

FLÁVIA REZENDE TINANO

Caracterização clínica e genética da 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

2023

FLÁVIA REZENDE TINANO

Caracterização clínica e genética da puberdade precoce central familiar

Versão Original

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

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tinano, Flavia Rezende
Caracterização clínica e genética da puberdade
precoce central familiar / Flavia Rezende Tinano. --
São Paulo, 2023.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Puberdade precoce familiar
2.Puberdade precoce monogênica 3.Regulação genética
da puberdade 4.MKRN3 5.DLK1 6.MECP2

USP/FM/DBD-237/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

À minha **família**,
pelo apoio incondicional,
e por vibrarem a cada conquista minha.
Ao meu **marido** e companheiro de vida,
por embarcar comigo
nas muitas aventuras desses últimos 4 anos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter colocado tantas pessoas especiais em meu caminho, sem as quais essa tese não seria possível!

Aos meus pais, Toninho e Marilene, que me ensinaram desde cedo a buscar o conhecimento e ir atrás dos meus sonhos. Meu pai, exemplo de médico, e minha mãe, a professora mais paciente e didática que já conheci; cada um a seu modo me fizeram o que sou hoje. À minha irmã Andréia, pela amizade, companheirismo, apoio e incentivo; por estar sempre presente e trazer alegria e leveza à minha vida. Poder contar com o porto seguro de vocês foi o que sempre me fez ir mais longe. Obrigada por tanto!

Ao meu marido Matheus, que topou a aventura de desbravar a cidade de São Paulo comigo, e depois a aventura ainda maior de me acompanhar no doutorado sanduíche em Boston. Pela compreensão em todos os momentos, pelas “aulas” de Excel e Powerpoint, sem as quais minhas tabelas e apresentações não seriam as mesmas, por escutar meus treinos de apresentações até o ponto de aprender os nomes dos genes, e por me apoiar em tudo que precisei!

À minha querida orientadora, Dra. Ana Claudia Latronico, pela confiança, carinho e incentivo. Por me acolher desde o dia em que bati à sua porta, tão perdida e insegura, e me guiar e orientar com maestria por todo o percurso. Pelo entusiasmo contagiante e por me mostrar o quão longe podemos chegar. Você foi e sempre será uma fonte de admiração e inspiração, e me sinto privilegiada em ter sido sua aluna.

Ao querido Dr. Vinícius Brito, pessoa de gentileza sem igual, que contribuiu com tanto carinho e dedicação para meu aprendizado no ambulatório e na pesquisa.

À Dra. Berenice Mendonça, pelo acolhimento e incentivo, pelo entusiasmo inspirador e por ser esse exemplo de liderança e dedicação.

À Lu Montenegro, que me ensinou com tanta paciência e dedicação os procedimentos de bancada e, com seu jeitinho mineiro de ser, me fez me sentir em casa no LIM/42. Obrigada pela amizade, carinho, e por estar sempre disposta a ajudar, mesmo à distância!

Aos meus colegas de doutorado que trouxeram leveza e alegria aos meus dias: Aline Guimarães, Carlos Seraphim, Larissa Baracho, Aline Bastos e Ludmila Pedrosa. Obrigada pela amizade, companheirismo e torcida!

Ao Dr. Alexander Jorge, Dra. Ana Canton e Dr. Lucas Santana, que tanto me ensinaram e ajudaram nas análises genéticas. À Maiara Piovesan e à toda equipe do LIM/42 pelo auxílio na bancada, em especial à Cidinha, Miriam, Mariana Funari e às secretárias Rosângela e Nildinha (*in memoriam*).

A todos os médicos assistentes da Disciplina de Endocrinologia, com quem tanto aprendi, em especial à Dra. Larissa Gomes, pela oportunidade de dar um próximo passo nesse fascinante universo da pesquisa. A todos os funcionários da Disciplina de Endocrinologia, especialmente Roberta, Rubens, Roseli e Cida.

À Dra. Ursula Kaiser, que me acolheu em seu laboratório de pesquisa durante meu doutorado sanduíche com tanto carinho e generosidade. Obrigada pela incrível oportunidade de aprendizado e crescimento, pelo incentivo e pela confiança. À Rona Carroll, por cuidar de todos os detalhes para o bom funcionamento do laboratório; Dra. Ana Paula Abreu, por ser um exemplo de como a pesquisa pode nos levar longe; Dra. Stephanie Roberts, pelas excelentes contribuições nas discussões; Melissa Magnuson, pelo auxílio no ELISA e por estar sempre pronta a ajudar; e a toda equipe da Dra. Ursula Kaiser. Aos grandes amigos que Boston me deu, Sidney Pereira, que nunca hesitava em parar tudo que estava fazendo para me ajudar e tirar minhas inúmeras dúvidas; e Natalia Boris, minha fiel companheira de cafés que alegrava o laboratório com sua presença, e tanto me ajudou com as coletas nos camundongos. Às queridas Ticiane Paes, que completou nosso grupo de brasileiros com sua gentileza e doçura, e Audrey Fontes, companheira de laboratório, *happy hours* e afins! A toda equipe do Dr. Victor Navarro, em especial aos queridos Mauro, Encarni e Rajae. À Cinthia Meireles, que gentilmente completou meus experimentos após meu retorno ao Brasil. À Delanie Macedo, pela geração dos camundongos *Dlk1-KO* utilizados nessa pesquisa, pela disponibilidade em ajudar e pelo interesse em discutir meus resultados.

Ao Dr. Jesús Argente por sua imensa e valiosa contribuição nesse estudo, e a todos nossos colaboradores nacionais e internacionais.

A todos os pacientes e familiares que colaboraram com nossa pesquisa e nos permitiram tanto aprendizado.

Aos meus padrinhos, tios, tias, primos e primas pela incessante torcida. À minha segunda família; Zézinho, Carmem, Ju e Pedrinho; pelo carinho, apoio, incentivo e torcida. Aos meus amigos de Minas e São Paulo, pela amizade e apoio, em especial à Lu Schivek, que me contagiou com seu entusiasmo pela vida acadêmica

em São Paulo, me incentivou a persistir quando tudo parecia dar errado e me acolheu em sua casa quando precisei. À Nathalia Lisboa, que também me contagiou com sua paixão pelo serviço de Endocrinologia da FMUSP e me apontou o caminho a ser seguido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

*“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)

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

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

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

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

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ANEXOS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	24
1.1 FISILOGIA DA PUBERDADE.....	24
1.1.1 DETERMINAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DA PUBERDADE	26
1.1.2 INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DA PUBERDADE	27
1.1.3 INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DA PUBERDADE	27
1.2 PUBERDADE PRECOCE	27
1.2.1 EPIDEMIOLOGIA DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL.....	28
1.2.2 ETIOLOGIA DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL.....	30
1.2.2.1 Puberdade Precoce Central Familiar	32
1.2.2.2 Puberdade Precoce Central Monogênica	35
1.2.2.2.1 PPC causada por mutações inativadoras do MKRN3.....	35
1.2.2.2.2 PPC causada por mutações inativadoras do DLK1.....	39
1.2.2.2.3 PPC associada a mutações inativadoras do MECP2.....	40
2. JUSTIFICATIVA	42
3. OBJETIVOS	43
4. MÉTODOS	44
4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM PPC FAMILIAL	44
4.1.1 PACIENTES ESTUDADOS	44
4.1.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	44
4.1.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	45
4.1.4 COLETA DE DADOS.....	45
4.1.4.2 Coleta De Dados Familiais	46
4.1.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR	46
4.1.5.1 Coleta de DNA.....	46
4.1.5.2 Sequenciamento por Sanger e Avaliação Retrospectiva de Pacientes com Mutação nos Genes MKRN3 e DLK1	47

4.1.5.3 Estudo por SPLE de Pacientes sem Diagnóstico Genético Estabelecido	47
4.1.5.3.2 Análise de dados provenientes do SPLE	48
4.1.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4.2 ESTUDO EM CAMUNDONGOS.....	51
4.2.1 CAMUNDONGOS ESTUDADOS.....	51
4.2.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS	51
4.2.3 RESSECÇÃO HIPOTALÂMICA E COLETA DE SANGUE.....	51
4.2.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E ANÁLISE QUANTITATIVA DE PCR EM TEMPO REAL.....	53
4.2.5 ANÁLISE DE WESTERN BLOT	53
4.2.6 DOSAGEM SÉRICA DO DLK1 CIRCULANTE	54
4.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM PPC FAMILIAL	56
5.1.1 PREVALÊNCIA DA PPC FAMILIAL ENTRE PACIENTES BRASILEIROS E ESPANHÓIS.....	56
5.1.2 CLASSIFICAÇÃO DO MODO DE TRANSMISSÃO DA PPC FAMILIAL E ANÁLISE DOS HEREDOGRAMAS DO TOTAL DE FAMÍLIAS AVALIADAS	57
5.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE PACIENTES COM PPC FAMILIAL	58
5.1.3.2 Dados de Tratamento com aGnRH em Pacientes com PPC Familiar .	60
5.1.3.3 Dados de Nascimento em Pacientes com PPC Familiar	60
5.1.4 ANÁLISE GENÉTICA	62
5.1.4.2 Variantes patogênicas nos genes MKRN3 e DLK1	64
5.1.4.3 Novos Possíveis Genes Candidatos	64
5.2 ESTUDO EM CAMUNDONGOS.....	67
5.2.1 CONCENTRAÇÕES HIPOTALÂMICAS DE mRNA DOS GENES MKRN3, DLK1 E MECP2 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PUBERAL	67
5.2.2 CONCENTRAÇÕES PROTEICAS HIPOTALÂMICAS DO MKRN3 E DLK1 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PUBERAL.....	70
5.2.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DO DLK1 CIRCULANTE AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PUBERAL EM CAMUNDONGOS WT, DLK1-KO E DLK1-cKO.....	73
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÃO	81
8. ANEXOS	82

9. REFERÊNCIAS.....	85
APÊNDICE.....	93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABraOM	banco de dados: Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	Colégio Americano de Genética Médica e Genômica, <i>The American College of Medical Genetics and Genomics</i>
aGnRH	análogo do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas
AMP	Associação de Patologia Molecular, <i>The Association for Molecular Pathology</i>
ARC	núcleo arqueado hipotalâmico
AVPV	núcleo hipotalâmico anteroventral periventricular
<i>BRWD1</i>	gene <i>Bromodomain and WD repeat domain containing 1</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise em Pesquisa
cDNA	DNA complementar (sintetizado a partir de um molde de RNA mensageiro maduro)
ClinVar	banco de dados que possui informações de significado clínico de variantes descritas
dbscSNV	ferramenta de predição <i>in silico</i> para variantes em regiões consenso para <i>splicing</i>
<i>DLK1</i>	gene <i>Delta-like-homolog type 1</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio-padrão
Dyn	dinorfina
EAP1	fator de estímulo à puberdade
ECLIA	ensaios de eletroquimioluminescência
ELISA	imunoensaios enzimáticos
EP	erro padrão

FIA	fluoroimunoensaios
FSH	hormônio folículo-estimulante
GABA	ácido gama-aminobutírico
<i>GABRA1</i>	gene do receptor GABA-A
gnomAD	banco de dados: <i>Genome Aggregation Database</i>
GnRH	hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas
<i>GNRH1</i>	gene codificador do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas
GTEx	banco de dados: <i>Genotype-Tissue Expression</i>
GWAS	estudos de associação de polimorfismo envolvendo o genoma completo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HHG	hipotálamo-hipófise-gonadal
<i>Hprt</i>	gene <i>Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase</i>
IC	idade cronológica
IFMA	ensaios imunofluorométricos
IGF2BP1	proteína ligadora 1 do fator de crescimento insulino-símile 2
IGV	programa de bioinformática: <i>Integrative Genomics Viewer</i>
IMC	índice de massa corpórea
IO	idade óssea
IQ	intervalo interquartil
<i>KISS1</i>	gene da kisspeptina
<i>KISS1R</i>	gene do receptor da kisspeptina
KNDy	kisspeptina-neurocinina-dinorfina

KO	nocaute genético (deleção gênica)
<i>LEP</i>	gene da leptina
<i>LEPR</i>	gene do receptor da leptina
LH	hormônio luteinizante
LIM/42	Laboratório de Hormônios e Genética Molecular
<i>LIN28B</i>	gene <i>Lin-28 Homolog B</i>
MAF	frequência do alelo menos frequente, <i>minor allele frequency</i>
MBD3	proteína ligadora do DNA metilado tipo 3
MBH	hipotálamo médio-basal
<i>MECP2</i>	gene <i>Methyl-CpG-binding protein 2</i>
miRNAs	microRNAs
<i>MKKS</i>	gene <i>McKusick-Kaufman syndrome</i>
<i>MKRN3</i>	gene <i>Makorin Ring Finger 3</i>
mRNA	RNA mensageiro
NKB	neurocinina B
NOTCH1	receptor 1 da via Notch
<i>NPYR</i>	gene do receptor do neuropeptídeo Y
OMIM	banco de dados: <i>Mendelian Inheritance in Man</i>
P	valor-p ou probabilidade de significância
PABPs	proteínas ligadoras de Poly(A)
PCR	reação em cadeia da polimerase
PN	idade pós-natal
POA	área pré-óptica
PPC	puberdade precoce central

PREF-1	fator 1 pré-adipócito (nomenclatura alternativa do DLK1)
PubMed	ferramenta de busca à base de dados MEDLINE
RNA	ácido ribonucleico
SELA	Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP
SNC	sistema nervoso central
SPLE	sequenciamento paralelo em larga escala
<i>TAC3</i>	gene da neurocinina B
<i>TAC3R</i>	gene do receptor da neurocinina B
TACE	fator de necrose tumoral α
<i>TET2</i>	gene <i>TET Metilcitosine Dioxigenase 2</i>
TTF-1	fator de transcrição da tireoide-1
<i>UGT2B4</i>	gene <i>Uridine diphosphate glycosyltransferase 2 family member 4</i>
VCF	arquivo “ <i>variant call format</i> ” contendo dados do sequenciamento paralelo em larga escala
VUS	variantes de significado incerto, <i>variants of uncertain significance</i>
WES	sequenciamento exômico global, <i>whole-exome sequencing</i>
WT	alelo do tipo selvagem, <i>wild-type</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Regulação hipotalâmica da secreção do GnRH.....	25
Figura 2 - Fluxo da filtragem utilizada para selecionar as variantes encontradas por SPLE.....	50
Figura 3 - Representação dos grupos de camundongos estudados.	52
Figura 4 - Representação das áreas dissecadas do hipotálamo de camundongos..	52
Figura 5 - <i>Western blots</i> mostrando especificidade das bandas encontradas para Mkrn3 e Dlk1.	54
Figura 6 - Prevalência e modo de transmissão da PPC familiar nas famílias estudadas.	56
Figura 7 - Heredogramas de famílias com PPC submetidas ao SPLE por WES (A, B e C) e sequenciamento por painel de genes customizado (D).	62
Figura 8 - Expressão gênica relativa do <i>Mkrn3</i> (mRNA <i>Mkrn3/Hprt</i>) no MBH e POA de camundongos WT de acordo com a idade.....	67
Figura 9 - Expressão gênica relativa do <i>Dlk1</i> (mRNA <i>Dlk1/Hprt</i>) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.....	68
Figura 10 - Expressão gênica relativa do <i>Dlk1</i> (mRNA <i>Dlk1/Hprt</i>) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.....	68
Figura 11 - Expressão gênica relativa do <i>Mecp2</i> (mRNA <i>Mecp2/Hprt</i>) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.....	69
Figura 12 - Expressão gênica relativa do <i>Mecp2</i> (mRNA <i>Mecp2/Hprt</i>) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.....	69
Figura 13 - Expressão proteica relativa do Mkrn3 (Mkrn3/B-actina) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.....	71
Figura 14 - Expressão proteica relativa do Mkrn3 (Mkrn3/B-actina) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.....	71
Figura 15 - Expressão proteica relativa do Dlk1 (Dlk1/B-actina) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.....	72
Figura 16 - Expressão proteica relativa do Dlk1 (Dlk1/B-actina) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.....	72
Figura 17 - Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos WT e <i>Dlk1</i> -KO de acordo com a idade.....	74

Figura 18 – Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos fêmeas WT de acordo com estágio de maturação puberal.	74
Figura 19 - Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos <i>Dlk1</i> -KO x <i>Dlk1</i> -cKO.	75
Figura 20 - Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos WT x <i>Dlk1</i> -cKO pareados por idade (PN120).	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação da incidência de PPC em diferentes estudos nas últimas três décadas.....	30
Tabela 2 - Dados de prevalência dos principais estudos epidemiológicos da PPC familiar.....	34
Tabela 3 - N° de gerações afetadas de acordo com o modo de transmissão da PPC familiar.....	57
Tabela 4 - Características clínico-laboratoriais dos pacientes com diferentes formas de transmissão familiar da PPC.	59
Tabela 5 - Características clínicas de pacientes com PPC familiar antes e depois do tratamento com aGnRH de acordo com o modo de transmissão.....	61
Tabela 6 - Mutações inativadoras nos genes <i>MKRN3</i> e <i>DLK1</i> em pacientes com PPC familiar.....	64
Tabela 7 - Variantes raras de significado incerto em heterozigose identificadas em pacientes com PPC familiar.	66

LISTA DE ANEXOS

Anexo A: Critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas quanto à patogenicidade.

Anexo B: Normas para combinação dos critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas identificadas.

Anexo C: Lista das sequências de oligonucleotídeos utilizadas no sequenciamento por Sanger dos genes *MKRN3* e *DLK1*.

Anexo D: Lista das sequências de oligonucleotídeos utilizadas na PCR em tempo real.

RESUMO

Tinano FR. Caracterização clínica e genética da puberdade precoce central familiar [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

Contexto: A puberdade precoce central (PPC) decorre da reativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), e é considerada familiar quando acomete mais de um membro da mesma família. O reconhecimento desta condição herdada aumentou após a identificação da PPC autossômica dominante com transmissão paterna causada por mutações nos genes *MKRN3* e *DLK1*. Recentemente, variantes raras no gene *MECP2* foram identificadas em crianças com PPC familiar e esporádica. Embora os mecanismos pelos quais o *MKRN3* regula o início da puberdade tenham sido parcialmente elucidados nos últimos anos, o papel do *DLK1* e do *MECP2* na regulação puberal ainda não é compreendido. Apesar do grande número de famílias com transmissão materna da PPC reportadas, as bases genéticas dessa forma herdada de PPC permanecem desconhecidas. **Objetivos:** Calcular a prevalência e determinar os modos de herança da PPC familiar em uma grande coorte multiétnica; comparar características clínica e hormonais, bem como resposta ao tratamento com análogos de GnRH (aGnRH), em crianças com modos distintos de transmissão da PPC familiar; investigar as bases genéticas da PPC familiar e elucidar os mecanismos pelos quais *MKRN3*, *DLK1* e *MECP2* influenciam o início da puberdade. **Métodos:** Avaliação retrospectiva de 586 crianças com diagnóstico de PPC foi realizada. Pacientes com PPC familiar (n= 276) foram submetidos à caracterização clínica e genética. A avaliação genética incluiu a análise de dados de 204 pacientes submetidos ao sequenciamento dos genes *MKRN3* e *DLK1* e 118 indivíduos (provenientes de 58 famílias) submetidos ao sequenciamento paralelo em larga escala. Estudos funcionais foram realizados em camundongos do tipo selvagem (WT), nocaute global de *Dlk1* (*Dlk1*-KO) e nocaute específico de *Dlk1* no sistema nervoso central (*Dlk1*-cKO). Avaliação da expressão hipotalâmica dos genes *Mkfn3*, *Dlk1* e *Mecp2* foi realizada em camundongos WT machos e fêmeas com idades pós-natais (PN) 10, 15, 22, 30 e 60 dias; por meio da quantificação das concentrações de mRNA (*Mkfn3*, *Dlk1* e *Mecp2*) e proteína (*Mkfn3* e *Dlk1*) no hipotálamo médio-basal e área pré-óptica. *Dlk1* sérico circulante foi mensurado e comparado entre machos e fêmeas WT de diferentes idades (PN10 a 60), entre fêmeas WT em diferentes estágios de maturação puberal e entre camundongos *Dlk1*-KO e *Dlk1*-cKO. **Resultados:** A prevalência da PPC familiar foi estimada em 22%. Os modos de transmissão materna e paterna foram os mais frequentes (39 e 38%, respectivamente), seguidos pelos modos de transmissão indeterminada (19%) e simultaneamente materna e paterna (4%). A análise dos heredogramas de famílias com transmissão materna sugeriu herança autossômica dominante com maior penetrância no sexo feminino. As características clínicas e hormonais, bem como a resposta ao tratamento com aGnRH, foram similares entre os pacientes com diferentes formas de transmissão da PPC familiar. Mutações causadoras de perda de função (inativadoras) do *MKRN3* foram a causa mais prevalente de PPC familiar, seguidas pelas mutações inativadoras do *DLK1*, ambas afetando exclusivamente famílias com transmissão paterna. Variantes raras de significado incerto foram identificadas em famílias com PPC de transmissão materna. A expressão hipotalâmica dos genes *Mkfn3* e *Mecp2* se reduziu em

camundongos machos e fêmeas entre a infância e a idade adulta, enquanto a expressão hipotalâmica do *Dlk1* aumentou no mesmo período. Por outro lado, as concentrações séricas de *Dlk1* se reduziram com a progressão da idade e a maturação puberal dos camundongos WT. Camundongos *Dlk1*-KO tiveram concentrações séricas de *Dlk1* indetectáveis ou muito baixas, enquanto camundongos *Dlk1*-cKO tiveram concentrações similares ou maiores que os controles. **Conclusões:** A PPC familiar foi prevalente em nosso estudo, com uma frequência similar de transmissão materna e paterna. Mutações inativadoras dos genes *MKRN3* e *DLK1* foram as principais causas de PPC familiar com transmissão paterna. Nenhuma causa monogênica definitiva foi associada à PPC de transmissão materna. A redução da expressão hipotalâmica dos genes *Mkfn3* e *Mecp2* antes do início da puberdade em camundongos sugere que esses fatores atuem como inibidores do eixo HHG. O papel do *Dlk1* permanece ainda incerto, mas os achados atuais sugerem um papel da sua forma circulante periférica na inibição puberal.

Palavras-chave: Puberdade precoce familiar. Puberdade precoce monogênica. Regulação genética da puberdade. MKRN3. DLK1. MECP2.

ABSTRACT

Tinano FR. Clinical and genetic characterization of familial central precocious puberty [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. 2023.

Context: Central precocious puberty (CPP) results from the reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis and is considered familial when it affects more than one family member. The recognition of this inherited condition increased after the identification of autosomal dominant CPP with paternal transmission caused by mutations in the *MKRN3* and *DLK1* genes. Recently, rare variants in the *MECP2* gene were identified in children with familial and sporadic CPP. While the mechanisms by which *MKRN3* regulates puberty onset have been partially elucidated in recent years, the manner by which *DLK1* and *MECP2* influence pubertal timing have not been determined. Despite the large number of families with maternal transmission of CPP reported, its genetic basis remains unknown. **Objectives:** To characterize the inheritance and estimate the prevalence of familial CPP in a large multiethnic cohort; to compare clinical and hormonal features, as well as treatment response to GnRH analogs (GnRHa), in children with distinct modes of transmission; to investigate the genetic basis of familial CPP; and to investigate the mechanism by which *MKRN3*, *DLK1* and *MECP2* influences pubertal onset. **Methods:** We retrospectively studied 586 children with a diagnosis of CPP. Patients with familial CPP (n=276) were selected for clinical and genetic analysis. The genetic evaluation included analysis of data from 204 patients who underwent sequencing of the *MKRN3* and *DLK1* genes and 118 individuals (from 58 families) who underwent large-scale parallel sequencing. Functional studies were performed in wild-type (WT), global *Dlk1* knockout (*Dlk1*-KO) and specific central nervous system *Dlk1* knockout (*Dlk1*-cKO) mice. Hypothalamic expression of the *Mkfn3*, *Dlk1* and *Mecp2* genes was analyzed in male and female WT mice with postnatal ages (PN) 10, 15, 22, 30 and 60 days by mRNA (*Mkfn3*, *Dlk1* and *Mecp2*) and protein (*Mkfn3* and *Dlk1*) quantification in the medium-basal hypothalamus and pre-optic area. Circulating serum *Dlk1* was measured and compared among WT males and females of different ages (PN10 to 60), as well as WT females at different stages of pubertal maturation, and between *Dlk1*-KO and *Dlk1*-cKO mice. **Results:** The prevalence of familial CPP was estimated at 22%. The maternal and paternal modes of transmission were the most frequent (39 and 38%, respectively), followed by the undetermined (19%) and simultaneously maternal and paternal (4%) forms of transmission. Pedigree analyses of families with maternal transmission suggested an autosomal dominant inheritance with greater penetrance in females. Clinical and hormonal features, as well as treatment response to GnRHa, were similar among patients with different forms of transmission of familial CPP. *MKRN3* loss-of-function mutations were the most prevalent cause of familial CPP, followed by *DLK1* loss-of-function mutations, both affecting exclusively families with paternal transmission. Rare variants of uncertain significance were identified in CPP families with maternal transmission. A decrease in *Mkfn3* and *Mecp2* hypothalamic expression, and an increase in *Dlk1* expression, was seen in male and female mice toward adulthood. Conversely, circulating *Dlk1* levels decreased with progression of age and pubertal maturation in WT mice. *Dlk1*-KO mice had undetectable or extremely

low serum Dlk1 levels, while *Dlk1*-cKO mice had similar or higher serum Dlk1 levels than controls. **Conclusions:** Familial CCP was prevalent in our study, with a similar frequency of maternal and paternal transmission. *MKRN3* and *DLK1* loss-of-function mutations were the major causes of familial CPP with paternal transmission. No definitive monogenic cause was associated with maternally transmitted CCP. The reduction in hypothalamic expression of the *Mkrr3* and *Mecp2* genes before pubertal onset in mice suggests that these factors may inhibit the HPG axis. The role of Dlk1 remains unclear, but current findings suggest a role for its peripheral circulating form in pubertal inhibition.

Keywords: Familial precocious puberty. Monogenic precocious puberty. Genetic regulation of puberty. MKRN3. DLK1. MECP2.

1. INTRODUÇÃO

A puberdade é o processo fisiológico de transição da infância para a vida adulta, na qual tem início o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, a maturação gonadal e aquisição da capacidade reprodutiva. O principal evento que determina a deflagração da puberdade é a reativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). Este eixo, na espécie humana, se ativa primariamente no feto, no período médio-gestacional, seguido por nova ativação logo após o nascimento, em um período denominado mini puberdade, o qual se inicia em média com uma semana de vida e termina por volta dos seis meses de idade nos meninos e três a quatro anos nas meninas.¹ Após o término da mini puberdade, há uma supressão do eixo HHG durante toda a infância, devido à inibição da secreção do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH). O início da puberdade é marcado pelo aumento do número e amplitude dos pulsos de secreção desse hormônio.

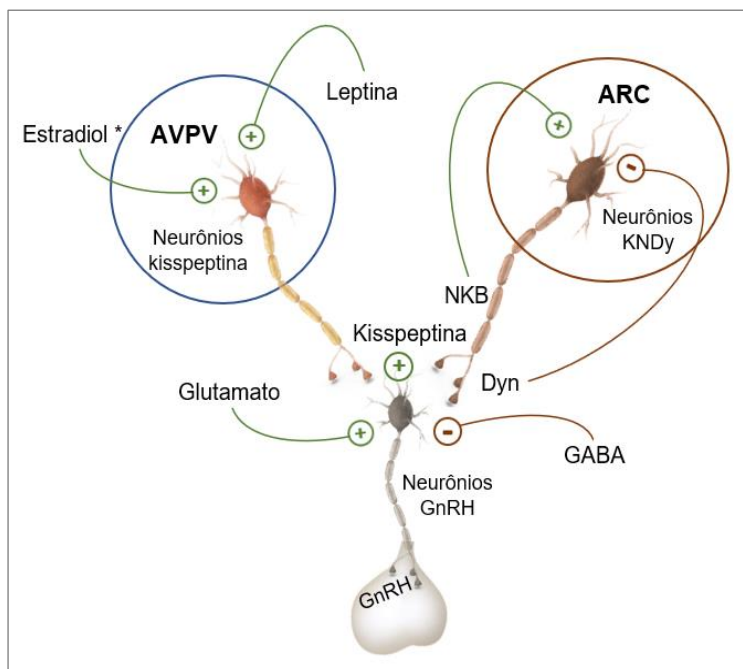
1.1 FISILOGIA DA PUBERDADE

A reativação da secreção do GnRH na puberdade é determinada pela interação de diversos fatores hipotalâmicos e neurotransmissores (Figura 1). Dentre eles, a kisspeptina se destaca como principal componente estimulatório do GnRH. A importância da via da kisspeptina foi reconhecida a partir da identificação de mutações inativadoras no gene do receptor da kisspeptina (*KISS1R*) em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico.² Posteriormente, estudos em animais revelaram que os neurônios secretores de kisspeptina localizados no núcleo arqueado hipotalâmico (ARC) também secretam neurocinina B (NKB) e dinorfina (Dyn – peptídeo opioide endógeno).^{3,4} Nesses neurônios kisspeptina-neurocinina-dinorfina (KNDy) a secreção da kisspeptina é autorregulada pela ação estimulatória da NKB e inibitória da Dyn de forma coordenada.⁴ Outro grupo de neurônios secretores de kisspeptina foi localizado no núcleo anteroventral periventricular (AVPV) em roedores do sexo feminino, com importante papel na retroalimentação positiva dos esteroides sexuais que culmina no pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH).⁵⁻⁷ Outros componentes importantes da via excitatória do GnRH são o glutamato, o fator de transcrição da tireoide-1 (TTF-1), o fator de estímulo à puberdade (EAP1) e as células da glia.⁸⁻¹⁰ O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um dos mais conhecidos inibidores dos neurônios GnRH maduros, e estudos de associação de polimorfismo envolvendo

o genoma completo (GWAS) identificaram variantes em sua via de sinalização associadas à idade de menarca.⁸

Fatores metabólicos periféricos, como leptina, insulina e ghrelina têm importante papel na sinalização do status metabólico para o eixo reprodutivo e deflagração da puberdade. A leptina é produzida pelo tecido adiposo de maneira proporcional aos estoques de energia, e tem importante papel permissivo sobre o eixo HHG, de modo que mutações homozigotas em seu gene codificador (*LEP*) ou no codificador de seu receptor (*LEPR*) são causadoras de hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos.¹¹ A insulina é um importante regulador da produção da leptina, e ainda não está claro se seu papel permissivo sobre o eixo reprodutivo é mediado apenas pelo hormônio leptina ou se ela também exerce efeito direto sobre o hipotálamo.¹¹ A ghrelina é um sinalizador periférico de insuficiência energética sintetizada principalmente no estômago, e tem papel inibitório na secreção pulsátil de GnRH e na resposta do LH ao GnRH.¹¹ A importância da interação entre os eixos metabólico e reprodutivo é ilustrada pelo atraso ou ausência do desenvolvimento puberal que ocorre em meninas submetidas à privação energética crônica (como desnutrição ou anorexia) e, por outro lado, pela antecipação da puberdade observada em meninos e meninas portadores de obesidade.¹⁰

Figura 1 - Regulação hipotalâmica da secreção do GnRH.



Representação dos principais reguladores hipotalâmicos conhecidos da secreção do hormônio hipotalâmico liberador de gonadotrofinas (GnRH): A kisspeptina é secretada pelos neurônios produtores de kisspeptina situados no núcleo hipotalâmico anteroventral paraventricular (AVPV) e pelos neurônios secretores de kisspeptina- neurocinina- dinorfina (KNDy) situados no núcleo arqueado hipotalâmico (ARC). A neurocinina B (NKB) e a dinorfina (Dyn) co-secretadas pelos neurônios KNDy são importantes autorreguladoras desse sistema. O glutamato é um fator estimulatório e o ácido gama-aminobutírico (GABA) um fator inibitório da secreção de GnRH, enquanto a leptina exerce efeito permissivo nos neurônios

kisspeptina. Mecanismo de retroalimentação positiva do estradiol sobre os neurônios kisspeptina do AVPV foi previamente demonstrado em roedores fêmeas.^{5,7}

FONTE: Produção do próprio autor.

1.1.2 DETERMINAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DA PUBERDADE

A influência genética no desenvolvimento puberal foi inicialmente sugerida por observações epidemiológicas, tais como idade semelhante de menarca entre mães e filhas e maior concordância cronológica dos eventos puberais entre membros de um mesmo grupo étnico.^{12,13} Além disso, diversos estudos¹⁴⁻¹⁷ mostraram maior correlação do desenvolvimento puberal entre gêmeos monozigóticos se comparados aos dizigóticos, dentre os quais um grande estudo populacional finlandês¹⁷ estimou, a partir da análise 1.891 pares de gêmeos, a influência genética no desenvolvimento puberal em 88%. Estima-se hoje que 50 a 80% da variação da idade de início da puberdade seja geneticamente determinada.¹¹ Diversos estudos GWAS identificaram centenas de *loci* associados à idade de menarca e ao início da puberdade masculina (avaliada pela idade de mudança no timbre de voz e surgimento de pelos faciais). É interessante notar que vários desse *loci* também foram associados à obesidade.¹⁸ Estudos sobre a regulação genética da puberdade ganharam maior visibilidade após o reconhecimento de causas monogênicas de puberdade precoce central (PPC) nos últimos anos, as quais serão descritas adiante.

