sexes [17, 27, 33, 34]. In affected boys, the later puberty onset also makes organic, structural causes less likely. These recent observations could modify the clinical decision-making for performing a CNS MRI in this group. In particular, in boys with familial CPP, the genetic study of the *MKRN3* gene could precede the brain MRI. In these cases, MRI should be postponed (nonmutated cases) or completely avoided (mutated cases). Furthermore, this genetic study is less costly than a brain MRI, an imaging exam that frequently requires anesthesia in children [42].

Clearly, recent human studies support that MKRN3 is a strong component of puberty regulation in both sexes [17–19, 43]. Currently, *MKRN3* mutations represent a prevalent cause of familial CPP. In conclusion, this study suggested a higher prevalence of *MKRN3* mutations in boys than in girls with idiopathic CPP. Remarkably, the affected boys had classical features of CPP with pubertal onset at a borderline age.

Acknowledgments

We thank the following pediatric endocrinologists for sending CPP cases for genetic analyses at São Paulo University: Carlos Alberto Longui and Cristiane Kochi (Departamento de Pediatria, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Brazil);

Priscila C. Gagliardi (Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Nemours Children's Clinic, Jacksonville, USA); Francis de Zegher (Department of Pediatrics, University Hospital Gasthuisberg, University of Leuven, Belgium); Sonir R. Antonini and Ana Claudia S. Reis (Departamento de Puericultura e Pediatria, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Brazil); George Chrousos, Evangelia Charmandari and Christie Kourkouti (Division of Endocrinology, Metabolism and Diabetes, First Department of Pediatrics, University of Athens Medical School, Greece); Korcan Demir (Division of Pediatric Endocrinology, Children's Hospital, Gaziantep, Turkey).

This work was supported by: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (to D.S.B. and M.C.S.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 2013/06391-1 (to D.B.M.); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Grant 13/03236-5 (to A.C.L.), and National Institutes of Health R01 HD082314 (to U.B.K.) and F05 HD072773 (to A.P.A.).

Disclosure Statement

The authors have nothing to disclose.

References

- 1 Carel JC, Leger J. Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med* 2008; 358:2366–2377.
- 2 Ojeda SR, Lomniczi A. Puberty in 2013: unravelling the mystery of puberty. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:67–69.
- 3 Ojeda SR, Lomniczi A, Mastrorandi C, Heger S, Roth C, Parent AS, Matagne V, Mungenast AE. Mini-review: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 2006; 147: 1166–1174.
- 4 Susman EJ, Houts RM, Steinberg L, Belsky J, Cauffman E, Dehart G, Friedman SL, Roisman GI, Halpern-Felsher BL. Longitudinal development of secondary sexual characteristics in girls and boys between ages 9½ and 15½ years. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2010; 164:166–173.
- 5 Herman-Giddens ME, Steffes J, Harris D, Sora E, Hussey M, Dowshen SA, Wasserman R, Sarwint JR, Smitherman L, Reiter EO. Secondary sexual characteristics in boys: data from the Pediatric Research in Office Settings Network. *Pediatrics* 2012; 130:e1058–e1068.
- 6 Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970; 45:13–23.
- 7 Brunner HG, Otten BJ. Precocious puberty in boys. *N Engl J Med* 1999; 341:1763–1765.
- 8 Macedo DB, Cukier P, Mendonça BB, Latronico AC, Brito VN. Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty (in Portuguese). *Arq Bras Endocrinol Metab* 2014; 58:108–117.
- 9 Choi KH, Chung SJ, Kang MJ, Yoon JY, Lee JE, Lee YA, Shin CH, Yang SW. Boys with precocious or early puberty: incidence of pathological brain magnetic resonance imaging findings and factors related to newly developed brain lesions. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* 2013; 18:183–190.
- 10 Pigneur B, Trivin C, Brauner R. Idiopathic central precocious puberty in 28 boys. *Med Sci Monit* 2008; 14:CR10–CR14.
- 11 Bridges NA, Christopher JA, Hindmarsh PC, Brook CG. Sexual precocity: sex incidence and aetiology. *Arch Dis Child* 1994; 70:116–118.
- 12 De Sanctis V, Corrias A, Rizzo V, Bertelloni S, Urso L, Galluzzi F, Pasquino AM, Pozzan G, Guarneri MP, Cisternino M, De Luca F, Gargantini L, Pilotta A, Sposito M, Tonini G. Etiology of central precocious puberty in males: the results of the Italian Study Group for Physiopathology of Puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2000; 13(suppl 1):687–693.
- 13 Alikasifoglu A, Vurali D, Gonc EN, Ozon A, Kandemir N. Changing etiological trends in male precocious puberty: evaluation of 100 cases with central precocious puberty over the last decade. *Horm Res Paediatr* 2015; 83:340–344.
- 14 Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2364–2368.
- 15 Lee HS, Park HK, Ko JH, Kim YJ, Hwang JS. Impact of body mass index on luteinizing hormone secretion in gonadotropin-releasing hormone stimulation tests of boys experiencing precocious puberty. *Neuroendocrinology* 2013; 97:225–231.
- 16 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.
- 17 Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med* 2013; 368:2467–2475.
- 18 Bulcao Macedo D, Nahime Brito V, Latronico AC. New causes of central precocious puberty: the role of genetic factors. *Neuroendocrinology* 2014; 100:1–8.
- 19 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:R131–R139.
- 20 Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, Bianco SD, Kuohung W, Xu S, Gryngarten M, Escobar ME, Arnold IJ, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:2276–2280.
- 21 Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr* 2014; 82:122–126.
- 22 de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod* 2014; 29:2838–2843.
- 23 Sattas N, Dacou-Voutetakis C, Karantzis M, Kanaka-Gantenben 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.
- 24 Brito VN, Batista MC, Borges MF, Latronico AC, Kohek MB, Thirone AC, Jorge BH, Arnold IJ, Mendonça BB. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3539–3544.
- 25 Neely EK, Hintz RL, Wilson DM, Lee PA, Gautier T, Argente J, Stene M. Normal ranges for immunochemiluminometric gonadotropin assays. *J Pediatr* 1995; 127:40–46.
- 26 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; 92:1424–1429.
- 27 Macedo DB, Abreu AP, Reis AC, Montenegro LR, et al. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene *makorin ring finger 3*. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:E1097–E1103.
- 28 Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008; 358:709–715.
- 29 San Lucas FA, Wang G, Sheet P, Peng B. Integrated annotation and analysis of genetic variants from next-generation sequencing studies with variant tools. *Bioinformatics* 2012; 28:421–422.

