

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES QUE CODIFICAM O  
RFRP-3 E SEU RECEPTOR EM PACIENTES COM DISTÚRBIOS  
PUBERAIS GNRH-DEPENDENTES

CRISTIANE JEYCE GOMES LIMA

BRASÍLIA-DF  
2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CRISTIANE JEYCE GOMES LIMA

ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES QUE CODIFICAM O  
RFRP-3 E SEU RECEPTOR EM PACIENTES COM DISTÚRBIOS  
PUBERAIS GNRH-DEPENDENTES

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Pesquisa realizada com financiamento do CNPq, referente ao edital Universal 2011/2013, projeto número 477016/2011-1.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto  
Universidade de Brasília/ UnB

Brasília- DF  
2014

CRISTIANE JEYCE GOMES LIMA

ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES QUE CODIFICAM O  
RFRP-3 E SEU RECEPTOR EM PACIENTES COM DISTÚRBIOS  
PUBERAIS GNRH-DEPENDENTES

Dissertação apresentada como requisito  
parcial para a obtenção do Título de Mestre  
em Ciências da Saúde pelo Programa de  
Pós-Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília

Aprovado em 24 de janeiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Adriana Lofrano Alves Porto  
Universidade de Brasília

Angélica Amorim Amato  
Universidade de Brasília

Augusto César Florêncio Costa  
Universidade de Brasília

*A meu querido marido Ivan,  
por compartilhar minha vida e meus  
sonhos, por seu apoio e  
companheirismo.*

*A nossas filhas, Natália e  
Isabela, por me fazerem sentir o  
amor em sua mais pura  
manifestação e por me  
impulsionarem a querer ser uma  
pessoa melhor a cada dia.*

*Esta conquista é nossa!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e me dar forças em meu caminho. Sinto Sua presença a cada passo de minha trajetória.

A minha querida mãe, Dilma, por todo seu amor e dedicação, em todos os momentos de minha vida. A meu pai, Obédio, meus irmãos Eduardo e Caroline, meus sogros Ivo e Lúcia, por participarem da minha vida e vibrarem com minhas conquistas. À querida Bini, por seu exemplo de carinho, doação e dedicação a minha família. À tia Almerinda e Dirlinha, pelo carinho e preocupação, por se fazerem sempre presentes apesar da distância.

A todos os professores que tive ao longo de minha vida, da Educação Infantil à Pós-graduação; eu não estaria completando mais esta etapa se não tivesse bons mestres. Aos meus preceptores de Residência em Endocrinologia do Hospital de Base, Dra. Lídia Vânia, Dra. Danícia e Dr. Mário Sérgio, por terem me ensinado a amar esta especialidade e por serem queridos amigos.

A minha amiga e orientadora Adriana Lofrano, por ter me tirado da inércia para aceitar este desafio, por seu exemplo de seriedade, comprometimento, paciência, dedicação e entusiasmo. A oportunidade de conviver e de aprender com uma pessoa tão íntegra é um dos melhores frutos deste trabalho.

Aos amigos que me estimularam a fazer a pós-graduação, Luiz Claudio, amigo de todas as horas, e Adriana Furtado, por sua alegria contagiante e colaboração com as referências bibliográficas. A minha colega de bancada, Sarah, por sua disposição em me ajudar sempre, sua paciência e pelo trabalho conjunto na realização dos experimentos, e pela amizade sincera. Aos colegas do Grupo de Pesquisa do Laboratório de Farmacologia Molecular da UnB, especialmente Andressa, que iniciou os experimentos comigo, Olívia e Vítor, pela colaboração no dia-a-dia da bancada e pelas dicas valiosas. Às alunas de PIBIC que participaram deste projeto, Emilie, Carla, Larissa e Gabriela, pelo valor do trabalho em equipe.

Aos colegas da Secretaria de Saúde que viabilizaram minha liberação para conclusão do Mestrado, especialmente Luiz Ricardo Muniz, Dr. Manoel Ximenes e Dr. Fernando Miziara.

A todos que me estimularam e me apoiaram em mais este desafio e àqueles que deram o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”.

Marcel Proust

## RESUMO

**Introdução:** O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é o principal regulador do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal (HHG), mas novos neuropeptídeos podem mediar a ação dos esteróides sexuais em nível hipotalâmico. Em 2000, um fator hipotalâmico da família RFamida, a mesma da kisspeptina, capaz de inibir o eixo HHG em codornas foi descoberto e denominado Hormônio Inibidor das Gonadotrofinas (GnIH). O peptídeo relacionado à RFamida-3 (RFRP-3), ortólogo do GnIH, e seu receptor GPR147 foram recentemente identificados no hipotálamo humano. No entanto, ainda não há evidências do papel funcional do sistema RFRP3/GPR147 em humanos. **Objetivos:** Investigar a associação do sistema inibidor das gonadotrofinas RFRP-3/GPR147 com a regulação do desenvolvimento puberal e capacidade reprodutiva em seres humanos. **Métodos:** Oitenta pacientes com puberdade precoce central idiopática (PPC) e 51 com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósico (HHI) foram investigados. Cinquenta pacientes formaram o grupo controle. A sequência codante dos genes *NPVF* and *NPFFR1*, que codificam respectivamente o RFRP e o GPR147, foram amplificadas e sequenciadas. As frequências dos polimorfismos (SNP) foram comparadas entre os grupos e a razão de probabilidades (*odds ratio*) para a ocorrência de cada SNP de PPC ou HHI foi determinada. **Resultados:** Todos os SNPs já estavam descritos em bancos de dados genéticos (*NCBI database*). Uma deleção *in frame* de três nucleotídeos foi identificada no gene *NPVF* (p.I71\_K72), com uma proporção levemente menor no grupo CCP, se comparado ao grupo com HHI (5% *versus* 15%, respectivamente;  $p=0.06$ ). Isto resulta na deleção da isoleucina na posição 71, adjacente à lisina em um dos sítios de clivagem endoproteolítica do peptídeo precursor. Este SNP esteve associado a proteção para a ocorrência de PPC (OR 0.33; IC 95%: 0.09-0.89); interessante, apenas dois homens com HHI foram homocigotos para esta variante. Um total de cinco SNPs *missense* foram encontrados no gene *NPFFR1*, com frequências semelhantes entre os grupos e sem associação com o tempo de puberdade. Esta é a primeira descrição de variantes genéticas dos genes *NPVF* and *NPFFR1* em uma série de pacientes com desordens puberais GnRH-dependentes e controles saudáveis. **Conclusão:** Concluímos que o sistema RFRP-3/GPR147 deve ter um papel secundário na regulação do desenvolvimento puberal; propõe-se um efeito modulador da variante p.I71\_K72 do gene *NPVF* sobre a ativação do eixo gonadotrófico.