A epigenética se refere à modificação da expressão gênica que não decorre de uma alteração na sequência do DNA, e sim de adições químicas ao DNA e/ou às histonas reguladoras da cromatina, culminando no silenciamento ou ativação gênica.¹⁰ A metilação de regiões promotoras do DNA é comumente associada ao silenciamento gênico, e estudos em animais demonstraram que a metilação de genes do grupo Polycomb, os quais atuam como silenciadores da via da kisspeptina, é importante para a deflagração da puberdade.^{19,20} Além disso, o processo de remodelação da cromatina também está implicado na ativação da via da kisspeptina.^{21,22} Recentemente, um estudo do perfil de metilação global de meninas com puberdade fisiológica ou precoce mostrou um aumento da metilação genômica durante o período puberal em relação ao período pré-púberal.²³ Tal fenômeno de hipermetilação de determinadas regiões genômicas durante a puberdade também foi reportado por outros estudos.²⁴⁻²⁷

A importância de mecanismos epigenéticos na deflagração da puberdade ganhou destaque após a identificação de mutações de perda de função (inativadoras) em genes submetidos a *imprinting* genômico (*Makorin Ring Finger 3* [*MKRN3*] e *Delta-like-homolog type 1* [*DLK1*]) causadoras de PPC.^{28,29} O *imprinting* genômico é um

processo de silenciamento gênico estabelecido através da metilação do DNA de regiões promotoras ou reguladoras de determinados genes, que passam a ser expressos de maneira dependente da origem paternal, culminando em uma expressão monoalélica desses genes.¹⁰ Os genes *MKRN3* e *DLK1* são submetidos ao silenciamento do alelo materno, de forma que apenas o alelo paterno é expresso.^{28,29} A associação de genes regulados por *imprinting* com a puberdade foi também destacada por um importante estudo GWAS que mostrou a associação de três *loci* situados em regiões de *imprinting* genômico com a idade da menarca: *DLK1-WDR25*, *MKRN3-MAGEL2* (ambos de expressão alélica paterna, como mencionado acima) e *KCNK9*, este último submetido ao silenciamento do alelo paterno e, portanto, de expressão alélica exclusivamente materna.¹⁸

A regulação epigenética da puberdade conta ainda com a ação de um grupo de RNAs não codificadores denominados microRNAs (miRNAs). Foi demonstrado que os miRNAs miR-200 e miR-155 são essenciais na regulação de fatores de transcrição do GnRH e início do desenvolvimento puberal.³⁰ Mais recentemente, foi demonstrado que o miR-30b contribui para a reativação da secreção pulsátil do GnRH por meio da repressão do *Mkfn3* hipotalâmico em ratos.³¹

1.1.3 INFLUÊNCIA DE FATORES AMBIENTAIS NO DESENVOLVIMENTO DA PUBERDADE

Diversos desreguladores endócrinos, como fitoestrógenos, pesticidas e produtos químicos industriais têm impacto sobre o desenvolvimento puberal por apresentarem propriedades semelhantes aos hormônios sexuais, podendo atuar como agonistas ou antagonistas nos receptores estrogênicos e androgênicos ou por meio de efeitos diretos nos neurônios GnRH. Os efeitos dos desreguladores endócrinos dependem da dose e da duração da exposição, bem como do estágio do desenvolvimento no qual o indivíduo foi exposto e da suscetibilidade individual.³²

1.2 PUBERDADE PRECOCE

A puberdade precoce é definida pelo surgimento dos caracteres sexuais secundários antes dos oito anos em meninas e nove anos em meninos. São consideradas variantes normais da puberdade: telarca precoce isolada, pubarca precoce isolada e sangramento vaginal precoce isolado. Geralmente representam condições benignas e não progressivas, mas requerem acompanhamento para

diagnóstico diferencial e pela da possibilidade de evolução para um quadro de precocidade sexual completa.³³ A puberdade precoce deve ser diferenciada em central (PPC), também denominada verdadeira ou dependente de gonadotrofinas, e periférica, também denominada pseudopuberdade precoce ou independente de gonadotrofinas. Na PPC o desenvolvimento da telarca em meninas ou o aumento do volume testicular em meninos ocorre em decorrência da reativação prematura do eixo HHG; enquanto na puberdade precoce de origem periférica a produção autônoma de esteroides sexuais de origem gonadal, adrenal ou, ainda, a atuação de hormônios esteroides exógenos, podem levar ao desenvolvimento de caracteres sexuais concordantes com o sexo do paciente (padrão isossexual) ou discordantes deste (padrão heterossexual). Tanto a puberdade precoce central quanto a periférica levam a uma aceleração da velocidade de crescimento e avanço na idade óssea, com prejuízo na altura final do paciente; além de impacto emocional e psicossocial. Além disso, a menarca precoce é associada ao aumento do risco de obesidade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes mellitus tipo 2, doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral, câncer estrógeno-dependente e mortalidade cardiovascular.³⁴

1.2.1 EPIDEMIOLOGIA DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A puberdade precoce de origem central é a mais prevalente e tem uma frequência 10 a 20 vezes maior em meninas do que em meninos.¹⁰ Todavia, a incidência e a prevalência da PPC foram avaliadas em poucos estudos. Um recente artigo de revisão cita alguns fatores que contribuem para que essa informação seja ainda imprecisa: 1) O diagnóstico da PPC não depende de uma única variável; 2) a existência de diferentes critérios para definição do limite de idade para diagnóstico; 3) a terminologia confusa pode levar ao diagnóstico errôneo de variantes da normalidade ao invés de PPC; 4) o uso de diferentes critérios radiológicos e bioquímicos para diagnóstico; 5) a existência de diferentes modelos nacionais de registro de dados.³⁵ É interessante notar que diferentes estudos mostraram um aumento na incidência e prevalência da PPC nos últimos anos (Tabela 1). Um estudo epidemiológico espanhol que encontrou uma prevalência média de 1,9 casos de PPC por 10.000 crianças entre 1997 e 2009 (3,7 por 10.000 meninas e 0,05 por 10.000 meninos) observou grande variação na incidência anual dentro do período analisado (entre 0,002 e 0,1 casos novos por 10.000 indivíduos em risco), com aumento notável a partir do ano 2000, principalmente entre as meninas.³⁶ Em 2015, um estudo coreano estimou a

prevalência de PPC no país em 5,6 por 10.000 meninas e 0,17 por 10.000 meninos, notando também um aumento de aproximadamente 15 vezes na incidência anual de PPC entre 2004 e 2010, variando de 0,33 a 5,04 por 10.000 meninas e de 0,03 a 0,12 por 10.000 meninos.³⁷ Curiosamente, em 2018, foi publicado outro estudo coreano que avaliou o mesmo banco de dados entre 2008 e 2014; porém com a inclusão também de meninas e meninos que iniciaram tratamento para PPC até, respectivamente, 9 e 10 anos; considerando um atraso médio de um ano e meio desde o início dos primeiros sinais puberais até o início do tratamento.³⁸ Neste estudo, a incidência média da PPC durante o período estudado foi muito mais alta que a encontrada anteriormente: 26,3 por 10.000 meninas e 0,7 por 10.000 meninos, com um aumento importante também na incidência anual ao longo do período avaliado.³⁸ Ainda em 2018, pesquisadores franceses realizaram um estudo epidemiológico incluindo pacientes com início de tratamento para PPC até os 9 anos em meninas e 10 anos em meninos entre 2011 e 2013, no qual a incidência anual de PPC foi bem mais baixa que a do estudo coreano: 2,7 por 10.000 meninas e 0,2 por 10.000 meninos.³⁹ Mais recentemente, um estudo dinamarquês avaliou a incidência de PPC no país entre 1998 e 2017 em meninas até os 8 ou 9 anos (7,7 por 10.000 e 9,2 por 10.000, respectivamente) e em meninos até os 9 ou 10 anos (0,8 por 10.000 e 0,9 por 10.000, respectivamente).⁴⁰ Os pesquisadores dinamarqueses também observaram aumento da incidência de PPC ao longo do período estudado de 6 vezes nas meninas e 15 vezes nos meninos.⁴⁰ Além disso, foi notável a diferença em relação ao estudo do mesmo banco de dados entre 1993 e 2001, que mostrava uma incidência de PPC de 3 por 10.000 meninas e 0,4 por 10.000 meninos.⁴¹ Nota-se que a diferença dos dados encontrados no mais recente estudo coreano³⁸ em relação aos demais estudos é considerável, e sua razão é desconhecida. Os autores sugerem que a menor heterogeneidade genética coreana poderia contribuir para uma incidência mais elevada de PPC, porém não justificaria um aumento tão grande dessa taxa em um curto período, e, dessa maneira, mais estudos investigando o papel de desreguladores endócrinos e outros possíveis fatores são necessários.³⁸

De maneira interessante, pesquisadores italianos reportaram um aumento na incidência de PPC durante o período de quarentena devido à doença do coronavírus (COVID-19) na Itália, assim como aceleração do desenvolvimento puberal daqueles pacientes previamente diagnosticados com PPC de lenta progressão.⁴² Esses

achados foram posteriormente corroborados por diversos outros estudos em diferentes países.⁴³ Alterações no índice de massa corpórea (IMC), metabolismo da glicose e insulina, tempo de tela, qualidade do sono, níveis de vitamina D e exposição a desreguladores endócrinos são fatores potencialmente relacionados à prematuridade sexual elencados pelos estudos.⁴³

Tabela 1 - Comparação da incidência de PPC em diferentes estudos nas últimas três décadas.

País	Período	Fonte de dados	Incidência por 10.000 (meninas/ meninos)	Ref.
Dinamarca	1993-2001	Registro nacional de pacientes	3,0 / 0,4 ^a	41
Espanha	1997-2009	Centros terciários	0,217 / 0,023 ^b	36
Coréia	2004-2010	Agência nacional de seguro saúde	1,53 / 0,06 ^b	37
França	2011-2013	Base de dados nacional de seguro saúde	2,6 / 0,24 ^a	39
Coréia	2008-2014	Agência nacional de seguro saúde	26,28 / 0,7 ^a	38
Dinamarca	1998-2017	Registro nacional de pacientes	9,2 / 0,9 ^a 7,7 / 0,8 ^b	40

FONTE: Adaptada de Bräuner et al. (2020).⁴⁰

^a Incidência considerando diagnóstico/ início de tratamento em meninas até 9 anos e meninos até 10 anos de idade.

^b Incidência considerando diagnóstico/ início de tratamento em meninas até 8 anos e meninos até 9 anos de idade.

1.2.2 ETIOLOGIA DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A etiologia da PPC pode ser dividida de diferentes maneiras, tais como congênita ou adquirida, orgânica ou não orgânica, esporádica ou familiar, síndrome ou não síndrome.

As causas orgânicas são definidas pela presença de lesões no sistema nervoso central (SNC), que podem ser congênitas (hamartomas hipotalâmicos, cistos aracnoides, lesões associadas à neurofibromatose tipo 1, meningomielocel/ malformação de Chiari tipo 2, entre outras) ou adquiridas (tumores intracranianos, traumatismo craniano, acometimento do SNC por infecções neonatais ou doenças granulomatosas, acidente cerebrovascular, irradiação no SNC, encefalopatias e paralisia cerebral).¹⁰ A presença de tais alterações em pacientes com PPC é reportada em até 74% dos meninos e entre 0 e 24,3% das meninas estudadas, com predomínio das lesões congênitas, em especial os hamartomas hipotalâmicos.¹⁰

A PPC de etiologia congênita sem lesões no SNC é causada por alterações genéticas, que podem levar a quadros isolados ou sindrômicos. Apesar da apresentação isolada ser mais frequente, a PPC pode estar associada a outros sinais e sintomas em uma apresentação sindrômica.¹⁰ É interessante notar que algumas dessas síndromes envolvem alterações em genes também associados a formas isoladas de PPC monogênica (*MKRN3* e *DLK1*), enquanto em outras o mecanismo genético que desencadeia a precocidade sexual ainda não foi elucidado. A síndrome de Temple (OMIM 616222) é causada por defeitos epigenéticos no cromossomo 14q32.2, região que inclui o *DLK1* e seu centro de controle de *imprinting*, e cursa com PPC em 80 a 90% dos casos.¹⁰ Por sua vez, a síndrome de Prader Willi decorre da ausência de expressão do alelo paterno na região do cromossomo 15q11-q13, a qual contém genes regulados por *imprinting* materno, dentre eles o *MKRN3*. Todavia, a manifestação de PPC em pacientes portadores dessa síndrome é rara (por volta de 4%), o que pode ser resultante de outros distúrbios associados que levam ao hipogonadismo na maioria desses pacientes.¹⁰ Outras síndromes associadas à PPC incluem a síndrome de Silver-Russell (OMIM 180860) e a síndrome de Williams-Beuren (OMIM 194050), além de raras variações no número de cópias, tais como deleções no cromossomo 1p36, deleções distais no cromossomo 9p, duplicações no cromossomo 9q34.3, deleções no cromossomo Xp22.33 e a rara síndrome causada pela duplicação do cromossomo Xp11.23-p.11.22 (OMIM 300881).¹⁰ A associação da PPC com síndromes do espectro autista também tem ganhado notoriedade nos últimos anos.¹⁰ Um interessante estudo do nosso grupo que investigou 36 pacientes com PPC associada a múltiplas anomalias identificou raras anomalias genéticas em 12 (33%) deles, incluindo defeitos genéticos associados à síndrome de Temple e Williams-Beuren, deleções no cromossomo Xp22.33, duplicação no cromossomo 1p31.3 e mutações possivelmente patogênicas do tipo missense ou frameshift em genes que ainda não foram definitivamente associados à PPC (*TNRC6B*, *AREL1*, *UGT2B4* e *MKKS*).⁴⁴

Outras causas de PPC de etiologia adquirida são a exposição à desreguladores endócrinos, ativação secundária do eixo HHG por exposição precoce a esteroides sexuais exógenos ou endógenos (como nos casos de puberdade precoce periférica), e a adoção internacional, cujo mecanismo de ativação precoce da puberdade ainda não está bem estabelecido, mas parece se relacionar a recuperação de peso e

crescimento em crianças precocemente expostas a deficiências nutricionais.^{10,45} Todavia, a real incidência da PPC em crianças adotadas em contexto internacional é ainda incerta, sendo importante destacar que a idade cronológica dessas crianças no momento da adoção pode ser imprecisa devido registros da data de nascimento incertos ou ausentes.¹⁰

1.2.2.1 Puberdade Precoce Central Familiar

A PPC é classificada como familiar quando está presente em pelo menos dois membros (de primeiro, segundo ou terceiro grau) da mesma família.⁴⁶ Sua primeira descrição na literatura data de 1981, quando foram reportados três indivíduos de uma mesma família (pai, filho e filha) afetados.⁴⁷ Antes disso, havia menos de 20 casos de puberdade precoce familiar descritos na literatura, todos em meninos e provavelmente decorrentes de testotoxicose, um distúrbio autossômico dominante que causa puberdade precoce periférica somente em indivíduos do sexo masculino.^{47,48}

Em 1986, foi publicado um breve relato de caso no qual foram descritas três meninas com PPC familiar, as quais faziam parte de uma coorte de 58 meninas com PPC provenientes de um único centro americano, estimando uma frequência de PPC familiar em 5,2%.⁴⁹ Em 2004, de Vries et al.⁴⁶ demonstraram uma prevalência notoriamente maior de PPC familiar de 27,5% em uma coorte de 156 crianças israelenses (42 meninas e um menino afetados). Além do maior número de crianças estudadas, uma investigação mais ativa da história puberal familiar pode ter contribuído para a maior prevalência relatada no estudo israelense. Enquanto o estudo americano descreveu apenas familiares do sexo feminino de primeiro e segundo grau (mãe, irmã e avó materna) como potencialmente afetadas, o estudo israelense incluiu familiares do sexo masculino e feminino de primeiro, segundo e terceiro graus provenientes da família materna e/ou paterna. Nesse mesmo estudo, de Vries et al.⁴⁶ investigaram o modo de herança da PPC familiar por meio da análise de segregação, e sugeriram uma herança autossômica dominante com penetrância incompleta dependente do sexo (42% no sexo masculino e 73% no sexo feminino). Em 45,6% das famílias estudadas a herança foi de transmissão materna, enquanto em 21,7% a transmissão foi paterna, em 8,7% simultaneamente materna e paterna, e em 24% indeterminada. O modo de transmissão materna ou paterna não foi associado à diferença estatística nos parâmetros clínicos ou laboratoriais dos pacientes.⁴⁶

Em 2016, Durand et al.⁵⁰ estudaram 139 famílias com casos de PPC e/ ou puberdade avançada - definida como início da puberdade entre 8 e 10 anos em meninas e 10 e 11 anos em meninos. Em 100 dessas famílias foi possível determinar o modo de transmissão da herança, das quais 83 tinham transmissão exclusivamente materna (83%), duas tinham transmissão exclusivamente paterna (2%) e 15 tinham familiares afetados no lado materno e paterno (15%). Os casos índices pertenciam em sua maioria ao sexo feminino (68 meninas com PPC e 48 com puberdade avançada) e em menor número ao sexo masculino (39 meninos com PPC e 13 com puberdade avançada). Os autores concluíram que a herança nessas famílias era do tipo autossômica dominante com penetrância incompleta e expressividade variável. Nesse estudo também não foi observada diferença quanto à idade de apresentação e/ou características clínicas de acordo com a transmissão materna ou paterna da herança.⁵⁰

Recentemente, Harbulot et al.⁵¹ estudaram 332 pacientes com PPC isolada (sem etiologia orgânica ou causa genética identificada), e identificaram 228 pacientes (25%) com a forma familiar, pertencentes a 72 famílias. Consanguinidade foi referida em quatro famílias, e os modos de herança autossômica recessiva e dominante foram observados. Transmissão materna direta (mãe do caso índice afetada) foi observada em 23 famílias, e transmissão paterna direta (pai do caso índice afetado) em cinco. Transmissão potencialmente materna (mãe não afetada, porém PPC relatada em outros membros da família materna) foi observada em cinco famílias, e transmissão potencialmente paterna (pai não afetado, porém PPC relatada em outros membros da família paterna) em 13. Dessa maneira, 39% das famílias apresentaram transmissão materna direta ou potencialmente materna, enquanto 25% das famílias apresentaram transmissão paterna direta ou potencialmente paterna. O modo autossômico dominante de transmissão com penetrância incompleta foi considerado mais sugestivo, pela alta proporção de pais afetados (33 de 72 famílias, 46%). No entanto, os autores ressaltaram que herança com transmissão recessiva também pode estar presente em famílias com apenas irmãos afetados (16 famílias, 22%), e modos mais complexos de transmissão podem ocorrer nas famílias com membros afetados em várias gerações sem transmissão clara de pai ou mãe para a prole (10 famílias, 14%). A PPC familiar foi mais frequente em meninas (n=78) do que em meninos (n=4). As

características clínicas dos pacientes não diferiram entre os modos de transmissão familiar.⁵¹

Além destes estudos epidemiológicos (resumidos na Tabela 2), alguns trabalhos de investigação genética da PPC também forneceram dados interessantes sobre a transmissão da PPC familiar. Em 2006, Brito et al.⁵² estudaram 31 meninas com PPC idiopática acompanhadas na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), das quais seis foram classificadas como casos familiares, provenientes de três famílias diferentes. Na primeira família havia apenas irmãos afetados, não sendo possível distinguir o modo de transmissão da herança, enquanto na segunda a transmissão era paterna, e, na terceira, materna.⁵² Em estudo multicêntrico publicado em 2013, realizado por nosso grupo em associação a outros centros de pesquisa universitários, Abreu et al.²⁸ estudaram 15 famílias com PPC, com um total de 36 membros do sexo feminino e sete do sexo masculino afetados. Em cinco delas foram identificadas mutações inativadoras do *MKRN3*, herdadas de maneira autossômica dominante por transmissão paterna, como causadoras da PPC. Nas demais 10 famílias sem mutações nesse gene, havia outros familiares da linhagem materna afetados em quatro, da linhagem paterna em três e apenas irmãos afetados em outras três.²⁸ Em 2017, Grandone et al.⁵³ realizaram um estudo genético em meninas com PPC idiopática e familiar. Dos 23 casos familiares, nove tinham transmissão materna (39,1%), 11 paterna (47,8%) e em três a transmissão era simultaneamente materna e paterna (13,1%).⁵³

Tabela 2 - Dados de prevalência dos principais estudos epidemiológicos da PPC familiar.

Prevalência da PPC familiar (Casos familiares/ totais)	Nº de famílias estudadas	Modo de transmissão				Ref.
		Materna	Paterna	Indeterminada	Materna e paterna	
27,5% (43/156)	46*	21 (45,6%)	10 (21,7%)	11 (24%)	4 (8,7%)	de Vries et al. 2004. ⁴⁶
NA	139	83 (59,7%)	2 (1,5%)	39 (28%)	15 (10,8%)	Durand et al. 2016. ⁵⁰
25% (228/332)	72	28 (39%)	18 (25%)	26 (36%)	0	Harbulot et al. 2021. ⁵¹

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

*Quatro pacientes adicionais com PPC familiar foram incluídos apenas na análise de segregação e caracterização de casos familiares.

NA: Não se aplica (estudo realizado apenas com casos familiares).

1.2.2.2 Puberdade Precoce Central Monogênica

As primeiras mutações genéticas associadas à PPC foram identificadas no sistema kisspetina-KISS1R. Em 2008, um estudo realizado por nosso grupo em parceria com colaboradores internacionais descreveu uma mutação em heterozigose no gene *KISS1R* (p.Arg386Pro, a qual resultava em uma ativação não constitutiva do receptor da kisspeptina) em uma menina brasileira, adotada, com diagnóstico de PPC.⁵⁴ Em 2010 foi identificado também o envolvimento do gene *KISS1*: uma mutação ativadora (p.Pro74Ser) em heterozigose diagnosticada em um menino brasileiro com PPC esporádica.⁵⁵ Apesar de não terem sido identificadas outras mutações no sistema kisspetina-KISS1R como causadoras da PPC desde então, polimorfismos nesses genes (*KISS1/ KISS1R*) ou em regiões próximas foram associados à maior probabilidade de PPC ou à menor idade de menarca em estudos populacionais.^{56–59}

Vários outros genes, cujos transcritos estão envolvidos na modulação do eixo HHG, foram estudados, porém sem evidência de associação à PPC, tais como: sistema da neurocinina B e seu receptor (*TAC3/ TAC3R*)⁶⁰, receptor do neuropeptídeo Y (*NPYR*)⁶¹, receptor do GABA-A (*GABRA1*)⁵², *TTF1* e *EAP1*⁶². O gene *Lin-28 Homolog B (LIN28B)* também foi estudado devido à sua associação com idade de menarca em estudos GWAS^{18,63}, todavia também não foi demonstrada relação causal com a PPC.⁶⁴

1.2.2.2.1 PPC causada por mutações inativadoras do *MKRN3*

Em 2013, Abreu e Dauber et al.²⁸ descreveram pela primeira vez mutações inativadoras no gene *MKRN3* associadas à PPC familiar. Esse gene, composto de um único éxon, é localizado no cromossomo 15q11 e submetido ao *imprinting* materno, de modo que a PPC causada por sua perda de função tem herança autossômica dominante com transmissão exclusivamente paterna. O *MKRN3* é um membro da família de proteínas Makorin composto por um anel em dedo de zinco localizado centralmente, 2 dedos de zinco CH3 na região aminoterminal e um arranjo específico Cys-His.²⁸ Os dedos de zinco CH3 são importantes para a ligação ao RNA mensageiro (mRNA), enquanto o anel em dedo de zinco é responsável pela atividade da ubiquitina ligase E3.²⁸ O processo de ubiquitinação é conhecido principalmente por sua função de marcação de proteínas a serem degradadas, mas também pode estar envolvido na transdução de sinais, regulação do ciclo celular, diferenciação e morfogênese.²⁸

Diferentes mecanismos pelos quais o MKNR3 regula o início da puberdade foram propostos. Seu papel inibitório sobre o eixo HHG foi inicialmente sugerido pela observação de queda nas concentrações de mRNA do *Mkrn3* hipotalâmico em camundongos machos e fêmeas antes do início da puberdade, verificada nas regiões hipotalâmicas que englobam os neurônios KNDy (ARC) e kisspetina (AVPV).^{28,65} A redução pré-puberal da expressão hipotalâmica do *Mkrn3* também foi observada em ratos e primatas antes do início da puberdade, e Abreu et al.⁶⁵ demonstraram ainda a co-expressão de *Mkrn3* e *Kiss1* em camundongos, e, adicionalmente, que o MKRN3 é capaz de reprimir (via ubiquitinase) a atividade dos promotores dos genes *KISS1* e *TAC3 in vitro*. Mais recentemente, o mesmo grupo avaliou a expressão do *KISS1*, *TAC3* e seus produtos codificados, kisspeptina e NKB, em camundongos com deleção do *Mkrn3* no alelo paterno (*Mkrn3*-KO), observando um aumento nas concentrações do NKB no ARC de camundongos *Mkrn3*-KO aos 25 dias de vida em relação aos controles.⁶⁶ Os autores demonstraram, ainda, um aumento no número de terminais dendríticos no ARC de camundongos *Mkrn3*-KO, sugerindo que o *Mkrn3* possa ter papel na regulação da neuroplasticidade no desenvolvimento no ARC desses animais.⁶⁶

Paralelamente, um grupo chinês identificou possíveis mecanismos de regulação epigenética e pós-transcricionais do GnRH pelo MKRN3^{67,68}. Inicialmente, Li et al.⁶⁷ demonstraram que a ablação genética do *Mkrn3* acelerou o início da puberdade em camundongos machos e fêmeas, com aumento das concentrações de GnRH1 hipotalâmico e sérico. O mecanismo de regulação do *GNRH1* pelo MKRN3 proposto nesse estudo envolve a proteína ligadora do DNA metilado tipo 3 (MBD3), a qual tem importante papel na regulação epigenética da transcrição.⁶⁷ Ao se ligar ao DNA metilado de regiões de promotoras, codificadoras e potenciadoras (*enhancers*) de genes ativamente transcritos, a MBD3 promove a atividade da proteína TET Metilcitosina Dioxigenase 2 (TET2), por sua vez responsável pela desmetilação do DNA.^{67,69} De maneira interessante, os autores do estudo identificaram que a MBD3 atua como um substrato para a ubiquitina ligase E3 do MKRN3, e que esse processo de ubiquitinação regula negativamente sua afinidade pelo DNA metilado e pela TET2, resultando no silenciamento epigenético da expressão do *GNRH1*.⁶⁷ Pouco tempo depois, o mesmo grupo de pesquisadores verificou que a ubiquitinação mediada pelo MKRN3 pode prejudicar também a tradução do *GNRH1* por modificações em

membros da família das Proteínas Ligadoras de Poly(A) (PABPs).⁶⁸ As PABPs são importantes reguladoras da estabilidade e tradução do mRNA a partir de sua ligação à cauda poly(A). Os autores do estudo identificaram as PABPC1, PABPC3 e PABPC4 como substratos de ubiquitinação do MKRN3, que atenua a capacidade de ligação dessas proteínas à cauda poly(A) do mRNA do *GNRH1*, comprometendo a formação do complexo de iniciação da tradução desse gene.⁶⁸ Posteriormente, Naulé et al.⁶⁶ confirmaram a interação do MKRN3 às PABPs e também à proteína ligadora 1 do fator de crescimento insulino-símile 2 (IGF2BP1).⁶⁶ É interessante notar que as PABPs e o IGF2BP1 são componentes de um complexo essencial para a regulação da tradução do mRNA.⁶⁶ Entre outros estudos que também investigaram os mecanismos de ação do MKRN3 na regulação puberal, é interessante citar um estudo finlandês que demonstrou interação do MKRN3 com 20 proteínas codificadas por genes associados à regulação do início da puberdade, dentre eles o *LIN28B*.⁷⁰

As mutações do *MKRN3* foram amplamente estudadas desde sua primeira descrição, tendo sido descritas em mais de 150 pacientes de diversas nacionalidades, sendo consideradas hoje a causa genética mais comum de PPC, com uma prevalência estimada em torno de 10% dos casos e uma frequência ainda maior entre os casos familiares, estimada em até 33% a 46%.^{28,71,72} Todavia, elas parecem ser menos comuns em determinadas populações, como a coreana e outras populações asiáticas;^{71,73} e uma menor frequência entre os casos familiares foi reportada em alguns estudos (3,8 a 15,7%).^{53,74-76} Atualmente são conhecidas mais de 60 diferentes mutações inativadoras deste gene relacionadas à PPC.^{10,74,76,77} A maioria dessas mutações são do tipo missense, seguidas por mutações frameshift e, em menor número, nonsense.¹⁰ Foram descritas, ainda, deleções englobando todo o gene e mutações na região promotora associadas à PPC.^{78,79}

As características clínicas da PPC causada por mutações inativadoras do *MKRN3* são similares às da PPC idiopática^{80,81}, apesar de alguns estudos terem observado uma idade de início mais precoce da puberdade em pacientes com mutações nesse gene^{72,76}, o que pode ter sido influenciado pela maior observação de sinais puberais iniciais em pacientes com história familiar positiva. Essa hipótese é reforçada por um estudo do nosso grupo que mostrou menor intervalo entre o início dos sinais puberais e a primeira avaliação médica em meninas com mutações no *MKRN3*.⁸¹ Nesse mesmo estudo, Seraphim et al.⁸¹ observaram concentrações mais

elevadas do hormônio folículo-estimulante (FSH) no grupo de meninas com PPC associada a mutações no *MKRN3* em relação ao grupo com PPC idiopática. Os autores observaram, ainda, que dentro do grupo de pacientes com PPC causada por defeitos genéticos no *MKRN3*, aqueles com mutações severas (frameshift, nonsense e mutações na região promotora) tiveram um maior avanço da idade óssea e concentrações mais elevadas de LH no momento da primeira avaliação do que os pacientes com mutações missense.⁸¹ Magnotto et al.⁷⁶ também avaliaram as concentrações hormonais em meninas com PPC causada por mutações do *MKRN3*, e observaram que, em relação às meninas com PPC idiopática, aquelas com mutações missense do *MKRN3* apresentaram maiores concentrações de LH, enquanto aquelas com mutações frameshift apresentaram maiores concentrações de FSH. Essa diferença nos achados hormonais entre os dois estudos pode ter sido influenciada pelo número e sexo dos pacientes incluídos. Enquanto o estudo de Seraphim et al.⁸¹ analisou 45 meninas e 26 meninos com mutações no *MKRN3* (53 mutações severas e 18 missense) dentro de um grupo de 716 paciente com PPC, o estudo de Magnotto et al.⁷⁶ analisou apenas nove meninas com mutações no *MKRN3* (três mutações frameshift e seis mutações missense) dentro de um grupo de 79 meninas com PPC. A resposta ao tratamento com análogos do GnRH (aGnRH) e os desfechos antropométricos, metabólicos e reprodutivos em pacientes com PPC com e sem mutações no *MKRN3* foram avaliados em um estudo do nosso grupo, que não encontrou diferenças nesses parâmetros.⁸²

O papel do MKRN3 sérico circulante no diagnóstico da PPC ainda não foi bem estabelecido. Apesar de ter sido demonstrado queda em suas concentrações em meninos e meninas saudáveis antes do início da puberdade, foi observada grande variação interindividual, de modo que não foi possível estabelecer um ponto de corte que se associasse ao início puberal.^{83,84} Um estudo dinamarquês⁸⁴ e um estudo italiano⁸⁵ demonstraram que as concentrações do MKRN3 circulante em meninas com PPC sem mutações inativadoras nesse gene são menores que as do grupo controle pré-púbere pareado por idade^{84,85}, mas similares às do grupo controle púbere pareado por estágio puberal⁸⁵. No estudo dinamarquês também foram observadas concentrações indetectáveis do MKRN3 circulante em uma menina com PPC sem mutação detectada nesse gene, além de baixas concentrações em um subgrupo de meninas com PPC sem mutações conhecidas.⁸⁴ Até o momento, não há estudos

publicados englobando a análise dos níveis séricos de MKRN3 em pacientes com mutações nesse gene.

1.2.2.2.2 PPC causada por mutações inativadoras do *DLK1*

Em 2017, Dauber et al.²⁹ identificaram uma mutação complexa em heterozigose, envolvendo a deleção do primeiro éxon e duplicação de um segmento do terceiro íntron, no gene *DLK1* em uma família brasileira acompanhada em nosso serviço, na qual duas irmãs e duas meias-irmãs paternas apresentavam PPC e a avó paterna tinha história de menarca entre 9 e 10 anos.²⁹ Em 2018, três novas mutações heterozigotas em frameshift no *DLK1* foram identificadas por nosso grupo em cinco mulheres de três diferentes famílias (duas famílias brasileiras e uma britânica) com PPC.⁸⁶ Em 2020, Montenegro et al.⁸⁷ estudaram uma coorte brasileira-hispânica e identificaram uma deleção alélica rara *de novo* em um sítio de reconhecimento da junção de *splicing* do *DLK1* em uma menina espanhola com PPC esporádica. Mais recentemente, foram descritas duas mutações no *DLK1* associadas à PPC em uma família chinesa e uma família italiana.^{88,89} É interessante notar que, assim como ocorre nas mutações do *MKRN3*, o fenótipo de PPC só é expresso quando a mutação do *DLK1* é herdada do pai, em um padrão de herança compatível com *imprinting* materno. Com exceção da mutação *de novo* descrita por Montenegro et al.⁸⁷, todas as outras mutações associadas à PPC descritas até o momento seguiram o padrão de transmissão paterna.^{29,86,88,89} Notavelmente, o gene *DLK1* está situado no cromossomo 14q.32, em uma região de genes regulados por *imprinting* associada à Síndrome de Temple.²⁹

A proteína codificada pelo *DLK1* também é conhecida como fator 1 pré-adipócito (PREF-1) ou antígeno fetal 1, e é composta por um domínio extracelular, contendo seis repetições semelhantes ao fator de crescimento epidérmico e um sítio de clivagem mediado por enzima conversora do fator de necrose tumoral α (TACE), um domínio transmembrana e uma pequena porção intracelular.⁹⁰ O *DLK1* é um ligante não canônico da via Notch, uma via de sinalização evolutivamente conservada que participa de uma ampla gama de processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose.⁹⁰ Sua ligação ao receptor NOTCH1 impede a ativação deste por ligantes canônicos, tornando-o um importante inibidor desta via.⁹¹ Entre as diversas funções conhecidas do *DLK1*, destacam-se a regulação da osteogênese, adipogênese e diferenciação de células neuroendócrinas.⁹⁰ Sua expressão tecidual é

difusa durante o desenvolvimento embrionário de camundongos, e na vida adulta torna-se restrita a tecidos (neuro) endócrinos; incluindo hipófise, glândulas adrenais, pâncreas, neurônios monoaminérgicos no SNC, testículos, próstata e ovários.⁹⁰ Apesar de sua expressão em diversos núcleos hipotalâmicos (incluindo o ARC) ter sido previamente demonstrada em camundongos, seu papel na regulação do desenvolvimento puberal é incerto.⁹² Curiosamente, Villanueva et al.⁹² observaram um aumento na expressão hipotalâmica do *Dlk1* entre a infância e a idade adulta em camundongos, paralelo ao aumento na expressão do *Kiss1* hipotalâmico. Um estudo de camundongos nocaute para *Dlk1* (os quais apresentavam retardo de crescimento pré- e pós-natal) mostrou que eles iniciaram a puberdade com um peso corporal consideravelmente menor que os controles, corroborando a participação desse gene na regulação puberal.⁹³ Em um interessante artigo de revisão sobre o papel do DLK1 no início da puberdade, Macedo e Kaiser⁹⁰ destacaram que a via Notch tem importante papel no desenvolvimento dos neurônios kisspeptina, e propuseram que o DLK1 possa participar da regulação da neurogênese hipotalâmica, interferindo indiretamente na formação, maturação e/ou secreção de neurônios kisspeptina através da ativação ou inibição de genes regulados pela via Notch.