- 30 National Heart, Lung, and Blood Institute Exome variant server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP). <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> 2013.
- 31 Frouios 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; 102:223–228.
- 32 Min L, Nie M, Zhang A, Wen J, Noel SD, Lee V, Carroll RS, Kaiser UB: Computational analysis of missense variants of G protein-coupled receptors involved in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Neuroendocrinology* 2016; 103:230–239.
- 33 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* 2015; 48:118–122.
- 34 Kansakoski 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; 78:709–711.
- 35 Smon D, Bai J, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, Houang M, Jesuran Perelroizen M, deFilippo GP, Salerno M, Smonin G, Reynaud R, Carel JC, Leger J, de Roux N: Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol* 2015; 174: 1–8.
- 36 Juul A, Magnusdottir S, Scheike T, Prytz S, Skakkebaek NE: Age at voice break in Danish boys: effects of pre-pubertal body mass index and secular trend. *Int J Androl* 2007; 30:537–542.
- 37 Harries ML, Walker JM, Williams DM, Hawkins S, Hughes IA: Changes in the male voice at puberty. *Arch Dis Child* 1997; 77:445–447.
- 38 de Brito VN, Latronico AC, Arnhold LJ, Lo LS, Domenice S, Albano MC, Fraga MC, Mendonça BB: Treatment of gonadotropin dependent precocious puberty due to hypothalamic hamartoma with gonadotropin releasing hormone agonist depot. *Arch Dis Child* 1999; 80: 231–234.
- 39 Schedewie HK, Reiter EO, Beitins IZ, Seyed S, Wooten VD, Jimenez JF, Aiman EJ, DeVane GW, Redman JF, Elders MJ: Testicular Leydig cell hyperplasia as a cause of familial sexual precocity. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52: 271–278.
- 40 Reiter EO, Brown RS, Longcope C, Beitins IZ: Male-limited familial precocious puberty in three generations. Apparent Leydig-cell autonomy and elevated glycoprotein hormone alpha subunit. *N Engl J Med* 1984; 311:515–519.
- 41 Bianco SD: 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 (Lausanne)* 2012; 3:149.
- 42 Latronico AC, Brito VN, Carel JC: Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4: 265–274.
- 43 Hagen CP, Sorensen K, Mieritz MG, Johannsen TH, Almstrup K, Juul A: Circulating MKRN3 levels decline prior to pubertal onset and through puberty: a longitudinal study of healthy girls. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100:1920–1926.

Macedo DB, Silveira LF, **Bessa DS**, Brito VN, Latronico AC. Sexual precocity - genetic bases of central precocious puberty and autonomous gonadal 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/KISS1R*) 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].