## ABSTRACT

**Introduction:** Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is the main regulator of hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis, but new discovered neuropeptides can mediate the action of sexual steroids on hypothalamic level. In 2000, a hypothalamic factor of RFamide peptide family, the same one of kisspeptin, capable of inhibiting the HPG axis in quails, was discovered and named gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH). RFamide-related peptide-3 (RFRP-3), the ortholog of avian gonadotropin-inhibitory hormone, and its receptor GPR147 have been recently identified in the human hypothalamus. However, there are still no evidences of the functional role of RFRP-3/GPR147 system in humans. **Objectives:** Our aim was to investigate the association of the gonadotrophin inhibitory system RFRP-3/GPR147 with the regulation of puberal development and reproductive capacity in humans. **Methods:** Eighty patients with idiopathic central precocious puberty (CPP) and 51 with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism (nIHH) were investigated. Fifty healthy subjects comprised the control group. The coding sequence of the *NPVF* and *NPFFR1* genes, which encode respectively RFRP and GPR147, were amplified and sequenced. The frequencies of polymorphisms (SNP) were compared among the groups and the odds ratio of each SNP for the occurrence of CPP or nIHH was determined. **Results:** All SNPs were already described in NCBI database. A 3-nucleotide in frame deletion was identified in the *NPVF* gene (p.I71\_K72), with a slightly smaller proportion in the CPP (5%) as compared to the nIHH (15%) group ( $p=0.06$ ). It results in the deletion of the isoleucine at position 71, adjacent to lysine at an endoproteolytic cleavage site of the precursor peptide. This SNP was associated to protection for the occurrence of CPP (OR 0.33; 95%CI: 0.09-0.89); interestingly, only 2 men with nIHH were homozygotes for it. A total of 5 missense SNPs were found in the *NPFFR1* gene with similar frequencies among groups and no association with pubertal timing. This is the first description of *NPVF* and *NPFFR1* genetic variants in a series of patients with GnRH-dependent pubertal disorders and healthy controls. **Conclusion:** We concluded that RFRP-3/GPR147 may play secondary, modulatory roles on the regulation of pubertal development; a restraining modulatory effect of the *NPVF* p.I71\_K72 variant on gonadotropic axis activation is proposed.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal ..... 17
- Figura 2-** Resultados da análise *in silico* de três variantes missense do gene *NPFFR1* .....44
- Figura 3-** Sequência de aminoácidos do peptídeo precursor do RFRP humano.....49
- Figura 4-** Representação da estrutura secundária do receptor do RFRP humano (GPR147), com as variantes *missense* identificadas .....51
- Figura 5.** Simulação *in silico* de uma rede de genes conectados aos genes *NPVF* e *NPFFR1* .....55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sequências dos peptídeos ortólogos do GnIH em mamíferos ....	23
<b>Tabela 2</b> - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>NPVF</i> .....	33
<b>Tabela 3.</b> Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene <i>NPFFR1</i> .....	33
<b>Tabela 4.</b> Identificação, localização e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) dos polimorfismos dos genes <i>NPVF</i> and <i>NPFFR1</i> identificados em pacientes com distúrbios puberais GnRH-dependentes (HHI and PPC) e controles .....	38
<b>Tabela 5.</b> Identificação e localização dos polimorfismos do gene <i>NPVF</i> .....	39
<b>Tabela 6.</b> Distribuição das frequências alélicas e genotípicas da deleção <i>NPVF</i> c.212_214 (p.I71_K72) em pacientes com HHI e CPP.....	40
<b>Tabela 7.</b> Identificação e localização dos polimorfismos do gene <i>NPFFR1</i> ).....	41
<b>Tabela 8.</b> Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene <i>NPFFR1</i> identificadas em pacientes com HHI, PPC e controles .....	42
<b>Tabela 9.</b> Resultados da análise <i>in silico</i> das variantes missense do gene <i>NPFFR1</i> com o uso do <i>software</i> público PolyPhen-2 .....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- CEP: Comitê de Ética em Pesquisa
- CRH: hormônio liberador de corticotrofinas
- cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DMH: núcleo dorsomedial do hipotálamo
- EAP1: *enhanced at puberty 1*; aumentado na puberdade 1
- EDTA: ácido etileno diaminotetracético
- EGFR – *Epidermal growth factor receptor*; receptor do fator de crescimento epidérmico
- EM: eminência mediana
- ER: Receptor do estrógeno
- FSH: Hormônio foliculoestimulante
- GABA: ácido gama-aminobutírico
- GABRQ: receptor do ácido gama-aminobutírico
- GnIH: hormônio inibidor de gonadotrofinas
- GnIH-ir: neurônios imunorreativos ao GnIH
- GnIH-RP: peptídeos relacionados ao GnIH
- GnRH: Hormônio liberador das gonadotrofinas
- GPCR: receptores acoplados à proteína G
- GWAS: genome-wide association studies
- HC-FMUSP: Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
- HHG: Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
- HHI: hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático
- HMZ mut: homocigoto mutado
- HPLC: *high-performance liquid chromatography*; cromatografia líquida de alta performance
- HTZ : heterocigoto
- KNDy: neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo que colocalizam kisspeptina (K), neurokinina B (N) e dinorfina (Dy)
- KISSR: receptor da kisspeptina

LH: Hormônio luteinizante  
LHRH: Hormônio liberador de hormônio luteinizante  
MKRN3: Makorin RING-finger protein 3  
mRNA: RNA mensageiro  
NCBI: *National Center for Biotechnology and Information*  
NPAF: Neuropeptídeo AF  
NPFF: Neuropeptídeo FF  
NPV: núcleo paraventricular do hipotálamo  
NPY: neuropeptídeo Y  
OCT2: *octamer transcription fator 2*; fator de transcrição octamérico  
PCR: polymerase chain reaction; reação de polimerização em cadeia  
PPC: puberdade precoce central  
RCCD: retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento  
RFRP: *RFamide related peptides*; peptídeos relacionados à Rfamida  
SD: *short day photoperiods*; fotoperíodos de dias curtos  
SNP: *single nucleotide polymorphism*; polimorfismo de nucleotídeo único  
TEN: TRIS/EDTA/NaCl  
7TMR: sete domínios transmembrana  
TRHR: receptor do hormônio liberador de tireotrofina  
TTF1: *Thyroid Transcription Factor 1*; fator de transcrição da tireoide  
UnB: Universidade de Brasília  
USP: Universidade de São Paulo  
WT: *wild type*; selvagem

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1. Os neurônios secretores de GnRH .....	15
1.2. Novos peptídeos hipotalâmicos da família RFamida .....	17
1.2.1. Hormônio inibidor das gonadotrofinas (GnIH).....	19
1.2.2. Ortólogos do hormônio inibidor das gonadotrofinas em mamíferos ...	21
1.2.3. Kisspeptina .....	23
1.3. Desenvolvimento puberal normal .....	24
1.4. Distúrbios puberais GnRH dependentes .....	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
3.1. Geral .....	28
3.2. Específicos .....	28
<b>4. MÉTODOS</b> .....	30
4.1. Sujeitos do estudo .....	30
4.2. Avaliação molecular .....	31
4.2.1. Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico .....	31
4.2.2. Reação de polimerização em cadeia .....	32
4.2.3. Sequenciamento automático .....	34
4.2.4. Leitura e análise das sequências .....	34
4.2.5. Análise de predição do efeito funcional de variantes <i>in silico</i> .....	35
4.2.6. Análise da conectividade dos genes <i>NPVF</i> e <i>NPFFR1</i> .....	35
4.3. Análise estatística.....	35
4.4. Aprovação pelo Comitê de Ética .....	36
<b>5. RESULTADOS</b> .....	37
5.1. Variantes do gene <i>NPVF</i> .....	38
5.2. Variantes do gene <i>NPFFR1</i> .....	40
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	45
6.1. Estudo molecular dos genes <i>NPVF</i> e <i>NPFFR1</i> .....	46
6.2. Considerações sobre GnIH/RFRP na reprodução sazonal de aves e ovelhas .....	56

6.3. Limitações técnicas do estudo .....	59
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>62</b>
<b>9. APÊNDICE.....</b>	<b>71</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. OS NEURÔNIOS SECRETORES DE GnRH

O controle da função reprodutiva é feito através do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG). No hipotálamo há neurônios que secretam o GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*; hormônio liberador das gonadotrofinas), os quais localizam-se dorsalmente no hipotálamo mediobasal, no infundíbulo e na região periventricular em humanos. Esses neurônios secretam o GnRH, que estimula os gonadotrofos, localizados na hipófise anterior, a secretar as gonadotrofinas, FSH (*follicle-stimulating hormone*; hormônio foliculoestimulante) e LH (*luteinizing hormone*; hormônio luteinizante). Resumidamente, o papel biológico primordial do FSH e LH é estimular as gônadas, respectivamente, a produzir gametas e a secretar os esteroides sexuais: estrógeno e progesterona no sexo feminino e testosterona no sexo masculino (1).