A evolução clínica de pacientes com PPC associada a mutações no DLK1 é de particular relevância, uma vez que as pacientes do sexo feminino tiveram maior prevalência de alterações metabólicas na vida adulta, tais como sobrepeso/obesidade, dislipidemia, resistência insulínica, diabetes mellitus tipo 2 e síndrome dos ovários policístico, sugerindo que o DLK1 possa ser um novo elo entre metabolismo e reprodução.^{29,86} O menor número de pacientes do sexo masculino diagnosticados com PPC associada a defeitos neste gene dificulta a caracterização fenotípica desses indivíduos. O menino chinês reportado por Yuan et al.⁸⁸ tinha como comorbidade hiperuricemia persistente, enquanto o pai do menino italiano reportado por Palumbo et al.⁸⁹ tinha hipercolesterolemia como única alteração metabólica.

Uma forma solúvel do DLK1 pode ser gerada através da clivagem mediada por TACE de seu domínio extracelular, tornando-o uma proteína sérica mensurável. É interessante notar que as concentrações séricas de DLK1 foram indetectáveis em todos os pacientes reportados com PPC associada a mutações nesse gene.^{29,86,87,89}

1.2.2.2.3 PPC associada a mutações inativadoras do MECP2

Um recente estudo do nosso grupo por Canton et al.⁹⁴ demonstrou a presença de raras mutações heterozigotas possivelmente patogênicas no gene *Methyl-CpG-binding protein 2 (MECP2)* em pacientes com PPC familiar (duas irmãs gêmeas monozigóticas) e esporádica (cinco meninas). O *MECP2* é um gene localizado no cromossomo Xq28 que codifica uma proteína nuclear capaz de se ligar ao DNA metilado em regiões promotoras, funcionando como repressor ou ativador da transcrição gênica. O *MECP2* é amplamente expresso em humanos, com a maior expressão observada no cérebro. Mutações inativadoras desse gene geralmente estão associadas a distúrbios do neurodesenvolvimento, em particular à síndrome de Rett (OMIM 312750), a qual ocorre quase exclusivamente em mulheres. Em sua forma típica, a síndrome de Rett se manifesta com graves distúrbios de aprendizagem, regressão da fala e habilidades motoras após 6-18 meses de vida, movimentos estereotipados das mãos, deficiência intelectual e convulsões.^{95,96} Todavia, indivíduos com mutações patogênicas no *MECP2* podem apresentar fenótipos mais brandos, incluindo autismo ou deficiência intelectual isolada.^{96,97} A diversidade fenotípica observada em portadores de mutações neste gene pode ser em parte atribuída ao fato de ele estar sujeito à inativação do X em mulheres, um mecanismo de regulação genética que garante a compensação de dosagem entre ambos os sexos. Notavelmente, alterações na idade de início da puberdade são descritas em parte das pacientes com Síndrome de Rett, mais frequentemente sob a forma de telarca precoce isolada, e, menos frequentemente, pubarca precoce ou PPC.⁹⁸⁻¹⁰² As pacientes estudadas por nosso grupo apresentaram PPC isolada ou associada a fenótipos neurocomportamentais não associados à Síndrome de Rett (dificuldade leve de aprendizado, autismo e alterações no perímetro cefálico).⁹⁴ Dessa forma, esses achados sugerem que o *MECP2* possa ser um novo gene associado à PPC sindrômica ou não sindrômica. A expressão hipotalâmica do *Mecp2* em camundongos fêmeas púberes foi também avaliada por este estudo, demonstrando sua expressão em diversos núcleos hipotalâmicos (incluindo o ARC) e sua presença em mais de 70% das células neuronais de GnRH visualizadas.⁹⁴ Todavia, até o momento, não há descrição do padrão de expressão do *Mecp2* hipotalâmico ao longo do desenvolvimento puberal, e seus mecanismos de regulação da puberdade ainda não são compreendidos.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar da PPC familiar ter sido avaliada em poucos estudos, ela foi diagnosticada em cerca de um quarto das crianças com PPC não orgânica.^{46,51} O reconhecimento de sua importância aumentou consideravelmente nos últimos anos, após a descrição de famílias com PPC associada a mutações nos genes *MKRN3* e *DLK1*, herdadas de maneira autossômica dominante com transmissão exclusivamente paterna.^{28,29} Enquanto os mecanismos de regulação do início da puberdade pelo *MKRN3* foram parcialmente elucidados,^{11,67,68} as possíveis vias de regulação puberal pelo *DLK1* ainda não são conhecidas. A recente identificação de pacientes com PPC (familiar e esporádica) associada a mutações no *MECP2* sugere que esse possa ser um novo gene implicado na etiologia da PPC familiar. Seus possíveis mecanismos de regulação da puberdade ainda não são conhecidos. Apesar da alta prevalência da PPC familiar de transmissão materna^{46,50,51,53}, suas bases genéticas ainda não foram determinadas. O presente estudo analisou a prevalência e os modos de herança e transmissão da PPC familiar em uma grande coorte multiétnica, além de comparar as características clínico-laboratoriais dos pacientes com diferentes formas de transmissão da PPC, a fim de caracterizar as distintas apresentações da PPC familiar. A prevalência das mutações nos genes *MKRN3* e *DLK1* dentro dessa coorte foi calculada a partir da avaliação retrospectiva de pacientes com diagnóstico genético previamente estabelecido. Além disso, estudo genético prospectivo foi realizado em um subgrupo de pacientes e familiares com PPC familiar por meio do sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) com objetivo de identificar novos genes associados à PPC familiar, especialmente nos casos com transmissão materna. O estudo da expressão hipotalâmica em camundongos dos genes *Mkfn3*, *Dlk1* e *Mecp2*, associado à análise das concentrações séricas circulantes do *Dlk1*, foram realizados com objetivo de ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos de regulação puberal.

3. OBJETIVOS

A) Caracterização clínica e genética da PPC familiar:

- Calcular a prevalência e determinar os modos de herança e transmissão da PPC familiar em uma grande coorte multiétnica;
- Comparar as características clínicas e hormonais, assim como a resposta ao tratamento com aGnRH entre pacientes com diferentes formas de transmissão da PPC familiar;
- Calcular a prevalência das mutações nos genes *MKRN3* e *DLK1* nos pacientes e famílias com diagnóstico genético previamente estabelecido dentro da coorte;
- Investigar as bases genéticas de um subgrupo de pacientes com PPC familiar sem diagnóstico etiológico definido por meio de SPLE.

B) Estudo dos mecanismos de regulação da puberdade:

- Determinar a expressão hipotalâmica dos genes *Mkfn3*, *Dlk1* e *Mecp2* em camundongos do tipo selvagem (WT) em diferentes estágios de maturação sexual;
- Determinar a influência do *Dlk1* periférico circulante no desenvolvimento puberal por meio da análise de suas concentrações séricas em: a) camundongos WT em diferentes estágios de maturação sexual; b) camundongos com nocaute total ou parcial do *Dlk1*.

4. MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM PPC FAMILIAL

4.1.1 PACIENTES ESTUDADOS

No total, 586 crianças com diagnóstico confirmado de PPC sem lesões do SNC foram avaliadas retrospectivamente, incluindo crianças brasileiras avaliadas no HCFMUSP (n=242), crianças espanholas participantes do Registo Espanhol PUBERE (n=179), e um subgrupo de crianças de múltiplas nacionalidades (n=165). A avaliação retrospectiva baseou-se nos prontuários das crianças avaliadas entre 1988 e 2021. A coorte brasileira proveniente do HCFMUSP foi avaliada no ambulatório de Puberdade Precoce da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento. O Registo Espanhol PUBERE conta com 55 centros em todo o país e é apoiado pela Sociedade Espanhola de Endocrinologia Pediátrica. A coorte de 165 crianças de múltiplas nacionalidades foi constituída por crianças proveniente de 10 diferentes países: 93 brasileiras (de diferentes centros universitários), 42 francesas, seis belgas, cinco turcas, cinco americanas, cinco argentinas, quatro gregas, duas britânicas, duas israelenses e uma australiana. Notavelmente, essa última coorte era composta apenas por paciente com PPC familiar.

4.1.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi conduzido de acordo com princípios éticos e orientações contidas na declaração de Helsinki e pelos termos descritos pela Portaria 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq, HCFMUSP), CAAE: 19813419.3.0000.0068, conforme o parecer 3.555.875. Consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados. A confidencialidade dos resultados obtidos foi garantida a todos os pacientes. Os achados de defeitos genéticos relacionados às doenças em investigação foram informados aos pacientes e/ou seus responsáveis legais, que receberam aconselhamento genético e seguimento conforme o recomendado pela Sociedade Brasileira de Genética Médica no projeto Diretrizes do Conselho Federal de Medicina.

4.1.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Início dos caracteres sexuais secundários antes dos oito anos em meninas e nove anos em meninos;
- Concentrações de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH exógeno ou com aGnRH (acetato de leuprorrelina ou acetato de triptorrelina) em concentrações puberais;
- Ressonância magnética do SNC sem anormalidades;
- Presença de um ou mais membros da família de primeiro (mãe, pai e irmãos), segundo (avós e tios) ou terceiro grau (primos) com história de desenvolvimento sexual precoce, comprovada ou com base em relato de:
 - Tratamento para PPC na infância;
 - Menarca antes dos nove anos em familiares do sexo feminino;
 - Início de sinais puberais (idade em que começou a se barbear, mudança no timbre de voz e/ou estirão de crescimento) antes de seus pares em familiares do sexo masculino.

4.1.4 COLETA DE DADOS

Dados clínicos e hormonais rotineiramente disponíveis foram coletados de registros médicos de crianças com PPC familiar, incluindo idade cronológica (IC) aos primeiros sinais puberais (desenvolvimento das mamas em meninas e aumento testicular em meninos), IC à pubarca, IC e idade óssea (IO, método de Greulich e Pyle) à primeira avaliação, avanço da idade óssea (IO – IC), desvio-padrão (DP) da altura e do IMC à primeira avaliação. Os dados hormonais incluíram concentrações de LH e FSH basais e estimulados por GnRH, medidos por ensaios de eletroquimioluminescência (ECLIA, Roche Diagnósticos) após 2012, ou ensaios imunofluorométricos (IFMA, Perkin Elmer) antes de 2012; além de concentrações basais de estradiol ou testosterona, medidos por ECLIA (Roche Diagnostics) após 2012, ou fluoroimunoensaios (FIA, Perkin Elmer) antes de 2012. As concentrações de LH basal foram consideradas na faixa puberal se $>0,3$ UI/L (ECLIA) ou $>0,6$ UI/L (IFMA) e o valor de corte do LH estimulado por GnRH foi >5 UI/L usando ECLIA ou $>6,9$ UI/L para meninas e $>9,6$ UI/L para meninos usando IFMA.¹⁰³

Nos pacientes com PPC tratados com aGnRH, foram documentados IC ao início do tratamento e IC, IO e DP de altura e IMC à interrupção do tratamento. Os

parâmetros clínicos e hormonais avaliados durante o tratamento incluíram: regressão ou estabilização das características sexuais secundárias, velocidade de crescimento adequada para IC e níveis de esteroides sexuais compatíveis com o período pré-puberal (LH basal <0,6 UI/L para IFMA e <0,3 UI/L para ECLIA; LH 120 minutos após aGnRH <4 UI/L).¹⁰⁴ Sempre que disponível, IC à menarca e os DP da altura adulta e altura alvo (calculada pela altura média dos pais menos 6,5 cm para meninas ou mais 6,5 cm para meninos) também foram analisados. A faixa de altura alvo foi estabelecida como altura alvo $\pm 8,5$ cm.^{105,106} Além disso, peso e comprimento de nascimento foram obtidos, e as crianças foram classificadas como pequenas, adequadas, ou grande para a idade gestacional.

4.1.4.2 Coleta De Dados Familiais

Todas as famílias foram ativamente questionadas sobre o desenvolvimento puberal dos pais, irmãos, avós, tios e primos da criança com PPC. Com base nos critérios de inclusão descritos em 4.1.3, o modo de transmissão da PPC familiar foi dividido em quatro grupos de acordo com o sexo do indivíduo que transmitiu o traço ao caso índice:

- a) materno: mãe e/ ou outros familiares maternos afetados;
- b) paterno: pai e ou outros familiares paternos afetados;
- c) indeterminado: apenas irmãos afetados;
- d) simultaneamente materno e paterno: pelo menos um familiar materno e um familiar paterno afetados.

4.1.5 AVALIAÇÃO MOLECULAR

4.1.5.1 Coleta de DNA

A Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do HCFMUSP tem sido pioneira no estudo de causas genéticas da PPC idiopática. Antes de 2013, o estudo genético era baseado no sequenciamento de genes candidatos pelo método de Sanger em pacientes selecionados. A identificação de mutações inativadoras do *MKRN3* associadas à PPC familiar em 2013²⁸ expandiu de forma considerável o estudo genético por nosso grupo de pesquisa. Desde então, todos os pacientes atendidos em nosso ambulatório com diagnóstico de PPC não orgânica foram sistematicamente convidados a participar dos estudos genéticos, e diversos pacientes

avaliados em outros centros universitários foram encaminhados para análise genética em nosso Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM/42). Os pacientes e familiares que concordaram em participar dos estudos tiveram seu DNA genômico extraído de leucócitos periféricos, de acordo com a metodologia padrão adotada no LIM/42. Desse modo, até o momento em que essa tese foi escrita, DNA de 204 pacientes com PPC familiar estavam disponíveis para estudo.

4.1.5.2 Sequenciamento por Sanger e Avaliação Retrospectiva de Pacientes com Mutação nos Genes MKRN3 e DLK1

A regiões codificadoras do *MKRN3* e *DLK1* foram sequenciadas em todos os 204 pacientes pelo método de Sanger, método previamente descrito¹⁰⁷, utilizando as sequências de oligonucleotídeos (*primers*) descritas no Anexo C. A avaliação da prevalência das mutações nos genes *MKRN3* e *DLK1* em pacientes com PPC familiar foi retrospectiva, incluindo tanto pacientes sequenciados durante esse projeto quanto pacientes estudados antes do início desse projeto, como parte de outras pesquisas realizadas por nosso grupo.

4.1.5.3 Estudo por SPLE de Pacientes sem Diagnóstico Genético Estabelecido

Todos os pacientes com PPC familiar sem diagnóstico genético estabelecido foram convidados a participar deste estudo, assim como seus familiares afetados e não afetados, para fins de segregação genética. Foram selecionadas para sequenciamento exômico global (WES) as famílias cujo DNA do probando e pelo menos mais dois familiares estavam disponíveis para estudo, com prioridade para as famílias com PPC de transmissão materna (total de 39 indivíduos provenientes 11 famílias, sendo oito famílias com transmissão materna, uma com transmissão paterna e duas com transmissão simultaneamente materna e paterna). As bibliotecas foram construídas utilizando o *SureSelect Target Enrichment system* (Agilent Technologies, CA, USA), e as sequências foram geradas no Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP (SELA) e no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, utilizando, respectivamente, as plataformas *NextSeq 500, Kit MidOutput V2 2x150* (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA) e *NovaSeq 6000, Kit XGen IDT Exome, v.1.0* (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA), de acordo com protocolos previamente publicados.¹⁰⁸ Adicionalmente, dados de corridas realizadas previamente no laboratório SELA - 26 indivíduos pertencentes a 8 famílias - e no *Broad Institute*

(Boston, MA, EUA) - 39 indivíduos pertencentes 15 famílias - estavam disponíveis e foram incluídos na análise genética.

De maneira complementar, 14 probandos com PPC familiar foram estudados por meio de um painel customizado de genes que englobou o sequenciamento de 746 genes associados a diversos distúrbios endócrinos e/ou metabólicos, incluindo a PPC. Esse painel foi elaborado pela Disciplina de Endocrinologia do HCFMUSP em 2017 e é constantemente atualizado desde então. As crianças selecionadas para sequenciamento por painel de genes foram incluídas por terem apresentado telarca em idade mais precoce (≤ 6 anos) ou por terem diagnóstico de PPC sindrômica; sendo que este último critério foi parte de um estudo previamente publicado por nosso grupo sobre a caracterização genética da PPC associada a múltiplas anomalias.⁴⁴ As bibliotecas foram construídas utilizando o ensaio *Agilent SureSelect Tier 2* (Agilent Technologies, CA, USA) e as sequências foram geradas no laboratório SELA utilizando a plataforma *NextSeq 500, Kit MidOutput V2 2x150* (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA).

Todas as sequências foram alinhadas tendo como referência o GRCh37/hg19. Uma equipe de bioinformática vinculada ao SELA (Dr. Antônio Lerário [Departamento de Medicina Interna da Divisão de Metabolismo, Endocrinologia e Diabetes da Universidade de Michigan], Dr. Lucas Santana [HCFMUSP] e Anna Flavia Benedetti [SELA]) foi responsável pela análise dos dados brutos e geração dos arquivos analisáveis (VCF anotada). O programa *Annovar* foi usado pelos bioinformatas para incluir no arquivo VCF informações relativas à cada variante identificada nas corridas, tais como sua localização, frequência em bancos de dados públicos e análise por ferramentas *in silico*. As VCF anotadas foram então analisadas pela pesquisadora.

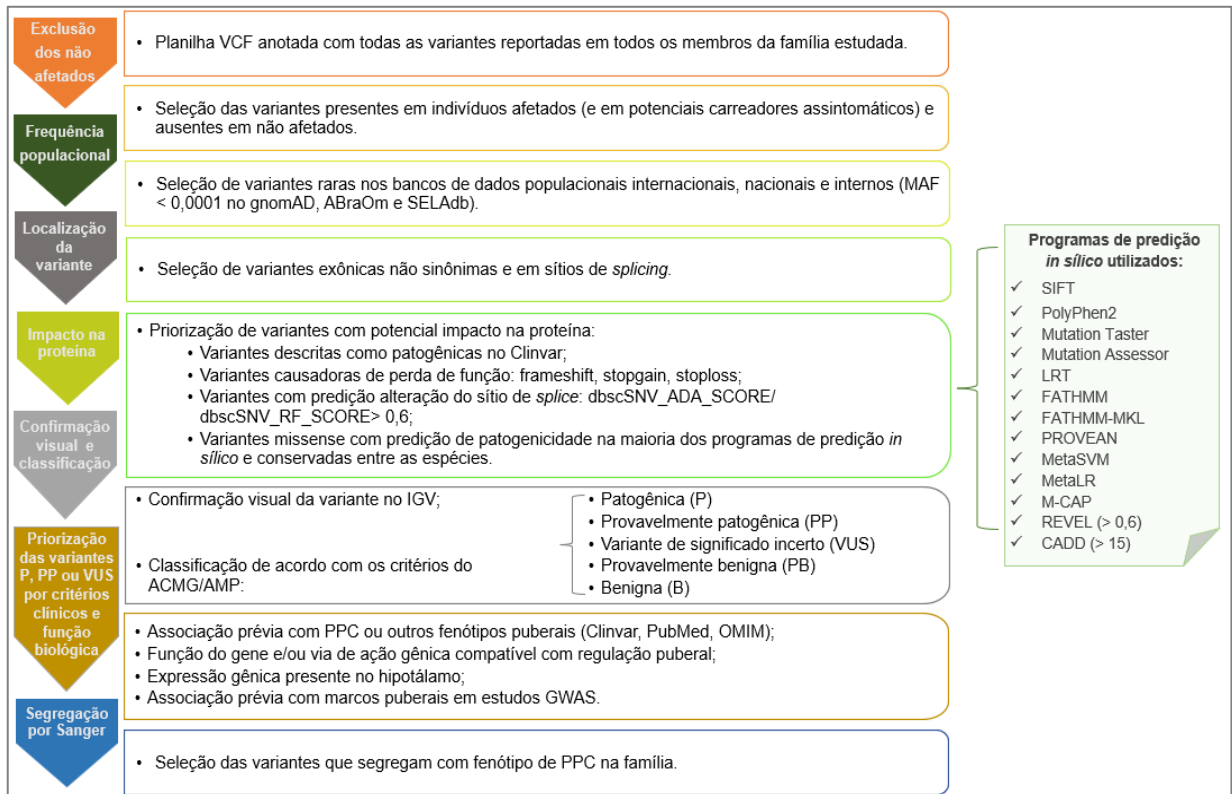
4.1.5.3.2 Análise de dados provenientes do SPLE

Os dados da VCF foram inicialmente filtrados de modo a selecionar variantes causadoras de perda de função e/ou variantes missense não sinônimas presentes no caso índice (Figura 2). Uma vez que o WES permite a análise conjunta de todos os membros da família sequenciados, as variantes encontradas por esse método foram adicionalmente filtradas com base nos heredogramas, selecionando as variantes presentes em indivíduos afetados e possíveis carreadores assintomáticos e ausentes em indivíduos não afetados. Em seguida, foram filtradas as variantes raras (frequência

alélica menor [MAF] $\leq 0,01\%$ em bancos de dados públicos e interno) localizadas em regiões exômicas e/ou regiões consenso de *splicing*. As análises de regiões de *splicing* foram realizadas usando o dbSCSNV e o *Human Splice Finder*. Os bancos de dados públicos incluíram o gnomAD e o ABraOM,^{109,110} enquanto o banco de dados interno utilizado foi o SELAdb, que inclui uma coorte de 523 indivíduos não relacionados encaminhados ao HCFMUSP com diferentes diagnósticos médicos.¹¹¹ Entre as variantes raras filtradas, foram priorizadas as causadoras de perda de função (frameshift, stopgain, stoploss ou alta predição de alteração do sítio de *splice*) e as variantes missense preditas como patogênicas por múltiplos programas de análise *in silico* (descritos na Figura 2). As sequências contendo variantes candidatas foram inspecionadas visualmente usando o *Integrative Genomics Viewer* (IGV; Broad Institute, Cambridge, MA, EUA) . Possíveis variantes candidatas foram classificadas de acordo com o Colégio Americano de Genética Médica e Genômica/ Associação de Patologia Molecular (ACMG/ AMP – Anexos A e B) em cinco categorias de patogenicidade: patogênicas, provavelmente patogênicas, variantes de significado incerto (VUS), provavelmente benignas e benignas.¹¹²

Variantes classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas ou VUS foram então priorizadas de acordo com associações prévias dos genes nos quais se encontram com PPC e/ou outros fenótipos puberais (ClinVar, PubMed, OMIM), função do gene e/ou via de ação gênica compatível com regulação puberal, expressão gênica presente no hipotálamo (Portal GTEx) e associação com marcos puberais em GWAS.

Figura 2 - Fluxo da filtragem utilizada para selecionar as variantes encontradas por SPLE.



FONTE: Produção do próprio autor.

ABraOM: banco de dados - Arquivo Brasileiro Online de Mutações; ACMG/ AMP: Colégio Americano de Genética Médica e Genômica/ Associação de Patologia Molecular; ClinVar: banco de dados que possui informações de significado clínico de variantes descritas; dbscSNV: ferramenta de predição *in silico* para variantes em regiões consenso para *splicing*; gnomAD: banco de dados - Genome Aggregation Database; GWAS: estudos de associação de polimorfismo envolvendo o genoma completo; IGV: programa de bioinformática - Integrative Genomics Viewer; MAF: frequência do alelo menos frequente; OMIM: banco de dados - Mendelian Inheritance in Man; PubMed: ferramenta de busca à base de dados MEDLINE; SELAdb: banco de dados do Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala da FMUSP

4.1.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos dados clínicos, laboratoriais, epidemiológicos e genéticos foram expressos como valores numéricos (porcentagens) para variáveis categóricas e como medianas associadas ao intervalo interquartil (IQ) para variáveis contínuas, devido à distribuição não Gaussiana (testado pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov). Comparações entre os grupos com diferentes tipos de transmissão da PPC foram realizadas pelos testes de qui-quadrado para variáveis categóricas e testes não paramétricos de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas. A análise estatística foi realizada na plataforma R x 64 (v 4.1.0, 2021, Viena, Áustria). A significância estatística foi estabelecida por $P < 0,05$.

4.2 ESTUDO EM CAMUNDONGOS

4.2.1 CAMUNDONGOS ESTUDADOS

Camundongos WT de diferentes idades e estágios puberais foram gerados a partir do acasalamento de camundongos adultos WT C57BL/6 adquiridos do Laboratório Charles River (Massachusetts). Camundongos com nocaute total de *Dlk1* (*Dlk1*-KO) haviam sido adquiridos do Dr. Steven R. Bauer (*Food and Drug Administration*, Bethesda, MD) para estudos prévios,⁹³ enquanto camundongos com nocaute parcial de *Dlk1*, restrito ao SNC (*Dlk1*-cKO), haviam sido gerados no Centro da Faculdade de Medicina de Harvard de Recursos Animais e Medicina Comparativa para pesquisas prévias pela Dra. Delanie B. Macedo (manuscrito ainda não publicado).

4.2.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E CONDUÇÃO DOS EXPERIMENTOS

Todos os estudos com animais foram aprovados pelo Comitê Permanente da Área Médica de Harvard sobre o Uso de Animais em Pesquisa e Ensino no Centro da Faculdade de Medicina de Harvard de Recursos Animais e Medicina Comparativa. Os camundongos foram mantidos em um ciclo de 12 horas de luz/12 horas de escuridão e foram alimentados com uma dieta padrão para roedores e água *ad libitum*.

Todos os experimentos foram conduzidos na Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Hipertensão do *Brigham and Women's Hospital* e *Harvard Medical School*.

4.2.3 RESSECÇÃO HIPOTALÂMICA E COLETA DE SANGUE

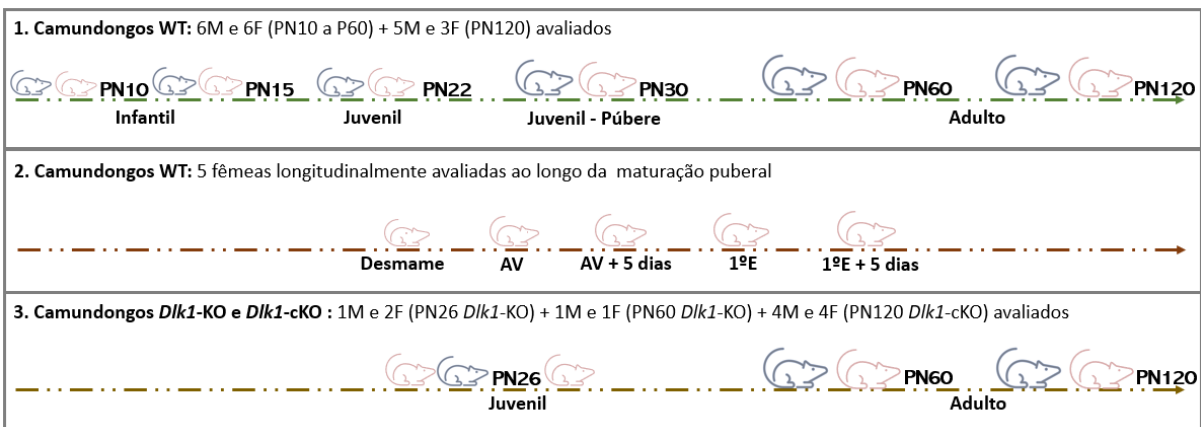
Camundongos WT machos e fêmeas foram sacrificados por inalação de gás carbônico em diferentes estágios do desenvolvimento pós-natal, correspondendo aos períodos infantil (PN10 e PN15), juvenil (PN22), juvenil/peripúbere (PN30) e adulto/pós-púbere (PN60) (Figura 3.1). Após a decapitação, aproximadamente 1 ml de sangue do tronco foi coletado e o tecido cerebral foi removido. O hipotálamo foi isolado por dois cortes bilaterais parassagitais, cada um 0,5 mm lateral à linha média, tomando como limites a margem posterior do quiasma óptico (rostralmente) e a margem anterior do corpo mamilar (caudalmente), com profundidade de dissecação de aproximadamente 2 mm. Cada amostra hipotalâmica foi dissecada e dividida em duas partes: área pré-óptica (POA) e hipotálamo médio-basal (MBH), englobando,

respectivamente, os núcleos AVPV e ARC (Figura 4). Todos os animais foram pesados antes da eutanásia.

Adicionalmente, camundongos WT fêmeas foram monitoradas quanto ao surgimento dos sinais puberais de abertura vaginal, que marca o início da puberdade nesses animais, e primeiro estro (início do ciclo estral), que sinaliza a maturidade sexual. Para coleta de sangue desses animais foi realizada uma incisão na extremidade da cauda e retirado aproximadamente 0,2 ml de sangue da veia caudal com auxílio de uma micropipeta. A coleta foi realizada em cinco estágios distintos da maturação sexual: 1) desmame (21 dias de vida), 2) abertura vaginal, 3) cinco dias após abertura vaginal, 4) primeiro estro, 5) cinco dias após primeiro estro (Figura 3.2). Todos os animais foram pesados antes de cada coleta.

Amostras de soro de camundongos *Dlk1*-KO e *Dlk1*-cKO congeladas a -80°C estavam disponíveis para as idades PN26 e PN60 (*Dlk1*-KO) e PN120 (*Dlk1*-cKO). A fim de obter um controle para comparação dos animais *Dlk1*-cKO PN120, foi coletado aproximadamente 0,2 ml sangue do plexo retro-orbital de camundongos WT com idade pareada, após anestesia local (Figura 3.1/ 3.3).

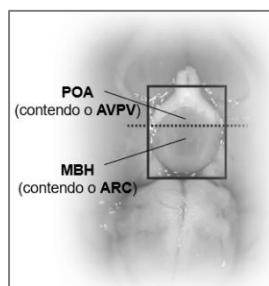
Figura 3 - Representação dos grupos de camundongos estudados.



FONTE: Produção do próprio autor.

1ºE: primeiro estro, AV: abertura vaginal, F: fêmeas, M: machos, PN: idade pós-natal.

Figura 4 - Representação das áreas dissecadas do hipotálamo de camundongos.



POA: área pré-óptica hipotalâmica;

AVPV: núcleo hipotalâmico anteroventral periventricular;

MBH: hipotálamo médio-basal;

ARC: núcleo arqueado hipotalâmico.

FONTE: Adaptada de Quennell et al. (2011).¹¹³

4.2.4 EXTRAÇÃO DE RNA, SÍNTESE DE cDNA E ANÁLISE QUANTITATIVA DE PCR EM TEMPO REAL

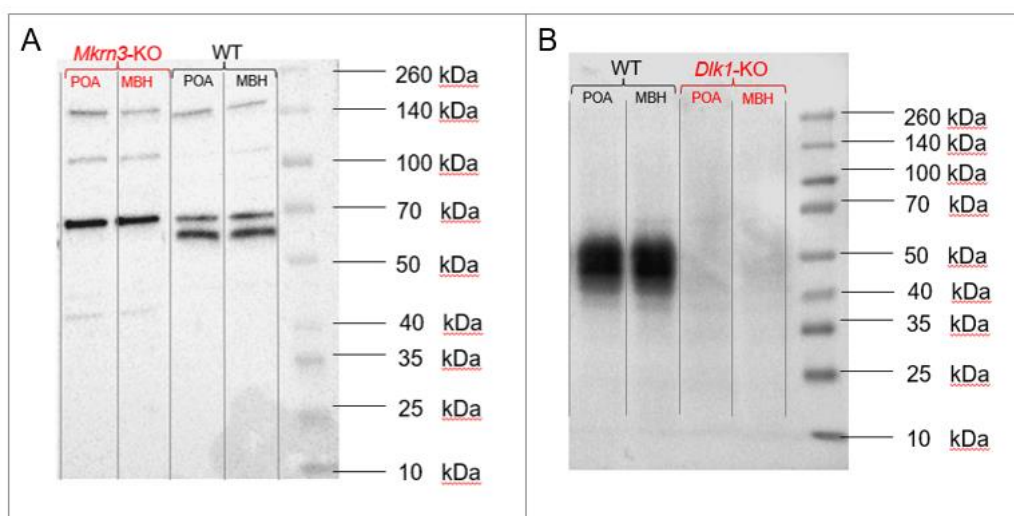
RNA total foi extraído do MBH e POA dos camundongos usando TRIzol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. Após mensuração da concentração total de RNA pelo espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, MA), o RNA total (500 ng) foi reversamente transcrito usando o *iScript cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, Hercules, CA), gerando DNA complementar (cDNA). Ensaios quantitativos de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram realizados em duplicata para cada amostra de cDNA usando *iQ™ SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad), juntamente com as sequências de oligonucleotídeos (*primers*) correspondentes (10 pmol/μL, anexo D) no sistema *QuantStudio 3 Real-Time PCR* (*Applied Biosystems*, Foster City, US). Os níveis relativos de mRNA foram normalizados utilizando o gene referência *Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase* (*Hprt*), e calculados pelo método do ciclo limiar comparativo (Ct), de acordo com a fórmula $(2^{-\Delta\Delta Ct})$.¹¹⁴

4.2.5 ANÁLISE DE WESTERN BLOT

As proteínas totais foram extraídas do MBH e POA dos camundongos usando o tampão de extração e lise de proteínas RIPA (*Thermo Fisher Scientific*). Após a quantificação, 10μg de proteínas solúveis foram separados por *SDS-PAGE* em gel de poliacrilamida 10% sob condições redutoras em temperatura ambiente e voltagem constante (100V). As proteínas foram então transferidas por 90 minutos em temperatura ambiente e voltagem constante (100V) para membranas de fluoreto de polivinilideno (*Millipore Corp.*, Bedford, MA, EUA). As ligações inespecíficas foram bloqueadas com tampão de bloqueio por 1 hora à temperatura ambiente em uma plataforma oscilante. As membranas foram então incubadas com os anticorpos anti-Mkrn3 (Sigma Aldrich, HPA029494) e anti-Pref1 (*R&D systems*, MAB8634) de camundongo diluídas na proporção 1:1.000 em tampão de bloqueio durante a noite, a 4°C com agitação suave. Os *blots* foram lavados com solução salina tamponada com Tris com adição de 0,05% de *Tween-20* (TBST) e incubados com uma diluição de 1:1.000 de anticorpo anti-coelho IgG *Horseradish Peroxidase*-conjugado por 1 hora. Após lavagem com TBST, os *blots* foram desenvolvidos com um sistema de quimioluminescência aprimorado e visualizados por autorradiografia. Finalmente, para fins de normalização, os *blots* foram removidos usando tampão de remoção (*Thermo*

Fisher Scientific) e incubados com anticorpo anti- β -actina (1:10.000, Sigma Aldrich, A3854). Um marcador de peso molecular (Bio-Rad, 1610375) foi utilizado em cada membrana para checagem da massa molecular. A especificidade das bandas visualizadas foi confirmada usando amostras de proteína de animais nocaute para *Mkrn3* e *Dlk1*, respectivamente (Figura 5). As áreas das bandas obtidas foram mensuradas no programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA). A quantificação proteica do *Mecp2* hipotalâmico não foi realizada pela indisponibilidade de animais *Mecp2*-KO para confirmação da especificidade das bandas.