O principal regulador deste eixo é o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), um decapeptídeo hipotalâmico, cuja estrutura primária foi inicialmente identificada em suínos (2, 3) e, em seguida, em ovinos (4).

Os neurônios secretores de GnRH tem origem fora do sistema nervoso central. Originam-se no epitélio do placódio nasal e migram através do septo nasal durante o período embrionário para sua localização definitiva no hipotálamo. Diferentemente do que ocorre em outras espécies incluindo seres humanos, em primatas, tais neurônios tem distribuição dispersa e não sob a forma de núcleos distintos (5, 6). Esses neurônios possuem a capacidade intrínseca de liberar GnRH de forma pulsátil, propriedade conhecida como pulso gerador de GnRH (7). Ao contrário do que se pensava até o início dos anos 70, quando era conhecido por LHRH (*luteinizing hormone-releasing hormone*; hormônio liberador de hormônio luteinizante), o GnRH estimula a síntese e a secreção hipofisária tanto do hormônio luteinizante (LH), quanto do hormônio foliculo estimulante (FSH) (8), dependendo da amplitude e da frequência de seus pulsos (9).

Existem vários sistemas regulatórios sobre os neurônios secretores de GnRH, representados por neurônios aferentes que secretam diversos hormônios e peptídeos neurotransmissores. Tais sistemas seriam os responsáveis pela regulação fisiológica dos neurônios secretores de GnRH, transmitindo a estes neurônios informações sobre o ambiente exógeno, como estresse, estado nutricional, sazonalidade, bem como sobre o ambiente endógeno, ou seja, a concentração de esteroides sexuais circulantes (1, 10).

Com o advento de técnicas citogenéticas para localização de estruturas nos níveis celular e subcelular, tais como imunocitoquímica, imunohistoquímica e hibridização *in situ*, foi possível mapear os receptores expressos pelos neurônios secretores de GnRH. Um achado intrigante foi a ausência de imunorreatividade ao receptor do estrógeno (ER) nos neurônios secretores de GnRH de mamíferos (11, 12). De modo semelhante, não foram identificados receptores de progesterona em ovelhas (13) e nem receptores de andrógenos em neurônios secretores de GnRH de carneiros (14).

A ausência de receptores de esteróides sexuais nos neurônios secretores de GnRH reforça a importância dos sistemas neuronais aferentes envolvidos em intermediar os sinais regulatórios entre as gônadas e o hipotálamo. Por este motivo, há crescente interesse na busca de novos peptídeos hipotalâmicos e nas vias aferentes sobre os neurônios secretores de GnRH.



(FMRFamida) e o mesmo apresenta propriedades cardioexcitatórias. O motivo estrutural RFamida é definido pela sequência composta por uma arginina e uma fenilalanina seguidas de um grupamento amida na extremidade carboxiterminal, Arg-Phe-NH<sub>2</sub>, e caracteriza esta família de peptídeos (15).

Após esta descoberta, seguiram-se descrições de diversos neuropeptídeos semelhantes em outros invertebrados e, posteriormente, em vertebrados. Nestes, a primeira descrição foi em aves, em 1983, quando foi identificado um pentapeptídeo RFamida no cérebro de galinhas (16).

Em mamíferos, os primeiros relatos de peptídeos da família RFamida compreenderam o neuropeptídeo FF (NPFF) e o neuropeptídeo AF (NPAF) em bovinos, os quais chamaram atenção por sua atividade antagonista opióide, dentre outras (17, 18).

À procura de outros neuropeptídeos da família RFamida, Hinuma e colaboradores, em 2000, descreveram os peptídeos RFRP-1, RFRP-2 e RFRP-3 (*RFamide related peptides*; peptídeos relacionados à RFamida) e seu receptor em mamíferos. Por meio de pesquisa ampla em banco de dados genéticos, os autores identificaram marcadores de sequência genética (*expressed sequence tags* – EST) e isolaram o DNA complementar (cDNA) de uma região codante completa em humanos, bovinos, ratos e camundongos. Desta forma, chegaram a sequência de uma preproteína e previram pelo menos três peptídeos relacionados à RFamida, considerando possíveis sítios proteolíticos de clivagem: RFRP-1, RFRP-2 e RFRP-3. Esses mesmos autores observaram que a sequência de aminoácidos do RFRP-2 estava ausente nos roedores estudados e possivelmente teria pouca relevância fisiológica em humanos e bovinos (19).

Neste mesmo estudo, os autores identificaram o receptor do RFRP em mamíferos. Utilizando abordagem de farmacologia reversa (*reverse pharmacological approach*) para identificar ligantes de receptores órfãos da família de receptores acoplados à proteína G (GPCRs), rastreamos vários receptores órfãos com sete domínios transmembrana (7TMRs). Concluíram que o RFRP-1 humano (hRFRP-1) e RFRP-3 humano (hRFRP-3) estimulavam especificamente o receptor órfão OT7T022. Entretanto, neste

estudo os novos neuropeptídeos RFamida não foram associados a alteração nas concentrações plasmáticas de gonadotrofinas(19).

No mesmo ano, dois grupos identificaram e caracterizaram receptores para o neuropeptídeo FF (NPFF) e o neuropeptídeo AF (NPAF); ambos apresentaram alta afinidade para o receptor HLWAR77 (20, 21).

Em 2003, Yoshida e colaboradores compararam a afinidade de ligação dos receptores OT7T022 e do HLWAR77 ao RFRP-3 e ao NPFF radiomarcados. Concluíram que o OT7T022 apresenta maior especificidade para o RFRP, enquanto o HLWAR77 é mais específico para o NPFF (22).

Subsequentemente, a nomenclatura dos receptores de peptídeos RFamida vem sendo modificada. Mais recentemente, o receptor OT7T022 vem sendo referido por NPFF-1 ou GPR147, enquanto o HLWAR77 é também chamado NPFF-2, GPR74 ou NPGPR (23).

### **1.2.1. Hormônio inibidor das gonadotrofinas (GnIH)**

Em 2000, Tsutsui e colaboradores identificaram um peptídeo no extrato do cérebro de codornas japonesas usando HPLC (*high-performance liquid chromatography*) e um ensaio imunoenzimático para o motivo estrutural RFa (Arg-Phe-NH<sub>2</sub>). Tratava-se de um dodecapeptídeo com terminação Arg-Phe-NH<sub>2</sub> em sua extremidade carboxiterminal, portanto um peptídeo pertencente à família RFamida. Através de imunohistoquímica, foi identificada a localização do novo peptídeo no cérebro das codornas: os corpos celulares situavam-se principalmente no núcleo paraventricular (NPV) do hipotálamo, com projeções para a eminência mediana (EM). O peptídeo demonstrou ser capaz de inibir, *in vitro*, a secreção de gonadotrofinas, sobretudo de LH. Este foi o primeiro relato da existência de um peptídeo hipotalâmico inibidor da liberação de gonadotrofinas em vertebrados, motivo pelo qual foi denominado hormônio inibidor de gonadotrofinas (GnIH) (24).