Figura 5 - Western blots mostrando especificidade das bandas encontradas para Mkrn3 e Dlk1.



FONTE: Produção do próprio autor .

A) *Western blot* desenvolvido com anti-Mkrn3 (Sigma-Aldrich, HPA029494) mostrando banda de peso molecular aproximado 56 kilodaltons (kDa) presente no MBH e POA de camundongo WT e ausente no camundongo *Mkrn3*-KO.

B) *Western blot* desenvolvido com anti-Pref1 (R&D systems, MAB8634) mostrando banda de peso molecular aproximado 45 - 60 kDa presente no MBH e POA de camundongo WT e ausente no camundongo *Dlk1*-KO.

4.2.6 DOSAGEM SÉRICA DO DLK1 CIRCULANTE

Soro dos camundongos foi obtido a partir do sangue total coletado após centrifugação a 1000 \times G por 10 minutos. O *Dlk1* sérico circulante foi então mensurado com imunoenaios enzimáticos (ELISA; EM66RB, Invitrogen, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A sensibilidade do ensaio foi de 0,0045 ng/ml, enquanto o coeficiente de variabilidade inter-ensaios era <12% e a variabilidade intraensaio <10%, de acordo com as informações do fabricante.

4.2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados dos experimentos em camundongos foram expressos como a média \pm erro padrão (EP) para cada grupo. Para experimentos com duas comparações, um teste t de Student não pareado bicaudal foi usado para análise estatística. Para experimentos com comparações múltiplas, testes ANOVA de uma ou duas vias, seguidos por teste de *Tukey's post hoc*, foram utilizados para comparações dentro de um mesmo grupo ou entre diferentes grupos, respectivamente. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando o *Prism Software* (GraphPad, Inc., San Diego, CA).

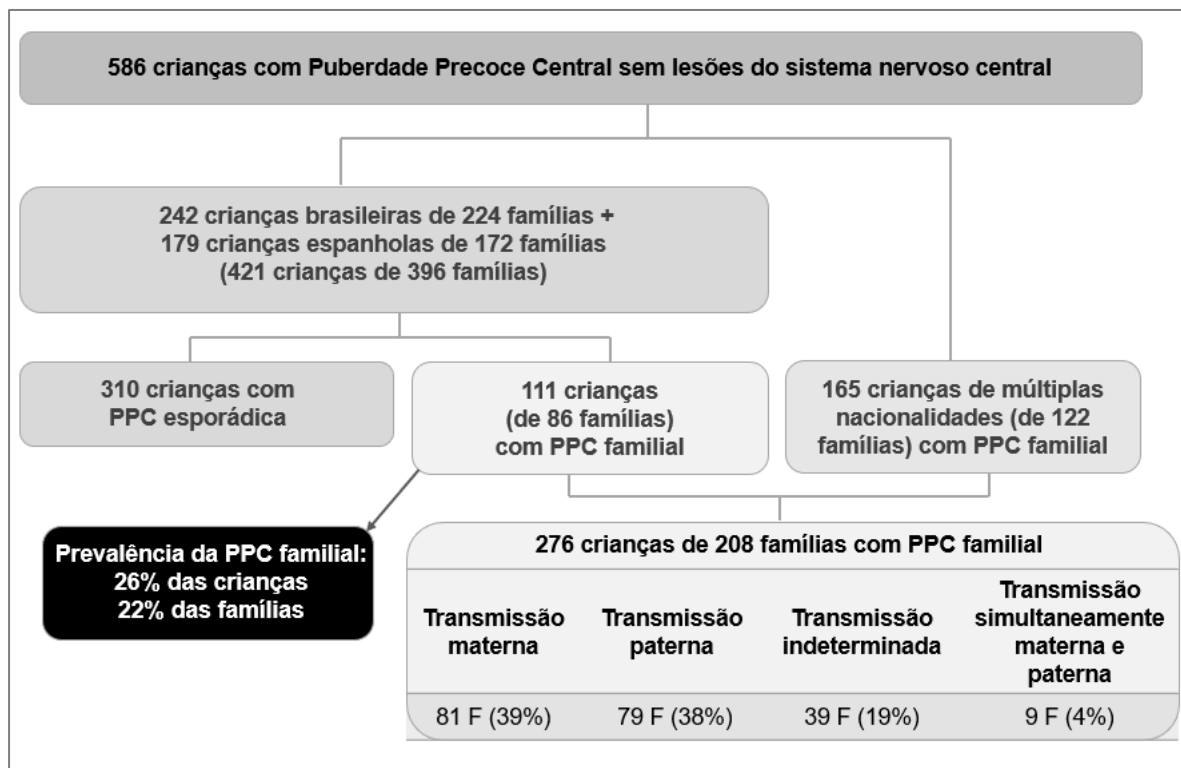
5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E GENÉTICA DE PACIENTES COM PPC FAMILIAL

5.1.1 PREVALÊNCIA DA PPC FAMILIAL ENTRE PACIENTES BRASILEIROS E ESPANHÓIS

Para pacientes provenientes da Divisão de Endocrinologia do HCFMUSP e do registro espanhol PUBERE, tivemos acesso aos prontuários do total de pacientes com PPC (421 crianças - 402 meninas e 19 meninos - de 396 famílias). Desse modo, pudemos estimar a prevalência de PPC familiar nesta coorte, na qual foram identificados 111 pacientes provenientes de 86 famílias (considerando menarca ≤ 9 anos), correspondendo a 26% dos casos e 22% das famílias (Figura 6). Uma prevalência aumentada de PPC familiar foi observada quando a idade da menarca foi considerada ≤ 10 anos: 131 pacientes de 106 famílias, correspondendo a 31% dos casos e 27% das famílias.

Figura 6 - Prevalência e modo de transmissão da PPC familiar nas famílias estudadas.



FONTE: Produção do próprio autor.

F: número de famílias.

5.1.2 CLASSIFICAÇÃO DO MODO DE TRANSMISSÃO DA PPC FAMILIAL E ANÁLISE DOS HEREDOGRAMAS DO TOTAL DE FAMÍLIAS AVALIADAS

A classificação do modo de transmissão foi possível em todas as 208 famílias com PPC familiar (Figura 6). Transmissão materna foi identificada em 81 famílias (39%), transmissão paterna em 79 famílias (38%), transmissão indeterminada em 39 famílias (19%) e transmissão tanto paterna quanto materna nos demais 9 famílias (4%). Nenhuma consanguinidade foi reportada entre as famílias avaliadas.

A análise do heredograma foi possível em 157 das 208 (75,5%) famílias com informações completas sobre o início da puberdade dos membros da família em prontuário (Tabela 3). O predomínio de mulheres afetadas foi marcante em todos os modos de transmissão da PPC familiar (369 de 409 indivíduos [90%]; Tabela 3). Entre as 71 famílias com transmissão materna da PPC, a maioria (n=53 [75%]) tiveram duas gerações sabidamente afetadas, e entre as 59 famílias com transmissão paterna da PPC, quase metade delas (n=29 [49%]) tiveram duas gerações sabidamente afetadas (Tabela 3). Notavelmente, em 66% dos probandos com PPC de transmissão materna, a mãe foi afetada, enquanto em 22% dos probandos com transmissão paterna da PPC, o pai era sabidamente afetado.

Tabela 3 - N° de gerações afetadas de acordo com o modo de transmissão da PPC familiar.

Modo de transmissão	N° de famílias	Membros afetados (F/ M)	1 geração afetada	2 gerações afetadas	≥ 3 gerações afetadas
Materna	71	183 (172/11)	11 (15%)	53 (75%)	7 (10%)
Paterna	59	154(130/24)	25 (42%)	29 (49%)	5 (9%)
Simultaneamente materna e paterna	7	31 (27/4)	0	3 (43%)	4 (57%)
Indeterminada	20	41 (40/1)	20 (100%)	0	0
Total	157	409 (369/40)	56 (36%)	85 (54%)	16 (10%)

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

F: Feminino, M: Masculino.

5.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-LABORATORIAIS DE PACIENTES COM PPC FAMILIAL

Dados clínicos, laboratoriais e de imagem estavam disponíveis em 145 meninas e 9 meninos provenientes de 127 famílias com PPC familiar. Devido ao pequeno número de pacientes do sexo masculino, esses foram excluídos da análise comparativa. Cinco meninas que tiveram PPC de transmissão simultaneamente materna e paterna também foram excluídas da análise comparativa. Portanto, a comparação foi feita entre 56 meninas com transmissão materna, 56 meninas com transmissão paterna e 28 meninas com transmissão indeterminada da PPC (Tabela 4). A telarca ocorreu em uma IC mediana de 6,5 anos (IQ 6; 7,1) em meninas com PPC de transmissão materna, 6,2 anos (IQ 5; 6,7) em meninas com PPC de transmissão paterna, e 7,1 anos (IQ 6,1; 7,4) em meninas com transmissão indeterminada da PPC ($P=0,029$). A análise *post hoc* demonstrou que a diferença na IC de telarca entre meninas com transmissão paterna vs. indeterminada da PPC foi estatisticamente significativa ($P=0,037$; vs. $P=0,101$ para transmissão materna vs. indeterminada e $P=0,269$ para transmissão materna vs. paterna). O DP de altura e avanço de IO à primeira consulta foi similar em meninas com transmissão materna, paterna ou indeterminada da PPC ($P>0,05$; Tabela 4). O DP mediano do IMC estava na faixa normal ($>-1,0$ e $<1,0$) para todos os três grupos ($P=0,789$; Tabela 4).

As concentrações de LH basal estavam na faixa puberal para a maioria das pacientes estudadas (64,7% das meninas com transmissão materna, 62% das meninas com transmissão paterna e 61,5% das meninas com transmissão indeterminada da PPC com resultados disponíveis em prontuário [$P=0,947$; Tabela 4]). Entre as meninas submetidas a testes de estímulo com GnRH, $>90\%$ tiveram resposta puberal, sem diferença entre os três grupos ($P=0,891$; Tabela 4). As concentrações hormonais não tiveram diferença significativa entre as distintas formas de transmissão da PPC familiar ($P>0,05$; Tabela 4).

Tabela 4 - Características clínico-laboratoriais dos pacientes com diferentes formas de transmissão familiar da PPC.

Características clínico-laboratoriais	Transmissão materna (n=56) <i>Mediana (IQ)</i>	Transmissão paterna (n=56) <i>Mediana (IQ)</i>	Transmissão indeterminada (n=28) <i>Mediana (IQ)</i>	<i>p</i> [#]
IC telarca (anos)	6,5 (6; 7,1)	6,2 (5,6; 7)	7,1 (6,1; 7,4)	0,029
IC pubarca (anos)	7 (6,5; 8)	7 (6; 7,5)	7,4 (6,2; 7,7)	0,485
<i>Primeira avaliação médica</i>				
IC (anos)	7,6 (6,9; 8,3)	7,7 (6,4; 8,3)	7,8 (7,5; 8,5)	0,339
IO (anos)	10 (9; 11)	10 (8,3; 11)	11 (8,9; 11,4)	0,541
Avanço IO (anos)	2,3 (1,5; 3,1)	2,1 (0,9; 2,9)	1,5 (1,1; 2,6)	0,152
DP altura	1,7 (1,1; 2,3)	1,6 (0,5; 2,2)	1,0 (0,4; 1,8)	0,104
DP IMC	0,8 (0,1; 1,6)	0,7 (0,4; 1,4)	0,6 (0,04; 1,4)	0,789
LH basal* (UI/L)	0,8 (0,1; 1,2)	1,4 (0,3; 4,2)	1,1 (0,2; 1,8)	0,126
FSH basal* (UI/L)	3,4 (2,0; 4,7)	4,2 (2,4; 6,0)	4,4 (3,0; 5,9)	0,508
LH basal na faixa puberal**	33/51 (64,7%)	31/50 (62%)	16/26 (61,5%)	0,947 ##
Estradiol (pg/mL)	18,2 (12,0; 33,2)	20,1 (14,9; 36,3)	17 (13,0; 29)	0,398
Pico LH após estímulo GnRH* (UI/L)	13,0 (9,8; 17,1)	9,7 (5,7; 18,5)	15,5 (9,3; 19,1)	0,652
Pico FSH após estímulo GnRH* (UI/L)	13,9 (10,3; 15,7)	14,0 (10,3; 24,2)	15,5 (14,3; 16,6)	0,375
Pico LH após estímulo GnRH na faixa puberal**	30/32 (93,7%)	20/21 (95,2%)	10/11 (90,9%)	0,891 ###

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

O valor de P foi calculado para comparação entre os três grupos simultaneamente usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas ou o teste qui-quadrado para variáveis categóricas. Valores de P estatisticamente significativos foram marcados em negrito.

Resultado do teste qui-quadrado=0,109.

Resultado do teste qui-quadrado=0,231.

*Para fins estatísticos; apenas hormônios medidos por ensaio de eletroquimioluminescência (ECLIA) foram incluídos.

**Hormônios medidos por ECLIA ou ensaio imunofluorométrico (IFMA) foram considerados.

DP: *escore de desvio padrão*; FSH: *hormônio folículo-estimulante*; GnRH: *hormônio liberador de gonadotrofinas*; IC: *idade cronológica*; IMC: *índice de massa corporal*; IO: *idade óssea*; IQ: *intervalo interquartil*; LH: *hormônio luteinizante*; PPC: *puberdade precoce central*.

5.1.3.2 Dados de Tratamento com aGnRH em Pacientes com PPC Familiar

Entre as crianças tratadas com aGnRH de ação prolongada, os dados de tratamento estavam disponíveis em 31 meninas com PPC de transmissão materna, 24 meninas com PPC de transmissão paterna e 13 meninas com transmissão indeterminada da PPC (Tabela 5). A mediana de duração do tratamento foi de 2,2 anos (IQ 2,0; 2,9) em meninas com PPC de transmissão materna, 2,6 anos (IQ 2,0; 3,5) em meninas com PPC de transmissão paterna, e 2,0 anos (IQ 1,6; 2,2) em meninas com transmissão indeterminada da PPC ($P=0,229$; Tabela 5). Todas as crianças tiveram parâmetros clínicos e hormonais adequados ao controle da PPC, de acordo com os critérios mencionados na seção 4.1.4 (dados não mostrados). Dentre as meninas que atingiram altura adulta antes da conclusão deste estudo, a maioria estava dentro da faixa de altura alvo parental, sem diferença estatística entre os grupos ($P=0,915$; Tabela 5)

5.1.3.3 Dados de Nascimento em Pacientes com PPC Familiar

A maioria das crianças (78 de 97 com dados de nascimento disponíveis [80,4%]) nasceram adequadas para a idade gestacional, enquanto 17 delas nasceram pequenas para a idade gestacional e duas nasceram grandes para idade gestacional. Não houve diferença estatisticamente significativa na proporção de crianças nascidas pequenas, adequadas ou grandes para idade gestacional entre esses três grupos ($P=0,428$).

Tabela 5 - Características clínicas de pacientes com PPC familiar antes e depois do tratamento com aGnRH de acordo com o modo de transmissão.

Dados de tratamento	Transmissão materna (n=31) <i>Mediana (IQ)</i>	Transmissão paterna (n=24) <i>Mediana (IQ)</i>	Transmissão indeterminada (n=13) <i>Mediana (IQ)</i>	<i>P</i> #
IC inicial (anos)	7,9 (7,0; 8,4)	8,0 (7,3; 8,4)	8,1 (7,9; 9,0)	0,206
IC final (anos)	10,5 (9,9; 10,7)	10,6 (10,0; 11,0)	10,5 (10; 11,0)	0,632
Duração do tratamento (anos)	2,2 (2,0; 2,9)	2,6 (2,0; 3,5)	2,0 (1,6; 2,2)	0,229
<i>Primeira avaliação após o tratamento</i>				
IO (anos)	12 (11,5; 12)	12 (12; 13)	12 (11,6; 12)	0,256
DP altura	1,6 (1,0; 1,9)	1,3 (0,9; 2,1)	0,6 (0,2; 1,3)	0,152
DP IMC	0,7 (0,2; 1,4)	0,8 (0,3; 1,4)	1,0 (0,6; 1,7)	0,269
Idade de menarca (anos)	n=27 11,2 (10,6; 12)	n=21 12 (11,0; 12,0)	n=8 11,8 (11,4; 12,1)	0,289
Tempo entre a interrupção do tratamento e a menarca (anos)	1,0 (0,6; 1,1)	1,0 (0,5; 1,5)	1,1 (1,0; 1,4)	0,382
DP alt. adulta	n=8 0,35 (0,0; 0,8)	n=13 -0,45 (-0,8; 0,4)	n=4 -1,25 (-2,1; -0,6)	0,086
DP alt. alvo	-0,4 (-1,0; 0,1)	-0,5 (-1,0; 0,5)	-1,0 (-1,4; 0,5)	0,612
DP alt. adulta – alt. alvo	0,7 (0,4; 1,0)	0,2 (-1,0; 1,2)	0,2 (-0,9; 1,1)	0,695
Alt. adulta dentro da faixa da alt. alvo	7/8 (87,5%)	9/11 (81,8%)	3/4 (75%)	0,915 ####

FONTE: Elaborada pelo próprio autor.

O valor de P foi calculado para comparação entre os três grupos simultaneamente usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para variáveis contínuas ou teste qui-quadrado para variáveis categóricas.

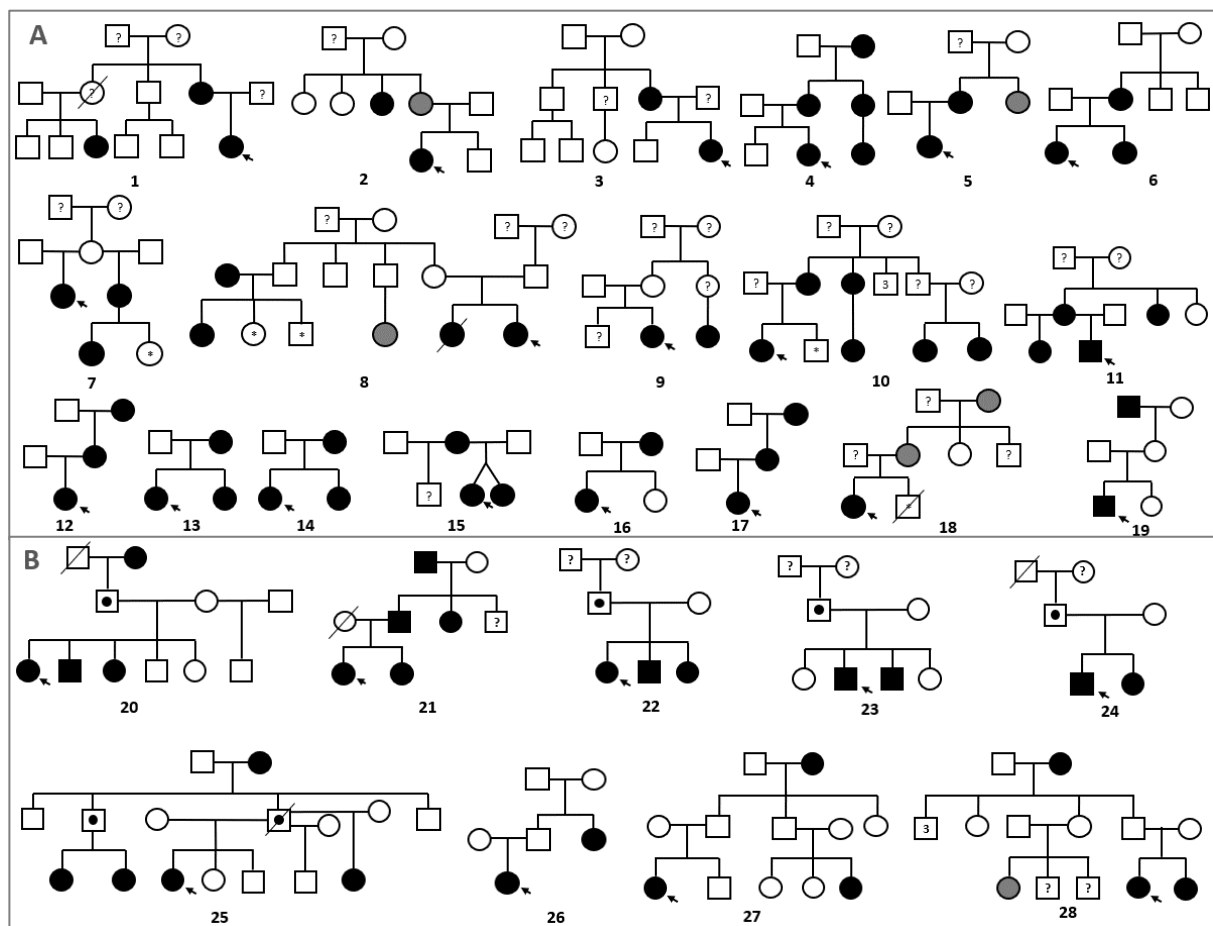
Resultado do teste qui-quadrado=0,964.

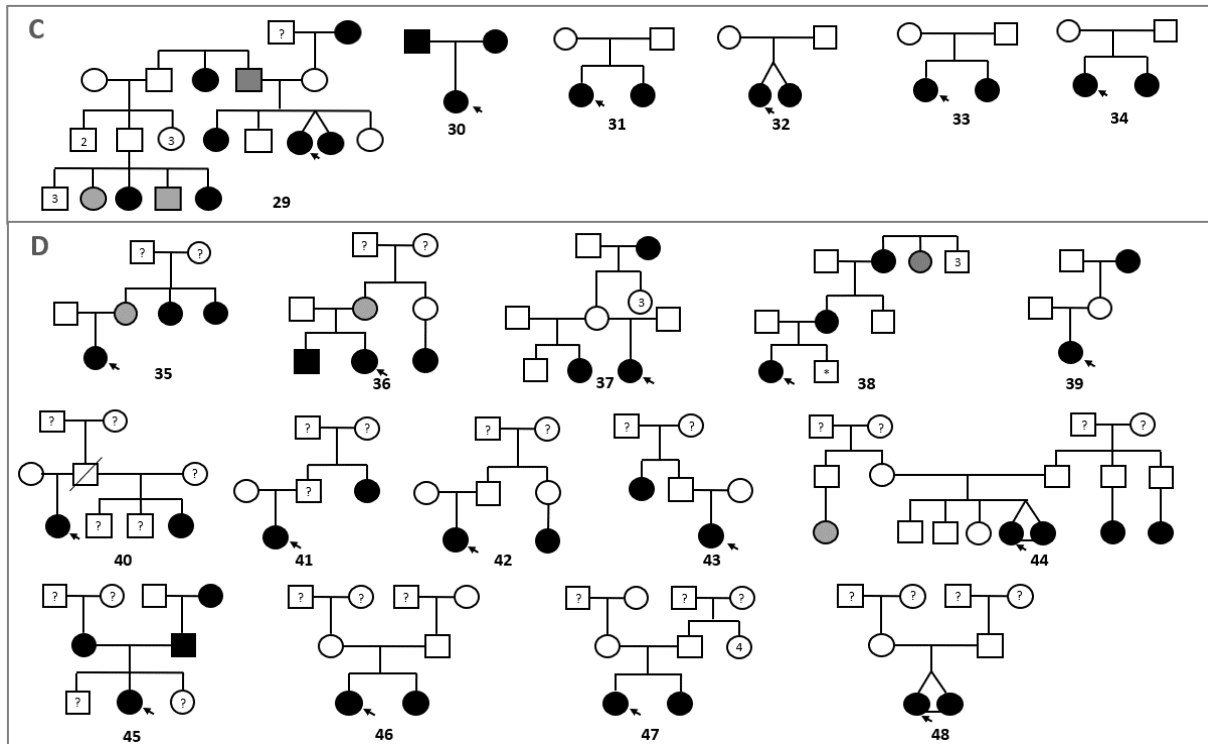
aGnRH: análogo do hormônio liberador de gonadotropina; Alt: altura; DP: escore de desvio padrão; IC: idade cronológica; IMC: índice de massa corporal; IO: idade óssea; IQ: intervalo interquartil; PPC: puberdade precoce central.

5.1.4 ANÁLISE GENÉTICA

Os resultados do sequenciamento por Sanger dos genes *MKRN3* e *DLK1* de 204 pacientes provenientes de 165 famílias foram analisados. Resultados do SPLE estavam disponíveis para 118 indivíduos de 48 famílias (representadas na Figura 7), a maioria deles estudados por WES (104 indivíduos de 34 famílias, sendo: 56 indivíduos de 19 famílias com PPC de transmissão materna [Figura 7A]; 30 indivíduos de nove famílias com PPC de transmissão paterna [Figura 7B]; oito indivíduos de duas famílias com PPC de transmissão simultaneamente materna e paterna e 10 indivíduos de quatro famílias com transmissão indeterminada da PPC [Figura 7C]). Os demais 14 pacientes foram sequenciados por um painel de genes customizado, sendo a transmissão da PPC materna em cinco deles, paterna em quatro, simultaneamente materna e paterna em duas e indeterminada nos outros três (Figura 7D).

Figura 7 - Heredogramas de famílias com PPC submetidas ao SPLE por WES (A, B e C) e sequenciamento por painel de genes customizado (D).





Fonte: Produção do próprio autor.

A: Famílias com transmissão materna de PPC.

B: Famílias com transmissão paterna de PPC. As famílias 20-24 são portadoras de mutações inativadoras do *MKRN3*, enquanto a família 25 é portadora de mutação inativadora do *DLK1*; todas previamente publicadas^{28,29,79,80}.

C: Famílias com transmissão simultaneamente materna e paterna (29 e 30) e indeterminada (31-34) de PPC.

D: Famílias com transmissão materna (35-39), paterna (40-43), simultaneamente materna e paterna (44-45) e indeterminada (46-48) de PPC submetidas a sequenciamento por painel de genes customizado.

Os quadrados indicam sexo masculino e os círculos sexo feminino. Os símbolos atravessados por uma barra diagonal denotam membros da família já falecidos. As linhas verticais bifurcadas indicam gêmeos dizigóticos. Os símbolos pretos indicam indivíduos afetados, os símbolos brancos indivíduos não afetados, os símbolos cinzas denotam puberdade adiantada (telarca entre 8 e 9 anos ou menarca entre 9 e 10 anos) e os símbolos brancos com círculos pretos internos indicam portadores assintomáticos. Os membros da família cujo fenótipo era desconhecido foram marcados com um ponto de interrogação, enquanto um asterisco foi usado para marcar meninos <9 anos e meninas <8 anos. As setas indicam o probando em cada família.

5.1.4.2 Variantes patogênicas nos genes *MKRN3* e *DLK1*

A causa monogênica mais prevalente de PPC familiar foram as mutações inativadoras do *MKRN3* (71 casos de 36 famílias), seguida por mutações inativadoras do *DLK1* (12 casos de 6 famílias). Esses defeitos genéticos patogênicos foram identificados por WES em cinco famílias com mutação do *MKRN3* e uma família com mutação do *DLK1* (Figura 7B), por sequenciamento genômico global em uma família com mutação do *DLK1* e por sequenciamento pela metodologia de Sanger nas demais famílias. Todos esses defeitos genéticos foram previamente descritos por nosso grupo, conforme referenciado na Tabela 6.

Tabela 6 - Mutações inativadoras nos genes *MKRN3* e *DLK1* em pacientes com PPC familiar.

Diagn. genético	Nº de pacientes e famílias afetadas	Proporção entre os casos de PPC familiar testados	Proporção entre os casos de PPC de transmissão paterna testados	Modos de herança e transmissão	Métodos de seq.	Ref.
Mutações no <i>MKRN3</i>	71 pacientes de 36 famílias	35% dos pacientes/ 22% das famílias	77% dos pacientes/ 57% das famílias	AD com transmissão paterna	WES, Sanger	28,79–81,87
Mutações no <i>DLK1</i>	12 pacientes de 6 famílias	6% dos pacientes/ 4% das famílias	13% dos pacientes/ 10% das famílias	AD com transmissão paterna	Seq. genômico global, WES, Sanger	29,86

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

Diagn.: diagnóstico, AD: autossômico dominante, Seq.: sequenciamento, Ref.: referências.

5.1.4.3 Novos Possíveis Genes Candidatos

Em uma família com transmissão materna de PPC, o probando do sexo masculino tinha PPC associada a outras anomalias (transtorno do espectro autista, alta estatura e características dismórficas) (Família 11; Figura 7A). O menino e seus familiares (três afetados e dois não afetados) foram submetidos ao WES, e duas variantes candidatas foram identificadas, ambas de baixa frequência em bancos de dados populacionais e que segregaram com o fenótipo de PPC na família: 1) uma substituição missense (p.Pro267Leu) no gene *Uridine diphosphate glycosyltransferase 2 family member 4 (UGT2B4)*, classificado como VUS; e 2) uma variante frameshift (p.Phe144Leufs*14) no gene *McKusick-Kaufman syndrome (MKKS)*, também classificada como VUS. Esses defeitos genéticos foram previamente publicados.⁴⁴

Uma rara variante missense em heterozigose (p.His650Arg) no gene *Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)* foi identificada em uma menina espanhola com PPC de transmissão materna (Família 4; Figura 7A). Essa paciente apresentou telarca aos 7,5 anos e sua mãe, com história de menarca aos 9 anos, apresentou a mesma variante (p.His650Arg), enquanto seu pai não afetado tinha a sequência de tipo selvagem. Embora ausente em bancos de dados públicos, a variante missense (p.His650Arg) teve uma predição benigna na maioria dos programas de análise *in silico* (Tabela 7). O gene *TET2* foi previamente associado com a idade de menarca em um estudo GWAS.¹¹⁵

Em paralelo, uma rara variante missense em heterozigose (p.Thr2181Met) no gene *Bromodomain and WD repeat domain containing 1 (BRWD1)* foi identificada em uma menina brasileira com PPC de transmissão materna submetida ao sequenciamento por painel de genes customizado (Família 36; Figura 7D). Essa paciente apresentou telarca aos 6 anos e sua mãe, que teve menarca aos 10 anos, apresentou a mesma variante (p.Thr2181Met). O irmão da probanda também tinha uma história de desenvolvimento sexual precoce, e uma prima de primeiro grau tinha história de tratamento para PPC com aGnRH. Só o DNA da mãe estava disponível para estudo genético. Embora rara em bancos de dados públicos, a variante missense (p.Thr2181Met) teve uma predição benigna em todos os programas *in silico* analisados (Tabela 7). O gene *BRWD1* foi previamente associado à idade de menarca em dois estudos GWAS distintos,^{18,115} bem como com ao início da puberdade masculina (mudança no timbre de voz).¹¹⁶ Além dessa, duas outras raras variantes heterozigotas classificadas como VUS (p.Thr1480Ala e p.Asn1263Ser) foram identificadas no gene *BRWD1* em duas meninas brasileiras com PPC esporádica que foram submetidas ao painel de genes customizado como parte de outros projetos de investigação genética da PPC por nosso grupo (Tabela 7).

Adicionalmente, uma rara variante heterozigota em frameshift (p.Ser422Argfs*7) no *UGT2B4* foi identificada em uma menina espanhola com história familiar de PPC materna e paterna (Família 30; Figura 7C). Essa paciente apresentou telarca aos 7,8 anos e seu pai, com histórico de puberdade precoce, apresentou a mesma variante (p.Ser422Argfs*7), enquanto a mãe tinha a sequência do tipo selvagem. O gene *UGT2B4* foi previamente associado à idade da menarca em populações específicas.¹¹⁷

Tabela 7 - Variantes raras de significado incerto em heterozigose identificadas em pacientes com PPC familiar.

Gene	Posição	Variante	dbSNP ID	MAF		Análise <i>in silico</i> *	ACMG/AMP	Modo de transmissão da variante	Dados clínicos e laboratoriais de indivíduos afetados
				gnomAD	ABraOM				
TET2	chr4: 106157048	NM_001127208: c.1949A>G: p.His650Arg	-	0	0	4P / 9B	VUS	Transmissão materna (Família 4; Fig. 7A)	Probando: Telarca aos 7,5 anos, 1ª consulta aos 7,9 anos: IO 11 anos, M2P1, Alt 1,3 DP, IMC -0,05 DP, LH basal=1 UI/L (ECLIA). Mãe: Menarca aos 9 anos.
BRWD1	chr21: 40568453	NM_018963: c.6542C>T: p.Thr2181Met	rs148068634	0,0001138	0	0P / 13B	VUS	Transmissão materna (Família 36; Fig. 7D)	Probando: Telarca aos 6 anos, 1ª consulta aos 8,2 anos: IO 11,5 anos, M4P3, Alt 2,3 DP, IMC 1,4 DP, LH basal=1,5 UI/L (IFMA). Mãe: Menarca aos 10 anos.
	chr21: 40574398	NM_018963: c.4438A>G: p.Thr1480Ala	rs775782176	0,0000159	0	2P / 11B	VUS	PPC esporádica	Probando: Telarca aos 7,8 anos, 1ª consulta aos 20 anos: M5P5, Alt -0,95 DP, IMC 1,3 DP.
	chr21: 40585477	NM_018963: c.3788A>G: p.Asn1263Ser	rs752901254	0,0000041	0	2P / 11B	VUS	PPC esporádica	Probando: Telarca aos 6 anos, 1ª consulta aos 6,5 anos: IO 8,9 anos, M2P2, Alt 0,7 DP, IMC -0,3 DP, LH basal=0,6 UI/L (IFMA), Pico LH após estímulo com GnRH=9,5 UI/L (IFMA).
UGT2B4	chr4: 70350967	NM_021139.3: c.1266_1269del: p.Ser422Argfs*7	rs765274693	0,0000040	0	-	VUS	Transmissão paterna (Família 30; Fig. 7C)	Probando: Telarca aos 7,8 anos, 1ª consulta aos 8 anos: IO 10,5 anos, M2P1, Alt 2,5 DP, IMC -0,2 DP, LH basal=0,6 UI/L (ECLIA). Pai: Puberdade adiantada.

Fonte: Elaborada pelo próprio autor

*Os algoritmos *in silico* utilizados foram descritos na Figura 2 (Seção 4.1.5.3.2).

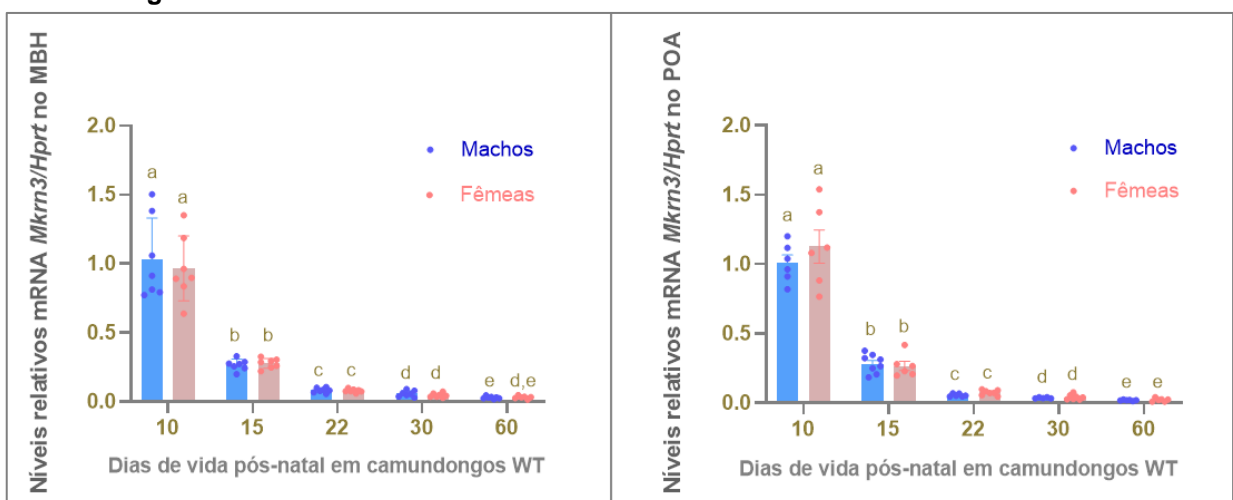
ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; ACMG/AMP: Colégio Americano de Genética Médica e Genômica/ Associação de Patologia Molecular;¹¹² Alt: altura; B: benigno; chr: cromossomo; dbSNP ID: Single Nucleotide Polymorphism Database Identifier; DP: escore de desvio padrão; gnomAD: Genome Aggregation Database; IMC: índice de massa corpórea; IO: idade óssea; MAF: menor frequência alélica, M-P: estadiamento de mama e pelos pubianos de acordo com Tanner e Marshal;¹⁰⁵ P: patogênico; VUS: variante de significado incerto.

5.2 ESTUDO EM CAMUNDONGOS

5.2.1 CONCENTRAÇÕES HIPOTALÂMICAS DE mRNA DOS GENES MKRN3, DLK1 E MECP2 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PUBERAL

As concentrações de mRNA do *Mkrn3* no MBH e POA foram mais altas em PN10, com queda significativa e progressiva nas demais idades estudadas, permanecendo baixas na idade adulta, com padrões semelhantes em camundongos machos e fêmeas (Figura 8). Em contraste, as concentrações de mRNA do *Dlk1* foram maiores em PN60 em comparação a PN22 no MBH de camundongos machos, enquanto no MBH de camundongos fêmeas foram maiores em PN22 e PN30 em comparação a PN10 (Figura 9). No POA de camundongos machos, as concentrações de mRNA do *Dlk1* foram maiores em PN60 em comparação a PN10 e PN15, enquanto não foram observadas diferenças significativas entre as idades no POA de camundongos fêmeas (Figura 10). As concentrações de mRNA do *Mecp2* foram maiores em PN10 quando comparadas a PN15 e PN22 no MBH de camundongos machos, e a PN15, PN30 e PN60 no MBH de camundongos fêmeas (Figura 11). No POA de camundongos machos e fêmeas as concentrações de mRNA do *Mecp2* foram significativamente maiores em PN10 em comparação a todas as outras idades (Figura 12). Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais estudados para cada idade ou nas concentrações de mRNA hipotalâmico entre camundongos machos e fêmeas para os três genes estudados ($P > 0,05$).

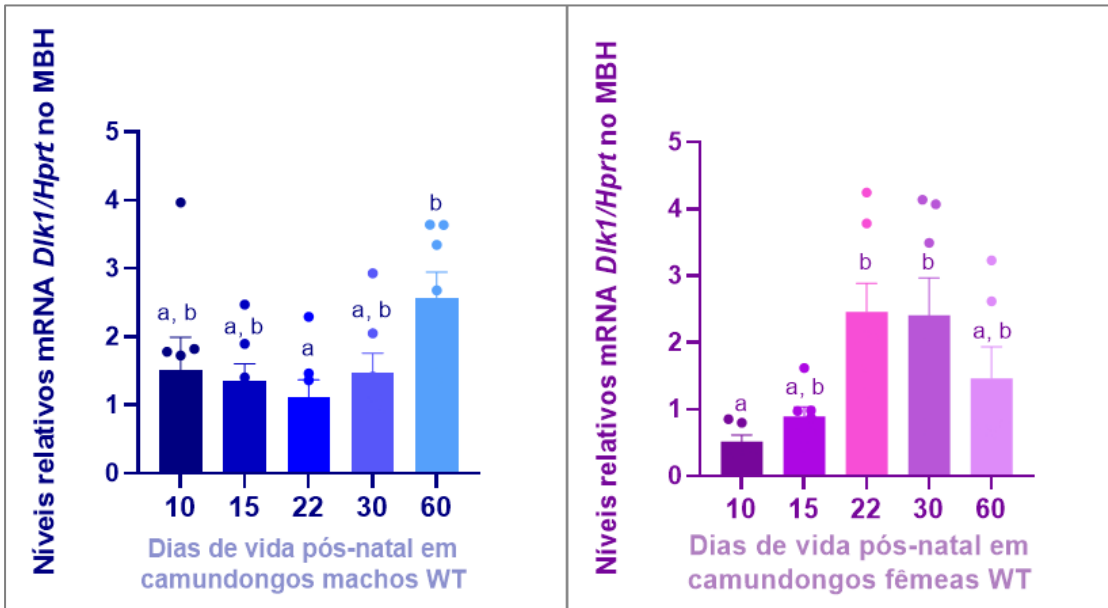
Figura 8 - Expressão gênica relativa do *Mkrn3* (mRNA *Mkrn3/Hprt*) no MBH e POA de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a - e) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

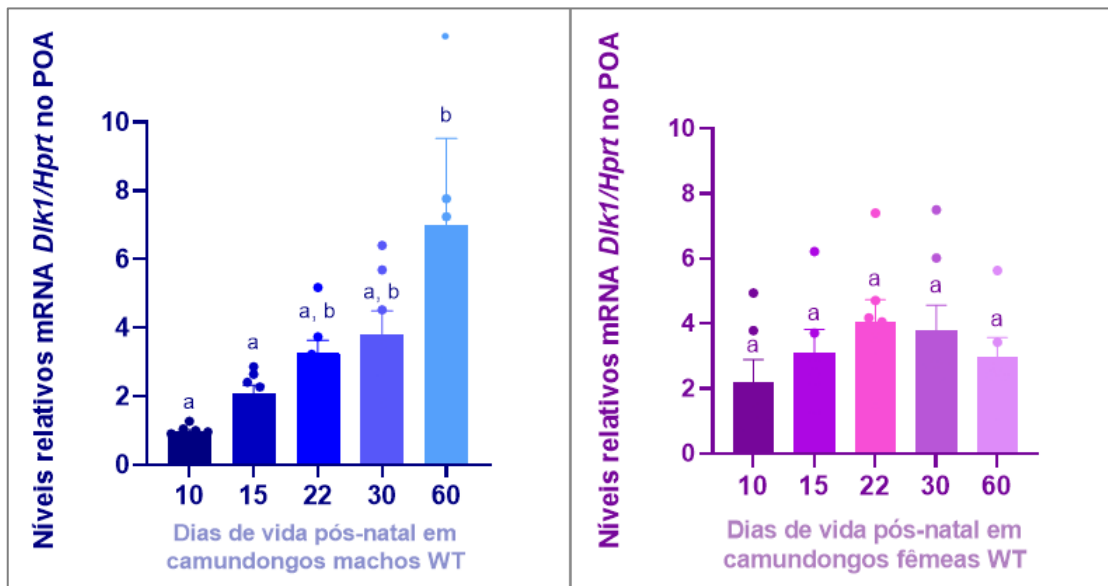
Figura 9 - Expressão gênica relativa do *Dik1* (mRNA *Dik1/Hprt*) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a, b) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

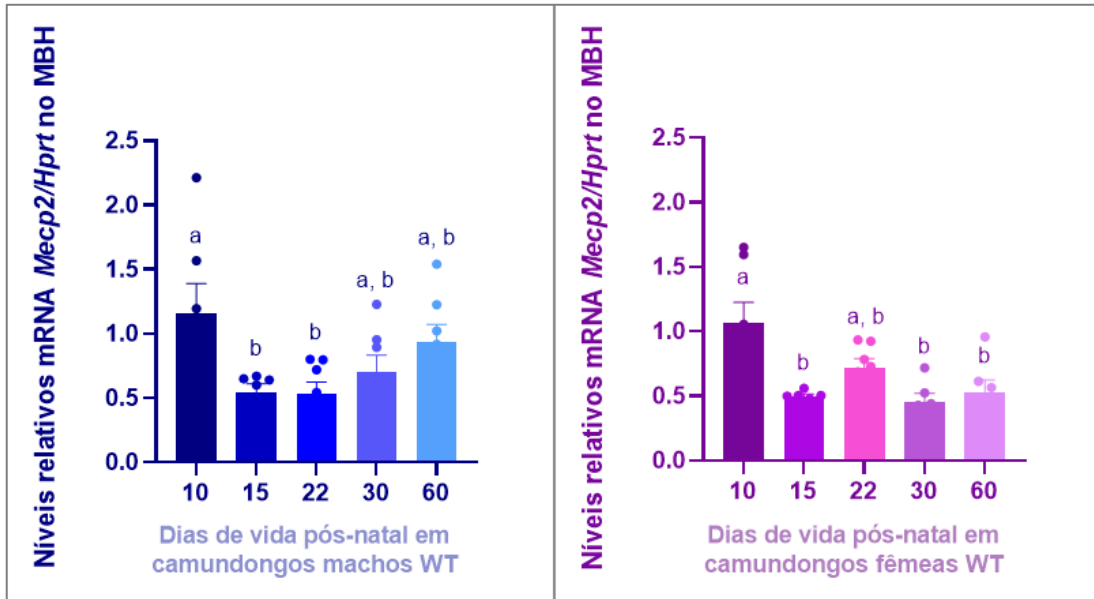
Figura 10 - Expressão gênica relativa do *Dik1* (mRNA *Dik1/Hprt*) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a, b) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

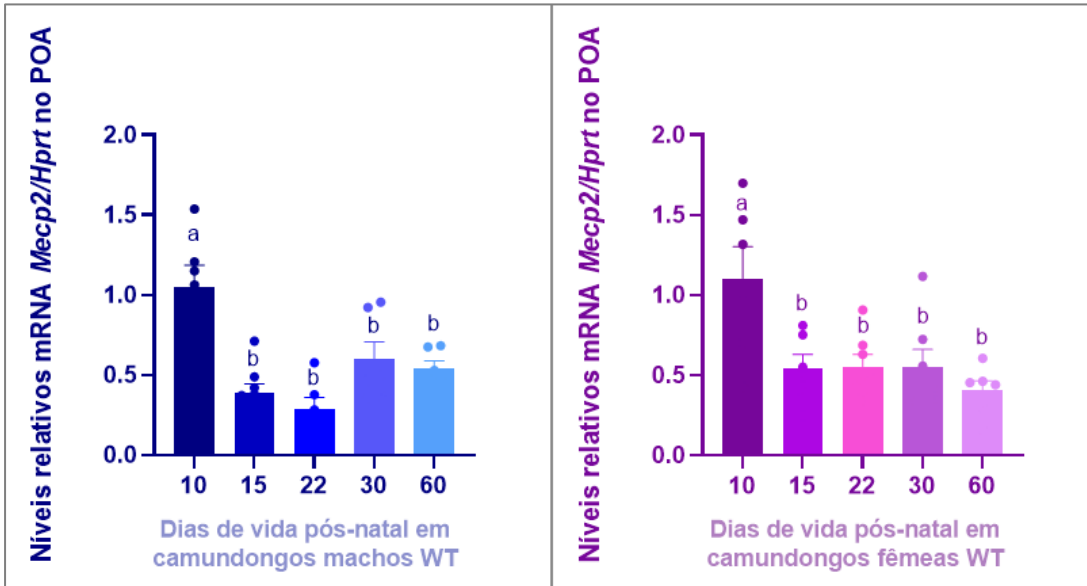
Figura 11 - Expressão gênica relativa do *Mecp2* (mRNA *Mecp2/Hprt*) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a, b) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

Figura 12 - Expressão gênica relativa do *Mecp2* (mRNA *Mecp2/Hprt*) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.



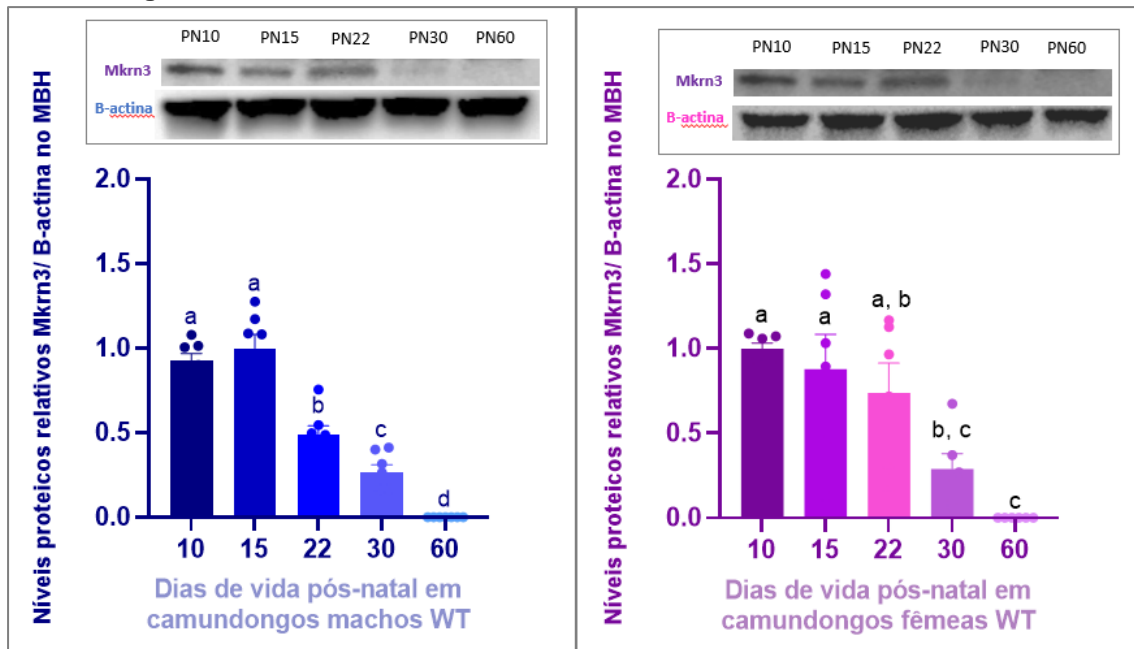
Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a, b) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

5.2.2 CONCENTRAÇÕES PROTEICAS HIPOTALÂMICAS DO MKRN3 E DLK1 AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PUBERAL

As concentrações proteicas do Mkrn3 tiveram queda após PN15 no MBH e POA de camundongos machos, após PN22 no MBH de camundongos fêmeas e após PN10 no POA de camundongos fêmeas (Figuras 13 e 14). Camundongos machos e fêmeas tiveram concentrações indetectáveis de Mkrn3 no MBH e POA na idade PN60 (Figuras 13 e 14). As concentrações do Dlk1 no MBH de camundongos machos foram maiores em PN60 quando comparado a PN10, PN15 e PN22; enquanto as concentrações em PN22 e PN30 foram maiores que em PN10 e PN15 (Figura 15). No MBH de camundongos fêmeas, as concentrações do Dlk1 em PN22, PN30 e PN60 foram maiores que em PN10 (Figura 15). No POA de camundongos machos, as concentrações do Dlk1 em PN60 foram maiores em comparação a PN10 e PN15; enquanto no POA de camundongos fêmeas as concentrações em PN60 foram maiores que em PN10, PN15 e PN22 e as concentrações em PN30 foram maiores que em PN10 (Figura 16). As concentrações proteicas foram comparadas apenas entre camundongos do mesmo sexo. Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais estudados para cada idade ($P > 0,05$).

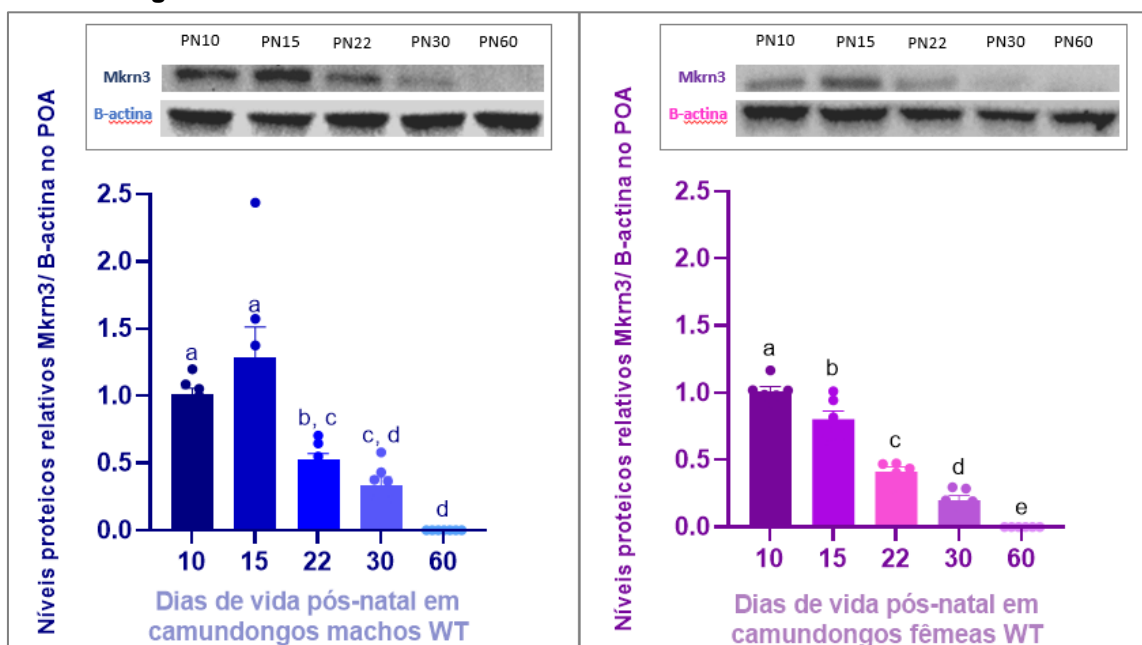
Figura 13 - Expressão proteica relativa do Mkrn3 (Mkrn3/B-actina) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a - d) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

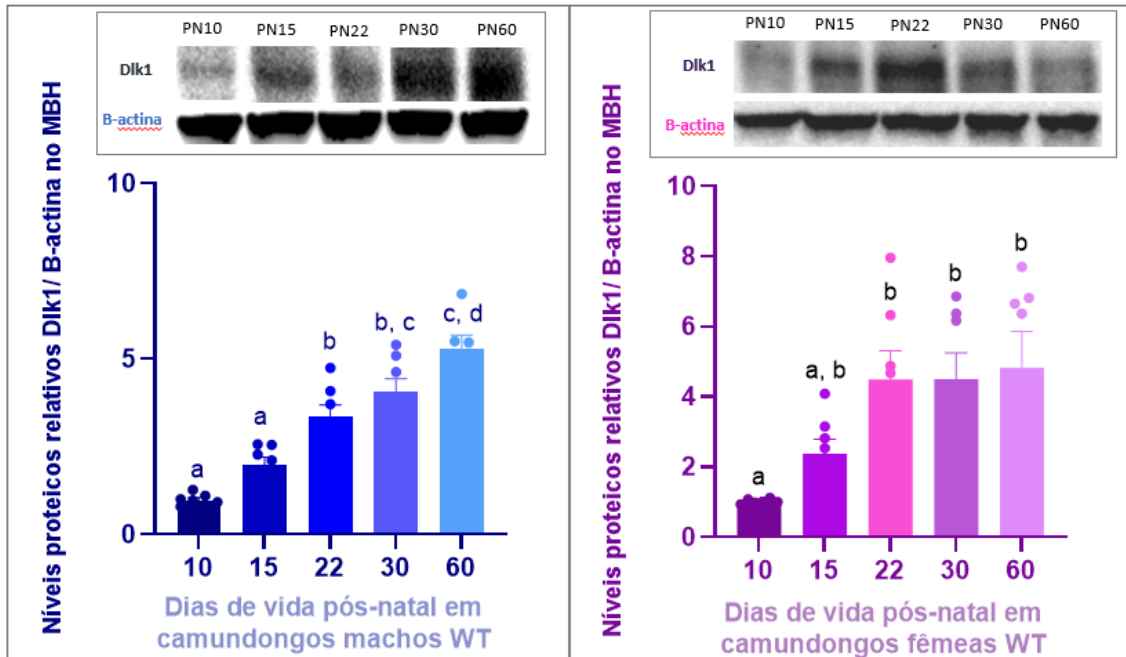
Figura 14 - Expressão proteica relativa do Mkrn3 (Mkrn3/B-actina) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a - e) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

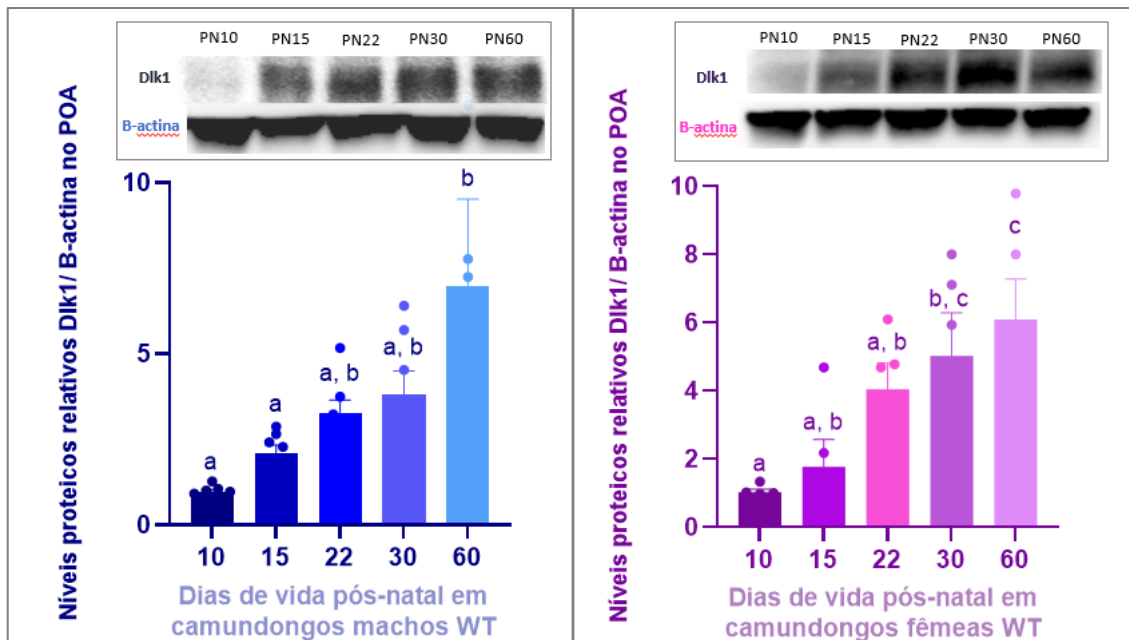
Figura 15 - Expressão proteica relativa do Dlk1 (Dlk1/B-actina) no MBH de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a - d) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

Figura 16 - Expressão proteica relativa do Dlk1 (Dlk1/B-actina) no POA de camundongos WT de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Barras designadas por letras diferentes (a - c) são significativamente diferentes entre si ($P < 0,05$).

5.2.3 CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DO DLK1 CIRCULANTE AO LONGO DO DESENVOLVIMENTO PUBERAL EM CAMUNDONGOS WT, DLK1-KO E DLK1-cKO

Entre camundongos WT machos e fêmeas, as concentrações de Dlk1 circulante foram mais altas em PN10, diminuindo progressivamente em cada idade subsequente até PN60 (Figura 17). As concentrações séricas de Dlk1 foram semelhantes entre camundongos machos e fêmeas, exceto para a idade PN15, quando as fêmeas tiveram concentrações mais altas que os machos. Em PN10, PN15 e PN22, nenhum dos camundongos havia apresentado sinais clínicos de puberdade (abertura vaginal nas fêmeas e separação prepucial nos machos). Em PN30, seis das oito fêmeas avaliadas apresentaram abertura vaginal, enquanto apenas um dos sete machos avaliados apresentou separação prepucial. Em PN60, todos os animais apresentaram sinais clínicos puberais. Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais estudados para cada idade ($P > 0,05$).

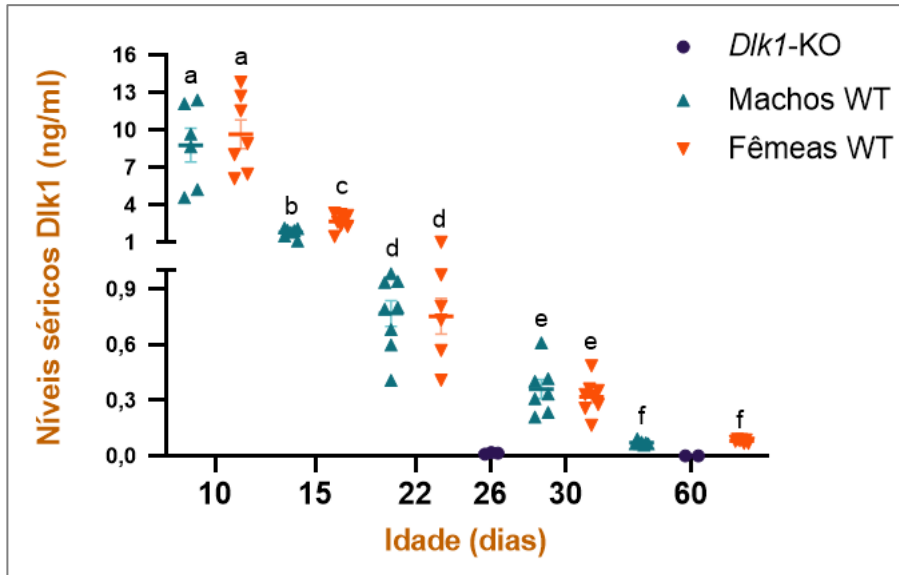
As cinco fêmeas WT avaliadas durante a maturação puberal apresentaram abertura vaginal na idade média de $25,6 \pm 1,9$ dias e primeiro estro na idade média de $37,6 \pm 2,6$ dias. Os níveis séricos de Dlk1 foram maiores ao desmame (21 dias de vida), diminuindo progressivamente ao longo da maturação puberal, atingindo os níveis mais baixos cinco dias após o primeiro estro (Figura 18). As concentrações séricas de Dlk1 foram estatisticamente diferentes entre os estágios puberais avaliados, exceto na comparação entre o primeiro estro vs. cinco dias após o primeiro estro ($p = 0,99$). Não foram observadas diferenças significativas no peso dos animais estudados para cada estágio puberal ($P > 0,05$).

Camundongos com nocaute total do *Dlk1* (*Dlk1*-KO) apresentaram concentrações indetectáveis de Dlk1 circulante em PN60 e concentrações muito baixas em PN26 (Figuras 17 e 19). As concentrações séricas de Dlk1 em PN26 foram significativamente menores do que as dos camundongos machos e fêmeas WT em PN22 e PN30 ($p = 0,0002$; $0,0003$; $0,0008$ e $0,002$; respectivamente).

Camundongos com nocaute parcial do *Dlk1* restrito ao SNC (*Dlk1*-cKO) com idade PN120 apresentaram concentrações séricas de Dlk1 significativamente maiores que as dos *Dlk1*-KO (PN26 e PN60) ($p = 0,027$ na comparação entre os machos e $p = 0,0008$ na comparação entre fêmeas; Figura 19). Em comparação aos camundongos WT com idade pareada, as fêmeas *Dlk1*-cKO apresentaram maiores

concentrações de Dlk1 circulante ($p=0,0088$), enquanto os machos não apresentaram diferença estatística ($p=0,4971$; Figura 20).

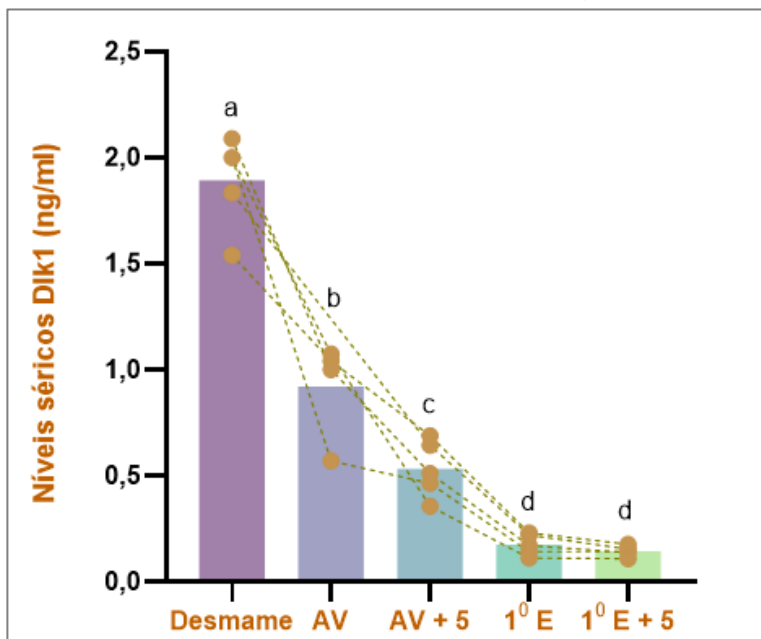
Figura 17 - Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos WT e *Dlk1*-KO de acordo com a idade.



Fonte: Produção do próprio autor.

As diferentes letras (a - f) representam diferença estatística entre camundongos selvagens (WT) machos e fêmeas de diferentes idades ($P<0,05$). As comparações entre camundongos WT e nocaute para *Dlk1* (*Dlk1*-KO) não foram representadas neste gráfico.

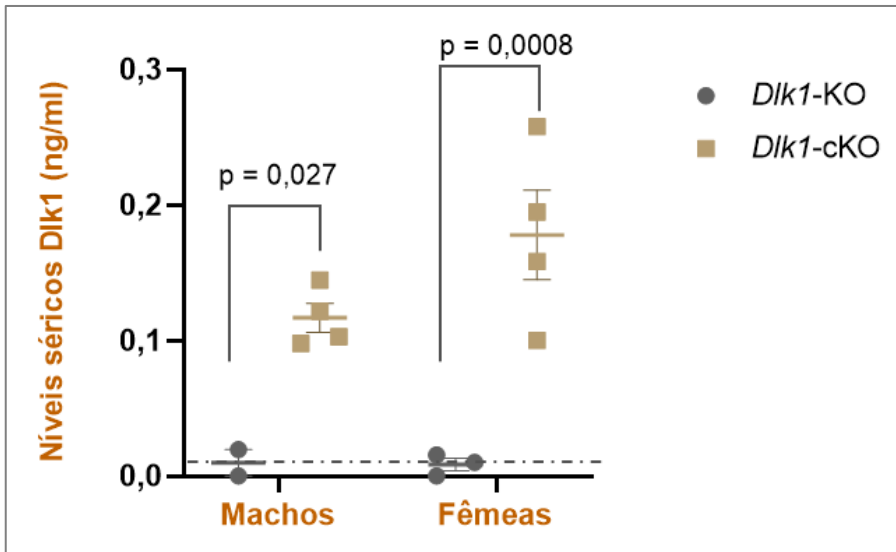
Figura 18 – Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos fêmeas WT de acordo com estágio de maturação puberal.



Fonte: Produção do próprio autor.

Dados expressos em média \pm EP. Colunas designadas por letras diferentes (a - d) são significativamente diferentes entre si ($P<0,05$). AV: abertura vaginal; 1º E: primeiro estro.