Em seguida, foi identificada a sequência codante do peptídeo precursor do GnIH em codornas (25), o qual dá origem a dois peptídeos relacionados ao GnIH (GnIH-RP-1 e GnIH- RP-2).

Em 2003, Bentley e colaboradores estudaram duas espécies de aves canoras, as quais apresentam reprodução sazonal de acordo com alterações na fotoperiodicidade. Além de confirmar a relação anatômica entre os neurônios secretores de GnIH e de GnRH, os autores confirmaram que o conteúdo hipotalâmico de GnIH e sua liberação são regulados sazonalmente de acordo com o estado reprodutivo das aves (26).

Visando ratificar esses achados e investigar os mecanismos que regulam a expressão do GnIH, Ubuka e colaboradores demonstraram, em codornas, que a melatonina induz a expressão gênica de GnIH. Também foi demonstrado que os neurônios secretores de GnIH expressam um subtipo de receptor da melatonina. Este foi o primeiro relato da ação da melatonina na indução de um neuropeptídeo no cérebro de vertebrados (27).

Com o crescente interesse nos peptídeos relacionados à RFamida (RFRPs), Ikemoto e Park procuraram confirmar se os RFRPs que vinham sendo descritos em vertebrados eram de fato ortólogos. Para tanto, identificaram o cDNA e o gene que codifica o RFRP de galinhas e demonstraram as relações ortólogas entre os genes codantes de RFRP de três classes de vertebrados – peixe, galinha e humano – através de técnica de conservação de sintenia em nível cromossômico (*chromosome-wide synteny conservation*) e não apenas por similaridade das sequências. Os autores também descreveram dois tipos de receptores para RFRPs de não mamíferos e os caracterizaram farmacologicamente utilizando RFRP de galinhas e de codornas (28). Esses autores consideraram a possibilidade de que o pentapeptídeo RFamida que foi descrito em galinhas em 1983 (16) seria um fragmento do RFRP de aves.

Em 2005, Yin e colaboradores identificaram o receptor do GnIH em codornas, fato essencial para a compreensão do mecanismo de ação do GnIH sobre a secreção de gonadotrofinas. Baseado em estudo prévio que identificou a estrutura do receptor do RFRP em mamíferos (19), os autores clonaram o DNA complementar (cDNA) do suposto receptor do GnIH. Este foi subclonado a um vetor de expressão e transfectado à fração bruta da membrana de células COS-7 para caracterizar sua atividade de ligação através de ensaios competitivos. Os autores também caracterizaram a

expressão do RNA mensageiro (mRNA) do receptor do GnIH na hipófise e no hipotálamo de codornas (29).

### **1.2.2. Ortólogos do hormônio inibidor das gonadotrofinas em mamíferos**

Em 2006, Kriegsfeld e colaboradores identificaram e caracterizaram um sistema inibidor de gonadotrofinas no cérebro de mamíferos. Utilizando técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ*, os autores demonstraram a concentração de corpos celulares de neurônios imunorreativos ao GnIH (GnIH-ir) no núcleo dorsomedial do hipotálamo (DMH) de três espécies de roedores (hamsters, ratos e camundongos). Além disso, através de técnicas de imunohistoquímica de dupla marcação e de microscopia convencional e confocal, observaram que as fibras de células GnIH-ir projetam-se para neurônios imunorreativos ao GnRH (GnRH-ir); este achado sugere implicações funcionais relevantes. Para confirmar o papel funcional do GnIH em mamíferos, os autores demonstraram *in vivo*, em hamsters fêmeas ovariectomizadas, que o GnIH inibe a secreção de LH e que as células GnIH-ir expressam receptores para esteroides sexuais (30).

A presença de ortólogos do GnIH e a mesma relação com os neurônios secretores de GnRH foi observada também em outras espécies de mamíferos. Em 2008, Clarke e colaboradores identificaram um cDNA no hipotálamo de ovinos que codifica um ortólogo do RFRP-3 e demonstraram a localização dos neurônios secretores de RFRP-3 no núcleo paraventricular (PVN) e dorsomedial (DMH) do hipotálamo ovino, com projeções para a eminência mediana. Ademais, os autores comprovaram que esse peptídeo inibe a secreção de gonadotrofinas *in vitro* e *in vivo*. Esta foi a primeira demonstração de que o RFRP-3 é um hormônio hipofisiotrófico em ovelhas (31). No mesmo ano, Smith e colaboradores propuseram que alterações na expressão de RFRP estariam relacionadas ao controle sazonal da reprodução de ovelhas (32). Tais alterações foram reciprocamente opostas à expressão de outro neuropeptídeo RFamida, a kisspeptina (34-36), de modo que durante a fase reprodutiva há predomínio da expressão de kisspeptina,

enquanto na fase não reprodutiva predomina a expressão de RFRP. Desta forma, os autores sugeriram que estes dois peptídeos hipotalâmicos atuariam em equilíbrio no controle da secreção de GnRH de ovelhas através das estações do ano ((32).

Em 2009, Ubuka e colaboradores isolaram o peptídeo RFRP-3 de macacos rhesus e localizaram os neurônios secretores de RFRP-3 predominantemente no núcleo periventricular intermediário do hipotálamo de macacos, bem como a descreveram a distribuição de suas fibras para diversas regiões do cérebro. A julgar pelo padrão de localização dos axônios, é possível que os neurônios secretores de RFRP-3 regulem vários sistemas neurais em macacos (33).

A existência de estruturas imunorreativas ao GnIH (GnIH-ir) no hipotálamo humano foi analisada por Ubuka e colaboradores em 2009. Foram identificados dois homólogos do GnIH: RFRP-1 e RFRP-3. Neurônios GnIH-ir foram observados na região dorsomedial do hipotálamo humano, com projeções axonais próximas aos corpos celulares dos neurônios GnRH-ir na área pré-óptica, bem como para a zona neurosecretória da eminência mediana. Além disso, por meio de hibridização *in situ* combinada com imunohistoquímica para LH, nesse estudo foi demonstrada também a expressão do mRNA do receptor GPR147 nos gonadotrofos na hipófise humana (34).

No caso do RFRP humano, foi identificada a sequência de aminoácidos do peptídeo precursor e foram avaliados os prováveis sítios de clivagem, chegando-se ao RFRP-1 e RFRP-3 como os peptídeos maduros; em modelos animais, o RFRP-3 apresenta potente atividade inibitória sobre a secreção de gonadotrofinas (34).

Os peptídeos RFRP, ortólogos do GnIH, apresentam algumas diferenças em sua sequência de aminoácidos entre as espécies (35) (Tabela 1). O RFRP-3 ovino é idêntico ao RFRP-3 humano e muito potente inibidor da secreção de gonadotrofina estimulada por GnRH, por isso tem sido usado na maioria dos experimentos (31). Além disso, nessa espécie é possível acessar o sistema porta-hipofisário com certa facilidade para a realização de amostragens sanguíneas (36). Recentemente, foi demonstrada a secreção de GnIH no sistema porta-hipofisário ovino, reduzindo a ação do GnRH (37).