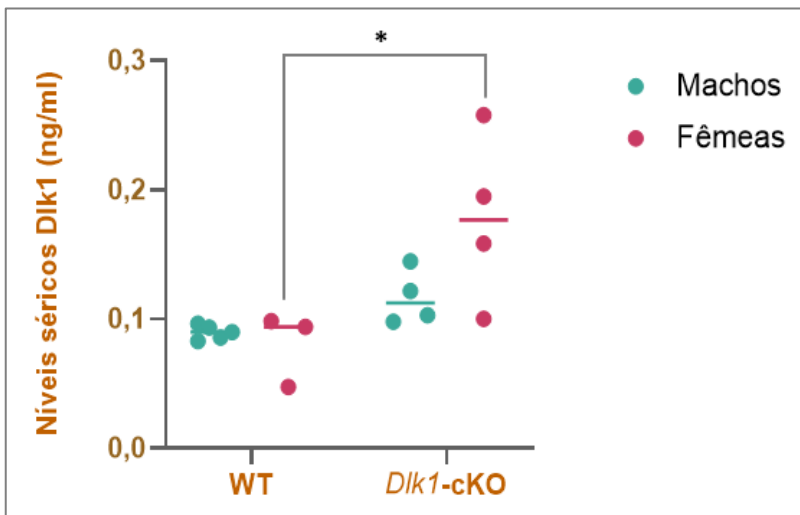
Figura 19 - Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos Dlk1-KO x Dlk1-cKO.



Fonte: Produção do próprio autor.

A linha tracejada representa o limite mínimo de detecção (0,0045 ng/ml).

Figura 20 - Concentrações séricas de Dlk1 circulante em camundongos WT x Dlk1-cKO pareados por idade (PN120).



Fonte: Produção do próprio autor.

*P=0,0088.

6. DISCUSSÃO

Este estudo demonstrou uma prevalência de PPC familiar de 22% das famílias avaliadas em uma grande coorte brasileira-hispânica. Apesar dessa frequência ser discretamente menor que a demonstrada em estudos prévios (25% a 27,5%),^{46,51} é importante notar que o critério de história familiar utilizado em nosso estudo (menarca ≤ 9 anos) foi mais restrito que o usado nos estudos anteriores (menarca ≤ 10 anos). De maneira interessante, a prevalência da PPC familiar em nosso estudo aumentou para 27% quando consideramos o critério de idade da menarca ≤ 10 anos.

A predominância da transmissão materna na maioria dos estudos que avaliaram a PPC familiar é notável, e é curioso que essa forma de transmissão não tenha sido associada a nenhuma causa monogênica definitiva até o momento.^{46,50,51} A prevalência da PPC de transmissão materna e paterna foi muito semelhante em nosso estudo (39% de transmissão materna e 38% de transmissão paterna). Notavelmente, a história familiar de puberdade precoce é mais facilmente reconhecida nas mães do que nos pais dos probandos, o que poderia gerar um viés de maior encaminhamento de casos de PPC de transmissão materna. Por outro lado, a proporção de famílias com transmissão paterna de PPC também pode ter sido superestimada neste estudo devido ao encaminhamento mais frequente dessas famílias para estudos genéticos de mutações no *MKRN3* e *DLK1* em nosso laboratório de análise genética (LIM/42). Famílias com mutações inativadoras desses genes submetidos a *imprinting* materno podem ter gerações não consecutivas afetadas pela PPC, devido a existência de portadores assintomáticos do sexo masculino que herdaram o defeito de suas mães. Isso se refletiu na proporção significativa (42%) de apenas uma geração sabidamente afetada em famílias com PPC de transmissão paterna. Além disso, embora as mulheres frequentemente se recordem da idade de menarca, a maioria dos homens não tem uma lembrança precisa do início de seus marcos puberais, e a falta dessa informação pode subestimar o número de pais (22%) e outros familiares do sexo masculino afetados nessas famílias. Ao contrário, a maioria das famílias (85%) com transmissão materna da PPC tiveram pelo menos duas gerações sabidamente afetadas, sugerindo uma herança autossômica dominante, com transmissão materna direta em 67% dos casos. A grande predominância de mulheres afetadas nas famílias (90%) sugere penetrância dependente do sexo. Todavia, o número de familiares do sexo masculino afetados

pode ter sido subestimado pela maior dificuldade de diagnóstico de PPC em meninos e pela recordação imprecisa do início puberal em homens.

Ao diagnóstico de PPC, a apresentação clínica e hormonal foi semelhante entre meninas com transmissão materna, paterna ou indeterminada da PPC; exceto pela IC de telarca, que ocorreu mais cedo em meninas com transmissão paterna do que em meninas com transmissão indeterminada da PPC. Além disso, uma resposta adequada e semelhante ao tratamento com aGnRH foi verificada entre os três grupos com modos distintos de transmissão familiar da PPC. Esses dados foram consistentes com um estudo anterior do nosso grupo, o qual mostrou que pacientes com PPC causada por mutações inativadoras do *MKRN3* tiveram uma evolução antropométrica, metabólica e reprodutiva similar ao grupo com PPC idiopática após o tratamento com aGnRH.⁸² Esses achados podem sugerir que os distintos modos de transmissão da PPC familiar tenham bases genéticas que envolvam fatores da mesma rede de regulação gênica.

Diversos estudos avaliaram as mutações inativadoras do *MKRN3* associadas à PPC familiar desde sua primeira descrição, e a prevalência de mutações neste gene foi estimada em até 33% a 46% dos casos familiares.^{28,72} No atual estudo, entre os 204 pacientes (provenientes de 165 famílias) com PPC familiar submetidos a testes genéticos, mutações inativadoras no *MKRN3* foram identificadas em 35% dos pacientes e 22% das famílias. Uma maior prevalência de mutações neste gene foi encontrada no grupo com PPC de transmissão paterna (77% dos pacientes e 57% das famílias). Assim, consideramos que a menor prevalência de mutações do *MKRN3* em famílias com PPC encontrada em nosso estudo em comparação aos estudos anteriores^{28,72} pode ter sido influenciada por um maior número de famílias com PPC de transmissão materna incluídas no estudo atual.

Mutações inativadoras do *DLK1* associadas a PPC foram reportadas em poucos estudos e são atualmente consideradas um causa rara de PPC familiar ou esporádica.^{29,86–89} Mutações neste gene foram identificadas em 6% dos pacientes e 4% das famílias neste estudo. Como esperado, todos os pacientes com mutações neste gene de *imprinting* materno tiveram transmissão paterna da PPC, e a prevalência de mutações dentro do grupo com PPC de transmissão paterna foi notavelmente maior: 13% dos pacientes e 10% das famílias.

Apesar do número significativo de famílias com transmissão materna da PPC submetidos a SPLE neste estudo (61 indivíduos de 24 famílias), nenhuma causa monogênica definitiva foi identificada. Estudos prévios também não foram capazes de definir defeitos genéticos associados a essa forma de transmissão da PPC familiar, sugerindo que suas possíveis causas genéticas sejam de difícil detecção pelos métodos de sequenciamento utilizados (sequenciamento por Sanger e sequenciamento exômico). Desse modo, consideramos importante considerar o possível envolvimento de outros mecanismos genéticos na PPC de transmissão materna; tais como variações no número de cópias, variações de nucleotídeo único localizadas em regiões reguladoras não cobertas pelo WES, defeitos epigenéticos, mutações de DNA mitocondrial e/ou herança oligo ou poligênica.

De maneira interessante, identificamos uma rara variante missense em heterozigose de significado incerto no *TET2* (p.His650Arg) em uma família com PPC de transmissão materna. O *TET2* faz parte da família de enzimas tet (*ten-eleven translocation*), responsáveis pela desmetilação do DNA.⁶⁹ Como discutido na seção 1.1.2, a metilação do DNA é um importante mecanismo epigenético envolvido na regulação da puberdade.^{19,20,23–27} Notavelmente, experimentos *in vitro* e em camundongos mostraram que a transcrição e a secreção do GnRH aumentaram com a superexpressão da Tet2, enquanto sua ablação levou a uma queda significativa na expressão do GnRH.⁶⁹ Além disso, como discutido na seção 1.2.2.2.1, a supressão do recrutamento da *TET2* pelo *MBD3* pode ser um dos mecanismos pelo qual o *MKRN3* promove o silenciamento epigenético do *GNRH1*.⁶⁷ Dessa maneira, nossa hipótese é de que a variante do *TET2* (p.His650Arg) encontrada nessa família com transmissão materna da PPC possa resultar em um ganho de função da enzima *TET2*, aumentando a expressão do *GNRH1* via desmetilação de seu promotor, consequentemente levando à ativação prematura do eixo HHG. Todavia, mais estudos são necessários para confirmação dessa hipótese. Ademais, a associação do *TET2* à idade da menarca em GWAS¹¹⁵ levanta a hipótese de seu possível envolvimento em formas de herança oligo ou poligênicas da PPC familiar.

Foram identificadas também raras variantes heterozigotas de significado incerto (p.Thr2181Met, p.Thr1480Ala e p.Asn1263Ser) no *BRWD1* em três diferentes pacientes do sexo feminino (uma delas com PPC familiar de transmissão materna e duas com PPC esporádica). O *BRWD1* é um regulador transcricional cujo gene

também foi associado à idade da menarca e ao início da puberdade masculina em GWAS,^{18,115,116} sugerindo que esse gene também possa estar associado a um modelo de herança oligo ou poligênica da PPC.

Adicionalmente, identificamos uma rara variante frameshift de significado incerto em heterozigose (p.Ser422Rfs*7) no *UGT2B4* em uma menina com PPC e em seu pai, que tinha um histórico de desenvolvimento sexual prematuro. O gene *UGT2B4* codifica uma enzima envolvida na glucuronidação de andrógenos e também foi associado à idade da menarca em populações específicas.¹¹⁷ De maneira interessante, uma rara variante heterozigota missense de significado incerto foi previamente descrita neste gene por nosso grupo, que observou perfeita segregação da variante com o fenótipo de PPC de transmissão materna em uma família brasileira.⁴⁴ Desse modo, consideramos que o *UGT2B4* também pode estar associado a um modo de herança oligo ou poligênico da PPC familiar.

Os estudos de expressão gênica realizados em camundongos revelaram que os genes *Mkrn3*, *Dlk1* e *Mecp2* apresentam diferentes padrões de expressão hipotalâmica ao longo das diferentes fases de maturação sexual desses animais. A redução da expressão hipotalâmica do *Mkrn3* observada em camundongos machos e fêmeas no MBH e POA antes do início puberal foi concordante com estudos prévios e reforça seu papel inibitório no eixo HHG.^{28,65} Como detalhado na seção 1.2.2.2.1, distintos mecanismos pelos quais o MKRN3 inibe a secreção do GnRH foram propostos, e mais estudos são ainda necessários para melhor compreensão da regulação puberal por esse que é hoje o mais importante gene associado à PPC.^{65–68}

Em contraste, a expressão do *Dlk1* no MBH e POA aumentou em camundongos machos e fêmeas entre a infância e a idade adulta, confirmando achados prévios de Villanueva et al.⁹² Esse padrão de crescente expressão ao longo da maturação sexual foi inesperado, uma vez que mutações inativadoras do *DLK1* levam à reativação prematura do eixo HHG.^{29,86–89} Curiosamente, um estudo previamente realizado pela Dra. Delanie B. Macedo (Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Hipertensão do *Brigham and Women's Hospital e Harvard Medical School*) mostrou que, enquanto os camundongos com nocaute total do *Dlk1* (*Dlk1*-KO) iniciaram a puberdade com um peso corporal consideravelmente menor que os controles,⁹³ nenhuma diferença foi observada no peso corporal ou idade de início da puberdade entre camundongos com nocaute do *Dlk1* restrito ao SNC (*Dlk1*-cKO) e os controles (Macedo et al. Estudo não

publicado). Esses dados sugerem que o Dlk1 que atua na regulação hipotalâmica da puberdade em camundongos seja de provável origem periférica, o que nos impulsionou a estudar a forma solúvel circulante do Dlk1 no soro de camundongos WT, *Dlk1-KO* e *Dlk1-cKO* em diferentes idades e estágios puberais. As concentrações séricas de Dlk1 se reduziram com o avanço da idade em camundongos machos e fêmeas, assim como durante a maturação puberal das fêmeas. Além disso, camundongos *Dlk1-KO* tiveram concentrações séricas indetectáveis ou muito baixas dessa proteína, de maneira similar aos pacientes portadores de mutações inativadoras desse gene.^{29,86,87,89} De maneira oposta, os camundongos *Dlk1-cKO* apresentaram concentrações séricas detectáveis de Dlk1, significativamente maiores que as dos *Dlk1-KO*. Quando comparados a camundongos WT de idade pareada, as concentrações de Dlk1 circulante dos camundongos *Dlk1-cKO* foram similares ou até mais elevadas, sugerindo que a deleção desse gene no SNC não altera a circulação periférica do Dlk1. Esses achados sugerem que o Dlk1 periférico circulante possa ter importante papel na regulação do início da puberdade, com uma ação inibitória no eixo HHG, consistente com o fenótipo de PPC em pacientes com mutações de perda de função nesse gene.

A investigação de novos genes associados à PPC por nosso grupo levou à identificação de variantes no gene *MECP2* em pacientes com PPC familiar e esporádica.⁹⁴ Apesar da existência de estudos prévios mostrando que pacientes com Síndrome de Rett causada por mutações nesse gene podem apresentar prematuridade sexual,⁹⁹⁻¹⁰² seus possíveis mecanismos de regulação do eixo HHG não são conhecidos. Dessa maneira, consideramos que o estudo de sua expressão hipotalâmica ao longo de diferentes fases de maturação sexual em camundongos poderia auxiliar no entendimento de seu papel no controle do início da puberdade. De maneira interessante, observamos que as concentrações de mRNA do *Mecp2* no MBH e POA são mais altas durante a infância, com uma queda antes do início da puberdade. Esses dados sugerem que o *Mecp2* possa atuar como um inibidor do eixo HHG, e corroboram com os achados de PPC associada a mutações inativadoras desse gene.

7. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou uma prevalência de 22% da PPC familiar, com uma frequência semelhante de transmissão materna e paterna dessa condição em uma grande coorte multiétnica. A maioria das famílias com PPC de origem paterna estudadas seguiram o padrão de herança autossômica dominante com transmissão exclusivamente paterna, característico de distúrbios genéticos associados ao *imprinting* materno. Entre as famílias com PPC de transmissão materna estudadas, um modo de herança autossômica dominante com maior penetrância no sexo feminino foi sugerido a partir da análise dos heredogramas. As características clínicas e hormonais ao diagnóstico e a resposta ao tratamento com aGnRH foram semelhantes entre pacientes com PPC familiar de transmissão materna, paterna ou indeterminada. As mutações inativadoras do *MKRN3* foram a causa mais prevalente de PPC familiar (22% das famílias), seguidas pelas mutações inativadoras do *DLK1* (4% das famílias), ambas ocorrendo exclusivamente em famílias com transmissão paterna da PPC. Nenhuma causa monogênica definitiva foi associada à PPC de transmissão materna, e a hipótese de modelos de herança oligo ou poligênicas devem ser consideradas.

Em camundongos, notou-se queda na expressão hipotalâmica dos genes *Mkfn3* e *Mecp2* antes do início puberal, sugerindo papéis inibitórios desses fatores no eixo HHG. Em contraste, a expressão hipotalâmica do *Dlk1* aumentou entre a infância e a idade adulta, enquanto as concentrações séricas do *Dlk1* circulante reduziram com a idade e ao longo da maturação sexual. Além disso, enquanto camundongos com nocaute total de *Dlk1* tiveram concentrações séricas dessa proteína indetectáveis ou muito baixas, o nocaute restrito ao SNC não reduziu as concentrações do *Dlk1* circulante. Tais dados sugerem que o *Dlk1* periférico circulante possa ter importante papel na regulação da puberdade.

Diante desses dados, consideramos que a história familiar de PPC deve ser ativamente e rotineiramente investigada, a fim de permitir diagnósticos e tratamentos mais precoces dessa condição familiar. Além disso, entendemos que o estudo da expressão hipotalâmica de genes associados à PCC é de fundamental importância no entendimento de seus mecanismos de regulação puberal.

8. ANEXOS

Anexo A: Critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas quanto à patogenicidade.

Critério muito forte para patogenicidade	
PVS1	Variante nonsense, frameshift, em sítios de <i>splice</i> canônicos ± 1 ou 2, códon de iniciação ou deleção de 1 ou vários éxons em um gene no qual variantes com perda de função são mecanismos conhecidos de doença
Critérios fortes para patogenicidade	
PS1	Troca de aminoácido já estabelecida como patogênica, independente da troca do nucleotídeo
PS2	Variante <i>de novo</i> em um paciente com doença sem história familiar (com paternidade confirmada)
PS3	Presença de estudos funcionais (<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>) bem estabelecidos que suportem o efeito prejudicial no gene ou sua proteína
PS4	A prevalência da variante nos indivíduos afetados é significativamente maior quando comparada com a prevalência em controles
Critérios moderados para patogenicidade	
PM1	Variante localizada em uma região <i>hotspot</i> para mutações e/ou região importante já estabelecida com um domínio funcional da proteína, sem variantes descritas como benignas
PM2	Variante ausente nos bancos de dados populacionais (<i>1000Genomes</i> , ExAC) (ou presente em frequência extremamente baixa, para os casos recessivos)
PM3	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica para as doenças recessivas
PM4	Modificação no tamanho da proteína causada por deleções ou inserções <i>in-frame</i> em região não repetitiva ou por variantes que perdem o códon de parada (<i>stop-loss</i>)
PM5	Nova variante missense em um aminoácido em que uma variante missense diferente já foi estabelecida como patogênica
PM6	Variante considerada <i>de novo</i> , sem confirmação da paternidade
Critérios moderados para benignidade	
PP1	Segregação da variante (em um gene conhecido como causador de doença) com a doença em uma família com vários membros afetados
PP2	Variante missense em um gene com uma baixa taxa de mutações missense benignas e no qual esse tipo de variante é considerado um mecanismo comum de doença
PP3	Várias ferramentas computacionais suportam a evidência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no <i>splicing</i> , etc)
PP4	O fenótipo do paciente ou a história da família são bastante específicos de uma doença monogênica
PP5	Variante recém-publicada como patogênica, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente.
Critérios fracos para benignidade	
BP1	Variante missense em um gene no qual variantes com perda de função são mecanismos conhecidos de doença
BP2	Variante detectada em <i>trans</i> com uma variante patogênica dominante com penetrância completa ou observada em <i>cis</i> com uma variante patogênica em qualquer tipo de herança
BP3	Deleções ou inserções <i>in-frame</i> em região repetitiva sem função conhecida
BP4	Várias ferramentas computacionais sugerindo ausência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no <i>splicing</i> , etc)
BP5	Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença
BP6	Variante recém-publicada como benigna, porém o laboratório não apresenta condições de fazer um estudo funcional independente.
BP7	Variante sinônima cujas ferramentas de predição de <i>splicing</i> não predizem impacto na sequência consenso de <i>splice</i> nem a criação de um novo sítio, e o nucleotídeo não é conservado
Critérios fortes para benignidade	
BS1	A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença

BS2	Variante para doença recessiva (em homozigose), dominante (em heterozigose) ou ligada ao X (hemizigose), com penetrância completa e de início precoce, observada em indivíduo adulto saudável
BS3	Presença de estudos funcionais (<i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i>) bem estabelecidos mostrando ausência de efeito prejudicial para a proteína ou <i>splicing</i>
BS4	Ausência de segregação nos indivíduos afetados da família
Critério benigno por si só	
BA1	Frequência alélica maior que 5% nos bancos de dados populacionais (<i>1000Genomes</i> , ExAC)

Fonte: Adaptado de Richards et al., 2015.¹¹² **PVS**: critério muito forte para patogenicidade; **PS**: critério forte para patogenicidade; **PM**: critério moderado para patogenicidade; **PP**: critério fraco para patogenicidade; **BA**: critério benigno por si só; **BS**: critério forte para benignidade; **BP**: critério fraco para benignidade. *1000Genomes*: *1000Genomes Project*; *ExAC*: *Exome Aggregation Consortium*.

Anexo B: Normas para combinação dos critérios do ACMG/AMP para classificação das variantes alélicas identificadas.

Classificação	Combinação dos critérios
Variante patogênica	(I) 1 critério muito forte para patogenicidade (PVS1) e (a) ≥ 1 critérios fortes para patogenicidade (PS1-PS4) ou (b) ≥ 2 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) ou (c) 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) e 1 critério fraco para patogenicidade (PP1-PP5) ou (d) ≥ 2 PP (PP1-PP5) (II) ≥ 2 critérios fortes para patogenicidade (PS1-PS4) ou (III) 1 critério forte para patogenicidade (PS1-PS4) e (a) ≥ 3 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) ou (b) 2 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 2 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5) ou (c) 1 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 4 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5)
Variante provavelmente patogênica	(I) 1 critério muito forte para patogenicidade (PVS1) e 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) ou (II) 1 critério forte para patogenicidade (PS1-PS4) e 1 ou 2 critérios moderado para patogenicidade (PM1-PM6) ou (III) 1 critério forte para patogenicidade (PS1-PS4) e ≥ 2 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5) ou (IV) ≥ 3 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) ou (V) 2 critérios moderados para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 2 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5) ou (VI) 1 critério moderado para patogenicidade (PM1-PM6) e ≥ 4 critérios fracos para patogenicidade (PP1-PP5)
Variante benigna	(I) 1 critério benigno por si só (BA1) ou (II) ≥ 2 critérios fortes para benignidade (BS1-BS4)
Variante provavelmente benigna	(I) 1 critério forte para benignidade (BS1-BS4) e 1 critério fraco para benignidade (BP1-BP7) ou (II) ≥ 2 critérios fracos para benignidade (BP1-BP7)
Variante de significado incerto	(I) outra combinação de critérios não mencionada acima ou (II) critérios para benignidade e patogenicidade contraditórios

Fonte: Adaptado de Richards et al., 2015.¹¹² **PVS**: critério muito forte para patogenicidade; **PS**: critério forte para patogenicidade; **PM**: critério moderado para patogenicidade; **PP**: critério fraco para patogenicidade; **BP**: critério fraco para benignidade; **BS**: critério forte para benignidade; **BA**: critério benigno por si só.

Anexo C: Lista das sequências de oligonucleotídeos utilizadas no sequenciamento por Sanger dos genes *MKRN3* e *DLK1*.

Gene	Referência NCBI	Éxon	Sequência senso	Sequência anti-senso
<i>MKRN3</i>	NM_005664.3	1	A: 5'-AAAGAGATGCACACTTCCCC-3' B: 5'-ACTGAGGGTGGCGTTTCG-3' C: 5'-CATCTGCATGGAGGTTGTCT-3'	A: 5'-CTCGGCTTCAAAGAAACCCC-3' B: 5'-ACTGAGGGTGGCGTTTCG-3' C: 5'-TGAAAGCAGTAAGAGTGTCAACA-3'
		1	5'-gagggAACGTGTACCAAACG-3'	5'-cttagggctaggcgggac-3'
<i>DLK1</i>	NM_003836.5	2	5'-ggctgtgtggcggaagac-3'	5'-tgcagcgtagtgccaag-3'
		3	5'-gggtccttggtccacagaa-3'	5'-ggagactgggaggagggtg-3'
		4	5'-cttactccagaccccactcg-3'	5'-ccaggatgagcgcttacttc-3'
		5	5'-cgctccctcattcacctgat-3'	5'-GCGTTCACCAGATTTGACAC-3'

Anexo D: Lista das sequências de oligonucleotídeos utilizadas na PCR em Tempo Real.

Gene	Referência NCBI	Sequência senso	Sequência anti-senso
<i>Mkrn3</i>	NM_011746.3	5'-AAGCGCATACTGGCATCAAG-3'	3'-AGCCAACGGTCATCAGAGAA-5'
<i>Dlk1</i>	NM_010052.5	5'-AGTGCGAAACCTGGGTGTC-3'	3'-GCCTCCTTGTTGAAAGTGGTCA-5'
<i>Mecp2</i>	NM_001081979	5'-CCACTGAAGTTTAAGAAGGCGA-3'	3'-GTCCCCGGTCACGGATAAT-5'

9. REFERÊNCIAS

1. Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: Minipuberty. Vol. 82, *Hormone Research in Paediatrics*. S. Karger AG; 2014. p. 73–80.
2. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 Sep 16;100(19):10972–6.
3. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CVR, Jafarzadehshirazi MR, et al. Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus of the Ewe Express Both Dynorphin A and Neurokinin B. *Endocrinology*. 2007 Dec 1;148(12):5752–60.
4. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion by Kisspeptin/Dynorphin/Neurokinin B Neurons in the Arcuate Nucleus of the Mouse. *The Journal of Neuroscience*. 2009 Sep 23;29(38):11859–66.
5. Overgaard A, Tena-Sempere M, Franceschini I, Desroziers E, Simonneaux V, Mikkelsen JD. Comparative analysis of kisspeptin-immunoreactivity reveals genuine differences in the hypothalamic Kiss1 systems between rats and mice. *Peptides (NY)*. 2013 Jul;45:85–90.
6. Zhang C, Bosch MA, Qiu J, Rønnekleiv OK, Kelly MJ. 17 β -Estradiol Increases Persistent Na⁺ Current and Excitability of AVPV/PeN Kiss1 Neurons in Female Mice. *Molecular Endocrinology*. 2015 Apr 1;29(4):518–27.
7. Wang L, Moenter SM. Differential Roles of Hypothalamic AVPV and Arcuate Kisspeptin Neurons in Estradiol Feedback Regulation of Female Reproduction. *Neuroendocrinology*. 2020;110(3–4):172–84.
8. Livadas S, Chrousos GP. Molecular and Environmental Mechanisms Regulating Puberty Initiation: An Integrated Approach. Vol. 10, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2019.
9. Mancini A, Howard SR, Cabrera CP, Barnes MR, David A, Wehkalampi K, et al. EAP1 regulation of GnRH promoter activity is important for human pubertal timing. *Hum Mol Genet*. 2019 Apr 15;28(8):1357–68.
10. Brito VN, Canton APM, Seraphim CE, Abreu AP, Macedo DB, Mendonca BB, et al. The Congenital and Acquired Mechanisms Implicated in the Etiology of Central Precocious Puberty. *Endocr Rev*. 2023 Mar 4;44(2):193–221.
11. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. Vol. 4, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Lancet Publishing Group; 2016. p. 254–64.
12. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the Timing of Puberty: Clinical Spectrum and Genetic Investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2364–8.
13. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The Timing of Normal Puberty and the Age Limits of Sexual Precocity: Variations around the World, Secular Trends, and Changes after Migration. *Endocr Rev*. 2003 Oct 1;24(5):668–93.
14. Fischbein S. Onset of Puberty in MZ and DZ Twins. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)*. 1977 Apr 1;26(2):151–7.
15. Sharma JC. The genetic contribution to pubertal growth and development studied by longitudinal growth data on twins. *Ann Hum Biol*. 1983 Jan 9;10(2):163–71.

16. Dick DM, Rose RJ, Pulkkinen L, Kaprio J. Measuring Puberty and Understanding Its Impact: A Longitudinal Study of Adolescent Twins. *J Youth Adolesc.* 2001 Aug;30(4):385–99.
17. Mustanski BS, Viken RJ, Kaprio J, Pulkkinen L, Rose RJ. Genetic and Environmental Influences on Pubertal Development: Longitudinal Data From Finnish Twins at Ages 11 and 14. *Dev Psychol.* 2004;40(6):1188–98.
18. Perry JRB, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature.* 2014 Oct 2;514(7520):92–7.
19. Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, et al. Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci.* 2013 Mar 27;16(3):281–9.
20. Rzeczowska PA, Hou H, Wilson MD, Palmert MR. Epigenetics: A New Player in the Regulation of Mammalian Puberty. *Neuroendocrinology.* 2014;99(3–4):139–55.
21. Lomniczi A, Ojeda SR. The Emerging Role of Epigenetics in the Regulation of Female Puberty. *Endocr Dev Basel, Karger.* 2016;29:1–16.
22. Wright H, Aylwin CF, Toro CA, Ojeda SR, Lomniczi A. Polycomb represses a gene network controlling puberty via modulation of histone demethylase Kdm6b expression. *Sci Rep.* 2021 Jan 21;11(1):1996.
23. Bessa DS, Maschietto M, Aylwin CF, Canton APM, Brito VN, Macedo DB, et al. Methylome profiling of healthy and central precocious puberty girls. *Clin Epigenetics.* 2018 Nov 22;10(1):146.
24. Chen S, Mukherjee N, Janjanam VD, Arshad SH, Kurukulaaratchy RJ, Holloway JW, et al. Consistency and Variability of DNA Methylation in Women During Puberty, Young Adulthood, and Pregnancy. *Genet Epigenet.* 2017 Jan 1;9:1179237X1772154.
25. Almstrup K, Lindhardt Johansen M, Busch AS, Hagen CP, Nielsen JE, Petersen JH, et al. Pubertal development in healthy children is mirrored by DNA methylation patterns in peripheral blood. *Sci Rep.* 2016 Jun 28;6(1):28657.
26. Thompson EE, Nicodemus-Johnson J, Kim KW, Gern JE, Jackson DJ, Lemanske RF, et al. 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 Dec 9;10(1):62.
27. Chen S, Refaey H, Mukherjee N, Solatikia F, Jiang Y, Arshad SH, et al. Age at onset of different pubertal signs in boys and girls and differential DNA methylation at age 10 and 18 years: an epigenome-wide follow-up study. *Hum Reprod Open.* 2020 Feb 1;2020(2).
28. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central Precocious Puberty Caused by Mutations in the Imprinted Gene MKRN3. *New England Journal of Medicine.* 2013 Jun 27;368(26):2467–75.
29. Dauber A, Cunha-Silva M, MacEdo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally Inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2017 May 1;102(5):1557–67.
30. Messina A, Langlet F, Chachlaki K, Roa J, Rasika S, Jouy N, et al. A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat Neurosci.* 2016 Jun 2;19(6):835–44.
31. Heras V, Sangiao-Alvarellos S, Manfredi-Lozano M, Sanchez-Tapia MJ, Ruiz-Pino F, Roa J, et al. Hypothalamic miR-30 regulates puberty onset via repression of the puberty-suppressing factor, Mkrn3. *PLoS Biol.* 2019 Nov 7;17(11):e3000532.
32. Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gérard A, Bourguignon JP. Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine

- control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol.* 2015 Jul;38:12–36.
33. Brito VN, Spinola-Castro AM, Kochi C, Kopacek C, Da Silva PCA, Guerra-Júnior G. Central precocious puberty: Revisiting the diagnosis and therapeutic management. Vol. 60, *Archives of Endocrinology and Metabolism.* Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia; 2016. p. 163–72.
 34. Day FR, Elks CE, Murray A, Ong KK, Perry JRB. Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Sci Rep.* 2015 Jun 18;5(1):11208.
 35. Soriano-Guillén L, Argente J. Central precocious puberty, functional and tumor-related. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2019 Jun;33(3):101262.
 36. Soriano-Guillén L, Corripio R, Labarta JI, Cañete R, Castro-Feijóo L, Espino R, et al. Central Precocious Puberty in Children Living in Spain: Incidence, Prevalence, and Influence of Adoption and Immigration. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Sep;95(9):4305–13.
 37. Kim SH, Huh K, Won S, Lee KW, Park MJ. A Significant Increase in the Incidence of Central Precocious Puberty among Korean Girls from 2004 to 2010. *PLoS One.* 2015 Nov 5;10(11):e0141844.
 38. Kim YJ, Kwon A, Jung MK, Kim KE, Suh J, Chae HW, et al. Incidence and Prevalence of Central Precocious Puberty in Korea: An Epidemiologic Study Based on a National Database. *J Pediatr.* 2019 May;208:221–8.
 39. Le Moal J, Rigou A, Le Tertre A, De Crouy-Channel P, Léger J, Carel JC. Marked geographic patterns in the incidence of idiopathic central precocious puberty: a nationwide study in France. *Eur J Endocrinol.* 2018 Jan;178(1):33–41.
 40. Bräuner E V., Busch AS, Eckert-Lind C, Koch T, Hickey M, Juul A. Trends in the Incidence of Central Precocious Puberty and Normal Variant Puberty Among Children in Denmark, 1998 to 2017. *JAMA Netw Open.* 2020 Oct 12;3(10):e2015665.
 41. Teilmann G, Pedersen CB, Jensen TK, Skakkebaek NE, Juul A. Prevalence and Incidence of Precocious Pubertal Development in Denmark: An Epidemiologic Study Based on National Registries. *Pediatrics.* 2005 Dec 1;116(6):1323–8.
 42. Stagi S, De Masi S, Bencini E, Losi S, Paci S, Parpagnoli M, et al. Increased incidence of precocious and accelerated puberty in females during and after the Italian lockdown for the coronavirus 2019 (COVID-19) pandemic. *Ital J Pediatr.* 2020 Dec 4;46(1):165.
 43. Prosperi S, Chiarelli F. Early and precocious puberty during the COVID-19 pandemic. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Jan 9;13.
 44. Canton APM, Krepischi ACV, Montenegro LR, Costa S, Rosenberg C, Steunou V, et al. Insights from the genetic characterization of central precocious puberty associated with multiple anomalies. *Human Reproduction.* 2021 Feb 1;36(2):506–18.
 45. Viridis R, Street ME, Zampolli M, Radetti G, Pezzini B, Benelli M, et al. Precocious puberty in girls adopted from developing countries. *Arch Dis Child.* 1998 Feb 1;78(2):152–4.
 46. De Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 2004 Apr;89(4):1794–800.
 47. Hopwood NJ, Kelch RP, Helder LJ. Familial Precocious Puberty in a Brother and Sister. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1981 Jan 1;135(1):78–78.
 48. Ruvalcaba RHA. Isosexual Precocious Puberty. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 1985 Dec 1;139(12):1179.