Tabela 1 – Sequências dos peptídeos ortólogos do GnIH em mamíferos, com a sequência característica de aminoácidos PXRf (“X” sendo L ou Q) na porção C-terminal em destaque [adaptado da referência(38)]

<b>Espécie</b>	<b>Peptídeo</b>	<b>Sequência</b>
Camundongo	RFRP-1	VPHSAANL <b>PLRF</b>
	RFRP-3	NMEAGTRSHFPSL <b>PQRF</b>
Rato	RFRP-1	VPHSAANL <b>PLRF</b>
	RFRP-3	ANMEAGTMSHPPSL <b>PQRF</b>
Hamster	RFRP-1	SPAPANKVPHSAANL <b>PLRF</b>
	RFRP-3	ILSRVPSL <b>PQRF</b>
Bovino	RFRP-1	SLTFEEVKDWAPKIKMNKPVVNKMPPSAANL <b>PLRF</b>
	RFRP-3	AM AHLPLRLGKNREDSLSRWVPNL <b>PQRF</b>
Ovino	RFRP-1	LTFEEVKDWGPKIKMNTPAVNKMPPSAANL <b>PLRF</b>
	RFRP-3	<u>VPNL<b>PQRF</b></u>
Macaco rhesus	RFRP-3	SGRNMEVSLVRQVLNL <b>PQRF</b>
Humano	RFRP-1	MPHSFANL <b>PLRF</b>
	RFRP-3	<u>VPNL<b>PQRF</b></u>

### 1.2.3. Kisspeptina

O gene *KISS1* foi identificado em 1996 como um gene supressor de metástases; o peptídeo codificado por ele foi denominado metastatina (39).

Em 2001, foi descoberto que a metastatina, um peptídeo de 54 aminoácidos da família RFamida, era o ligante de um GPCR órfão, o GPR54. Este peptídeo, bem como os menores, com 13 e 14 aminoácidos, que também tem atividade agonista sobre esse receptor, passaram ser chamados de kisspeptina (40-42).

Entretanto, a relação deste peptídeo com o sistema reprodutor só foi estabelecida em 2003, quando dois grupos independentes relataram a ocorrência de mutações com perda de função do receptor da kisspeptina (KISS1R ou GPR54) como causa de hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático (43, 44).

Messenger e colaboradores, em 2005, demonstraram a colocalização do GPR54 com os neurônios secretores de GnRH e provaram que a kisspeptina estimula a liberação de gonadotrofinas por atuar no GPR54. Além disso, os autores demonstraram, em ovelhas, que a kisspeptina administrada por via intracerebroventricular, produz grande liberação de GnRH no fluido cerebroespinal, com elevação paralela no LH sérico (45).

Em 2008, foi descrita uma mutação ativadora do GPR54 como causa de puberdade precoce central (46) e vários outros estudos confirmaram este importante papel da kisspeptina sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (47, 48).

De fato, a descoberta do papel da kisspeptina e de seu receptor, GPR54, na puberdade é considerado um dos grandes marcos da área de endocrinologia da reprodução, desde a descoberta do GnRH nos anos 70 (49). Os neurônios secretores de kisspeptina expressam receptores de esteroides sexuais (50) e seriam um elo entre os neurônios secretores de GnRH e os sinais provenientes da periferia, para a realização do *feedback*.

### 1.3. DESENVOLVIMENTO PUBERAL NORMAL

Puberdade é definida como o período de transição entre a infância e a idade adulta, durante o qual se desenvolvem caracteres sexuais secundários e se atinge a capacidade reprodutiva plena. O início da puberdade caracteriza-se pela secreção pulsátil de GnRH (51).

A maturação do sistema neuroendócrino reprodutivo inicia-se no fim do período embrionário, com a secreção de gonadotrofinas pela hipófise a partir da 11<sup>a</sup>. ou 12<sup>a</sup>. semana de gestação. Os níveis de LH e de FSH atingem seu pico no meio do período gestacional, para declinarem até o fim da gestação. A partir dos seis meses de vida, os níveis circulantes de LH, FSH e esteroides gonadais estão baixos e o sistema hipotálamo-hipófise-gonadal entra em um período de relativa quiescência até a época da puberdade (51). Uma das grandes questões da endocrinologia da reprodução diz respeito aos fatores que levam ao início da puberdade.

O aumento na secreção pulsátil de GnRH é essencial para o aumento na secreção de gonadotrofinas e consequente estímulo gonadal. Muitos neurotransmissores e neuromoduladores apresentam propriedades inibitórias ou excitatórias sobre a secreção do GnRH. Dentre os neurotransmissores inibitórios, podemos destacar o ácido gama-aminobutírico (GABA), opióides endógenos, a melatonina, o hormônio liberador de corticotrofinas (CRH). Dentre os neurotransmissores excitatórios, são conhecidas as ações do glutamato e da norepinefrina. O neuropeptídeo Y (NPY) pode ter papel estimulatório ou inibitório sobre a secreção de GnRH (10).

Como parte desta complexa rede de interações sobre os neurônios secretores de GnRH, surgem os neuropeptídeos hipotalâmicos da família RFamida, como o GnIH e seu ortólogo RFRP-3, como inibidor e, sobretudo, a kisspeptina, como potente estimulador da secreção de GnRH (50, 52).

A puberdade é considerada normal quando o início dos caracteres sexuais secundários ocorre entre 8 e 13 anos em meninas e entre 9 e 14 anos em meninos (51). Tem-se observado uma alteração na tendência secular de início da puberdade em ambos os sexos no sentido de uma redução na idade de início da puberdade (53). Dentre os sinais físicos que indicam a maturação sexual em meninas os principais são aceleração do crescimento linear, desenvolvimento mamário e menarca; em meninos, o principal sinal é o aumento do volume testicular (51).

#### 1.4. DISTÚRBIOS PUBERAIS GNRH DEPENDENTES

Puberdade precoce é o aparecimento de qualquer sinal de maturação sexual abaixo dos limites inferiores da normalidade, ou seja, abaixo de 8 anos em meninas e abaixo de 9 anos em meninos.

Quando essa precocidade sexual resulta de reativação prematura do eixo hipotálamo-hipofisário, a condição é GnRH dependente, sendo chamada puberdade precoce central (PPC) ou puberdade precoce completa ou precocidade isossexual verdadeira (54). Nesta pesquisa será adotado o termo puberdade precoce central. Quando se afastam causas orgânicas de

ativação do eixo, a PPC é chamada idiopática, sendo esta forma mais frequente em meninas que em meninos.

Por outro lado, quando o desenvolvimento puberal não se inicia até os 13 anos em meninas e os 14 anos em meninos, tem-se uma situação de atraso puberal. Neste caso é importante o diagnóstico diferencial entre um retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento (RCCD) e hipogonadismo hipogonadotrófico, considerando apenas as causas centrais de hipogonadismo(55).

O RCCD, mais que uma patologia, é uma variação normal do crescimento e do desenvolvimento, que representa o extremo final de distribuição normal do período de puberdade. É a causa mais comum de atraso puberal em ambos os sexos, mas é um diagnóstico de exclusão (56, 57).

No hipogonadismo central, a falência da maturação sexual é decorrente de secreção pulsátil insuficiente do GnRH e resultante deficiência de gonadotrofinas. Esta situação pode vir isolada ou associada a outras deficiências hipofisárias. Na ausência de causas orgânicas, como tumores do sistema nervoso central (SNC), a condição é considerada idiopática (hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático – HHI). Este pode ainda ser subdividido em normósmico e em anósmico ou hipósmico, quando há alteração concomitante no olfato (56, 58).

## 2. JUSTIFICATIVA

As fortes evidências sobre a importância do sistema da Kisspeptina/GPR54 em humanos, aliada à descoberta recente da existência no hipotálamo e hipófise humanos de um sistema neuro-hormonal com potencial inibidor sobre a secreção de gonadotrofinas, mediado pelo RFRP-3 e seu receptor, traz à tona a hipótese de que esses sistemas poderiam atuar na regulação da função gonadotrófica de maneira reciprocamente oposta. Entretanto, não há até o momento evidências da funcionalidade do sistema RFRP-3/GPR147 em humanos.