49. Rohn R, Rousonelos G. Familial Sexual Precocity. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1986 Aug 1;140(8):741.
50. Durand A, Bashamboo A, McElreavey K, Brauner R. Familial early puberty: Presentation and inheritance pattern in 139 families. *BMC Endocr Disord*. 2016 Sep 13;16(1).
51. Harbulot C, Lessim S, Simon D, Martinerie L, Storey C, Ecosse E, et al. Prevalence and clinical characteristics of isolated forms of central precocious puberty: A cohort study at a single academic center. *Eur J Endocrinol*. 2021 Feb 1;184(2):243–51.
52. Brito VN, Mendonca BB, Guilhoto LMFF, Monteiro Freitas KC, Prado Arnhold IJ, Latronico AC. Allelic variants of the γ -aminobutyric acid-A receptor α 1-subunit gene (GABRA1) are not associated with idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty in girls with and without electroencephalographic abnormalities. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2006;91(6):2432–6.
53. Grandone A, Capristo C, Cirillo G, Sasso M, Umamo GR, Mariani M, et al. Molecular Screening of MKRN3, DLK1, and KCNK9 Genes in Girls with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr*. 2017 Oct 1;88(3–4):194–200.
54. Teles MG, Bianco SDC, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54 -Activating Mutation in a Patient with Central Precocious Puberty . *New England Journal of Medicine*. 2008 Feb 14;358(7):709–15.
55. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 Gene in Disorders of Puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 May 1;95(5):2276–80.
56. Luan X, Yu H, Wei X, Zhou Y, Wang W, Li P, et al. GPR54 Polymorphisms in Chinese Girls with Central Precocious Puberty. *Neuroendocrinology*. 2007;86(2):77–83.
57. Ko JM, Lee HS, Hwang JS. KISS1 gene analysis in Korean girls with central precocious puberty: a polymorphism, p.P110T, suggested to exert a protective effect. *Endocr J*. 2010;57(8):701–9.
58. Rhie YJ, Lee KH, Ko JM, Lee WJ, Kim JH, Kim HS. *KISS1* Gene Polymorphisms in Korean Girls with Central Precocious Puberty. *J Korean Med Sci*. 2014;29(8):1120.
59. Day FR, Thompson DJ, Helgason H, Chasman DI, Finucane H, Sullem P, et al. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. *Nat Genet*. 2017 Jun 24;49(6):834–41.
60. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LFG, Jorge AAL, Brito VN, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 2012 Dec;56(9):646–52.
61. Freitas KCM, Ryan G, Brito VN, Tao YX, Costa EMF, Mendonca BB, et al. Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2007 Mar;87(3):627–34.
62. Cukier P, Wright H, Rulfs T, Silveira LFG, Teles MG, Mendonca BB, et al. Molecular and Gene Network Analysis of Thyroid Transcription Factor 1 (TTF1) and Enhanced at Puberty (EAP1) Genes in Patients with GnRH-Dependent Pubertal Disorders. *Horm Res Paediatr*. 2013;80(4):257–66.
63. Sullem P, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Holm H, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, et al. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. *Nat Genet*. 2009 Jun 17;41(6):734–8.
64. Silveira-Neto AP, Leal LF, Emerman AB, Henderson KD, Piskounova E, Henderson BE, et al. Absence of Functional LIN28B Mutations in a Large Cohort of Patients with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr*. 2012;78(3):144–50.

65. Abreu AP, Toro CA, Song YB, Navarro VM, Bosch MA, Eren A, et al. MKRN3 inhibits the reproductive axis through actions in kisspeptin-expressing neurons. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Aug 3;140(8):4486–500.
66. Naulé L, Mancini A, Pereira SA, Gassaway BM, Lydeard JR, Magnotto JC, et al. MKRN3 inhibits puberty onset via interaction with IGF2BP1 and regulation of hypothalamic plasticity. *JCI Insight*. 2023 Apr 24;8(8).
67. Li C, Lu W, Yang L, Li Z, Zhou X, Guo R, et al. MKRN3 regulates the epigenetic switch of mammalian puberty via ubiquitination of MBD3. *Natl Sci Rev*. 2020 Mar 1;7(3):671–85.
68. Li C, Han T, Li Q, Zhang M, Guo R, Yang Y, et al. MKRN3-mediated ubiquitination of Poly(A)-binding proteins modulates the stability and translation of *GNRH1* mRNA in mammalian puberty. *Nucleic Acids Res*. 2021 Apr 19;49(7):3796–813.
69. Kurian JR, Louis S, Keen KL, Wolfe A, Terasawa E, Levine JE. The methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocase-2 (*tet2*) Enables elevated GnRH Gene expression and maintenance of male reproductive function. *Endocrinology*. 2016 Sep 1;157(9):3588–603.
70. Yellapragada V, Liu X, Lund C, Känkäkoski J, Pulli K, Vuoristo S, et al. MKRN3 Interacts With Several Proteins Implicated in Puberty Timing but Does Not Influence GNRH1 Expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Feb 8;10.
71. Valadares LP, Meireles CG, De Toledo IP, De Oliveira RS, De Castro LCG, Abreu AP, et al. MKRN3 mutations in central precocious puberty: A systematic review and meta-analysis. *J Endocr Soc*. 2019 May 1;3(5):979–95.
72. Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, et al. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol*. 2016 Jan;174(1):1–8.
73. Lee H, Jin HS, Shim Y, Jeong H, Kwon E, Choi V, et al. Low Frequency of MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty Among Korean Girls. *Hormone and Metabolic Research*. 2015 May 4;48(02):118–22.
74. Kırkgöz T, Kaygusuz SB, Alavanda C, Helvacioğlu D, Abalı ZY, Tosun BG, et al. Molecular analysis of *MKRN3* gene in Turkish girls with sporadic and familial idiopathic central precocious puberty. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*. 2023 Mar 9;0(0).
75. Aycan Z, Savaş-Erdeve Ş, Çetinkaya S, Kurnaz E, Keskin M, Muratoğlu Şahin N, et al. Investigation of MKRN3 Mutation in Patients with Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2018 Jul 31;10(3):223–9.
76. Magnotto JC, Mancini A, Bird K, Montenegro L, Tütüncüler F, Pereira SA, et al. Novel *MKRN3* Missense Mutations Associated With Central Precocious Puberty Reveal Distinct Effects on Ubiquitination. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023 Mar 14;
77. Gernay C, Brachet C, Boros E, Tenoutasse S, Libiouille C, Heinrichs C. Six Novel Variants in the *MKRN3* Gene Causing Central Precocious Puberty. *J Endocr Soc*. 2022 Nov 17;7(1).
78. Meader BN, Albano A, Sekizkardes H, Delaney A. Heterozygous Deletions in *MKRN3* Cause Central Precocious Puberty Without Prader-Willi Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020 Aug 1;105(8):2732–9.
79. Macedo DB, França MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, Best DS, Abreu AP, et al. Central precocious puberty caused by a heterozygous deletion in the MKRN3 promoter region. *Neuroendocrinology*. 2018 Sep 1;107(2):127–32.
80. Macedo DB, Abreu AP, Reis ACS, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, et al. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the

- imprinted gene makorin ring finger 3. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014;99(6).
81. Seraphim CE, Canton APM, Montenegro L, Piovesan MR, Macedo DB, Cunha M, et al. Genotype-Phenotype Correlations in Central Precocious Puberty Caused by MKRN3 Mutations. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2021 Apr 1;106(4):1041–50.
 82. Ramos CDO, Macedo DB, Canton APM, Cunha-Silva M, Antonini SRR, Stecchini MF, et al. Outcomes of Patients with Central Precocious Puberty Due to Loss-of-Function Mutations in the MKRN3 Gene after Treatment with Gonadotropin-Releasing Hormone Analog. *Neuroendocrinology*. 2020 Jul 1;110(7–8):705–13.
 83. Busch AS, Hagen CP, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 Levels Decline During Puberty in Healthy Boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Jun;101(6):2588–93.
 84. Hagen CP, Sørensen 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 May;100(5):1920–6.
 85. Grandone A, Cirillo G, Sasso M, Capristo C, Tornese G, Marzuillo P, et al. MKRN3 levels in girls with central precocious puberty and correlation with sexual hormone levels: a pilot study. *Endocrine*. 2018 Jan 15;59(1):203–8.
 86. Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, Ramos CO, Montenegro LR, Canton A, et al. DLK1 is a novel link between reproduction and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;
 87. Montenegro L, Labarta JI, Piovesan M, Canton APM, Corripio R, Soriano-Guillén L, et al. Novel genetic and biochemical findings of DLK1 in children with central precocious puberty: A Brazilian–Spanish Study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2020 Oct 1;105(10):3165–72.
 88. Yuan G, Zhang X, Liu S, Chen T. Chinese familial central precocious puberty with hyperuricemia due to recurrent DLK1 mutation: Case report and review of the literature. *Mol Genet Genomic Med*. 2022 Dec 9;10(12).
 89. Palumbo S, Cirillo G, Sanchez G, Aiello F, Fachin A, Baldo F, et al. A new DLK1 defect in a family with idiopathic central precocious puberty: elucidation of the male phenotype. *J Endocrinol Invest*. 2022 Dec 28;
 90. Macedo DB, Kaiser UB. DLK1, Notch Signaling and the Timing of Puberty. *Semin Reprod Med*. 2019 Jul 23;37(04):174–81.
 91. Seraphim CE, Argente J, Latronico AC. Delta-like 1 homolog genetics and its emerging role in human puberty. Vol. 14, *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*. Elsevier Ltd; 2020. p. 22–8.
 92. Villanueva C, Jacquier S, de Roux N. DLK1 Is a Somato-Dendritic Protein Expressed in Hypothalamic Arginine-Vasopressin and Oxytocin Neurons. *PLoS One*. 2012 Apr 26;7(4):e36134.
 93. Macedo DB, Abreu AP, Tellez SL, Naule L, Kim HK, Capo-Battaglia A, et al. SUN-100 Mice Lacking Paternally Expressed DLK1 Reach Puberty at a Lower Body Weight Than Littermate Controls. *J Endocr Soc*. 2020 May 8;4(Supplement_1).
 94. Canton APM, Tinano FR, Guasti L, Montenegro LR, Ryan F, Shears D, et al. X-Linked Dominant Central Precocious Puberty in Girls with MECP2 Variants. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2023;In Press.
 95. Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*. 1999 Oct;23(2):185–8.

96. Hoffbuhr KC, Moses LM, Jerdonek MA, Naidu S, Hoffman EP. Associations between MeCP2 mutations, x-chromosome inactivation, and phenotype. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 2002;8(2):99–105.
97. Bach S, Ryan NM, Guasoni P, Corvin AP, El-Nemr RA, Khan D, et al. Methyl-CpG-binding protein 2 mediates overlapping mechanisms across brain disorders. *Sci Rep.* 2020 Dec 17;10(1):22255.
98. Garcia-Rudaz C, Deng V, Matagne V, Ronnekleiv OK, Bosch M, Han V, et al. FXYD1, a Modulator of Na⁺, K⁺-ATPase Activity, Facilitates Female Sexual Development by Maintaining Gonadotrophin-Releasing Hormone Neuronal Excitability. *J Neuroendocrinol.* 2009 Feb;21(2):108–22.
99. Killian JT, Lane JB, Cutter GR, Skinner SA, Kaufmann WE, Tarquinio DC, et al. Pubertal Development in Rett Syndrome Deviates From Typical Females. *Pediatr Neurol.* 2014 Dec;51(6):769–75.
100. Baş VN, Çetinkaya S, Ađladiođlu SY, Aksoy A, Gđlpınar B, Aycan Z. Report of the first case of precocious puberty in Rett syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism.* 2013 Jan 1;26(9–10).
101. Bernstein U, Demuth S, Puk O, Eichhorn B, Schulz S. Novel MECP2 Mutation c.1162_1172del; p.Pro388* in Two Patients with Symptoms of Atypical Rett Syndrome. *Mol Syndromol.* 2019;10(4):223–8.
102. Yang L, Jiang M, Yu R, Hu R, Xiong F, Li J. A case report of precocious puberty related to Rett syndrome and a literature review. *Pharmazie.* 2021 Nov 1;76(11):559–61.
103. Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. Vol. 4, *The Lancet Diabetes and Endocrinology.* Lancet Publishing Group; 2016. p. 265–74.
104. Macedo DB, Cukier P, Mendonca BB, Latronico AC, Brito VN. Avanços na etiologia, no diagnóstico e no tratamento da puberdade precoce central. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(2):108–17.
105. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child.* 1969 Jun 1;44(235):291–303.
106. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch Dis Child.* 1970 Feb 1;45(239):13–23.
107. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1977 Dec;74(12):5463–7.
108. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010 Jan 8;11(1):31–46.
109. Naslavsky MS, Yamamoto GL, Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017 Jul 3;38(7):751–63.
110. Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Wang JYT, Zverinova S, Karp T, et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. *Nat Commun.* 2022 Dec 4;13(1):1004.
111. Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, Funari MF de A, Nishi MY, Narcizo A de M, et al. SELAdb: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics.* 2020;75:e1913.
112. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American

- College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. 2015 May;17(5):405–24.
113. Quennell JH, Howell CS, Roa J, Augustine RA, Grattan DR, Anderson GM. Leptin Deficiency and Diet-Induced Obesity Reduce Hypothalamic Kisspeptin Expression in Mice. *Endocrinology*. 2011 Apr 1;152(4):1541–50.
 114. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402–8.
 115. Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, Gazal S, Burch K, Freund MK, et al. Leveraging Polygenic Functional Enrichment to Improve GWAS Power. *Am J Hum Genet*. 2019 Jan 3;104(1):65–75.
 116. Hollis B, Day FR, Busch AS, Thompson DJ, Soares ALG, Timmers PRHJ, et al. Genomic analysis of male puberty timing highlights shared genetic basis with hair colour and lifespan. *Nat Commun*. 2020 Dec 24;11(1):1536.
 117. Yermachenko A, Dvornyk V. UGT2B4 previously implicated in the risk of breast cancer is associated with menarche timing in Ukrainian females. *Gene*. 2016 Sep;590(1):85–9.

APÉNDICE

Clinical and Genetic Characterization of Familial Central Precocious Puberty

Flávia Rezende Tinano,¹ Ana Pinheiro Machado Canton,¹ Luciana R. Montenegro,¹ Andrea de Castro Leal,² Aline G. Faria,¹ Carlos E. Seraphim,¹ Raja Brauner,³ Alexander A. Jorge,^{1,4} Berenice B. Mendonca,¹ Jesús Argente,^{5,6,7,8,9} Vinicius N. Brito,¹ and Ana Claudia Latronico¹

¹Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brasil

²Departamento de Saúde Integrada, Universidade do Estado do Pará (UEPA), Santarém, 68040-090 Pará, Brasil

³Pediatric Endocrinology Unit, Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild and Université Paris Descartes, 75019 Paris, France

⁴Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM/25, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brasil

⁵Department of Pediatrics, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

⁶Departments of Paediatrics and Paediatric Endocrinology, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, 28009 Madrid, Spain

⁷Instituto de Investigación La Princesa, 28009 Madrid, Spain

⁸Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

⁹IMDEA Food Institute, CEIUAM+CSIC, 28049 Madrid, Spain

Correspondence: Ana Claudia Latronico, MD, PhD, Hospital das Clínicas da FMUSP, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, 7° andar, sala 7037—CEP: 05403-900—Cerqueira César—São Paulo, SP, Brasil. Email: anacl@usp.br or anaclusp@gmail.com.

Abstract

Context: Central precocious puberty (CPP) can have a familial form in approximately one-quarter of the children. The recognition of this inherited condition increased after the identification of autosomal dominant CPP with paternal transmission caused by mutations in the *MKRN3* and *DLK1* genes.

Objective: We aimed to characterize the inheritance and estimate the prevalence of familial CPP in a large multiethnic cohort; to compare clinical and hormonal features, as well as treatment response to GnRH analogs (GnRHa), in children with distinct modes of transmission; and to investigate the genetic basis of familial CPP.

Methods: We retrospectively studied 586 children with a diagnosis of CPP. Patients with familial CPP ($n=276$) were selected for clinical and genetic analysis. Data from previous studies were grouped, encompassing sequencing of *MKRN3* and *DLK1* genes in 204 patients. Large-scale parallel sequencing was performed in 48 individuals from 34 families.

Results: The prevalence of familial CPP was estimated at 22%, with a similar frequency of maternal and paternal transmission. Pedigree analyses of families with maternal transmission suggested an autosomal dominant inheritance. Clinical and hormonal features, as well as treatment response to GnRHa, were similar among patients with different forms of transmission of familial CPP. *MKRN3* loss-of-function mutations were the most prevalent cause of familial CPP, followed by *DLK1* loss-of-function mutations, affecting, respectively, 22% and 4% of the studied families; both affected exclusively families with paternal transmission. Rare variants of uncertain significance were identified in CPP families with maternal transmission.

Conclusion: We demonstrated a similar prevalence of familial CPP with maternal and paternal transmission. *MKRN3* and *DLK1* loss-of-function mutations were the major causes of familial CPP with paternal transmission.

Key Words: familial central precocious puberty, autosomal inheritance, mode of transmission, genetic of puberty, MKRN3, DLK1

Abbreviations: BA, bone age; BMI, body mass index; CA, chronological age; CPP, central precocious puberty; ECLIA, electrochemiluminescence assay; FSH, follicle-stimulating hormone; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; GnRHa, gonadotropin-releasing hormone analog; LH, luteinizing hormone; SDS, standard deviation score; VUS, variant of uncertain significance; WES, whole-exome sequencing.

Central precocious puberty (CPP) results from the premature reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, clinically manifested as the development of secondary sexual characteristics before the age of 8 years in girls and 9 years in boys (1). Familial CPP can be defined by diagnosis or clinical history of early sexual development in one or more first-

second-, or third-degree family member of a confirmed CPP case (2).

The first description of familial CPP dates back to 1981, when 3 related individuals, including 2 siblings and their father, were diagnosed with CPP (3). Subsequently, in 1986, an American brief report described 3 familial cases in a series

of 58 CPP girls, estimating a frequency of familial CPP of 5.2% (4). In 2004, de Vries et al (2) demonstrated a notorious higher prevalence of familial CPP of 27.5% in a cohort of 156 Israeli children (42 girls and 1 boy affected) (2). Besides having studied a larger cohort, a more active investigation of the familial pubertal history may have contributed to the higher prevalence reported in the Israeli study. While the American study reported only females of first- and second-degree (mother, sister, and maternal grandmother) as potentially affected relatives, the Israeli study included male and female relatives of first-, second-, and third-degree of both maternal and paternal sides. In fact, a recent French study that evaluated 332 children with non-syndromic CPP found a similar prevalence of familial cases of 25% (5). Interestingly, the inheritance of familial CPP was suggested by de Vries et al (2) and corroborated by more recent studies (5, 6) as autosomal dominant with incomplete, sex-dependent penetrance, with higher penetrance in girls and a high prevalence of maternal transmission.

The clinical recognition of familial CPP has increased significantly after the identification of genetic causes, including loss-of-function mutations in two maternally imprinted genes (Makorin ring finger protein 3 [*MKRN3*] and Delta-like non-canonical Notch ligand 1 [*DLK1*]) in families with CPP, providing evidence of the importance of monogenic causes in the familial form of CPP (7, 8). Inactivating defects in both genes cause non-syndromic autosomal dominant CPP with exclusive paternal transmission. Despite the large number of families with maternally transmitted CPP described in previous studies, no genetic etiology has been elucidated in this form of transmission (2, 5, 6).

In the current study, we evaluated a large and multiethnic cohort of familial CPP. We estimated the prevalence of familial CPP and characterized the modes of inheritance and transmission. We also compared clinical and hormonal features, as well as treatment response to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs (GnRHa), among children with distinct forms of transmission of familial CPP. In addition, we characterized the genetic basis of a subset of patients submitted to genetic studies.

Methods

Study Design and Participants

In total, 586 children with confirmed diagnosis of CPP without central nervous system lesions were retrospectively evaluated, including Brazilian children ($n=242$), Spanish children ($n=179$), and a subgroup of children from multiple countries ($n=165$) (Fig. 1). The retrospective evaluation was based on the children's medical files from 1988 to 2021. The Brazilian cohort was evaluated at a single tertiary center (Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil). The Spanish cohort was constituted by the Spanish PUBERE Registry, relying on 55 centers throughout the country and supported by the Spanish Society for Pediatric Endocrinology (Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica). The cohort of 165 children from multiple countries comprised 10 different ethnic backgrounds: 93 Brazilians (from different health centers), 42 French, 6 Belgians, 4 Greeks, 5 Turkish, 5 Americans, 5 Argentinean, 2 British, 2 Israelis, and 1 Australian. Notably, all of them had familial CPP.

The diagnosis of CPP was defined by the development of progressive pubertal signs before 8 years of age in girls and

9 years in boys and confirmed either by basal or GnRH-stimulated luteinizing hormone (LH) levels. Brain magnetic resonance imaging was performed in all CPP cases to rule out organic causes (1).

The familial form was defined by the presence of at least one first-, second-, or third-degree relative with a history of early sexual development. For female relatives, a report of clinically documented CPP or menarche ≤ 9 years old was considered (9). For male relatives, the considered parameters were either a report of clinically documented CPP or a self-report of pubertal signs (such as facial shaving, voice breaking, and early timing of growth spurt or growth completion) having occurred prior to their peers (10). First-degree relatives were defined as mother, father, brother(s) and sister(s); second-degree relatives as grandparents, aunt(s), and uncle(s); and third-degree relatives as cousins. For additional analysis, we considered families in which the menarche of female relatives occurred between 9 and 10 years old (corresponding to the interval between -2 and -1 SD score (SDS) of mean age of menarche in the general population) (11).

The mode of transmission of familial CPP included 4 groups according to the sex of the individual who transmitted the trait to the proband: 1) maternal: mother and or other maternal relatives affected, 2) paternal: father and or other paternal relatives affected, 3) undetermined: only siblings affected, 4) both maternal and paternal: at least one maternal and one paternal relative affected. The study protocol was approved by all Ethics Committees. Written informed consent was obtained from all patients and/or their legal guardians.

Clinical and Hormonal Data Collection

Available routine clinical and hormonal data were collected from medical files from children with familial CPP, including chronological age (CA) at first pubertal signs (breast development in girls and testicular enlargement in boys), CA at pubarche, CA and bone age (BA, Greulich and Pyle method) at first evaluation, bone age advancement (BA - CA), height SDS and body mass index (BMI) SDS at first evaluation. Hormonal data included basal and GnRH-stimulated LH and follicle-stimulating hormone (FSH) levels, measured either by electrochemiluminescence assays (ECLIAS; Roche Diagnostics; Cat# 11732234, RRID:AB_2800498 for LH and Cat# 11775863, RRID:AB_2800499 for FSH) after 2012, or immunofluorometric assays (IFMAs; Perkin Elmer; Cat# B031-101, RRID:AB_2783737 for LH and Cat# B017-201, RRID:AB_2783738 for FSH) before 2012; and basal estradiol or testosterone levels, measured either by ECLIA (Roche Diagnostics; Cat# 03000079, RRID:AB_2893079 for estradiol and Roche Cat# 05200067, RRID:AB_2783736 for testosterone) after 2012, or fluoroimmunoassays (FIA; Perkin Elmer; Cat# B056-101, RRID:AB_2927557 for estradiol and Cat# B050-201, RRID:AB_2783739 for testosterone) before 2012. Basal LH cutoff was considered in the pubertal range if >0.3 IU/L (ECLIA) or >0.6 IU/L (IFMA), and the GnRH-stimulated LH peak cutoff was >5 IU/L using ECLIA or >6.9 IU/L for girls and >9.6 IU/L for boys using IFMA (1). For those CPP patients treated with GnRHa, the CA (years) at the onset of treatment and CA (years), BA (years), height (SDS), and BMI (SDS) at the interruption of treatment were documented. Clinical and hormonal parameters during treatment included: regression or stabilization of secondary sexual characteristics, adequate

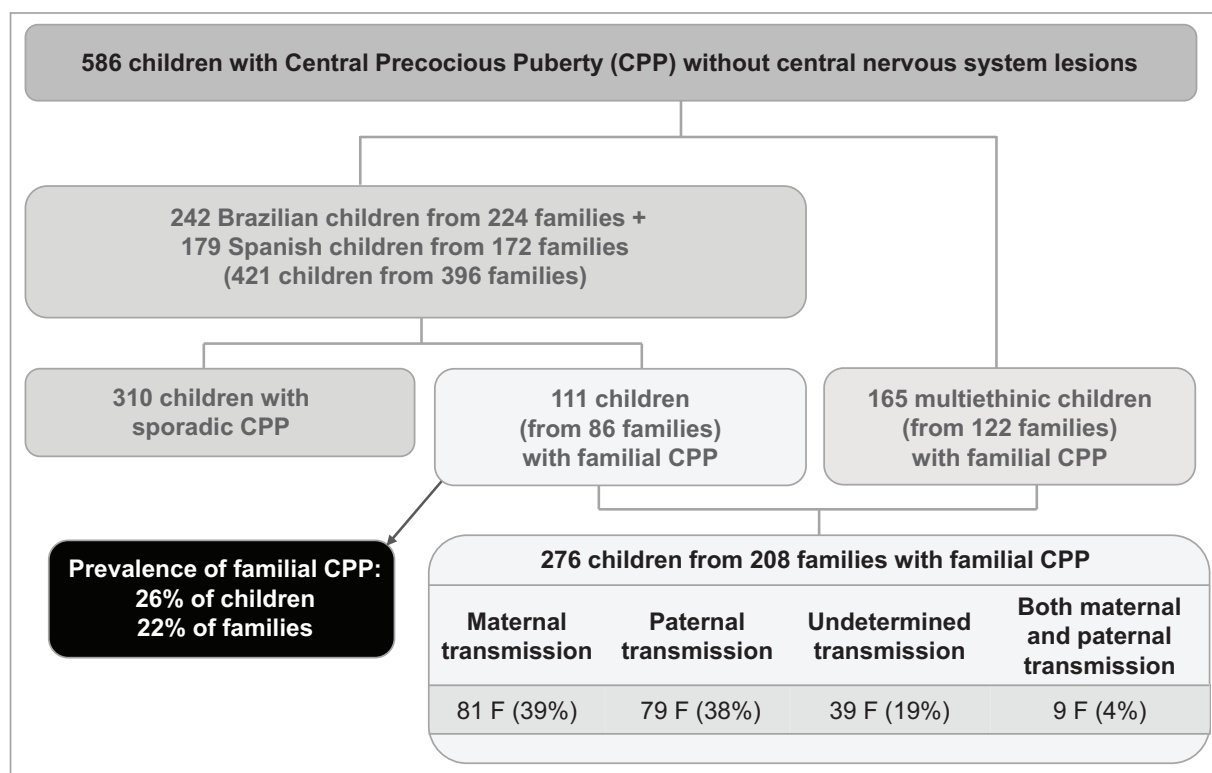


Figure 1. Flow chart of the study. F: Number of families.

growth velocity for CA, and suppressed sexual steroids levels with basal and/or GnRH-stimulated LH levels in the pre-pubertal range (basal LH <0.6 IU/L for IFMA and <0.3 IU/L for ECLIA; LH 120 minutes after GnRH α <4 IU/L) (12). Whenever available, CA at menarche (years), adult height (SDS) and target height (calculated using mid-parental height minus 6.5 cm for girls or plus 6.5 cm for boys; SDS) were also obtained. Target height range was established as target height \pm 8.5 cm (13, 14). Additionally, birth weight and birth length were obtained, and children were classified as small, adequate, or large for gestational age.

Statistical Analysis

For descriptive statistics, categorical variables were expressed as percentages and continuous variables as medians and inter-quartile ranges (IQR) due to non-Gaussian distribution (tested by Kolmogorov-Smirnov normality test). Comparisons of categorical variables between CPP groups with different modes of transmission were performed using the chi-square test. The Kruskal-Wallis test was applied to compare continuous variables among groups. The statistical analysis was performed on the R \times 64 platform (v 4.1.0, 2021, Vienna, Austria). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Genetic Analysis

The Developmental Endocrinology Unit at Hospital das Clínicas, São Paulo, has been a pioneer in studying genetic causes of idiopathic CPP (15). Prior to 2013, the genetic study was based on the sequencing of candidate genes by the Sanger method in selected patients. The use of whole-exome sequencing (WES) allowed the identification of loss-of-function mutations in *MKRN3* associated with familial CPP in 2013 (7).

Since then, all consecutive patients with CPP and normal magnetic resonance imaging were systematically invited to participate in the genetic studies. Therefore, we were able to study 204 patients with familial CPP who had available genomic leukocyte DNA. The coding region of *MKRN3* was sequenced in all 204 patients by the Sanger method, a method previously described (16). Since 2017, when loss-of-function mutations in *DLK1* were associated with familial CPP (8), the coding regions of this gene were also sequenced in all patients.

The probands' relatives who were affected by CPP were also invited to participate in the genetic studies, as well as some of the unaffected relatives, for the purpose of genetic segregation. Families in which DNA from more than one family member were available for study were selected for WES ($n = 34$).

An additional 14 patients with familial CPP without pathogenic mutations in *MKRN3* or *DLK1* were submitted to targeted gene panel sequencing. These children were selected either for having presented an earlier age of thelarche (≤ 6 years) or for having the diagnosis of syndromic CPP; this last criterion was part of a previous published study on the genetic characterization of CPP associated with multiple anomalies (17).

The genomic positions and the raw data of all experiments were aligned using the GRCh37/hg19 assembly of the human genome reference.

Large-scale parallel sequencing

WES was performed in 34 patients with familial CPP along with one or more close relatives, according to previously published protocols (18). The libraries were constructed with the SureSelect Target Enrichment system (Agilent Technologies, CA, USA) and the sequences were generated in the Illumina HiSeq 2500 and NovaSeq 6000 platforms running on paired-end mode. In-house bioinformatic analysis was

performed. Furthermore, an additional 14 patients with familial CPP were sequenced by a customized panel of targeted genes (746 genes known or candidates to be associated with developmental, endocrine, or metabolic disorders) using Agilent SureSelect assay (Agilent Technologies, CA, USA). Sequencing was performed on an Illumina NextSeq 500 platform in paired-end mode and in-house bioinformatic analysis was performed.

Data analysis of large-scale parallel sequencing

Large-scale parallel sequencing data were primarily filtered for loss-of-function and/or nonsynonymous variants present in the proband. Additionally, WES data were also filtered based on the family pedigree, selecting variants present in affected or possibly asymptomatic carriers' family members and absent in unaffected family members. Next, sequencing data were screened for rare variants (minor allele frequency $\leq 0.01\%$ in public and in-house databases) located in exonic regions and consensus splice site sequences. Splice site sequence analyses were performed using dbcsSNV and Human Splice Finder. Public database included gnomAD (Genome Aggregation Database) and ABraOM (Online Archive of Brazilian Mutations) (19, 20); while the in-house exome database (SELA Laboratory) included a local cohort of 523 unrelated individuals with distinct medical disorders with the same ethnic background (21). Subsequently, the variant filtration prioritized variants based on their potential to be pathogenic: loss-of-function variants and missense variants predicted to be pathogenic by multiple in silico programs among SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, Mutation Assessor, Likelihood Ratio Test (LRT), Functional Analysis through Hidden Markov Models (FATHMM and FATHMM-MKL), Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN), MetaSVM, MetaLR, Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity Score (M-CAP), Rare Exome Variant Ensemble Learner (REVEL), and Combined Annotation Dependent Depletion (CADD). The sequencing reads carrying candidate variants were visually inspected using the Integrative Genomics Viewer (IGV; Broad Institute, Cambridge, MA, USA) (18). Possible candidate variants were classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) standards with 5 categories of pathogenicity: pathogenic, likely pathogenic, variant of uncertain significance (VUS), likely benign, and benign (22). Variants classified as pathogenic, likely pathogenic, or VUS were then prioritized according to previous reports linking them—or the genes in which they are located—to CPP or other pubertal phenotypes (ClinVar, PubMed, Online Mendelian Inheritance in Man [OMIM]), gene function and pathway, gene expression in the hypothalamus (Genotype-Tissue Expression [GTEx] Portal), and association with pubertal milestones in Genome Wide Association Studies (GWAS).

Results

Prevalence of Familial CPP Among Brazilian and Spanish Patients

For patients followed at both the Division of Endocrinology of the University of São Paulo and the Spanish PUBERE registry, we had access to the medical registries of the total number of patients with CPP (421 children—402 girls and 19 boys—from 396 families). We estimated the prevalence of familial

CPP in this cohort and identified 111 patients from 86 families (considering menarche ≤ 9 years old), corresponding to 26% of the cases and 22% of the families. An increased prevalence of familial CPP was observed when age of menarche was considered ≤ 10 years old: 131 patients from 106 families, corresponding to 31% of cases and 27% of the families.

Classification of the Transmission Mode of Familial CPP and Pedigree Analysis Among All Families Evaluated

Classification of the transmission mode was performed in all 208 families with familial CPP (Fig. 1). Maternal transmission was identified in 81 families (39%), paternal transmission in 79 families (38%), undetermined transmission in 39 families (19%), and both paternal and maternal transmission in the remaining 9 families (4%). No consanguinity was recognized among the evaluated families.

Pedigree analysis was possible in 157 out of the 208 (75.5%) families with complete information about family members' pubertal onset on medical files (Table 1). The proportion of females was markedly predominant among affected individuals in all modes of transmission of familial CPP (369 of 409 individuals [90%]; Table 1). Among the 71 families with maternal transmission of CPP, most of them ($n = 53$ [75%]) had 2 generations known to be affected, while from the 59 families with the paternal transmission of CPP, almost half of them ($n = 29$ [49%]) had 2 generations known to be affected (Table 1). Notably, in 66% of the probands with maternally transmitted CPP the mother was affected, while in 22% of the probands with paternally transmitted CPP the father was known to be affected.

Clinical and Hormonal Features of Patients With Familial CPP

Clinical and hormonal data were available in 145 girls and 9 boys from 127 families with familial CPP. Due to the small number of male patients, boys were excluded from the comparative analysis. Five girls who had CPP with both maternal and paternal transmission were also excluded from the comparative analysis. Therefore, comparison was made among 56 girls with maternal transmission, 56 girls with paternal transmission, and 28 girls with undetermined transmission of CPP (Table 2).