Diante dessa hipótese e com base nos dados apresentados, o presente estudo busca verificar a ocorrência de mutações nos genes *NPVF* e *NPFFR1*, que codificam respectivamente o RFRP-3 humano e o receptor GPR147, em uma série de indivíduos portadores distúrbios puberais GnRH-dependentes. Esses distúrbios incluem, de um lado, a puberdade precoce central e, de outro, o hipogonadismo hipogonadotrófico. Por constituírem condições extremas em que ocorre fundamentalmente uma alteração no momento do início do desenvolvimento puberal, representam excelente modelo para o estudo dos processos que regulam a puberdade e a função reprodutiva em seres humanos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. GERAL

Investigar a associação do sistema inibidor das gonadotrofinas RFRP-3 /GPR147 com a regulação do desenvolvimento puberal e capacidade reprodutiva em seres humanos.

#### 3.2. ESPECÍFICOS

- Investigar a ocorrência de variantes no gene *NPVF*, que codifica o peptídeo RFRP-3 humano, em indivíduos portadores de puberdade precoce central e de hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico.

- Investigar a ocorrência de variantes no gene *NPFFR1*, que codifica o receptor do RFRP-3 humano (GPR147), em indivíduos portadores de puberdade precoce central e de hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico.

- Comparar a distribuição das variantes nos genes *NPVF* e *NPFFR1* entre indivíduos com puberdade precoce central e com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico,

- Comparar a distribuição das variantes nos genes *NPVF* e *NPFFR1* entre indivíduos com puberdade precoce central e indivíduos com desenvolvimento puberal normal.

- Comparar a distribuição das variantes nos genes *NPVF* e *NPFFR1* entre indivíduos com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico e indivíduos com desenvolvimento puberal normal.

- Analisar o impacto funcional, *in silico*, de variantes *missense* que venham a ser identificadas nos genes *NPVF* e *NPFFR1*.

- Analisar a conectividade dos genes *NPVF* e *NPFFR1* com outros genes sabidamente envolvidos no desenvolvimento puberal.

## 4.MÉTODOS

### 4.1. SUJEITOS DO ESTUDO

Foram estudados 80 pacientes com puberdade precoce central idiopática (PPC) e 51 pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico (HHI). Todos os pacientes com PPC foram selecionados e recrutados no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), bem como 44 pacientes com HHI, pela equipe responsável nesse serviço. Os demais 7 pacientes com HHI foram selecionados e recrutados no Ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do Hospital Universitário de Brasília, na Universidade de Brasília (HUB/UnB). As amostras de DNA dos pacientes com PPC e HHI procedentes do HC/FMUSP foram encaminhadas ao Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB, após estabelecida a colaboração científica entre os grupos de pesquisa, para o presente estudo.

Os critérios de inclusão foram:

1. Puberdade precoce central idiopática:

a) Desenvolvimento de características sexuais secundárias antes dos 8 anos de idade em meninas e antes dos 9 anos de idade em meninos, associado a aumento da velocidade de crescimento e avanço de idade óssea determinado pelo método de Greulich-Pyle;

b) Níveis plasmáticos de LH no nível puberal ( $> 0,6\text{U/L}$ , por ensaio quimioluminescente);

c) Ressonância nuclear magnética do sistema nervoso central demonstrando ausência de lesões anatômicas.

## 2. Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico:

a) Desenvolvimento puberal ausente ou incompleto após 16 anos de idade em meninas e após 18 anos de idade em meninos;

b) Níveis plasmáticos de esteróides gonadais baixos associados a níveis baixos ou inapropriadamente normais de gonadotrofinas;

c) Ressonância nuclear magnética do sistema nervoso central demonstrando ausência de lesões anatômicas.

d) Ausência de anormalidades ao teste do olfato - Smell Identification Test™ (Sensonics, Philadelphia, USA).

Foram excluídos, tanto para o diagnóstico de PPC quanto de HHI, pacientes com lesões anatômicas da região hipotálamo-hipofisária e pacientes com hipogonadismo adquirido.

O grupo controle foi composto por 50 indivíduos com desenvolvimento puberal normal, maiores de 18 anos.

## 4.2. AVALIAÇÃO MOLECULAR

### 4.2.1. Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico

O DNA dos sujeitos do estudo foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método de extração por sal modificado, conforme descrito a seguir (59). Aproximadamente 12 mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubos com ácido etileno diaminotetracético (EDTA). A extração ocorre em três etapas: lise das hemácias com tampão de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  1mM +  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1,4mM; lise dos leucócitos com TEN (TRIS 10mM pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0; NaCl 150mM pH 8,0), SDS10% e proteinase K (10mg/ML); precipitação do DNA com NaCl supersaturado (6M) e álcool absoluto gelado. Secagem e ressuspensão em TE. As amostras foram então armazenadas a  $-4^\circ\text{C}$  para posterior utilização.

#### 4.2.2. Reação de polimerização em cadeia

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação da região codante do gene *NPVF*, que codifica o RFRP humano, e do gene *NPFFR1*, que codifica o receptor GPR147. Para tanto, foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores intrônicos, conforme descrito nas Tabelas 2 e 3. O gene *NPVF* consiste de três exons, sendo que apenas os dois últimos codificam o polipeptídeo precursor, o qual é clivado e origina dois peptídeos RFamida, incluindo o RFRP-3, suposto ortólogo humano do GnIH aviário.

O gene *NPFFR1* é formado por 4 exons, que codificam o GPR147; como o produto do exon 4 é muito longo, utilizamos a estratégia de dividir este exon em 3 fragmentos, que foram denominados 4a, 4b e 4c.

Nas reações de amplificação (polymerase chain reaction – PCR) foram utilizados 100 ng de DNA genômico, 125 ng de cada oligonucleotídeo iniciador (*forward* e reverso) e GoTaq™ Green Master Mix (Promega Corporation), para um volume final de 50 µL. As amplificações foram realizadas nos termocicladores TC-3000 (Techne) e T100™ (BIO-RAD), nas seguintes condições:

Gene *NPVF*: desnaturação inicial a 96°C por 6 minutos, desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 54°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram realizados 35 ciclos.

Gene *NPFFR1*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* a 60°C durante 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram realizados 35 ciclos.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *NPVF*

Éxon	Oligonucleotídeos	Produto
1	1F: TGTGTGAGATTGATTTCACTGTT 1R: AACAGAGTACACACCAACTTACTTC	377 pb <sup>a</sup>
2	2F: TCTGCACATATGAACACAACTT 2R: TTAGTTCCTTGTGTCTTTGCCTC	684 pb
3	3F: TCATTTCAAGTGCAACACAATTC 3R: TATGTAGCTACTCTTCCGTGTGG	265 pb

<sup>a</sup>pb= pares de bases

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do gene *NPFFR1*

Éxon	Oligonucleotídeos	Produto
1	1F: AACCAAGTGCCCGGAGACC 1R: GCTGTCCAGAGCCAGACGTTG	225 pb <sup>a</sup>
2	2F: GTTTGGCACACAGAGGGTCTC 2R: GTCCCCTACCCCCACTTC	452 pb
3	3F: CAGTCTCTGGCTCTTGATGCG 3R: CTAGGGCCTGGCATTAAAGAGGA	218 pb
4	4aF: AGATGCGATGATGAAGGTCAGGTG 4aR: CTACACCACTGTGCTCTTCTCGCAC	348 pb
	4bF: AGGAGCACCACTTCATGGTGGGA 4bR: CACAAGGAGGCCTACTCCGAGC	534 pb
	4cF: CCCATCATCTACGGCTACTTCAACGA 4cR: CAGGGCCCCGATTGGACAC	366 pb

<sup>a</sup>pb= pares de bases

Para avaliar a eficiência da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE, com brometo de etídeo a 10mg/mL; para comparação visual do padrão de migração dos produtos no gel, utilizou-se marcador de peso molecular 1Kb Plus

(Invitrogen™). O gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado. Controles negativo e positivo foram utilizados em todas as reações.

#### 4.2.3. Sequenciamento automático

Os produtos de PCR foram purificados pelo kit de purificação QIAquick™ (Qiagen™) e enviados para sequenciamento automático, nas orientações sense (5'>3') e antisense (3'>5"), o qual foi realizado pela empresa especializada MacroGen Inc. que utiliza o aparelho ABI Prism Genetic Analyzer (Perkin-Elmer).

#### 4.2.4. Leitura e análise das sequências

As análises, alinhamentos e comparações entre as sequências foram realizadas com o auxílio de *software* especializado: *Sequencher* (Gene Codes Corporation versão Demo 4.10.1 2011, Ann Arbor, MI).

As sequências obtidas foram comparadas com a sequência referência disponível na base de dados PubMed (*National Center for Biotechnology and Information* - NCBI). Para o *NPVF*, gene que codifica o peptídeo RFRP: *NCBI Reference Sequence*: NM\_022150.3; e para o *NPFFR1*, gene que codifica o GPR147: *NCBI Reference Sequence*: NM\_022146.4.

As sequências nas quais não possível identificar determinados polimorfismos devido à baixa qualidade do sequenciamento, foram re-sequenciadas, porém, aquelas que mantiveram qualidade insuficiente para leitura e identificação inquestionável de variantes foram excluídas da análise.

#### 4.2.5. Análise de predição do efeito funcional de variantes *in silico*

A predição do efeito funcional e a severidade das variantes *missense* identificadas foi realizada com o uso do *software* público PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>).

#### 4.2.6. Análise da conectividade dos genes *NPVF* e *NPFFR1*

O *software* GeneMANIA ([www.genemania.com](http://www.genemania.com)) foi utilizado para fazer a análise de conectividade dos genes *NPVF* e *NPFFR1*. Este *software* encontra interações e genes complementares que são relacionados aos genes inseridos (60, 61).

### 4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência de cada polimorfismo foi testada para desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (62). Para análise comparativa das diferenças entre as frequências alélicas e genótípicas de cada polimorfismo entre pacientes com CPP, HHI e controles, foi usado o teste exato de Fisher (*two-sided Fisher's exact test*). Para comparação da distribuição dos genótipos de cada polimorfismo entre os grupos de PPC, HHI e controles, um modelo genético co-dominante foi aplicado, no qual o genótipo homocigoto mais comum (*wild-type*) foi usado como referência.

Para avaliar o nível de associação entre a presença de um dado polimorfismo do gene *NPVF* e *NPFFR1* e a ocorrência de PPC e HHI, um modelo caso-controle foi criado para estimar as razões de probabilidades (*odds ratio*) e respectivos intervalos de confiança 95%. Para comparação da distribuição dos alelos entre os grupos de estudo e na análise de casos e controles para estimativa da associação entre a presença de determinada variante e a ocorrência da doença, foram utilizadas as frequências alélicas

globais para cada polimorfismo disponíveis no banco de dados do NCBI, as quais são apresentadas como frequências do alelo menos comum numa população global padrão (*minor allele frequency* – MAF) (63). As mesmas análises foram realizadas para a comparação das frequências observadas no grupo controle para os polimorfismos em que foi possível essa determinação. A análise dos dados foi realizada com a utilização do *software* STATA, versão 8.2.

#### 4.4. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA

Esta pesquisa foi realizada em colaboração com o grupo da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), sob coordenação geral da Profa. Ana Cláudia Latronico. A casuística foi criada a partir de estudos realizados nos últimos anos e já recebeu aprovação prévia do respectivo comitê de ética em pesquisa em seres humanos (CEP – HC-FMUSP) para o estudo. Os pacientes procedentes do Ambulatório de Endocrinologia das Gônadas e Adrenais do HUB, Universidade de Brasília, foram incluídos nessa casuística.

Todos os sujeitos participaram da pesquisa mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelo próprio paciente, ou por seu responsável no caso de menores de 18 anos (Apêndice A – Termo de consentimento livre e esclarecido).

## 5. RESULTADOS

A média  $\pm$  DP de idade dos casos com PPC e HHI era de  $7.4 \pm 1.8$  e  $23.8 \pm 7.7$  anos, respectivamente. 93,7 % dos pacientes com PPC e 43,1 % dos pacientes com HHI eram do sexo feminino. A idade de início dos sinais de puberdade no grupo PPC foi de  $7,5 \pm 1,7$  anos no sexo feminino e de  $6,4 \pm 4,0$  anos no sexo masculino.

Por meio de sequenciamento genético, dois polimorfismos foram detectados na região codante do gene *NPVF* e doze no gene *NPFFR1* em todos os sujeitos estudados; todas as variantes já haviam sido descritas em banco de dados genéticos (<http://browser.1000genomes.org> e/ou [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)). Dentre estes, foi identificada uma deleção de três nucleotídeos no exon 2 do gene *NPVF*, c.212\_214del (p.I71\_72; rs3216928), e cinco variantes *missense* no exon 4 do gene *NPFFR1*.

Na tabela 4 estão listadas as seis variantes *não-sinônimas* encontradas, sua localização na sequência referência do gene correspondente à posição do nucleotídeo alterado na sequência codificante do gene (*NPVF*: NCBI Reference Sequence: NM\_022150.3; *NPFFR1*: NCBI Reference Sequence: NM\_022146.4), bem como a posição do aminoácido correspondente na proteína. Exceto pela distribuição do polimorfismo (*single nucleotide polymorphism*; SNP) p.I145L do *NPFFR1* no grupo controle e PPC, todas as demais variantes não sinônimas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg em todos os grupos de estudo.

Tabela 4- Identificação, localização e análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) dos polimorfismos identificados nos genes *NPVF* and *NPFFR1* identificados em pacientes com distúrbios puberais GnRH-dependentes (HHI and PPC) e controles

Identificação do polimorfismo <sup>a</sup>	Gene/região	Posição e troca de nucleotídeo <sup>b</sup>	Posição e troca de aminoácido <sup>c</sup>	HW p-valor <sup>d</sup>		
				HHI	PPC	controles
rs3216928	<i>NPVF</i> exon 2	c.212_214del	p.I71_K72	0,17	0,74	ND
rs3812694	<i>NPFFR1</i> Exon 4	433A>C	p.I145L	0,59	0,002	0,000
rs61746115	<i>NPFFR1</i> Exon 4	577G>T	p.A193S	0,94	0,79	1,00
rs61746113	<i>NPFFR1</i> Exon 4	587G>T	p.R196L	0,88	0,90	0,94
rs113487866	<i>NPFFR1</i> Exon 4	1039C>A	p.R347S	1,00	0,94	ND
rs200382790	<i>NPFFR1</i> Exon 4	1075G>A	p.A359T	1,00	0,94	ND

<sup>a</sup> Identificação dos polimorfismos do gene *NPVF* de acordo com os bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), baseado em população global padrão do projeto 1000Genome fase 1, liberado em maio 2011

<sup>b</sup> Posição da troca de nucleotídeos na sequência codante do RNAm (*NPVF*: CCDS 5395.1 e *NPFFR1*: CCDS 53539.1)

<sup>c</sup> Posição de troca de aminoácidos na proteína madura.