Thelarche occurred at a median CA of 6.5 years (IQR 6, 7.1) in girls with maternally transmitted CPP, 6.2 years (IQR 5.6, 7) in girls with paternally transmitted CPP, and 7.1 years (IQR 6.1, 7.4) in girls with undetermined transmission of CPP ($P = 0.029$). Post hoc analysis demonstrated that the difference in thelarche CA between girls with paternal vs undetermined transmission of CPP was statically significant ($P = 0.037$, vs $P = 0.101$ for maternal vs undetermined transmission and $P = 0.269$ for maternal vs paternal transmission). At first visit, girls with maternally transmitted CPP had a median BA advancement of 2.3 years (IQR 1.5, 3.1) and median height SDS of 1.7 (IQR 1.1, 2.3), while girls with paternally transmitted CPP had median BA advancement of 2.1 years (IQR 0.9, 2.9) and median height SDS of 1.6 (IQR 0.5, 2.2), and girls with undetermined transmission of CPP had median BA advancement of 1.5 years (IQR 1.1, 2.6) and median height SDS of 1.0 (IQR 0.4, 1.8) ($P > 0.05$). The median BMI SDS was in the normal range (> -1.0 and < 1.0) for all 3 groups ($P = 0.789$).

Thirty-three of the 51 girls (64.7%) with maternally transmitted CPP who had available data for basal LH levels had

Table 1. Number of affected generations in familial CPP according to the mode of transmission

Mode of transmission	No. of families	Affected members (F/M)	1 affected generation	2 affected generations	≥3 affected generations
Maternal	71	183 (172/11)	11 (15%)	53 (75%)	7 (10%)
Paternal	59	154 (130/24)	25 (42%)	29 (49%)	5 (9%)
Both maternal and paternal	7	31 (27/4)	0	3 (43%)	4 (57%)
Undetermined	20	41 (40/1)	20 (100%)	0	0
Total	157	409 (369/40)	56 (36%)	85 (54%)	16 (10%)

Abbreviations: F, Female; M, Male.

values in the pubertal range, while 30 out of the 32 (93.7%) who had GnRH-stimulated LH peak measured reached a pubertal response. Thirty-one of the 50 girls (62%) with paternally transmitted CPP who had available data for basal LH levels had values in the pubertal range, while 20 out of 21 (95.2%) who had GnRH-stimulated LH peak measured reached a pubertal response. Sixteen of the 26 girls (61.5%) with undetermined transmission of CPP who had available data for basal LH levels had values in the pubertal range, while 10 out of 11 (90.9%) who had GnRH-stimulated LH peak measured reached a pubertal response. Hormone levels did not differ between groups ($P > 0.05$; Table 2).

Treatment of CPP with long-acting GnRHa

Among children treated with GnRHa, data were available in 31 girls with maternally transmitted CPP, 24 girls with paternally transmitted CPP, and 13 girls with the

undetermined transmission of CPP (Table 3). The median treatment duration was 2.2 years (IQR 2.0, 2.9) in girls with maternally transmitted CPP, 2.6 years (IQR 2.0, 3.5) in girls with paternally transmitted CPP, and 2.0 years (IQR 1.6, 2.2) in girls with the undetermined transmission of CPP ($P = 0.229$; Table 3). All children reached an adequate clinical and hormone control levels, according to the criteria mentioned above in this manuscript (data not shown). In girls who achieved adult height before the conclusion of this study, it was within the target height range in 87.5% of those with maternally transmitted CPP, 81.8% of those with paternally transmitted CPP, and 75% of those with an undetermined transmission of CPP ($P = 0.915$); while it was below the target height range in the remaining girls, despite treatment with GnRHa.

Most children (78 of 97 with birth data available [80.4%]) were born appropriate for gestational age, while 17 of them were born small for gestational age and 2 were born large for

Table 2. Clinical and hormonal features of patients with familial CPP according to the mode of transmission

Clinical and hormonal features	Maternal transmission (n = 56) Median/IQR	Paternal transmission (n = 56) Median/IQR	Undetermined transmission (n = 28) Median/IQR	P^a
Thelarche CA, y	6.5 (6, 7.1)	6.2 (5.6, 7)	7.1 (6.1, 7.4)	0.029
Pubarche CA, y	7 (6.5, 8)	7 (6, 7.5)	7.4 (6.2, 7.7)	0.485
<i>First evaluation</i>				
CA, y	7.6 (6.9, 8.3)	7.7 (6.4, 8.3)	7.8 (7.5, 8.5)	0.339
BA, y	10 (9, 11)	10 (8.3, 11)	11 (8.9, 11.4)	0.541
BA advancement, y	2.3 (1.5, 3.1)	2.1 (0.9, 2.9)	1.5 (1.1, 2.6)	0.152
Height SDS	1.7 (1.1, 2.3)	1.6 (0.5, 2.2)	1.0 (0.4, 1.8)	0.104
BMI SDS	0.8 (0.1, 1.6)	0.7 (0.4, 1.4)	0.6 (0.04, 1.4)	0.789
Basal LH, ^b IU/L	0.8 (0.1, 1.2)	1.4 (0.3, 4.2)	1.1 (0.2, 1.8)	0.126
Basal FSH, ^b IU/L	3.4 (2.0, 4.7)	4.2 (2.4, 6.0)	4.4 (3.0, 5.9)	0.508
Basal LH within pubertal range ^c	33/51 (64.7%)	31/50 (62%)	16/26 (61.5%)	0.947 ^d
Estradiol, pg/mL	18.2 (12.0, 33.2)	20.1 (14.9, 36.3)	17 (13.0, 29)	0.398
GnRH-stimulated peak LH, ^b IU/L	13.0 (9.8, 17.1)	9.7 (5.7, 18.5)	15.5 (9.3, 19.1)	0.652
GnRH-stimulated peak FSH, ^b IU/L	13.9 (10.3, 15.7)	14.0 (10.3, 24.2)	15.5 (14.3, 16.6)	0.375
GnRH-stimulated LH peak in pubertal range ^c	30/32 (93.7%)	20/21 (95.2%)	10/11 (90.9%)	0.891 ^e

Abbreviations: BA, bone age; BMI, body mass index; CA, chronological age; CPP, central precocious puberty; FSH, follicle-stimulating hormone; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; IQR, interquartile range; LH, luteinizing hormone; SDS, standard deviation score.

^a P value was calculated for comparison among the 3 groups simultaneously using nonparametric Kruskal-Wallis test for continuous variables or chi-square test for categorical variables. Statistically significant P values were marked in bold.

^bFor statistical purposes, only hormones measured by electrochemiluminescence assay (ECLIA) were included.

^cHormones measured either by ECLIA or immunofluorometric assay (IFMA) were considered.

^dX-squared = 0.109.

^eX-squared = 0.231.

Table 3. Clinical features of patients with familial CPP before and after treatment with GnRH α according to the mode of transmission

Treatment data	Maternal transmission (n = 31) Median/IQR	Paternal transmission (n = 24) Median/IQR	Undetermined transmission (n = 13) Median/IQR	P ^a
Initial CA, y	7.9 (7.0, 8.4)	8.0 (7.3, 8.4)	8.1 (7.9, 9.0)	0.206
Final CA,	10.5 (9.9, 10.7)	10.6 (10.0, 11.0)	10.5 (10, 11.0)	0.632
Treatment duration, y	2.2 (2.0, 2.9)	2.6 (2.0, 3.5)	2.0 (1.6, 2.2)	0.229
<i>First evaluation after treatment</i>				
BA, y	12 (11.5, 12)	12 (12, 13)	12 (11.6, 12)	0.256
Height SDS	1.6 (1.0, 1.9)	1.3 (0.9, 2.1)	0.6 (0.2, 1.3)	0.152
BMI SDS	0.7 (0.2, 1.4)	0.8 (0.3, 1.4)	1.0 (0.6, 1.7)	0.269
Age at menarche, y	n = 27 11.2 (10.6, 12)	n = 21 12 (11.0, 12.0)	n = 8 11.8 (11.4, 12.1)	0.289
Time between interruption of treatment and menarche, y	1.0 (0.6, 1.1)	1.0 (0.5, 1.5)	1.1 (1.0, 1.4)	0.382
AH SDS	n = 8 0.35 (0.0, 0.8)	n = 13 −0.45 (−0.8, 0.4)	n = 4 −1.25 (−2.1, −0.6)	0.086
TH SDS	−0.4 (−1.0, 0.1)	−0.5 (−1.0, 0.5)	−1.0 (−1.4, 0.5)	0.612
AH – TH SDS	0.7 (0.4, 1.0)	0.2 (−1.0, 1.2)	0.2 (−0.9, 1.1)	0.695
AH within the TH range	7/8 (87.5%)	9/11 (81.8%)	3/4 (75%)	0.915 ^b

Abbreviations: CPP, central precocious puberty; GnRH α , gonadotropin-releasing hormone analog; IQR, interquartile range; CA, chronological age; BA, bone age; SDS, standard deviation score; BMI, body mass index; AH, adult height; TH, target height.

^aP value was calculated for comparison among the 3 groups simultaneously using nonparametric Kruskal-Wallis test for continuous variables or chi-square test for categorical variables.

^bX-squared = 0.964.

gestational age. There was no statistically significant difference in the proportion of children born small, appropriate, or large for gestational age among these 3 groups ($P = 0.428$).

Genetic Analysis

DNA sequencing of *MKRN3* and *DLK1* was performed in 204 patients from 165 families. WES was performed in 101 individuals from 34 families. Additionally, 14 probands from distinct families underwent targeted gene panel sequencing. The pedigrees of families submitted to WES and targeted gene panel are shown in Fig. 2.

Genetic findings previously reported

The most prevalent monogenic cause of familial CPP was *MKRN3* loss-of-function mutations (71 cases from 36 families), followed by *DLK1* loss-of-function mutations (12 cases from 6 families). These pathogenic genetic defects were previously described, as referenced in Table 4.

In a family with maternal transmission of CPP, the male proband had CPP associated with other anomalies (autism spectrum disorder, tall stature, and dysmorphic features) (Family 11; Fig. 2A). The boy and his relatives (3 affected and 2 unaffected relatives) were submitted to WES, and 2 rare candidate variants segregating with the early onset of puberty were identified: 1) a missense substitution (p.Pro267Leu) in the Uridine diphosphate glycosyltransferase 2 family member 4 (*UGT2B4*) gene, classified as a VUS; and 2) a frameshift deletion (p.Phe144Leufs*14) in the McKusick-Kaufman syndrome (*MKKS*) gene. These genetic defects were previously described (17).

New possible candidate genes

A rare heterozygous missense variant (p.His650Arg) in the Tet methylcytosine dioxygenase 2 (*TET2*) was identified in a

Spanish girl with maternally transmitted CPP (Family 4; Fig. 2A). This girl had thelarche at 7.5 years and her mother, who had a history of menarche at 9 years, presented the same variant (p.His650Arg), whereas her unaffected father had the wild-type sequence. Although absent in public databases, the missense variant (p.His650Arg) had a benign prediction in most in silico programs (Table 5). The *TET2* gene was previously associated with age of menarche onset in a GWAS analysis (28).

A rare heterozygous missense variant (p.Thr2181Met) in the Bromodomain and WD repeat domain containing 1 (*BRWD1*) was identified in a Brazilian girl with maternally transmitted CPP submitted to target panel gene sequencing (Family 36; Fig. 2D). This girl had thelarche at 6 years and her mother, who had menarche at 10 years, harbored the same variant (p.Thr2181Met). The proband's brother also had a history of early sexual development, and a maternal first cousin had been treated for CPP with GnRH α . Only the mother's DNA was available for genetic study. Although rare in public databases, the missense variant (p.Thr2181Met) had a benign prediction in all in silico programs analyzed (Table 5). The *BRWD1* gene was previously associated with age of menarche in 2 distinct GWAS (28, 29), as well as with male puberty timing (onset voice breaking) (10). Additionally, 2 other rare heterozygous variants of uncertain significance (p.Thr1480Ala and p.Asn1263Ser) were identified in the *BRWD1* gene in 2 Brazilian girls with sporadic CPP who had been previously submitted to target panel gene sequencing as part of genetic investigation of CPP at the University of São Paulo laboratory (Table 5).

Finally, a rare heterozygous frameshift variant (p.Ser422Argfs*7) in the *UGT2B4* was identified in a Spanish girl from a family with both maternal and paternal history of CPP (Family 30; Fig. 2C). This girl had thelarche at 7.8 years and her father, who had a history of early puberty, presented the same variant (p.Ser422Argfs*7), while her

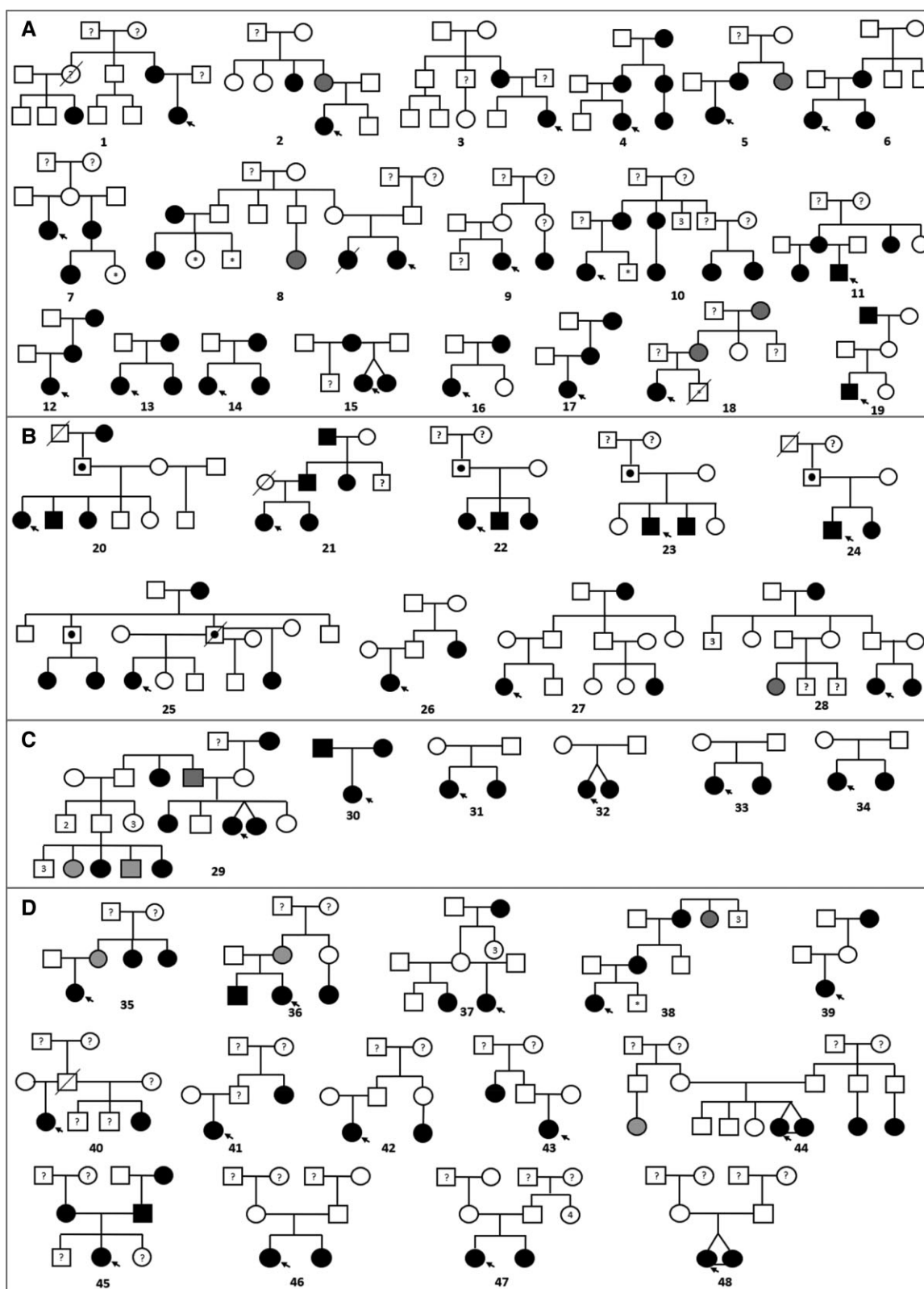


Figure 2. Pedigrees of families with familial central precocious puberty (CPP) submitted to whole-exome sequencing (WES) (A, B, C) and targeted panel sequencing (D). Squares indicate male family members, circles female family members, symbols with a slash deceased family members and bifurcated vertical lines dizygotic twins. Black symbols are affected subjects, white symbols are unaffected subjects, gray symbols denote early puberty (thelarche between 8 and 9 years of age and/or menarche between 9 and 10 years for females, and testicular enlargement between 9 and 10 years for males) and symbols with black circles mark asymptomatic carriers. Family members whose phenotype is unknown are marked with a question mark and brothers younger than 9 years and sisters younger than 8 years are labeled with an asterisk. Arrows indicate the proband in each family. A, Families with maternal transmission of CPP submitted to WES. B, Families with paternal transmission of CPP submitted to WES. Families 20-24 harbor *MKRN3* loss-of-function mutations and family 25 *DLK1* loss-of-function mutation. C, Families with both maternal and paternal (29 and 30) and undetermined (31-34) transmission of CPP submitted to WES. D, Families with maternal (35-39), paternal (40-43), both maternal and paternal (44-45), and undetermined (46-48) transmission of CPP submitted to targeted panel sequencing.

Table 4. Loss-of-function mutations in *MKRN3* and *DLK1* genes among patients with familial CPP

Genetic diagnosis	No. of affected cases and families	Proportion among tested familial CPP cases	Proportion among tested paternally transmitted CPP cases	Inheritance and transmission	Sequencing methods	References
<i>MKRN3</i> mutations	71 cases from 36 families	35% of cases/22% of families	77% of cases/57% of families	AD with paternal transmission	WES, Sanger	(7, 23, 24, 25, 26)
<i>DLK1</i> mutations	12 cases from 6 families	6% of cases/4% of families	13% of cases/10% of families	AD with paternal transmission	Whole-genome sequencing, WES, Sanger	(8, 27)

Abbreviations: AD, autosomal dominant; CPP, central precocious puberty; WES, whole-exome sequencing.

mother had the wild-type sequence. The *UGT2B4* gene was previously associated with age of menarche in specific populations (30).

Discussion

A significant prevalence of familial CPP (25% to 27.5%) has been demonstrated in a few clinical studies in the last decades (2, 6). Interestingly, the current study demonstrated a prevalence of 22% of familial CPP in the largest Brazilian-Spanish cohort using a more restricted criterion of familial history (menarche ≤ 9 years). Notably, the prevalence of familial CPP increased to 27% if considering the age of menarche ≤ 10 years old, the same criteria used in previous studies (2, 5).

The predominance of maternal transmission in most previous familial CPP studies is remarkable (2, 5, 6). However, this form of transmission has not been associated with a definitive and recurrent monogenic cause so far. The prevalence of maternally and paternally transmitted CPP was very similar in this cohort of 208 families (39% of maternal transmission and 38% of paternal transmission). Noteworthy, familial history of precocious puberty is more easily recognized in mothers than in fathers, which could create a referral bias for maternally transmitted CPP. However, in this particular study, the proportion of families with the paternal transmission of CPP may also have been overestimated due to the more frequent referral of these families for genetic studies of *MKRN3* and *DLK1*. Families with loss-of-function mutations in these maternally imprinted genes can have nonconsecutive generations affected due to male asymptomatic carriers who inherited the defect from their mothers. This is reflected by the significant proportion (42%) of only one generation known to be affected in CPP families with paternal transmission. In addition, while women often remember their age of menarche, most men do not have a precise remembrance of their pubertal milestones. The lack of this information can underestimate the number of affected fathers (22%) and other male relatives in these families. Oppositely, most families (85%) with maternal transmission of CPP had at least 2 generations known to be affected, suggesting an autosomal dominant inheritance, with direct maternal transmission in 67% of the cases. The great predominance of affected females in the family pedigrees (90%) suggests sex-dependent penetrance.

At diagnosis of CPP, the clinical and hormonal presentations were similar among children with maternal, paternal, or undetermined transmission of CPP, except for the CA of thelarche, which was earlier in girls with paternally transmitted CPP than in girls with undetermined transmission of CPP. In addition, an adequate and similar response to GnRHa treatment among the 3 groups with distinct modes of transmission of familial CPP was consistent with a previous study

showing that patients with CPP due to *MKRN3* loss-of-function mutations have anthropometric, metabolic, and reproductive outcomes after GnRHa treatment similar to those of idiopathic CPP (31). These findings may suggest that familial CPP from distinct modes of inheritance may involve factors from the same pathways or gene network.

The first description of loss-of-function mutations in the *MKRN3* gene associated with familial CPP occurred in 2013 and was followed by many other studies (7, 23–26, 32, 33). In the current study, among the 204 familial CPP cases (from 165 families) submitted to genetic testing, *MKRN3* loss-of-function mutations were identified in 35% of the patients and 22% of the families, contrasting with previous prevalence data ranging from 33% to 46% (7, 33). We demonstrated a high prevalence of *MKRN3* mutations among paternally transmitted CPP patients (77%) and families (57%) in this study.

DLK1 loss-of-function mutations associated with familial CPP were first identified in a Brazilian family with 5 affected members by Dauber et al (8) in 2017. Subsequently, other distinct inactivating mutations were identified in familial CPP cases with paternal transmission and 1 de novo mutation was identified in a sporadic CPP case (25, 27). *DLK1* mutations are especially relevant for their association with metabolic abnormalities manifested mainly in adulthood, which was attributed to the inhibitory effect of *DLK1* over adipogenesis (27). The pathways by which *DLK1* regulates puberty onset are still unknown. *DLK1* loss-of-function mutations were identified in 6% of the patients and 4% of the families in this study. As expected, all patients harboring mutations in this maternally imprinted gene had paternal transmission of CPP. Although *DLK1* mutations are currently considered a very rare cause of familial CPP, its prevalence in the paternally transmitted CPP cohort was notable: 13% of the patients and 10% of the families.

Despite the significant number of maternally transmitted CPP cases submitted to large-scale parallel sequencing in this study (62 individuals from 24 families), no definite monogenic cause was identified. We hypothesize that this form of familial CPP might be caused by either copy number variation, single nucleotide variation located in regulatory regions not covered by WES, epigenetic defects, mitochondrial DNA mutations, and/or oligogenic or polygenic inheritance. Interestingly, we have identified a rare heterozygous missense variant of uncertain significance in the *TET2* (p.His650Arg) in a family with maternally transmitted CPP. *TET2* is part of the family of ten-eleven translocation (tet) enzymes, responsible for DNA demethylation (34). Notably, DNA methylation is one of the best studied epigenetic mechanisms involved in modulating gene activity, and the importance of this process in pubertal onset regulation has been recognized through studies of kisspeptin repressors in animals (35, 36),

Table 5. Rare heterozygous variants of uncertain significance identified in patients with familial CPP

Gene	Position	Variant	dbSNP ID	Allele frequency		In silico analysis	ACMG	Variant inheritance	Clinical and laboratory data of affected individuals
				gnomAD	ABraOM				
<i>TET2</i>	chr4: 106157048	NM_001127208: c.1949A>	—	0	0	4P/9B	VUS	Maternally inherited (Family 4; Fig. 2A)	Proband: Thelarche at CA 7.5 yr. First visit at CA 7.9 yr, BA 11 yr, B2PH1, H=1.3 SDS, BMI=-0.05 SDS, basal LH=1 IU/L (ECLIA). Mother: Menarche at CA 9 yr.
		G: p.His650Arg							
<i>BRWD1</i>	chr21: 40568453	NM_018963: c.6542C>	rs148068634	0.0001138	0	0P/13B	VUS	Maternally inherited (Family 36; Fig. 2D)	Proband: Thelarche at CA 6 yr. First visit at CA 8.2 yr, BA 11.5 yr, B4PH3, H=2.3 SDS, BMI=1.4 SDS, basal LH=1.5 IU/L (IFMA). Mother: Menarche at CA 10 yr.
		T: p.Thr2181Met							
	chr21: 40574398	NM_018963: c.4438A>	rs775782176	0.0000159	0	2P/11B	VUS	Sporadic CPP	Proband: Thelarche at CA 7.8 yr. First visit at CA 20 yr, B5PH5, H=-0.95 SDS, BMI=1.3 SDS.
		G: p.Thr1480Ala							
	chr21: 40585477	NM_018963: c.3788A>	rs752901254	0.0000041	0	2P/11B	VUS	Sporadic CPP	Proband: Thelarche at CA 6 yr. First visit at CA 6.5 yr, BA 8.9 yr, B2PH2, H=0.7 SDS, BMI=-0.3 SDS, basal LH=0.6 IU/L (IFMA), GnRH-stimulated LH peak 9.5 IU/L (IFMA).
		G: p.Asn1263Ser							
<i>UGT2B4</i>	chr4: 70350967	NM_021139.3: c.1266_1269del: p.Ser422Argfs*7	rs765274693	0.0000040	0	—	VUS	Paternally inherited (Family 30; Fig. 2C)	Proband: Thelarche at CA 7.8 yr. First visit at CA 8 yr, BA 10.5 yr, B2PH1, H=2.5 SDS, BMI=-0.2 SDS, basal LH=0.6 IU/L (ECLIA). Father: Early puberty.

Abbreviations: ABraOM, Online Archive of Brazilian Mutations; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics; B, benign; BA, bone age; BMI, body mass index; B-PH, Breast and pubic hair stages according to Tanner and Marshall (12); CA, chronological age; chr, chromosome; CPP, central precocious puberty; dbSNP ID, Single Nucleotide Polymorphism Database Identifier; ECLIA, electrochemoluminescence assay; gnomAD, Genome Aggregation Database; GnRH, gonadotropin-releasing hormone; H, height; IFMA, immunofluorometric assay; LH, luteinizing hormone; P, pathogenic; SDS, standard deviation score; VUS, Variant of Uncertain Significance.

and, more recently, through a study of the global methylation profile of girls with physiological or central precocious puberty showing a pattern of hypermethylation during the pubertal period compared to the prepubertal period (37). Interestingly, in vitro and mice experiments showed that GnRH transcription and secretion increased with tet2 overexpression, while its ablation led to a significant drop in GnRH expression (34). Moreover, TET2 was shown to be recruited by the Methyl-CPG-Binding Domain Protein 3 (MBD3) to promote DNA demethylase and may be involved in the mechanism by which MKRN3 promotes epigenetic silencing of GNRH1 expression (38). We hypothesized that the TET2 variant (p.His650Arg) found in this family with maternal transmission of CPP could lead to a gain-of-function of TET2, increasing the expression of *GNRH1* via demethylation of its promoter, and ultimately leading to premature activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *TET2* was also associated with age at menarche in GWAS (28) and the role of this gene in a possible oligogenic or polygenic inheritance of familial CPP must be considered. Likewise, we identified rare heterozygous variants of uncertain significance (p.Thr2181Met, p.Thr1480Ala, and p.Asn1263Ser) in the *BRWD1* in 3 different patients (1 with maternally transmitted familial CPP and 2 with sporadic CPP). *BRWD1* is a transcriptional regulator whose gene was also associated with age at menarche and male puberty timing in GWAS (10, 28, 29) suggesting that this gene may also be associated with an oligogenic or polygenic inheritance model of CPP. Additionally, we identified a rare heterozygous frameshift variant of uncertain significance (p.Ser422Rfs*7) in the *UGT2B4* in a girl with CPP and in her father, who had a history of premature sexual development (Family 30; Fig. 2C). The *UGT2B4* gene encodes an enzyme involved in the glucuronidation of androgens and was also associated with age at menarche in specific populations (30, 39). We have previously described a rare heterozygous missense variant in this gene, segregating with maternally transmitted CPP in a Brazilian family submitted to WES (17), and we might consider that this gene could also be associated with an oligogenic or polygenic inheritance model of CPP.

In conclusion, we demonstrated that familial CPP can be prevalent, with a similar frequency of maternal and paternal transmission in a large multiethnic cohort of CPP. Although paternally transmitted CPP has been genetically characterized after the identification of mutations in the imprinted genes *MKRN3* and *DLK1*, the genetic basis of maternally transmitted CPP remains to be elucidated. The current study revealed that CPP with maternal transmission seems to be autosomal dominant, with higher penetrance in females. In addition, clinical and hormonal features at diagnosis and the response to GnRHa treatment were similar among maternal, paternal, or undetermined transmission forms of familial CPP. *MKRN3* loss-of-function mutations were the most prevalent cause of familial CPP with paternal transmission, followed by *DLK1* loss-of-function mutations. Finally, a family history of CPP should be actively and routinely investigated allowing potential early diagnosis and treatment.

Financial Support

F.R.T. was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 140289/2020-8) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2021/12205-2). A.P.M.C was

supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2022/00719-4). B.B.M. is supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 303002/2016-6). V.N.B. and A.C.L. are supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2019/27631-7). A.C.L. is supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 303183/2020-9).

Data Availability

The dataset generated and analyzed during the current study is not publicly available but is available from the corresponding author on reasonable request.

References

- Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(3):265-274.
- de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(4):1794-1800.
- Hopwood NJ, Kelch RP, Helder LJ. Familial precocious puberty in a brother and sister. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1981;135(1):78.
- Rohn R, Rousonelos G. Familial sexual precocity. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1986;140(8):741.
- Harbulot C, Lessim S, Simon D, et al. Prevalence and clinical characteristics of isolated forms of central precocious puberty: a cohort study at a single academic center. *Eur J Endocrinol*. 2021;184(2):243-251.
- Durand A, Bashamboo A, McElreavey K, Brauner R. Familial early puberty: presentation and inheritance pattern in 139 families. *BMC Endocr Disord*. 2016;16(1):50.
- Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med*. 2013;368(26):2467-2475.
- Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, et al. Paternally inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1557-1567.
- Brito VN, Spinola-Castro AM, Kochi C, Kopacek C, da Silva PCA, Guerra-Júnior G. Central precocious puberty: revisiting the diagnosis and therapeutic management. *Arch Endocrinol Metab*. 2016;60(2):163-172.
- Hollis B, Day FR, Busch AS, et al. Genomic analysis of male puberty timing highlights shared genetic basis with hair colour and lifespan. *Nat Commun*. 2020;11(1):1536.
- Fassler CS, Gutmark-Little I, Xie C, et al. Sex hormone phenotypes in young girls and the age at pubertal milestones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(12):6079-6089.
- Macedo DB, Cukier P, Mendonca BB, Latronico AC, Brito VN. Avanços na etiologia, no diagnóstico e no tratamento da puberdade precoce central. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):108-117.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291-303.
- Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13-23.
- Canton APM, Seraphim CE, Brito VN, Latronico AC. Pioneering studies on monogenic central precocious puberty. *Arch Endocrinol Metab*. 2019;63(4):438-444.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-5467.
- Canton APM, Krepischi ACV, Montenegro LR, et al. Insights from the genetic characterization of central precocious puberty associated with multiple anomalies. *Hum Reprod*. 2021;36(2):506-518.
- Vasques GA, Funari MFA, Ferreira FM, et al. IHH Gene mutations causing short stature with nonspecific skeletal abnormalities and response to growth hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):604-614.
- Naslavsky MS, Yamamoto GL, Almeida TF, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*. 2017;38(7):751-763.
- Naslavsky MS, Schiar MO, Yamamoto GL, et al. Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from Brazil. *Nat Commun*. 2022;13(1):1004.
- Lerario AM, Mohan DR, Montenegro LR, et al. SELADB: A database of exonic variants in a Brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics*. 2020;75:e1913.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-424.
- Macedo DB, Abreu AP, Reis ACS, et al. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(6):e1097-e1103.
- Macedo DB, França MM, Montenegro LR, et al. Central precocious puberty caused by a heterozygous deletion in the MKRN3 promoter region. *Neuroendocrinology*. 2018;107(2):127-132.
- Montenegro L, Labarta JL, Piovesan M, et al. Novel genetic and biochemical findings of DLK1 in children with central precocious puberty: a Brazilian-Spanish Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2020;105(10):3165-3172.
- Seraphim CE, Pinheiro A, Canton M, et al. Genotype-phenotype correlations in central precocious puberty caused by MKRN3 mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106(4):e1041-e1050.
- Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, et al. DLK1 Is a novel link between reproduction and metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(6):2112-2120.
- Kichaev G, Bhatia G, Loh PR, et al. Leveraging polygenic functional enrichment to improve GWAS power. *Am J Hum Genet*. 2019;104(1):65-75.
- Perry JRB, Day F, Elks CE, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature*. 2014;514(7520):92-97.
- Yermachenko A, Dvornyk V. UGT2B4 Previously implicated in the risk of breast cancer is associated with menarche timing in Ukrainian females. *Gene*. 2016;590(1):85-89.
- Ramos CDO, Macedo DB, Canton APM, et al. Outcomes of patients with central precocious puberty due to loss-of-function mutations in the MKRN3 gene after treatment with gonadotropin-releasing hormone analog. *Neuroendocrinology*. 2020;110(7-8):705-713.
- Valadares LP, Meireles CG, de Toledo IP, et al. MKRN3 Mutations in central precocious puberty: A systematic review and meta-analysis. *J Endocr Soc*. 2019;3(5):979-995.
- Simon D, Ba I, Mekhail N, et al. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(1):1-8.
- Kurian JR, Louis S, Keen KL, Wolfe A, Terasawa E, Levine JE. The methylcytosine dioxygenase ten-eleven translocase-2 (tet2) enables elevated GnRH gene expression and maintenance of male reproductive function. *Endocrinology*. 2016;157(9):3588-3603.
- Rzeczowska PA, Hou H, Wilson MD, Palmert MR. Epigenetics: a new player in the regulation of mammalian puberty. *Neuroendocrinology*. 2014;99(3-4):139-155.
- Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, et al. Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci*. 2013;16(3):281-289.
- Bessa DS, Maschietto M, Aylwin CF, et al. Methylome profiling of healthy and central precocious puberty girls. *Clin Epigenetics*. 2018;10(1):146.
- Li C, Lu W, Yang L, et al. MKRN3 Regulates the epigenetic switch of mammalian puberty via ubiquitination of MBD3. *Natl Sci Rev*. 2020;7(3):671-685.
- Barre L, Fournel-Gigleux S, Finel M, Netter P, Magdalou J, Ouzzine M. Substrate specificity of the human UDP-glucuronosyltransferase UGT2B4 and UGT2B7. *FEBS J*. 2007;274(5):1256-1264.