<sup>d</sup> p-valor calculado pelo teste de Fisher para desvios das frequências genotípicas do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW)

\* ND: não disponível

## 5.1. VARIANTES DO GENE *NPVF*

As duas variantes identificadas no éxon 2 do gene *NPVF* estão relacionadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Identificação e localização dos polimorfismos do gene *NPVF*

Identificação dos Polimorfismos <sup>a</sup>	Região do gene	Posição e troca de nucleotídeos <sup>b</sup>	Posição e troca de aminoácidos <sup>c</sup>
rs3216928	Exon 2	c.212_214del	Ile71_Lys72
rs2717851	Exon 2	384C>T	Pro128=

<sup>a</sup> Identificação dos polimorfismos do gene *NPVF* de acordo com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), baseado em população global padrão do projeto 1000 Genomes fase 1, liberado em maio 2011

<sup>b</sup> Posição da troca de nucleotídeos na sequência codante do RNAm (CCDS 5395.1)

<sup>c</sup> Posição de troca de aminoácidos na proteína madura.

O polimorfismo rs2717851 compreende a substituição de uma citosina (C) por uma timina (T) no nucleotídeo 384 do exon 2. Isto resulta em uma mutação silenciosa, pois o aminoácido codificado é o mesmo: uma prolina no resíduo 128 da proteína. Para fins de análise comparativa, apenas o polimorfismo não-sinônimo foi avaliado.

O polimorfismo do gene *NPVF* c.212\_214 (rs3216928) corresponde à deleção de três nucleotídeos, 212, 213 e 214, sendo que os dois primeiros pertencem a um códon (ATT) e o outro, ao códon seguinte (AAG), o qual codifica uma lisina, a qual é um aminoácido básico, previsto como sítio de clivagem do peptídeo precursor. Esta é uma deleção *in frame*, que resulta na perda de uma isoleucina na posição 71 (p.I71\_K72), porém, sem modificar a sequência de aminoácidos subsequente.

Usando um modelo genético co-dominante, observa-se que a frequência alélica desta variante tende a ser maior no grupo de HHI do que no grupo de PPC (15% versus 5%), embora esta diferença não seja estatisticamente significativa ( $p=0,06$ ) (Tabela 6).

É interessante destacar que esta variante ocorre em estado homozigoto em 5% ( $n=2$ ) dos pacientes com HHI, porém em nenhum paciente do grupo de PPC. Uma análise mais detalhada mostra ainda que a frequência do alelo variante (TAA deletado) no grupo HHI (15%) é mais próxima à frequência do alelo menor (minor allelic frequency – MAF) de 13,8% (disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP)).

Ademais, a análise da estimativa da razão de probabilidades (*odds ratio*) demonstra que a presença dessa variante está associada a uma

probabilidade significativamente reduzida de ter PPC (OR: 0,33; IC 95%: 0.09-0.89 ), enquanto nenhuma associação foi observada para a ocorrência de HHI (OR: 1,11; IC 95%: 0,54-2,08) - Apêndice A - Tabela A1.

Tabela 6- Distribuição das frequências alélicas e genótípicas da deleção *NPVF* c.212\_214 (p.I71\_K72) em pacientes com HHI and PPC

Identificação do polimorfismo <sup>a</sup>	Alelos e genótipos	HHI n (%)	PPC n (%)	p <sup>b</sup>
<b>rs3216928</b>	TAA	68 (85%)	76 (95% )	0,06
<b>p.I71_K72</b>	-	12 (15%)	4 (5%)	
	TAA/TAA	30 (75%)	36 (90%)	
	TAA/-	8 (20%)	4 (10%)	
	-/-	2 (5%)	0	

<sup>a</sup> Identificação dos polimorfismos do gene *NPVF* de acordo com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), baseado em população global padrão do projeto 1000Genomes fase 1, liberado em maio 2011; posição de troca de aminoácidos na proteína madura.

<sup>b</sup> valor *p* calculado usando o teste exato de Fisher (*two-sided*) para a comparação da proporção de alelos selvagens e alelos variantes pelo modelo de co-dominância entre HHI e PCC. Significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$

## 5.2. VARIANTES DO GENE *NPFFR1*

Na análise do gene *NPFFR1* foram identificados diversos polimorfismos, a maioria localizada no éxon 4.

Foram encontradas cinco variantes *missense* no exon 4, todas já descritas como polimorfismos em banco de dados (<http://browser.1000genomes.org> e/ou [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/)), a saber: rs3812694 (Ile145Leu), rs61746115 (Ala193Ser), rs61746113 (Arg196Leu), rs113487866 (Arg347Ser) e rs200382790 (Ala359Thr) (Tabela 7).

Tabela 7 – Identificação e localização dos polimorfismos do gene *NPFFR1*

Identificação do polimorfismo <sup>a</sup>	Região do gene	Posição e troca de nucleotídeos <sup>b</sup>	Posição e troca de aminoácidos <sup>c</sup>
rs3812694	Exon 4	433A>C	Ile145Leu
rs61746115	Exon 4	577G>T	Ala193Ser
rs61746113	Exon 4	587G>T	Arg196Leu
rs113487866	Exon 4	1039C>A	Arg347Ser
rs200382790	Exon4	1075G>A	Ala359Thr
rs1999624	Exon 4	1227C>T	409His=
rs140283186	Exon 4	729C>G	243Leu=
rs10999221	Exon 4	597G>T	199Pro=
rs60225321	Exon 4	1143C>T	Ser381=
rs186499075	Exon 4	816G>A	272Leu=
rs147150215	Exon 4	902C>T	298Leu=
rs3812696	Exon 2	201C>T	67Ile=

<sup>a</sup> Identificação dos polimorfismos do gene *NPFFR1* de acordo com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), baseado em população global padrão do projeto1000Genome fase 1, liberado em maio 2011

<sup>b</sup> Posição da troca de nucleotídeos na sequência codante do RNAm (CCDS 53539.1).

<sup>c</sup> Posição de troca de aminoácidos na proteína madura.

Apenas os polimorfismos não-sinônimos foram incluídos nas análises comparativas. A análise comparativa da distribuição destas variantes foi semelhante em todos os grupos estudados (tabela 8).

No éxon 2 foi encontrado um polimorfismo sinônimo, decorrente da substituição de uma citosina por uma timina no nucleotídeo 201, o que gera o mesmo aminoácido isoleucina na posição 67. No éxon 4 foram identificados outros seis polimorfismos sinônimos: 199Pro, 243Leu, 272Leu, 298Leu, 381Ser, 409His (Tabela 7).

De modo geral, nenhum polimorfismo do *NPFFR1* esteve associado a distúrbios puberais, seja HHI ou PPC (Apêndice A - Tabela A2).

A estrutura secundária do receptor do RFRP humano (GPR147), com as variantes *missense* identificadas nesta pesquisa, está representada na figura 4, no capítulo Discussão.

Tabela 8 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos do gene *NPFFR1* identificadas em pacientes com HHI, PPC e controles

Identificação do polimorfismo <sup>a</sup>	HHI	PPC	controles	p1 <sup>b</sup>	p2 <sup>b</sup>	p3 <sup>b</sup>
<b>rs3812694</b>						
<b>p.I145L</b>						
A	66 (91,6%)	111 (86,7%)	89 (89%)	0,78	0,47	0,79
C	6 (8,4%)	17 (13,3%)	11 (11%)			
AA	30 (83%)	51 (80%)	43 (86%)			
AC	6 (17%)	9 (14%)	3 (6%)			
CC	0	4 (6%)	4 (8%)			
<b>rs61746115</b>						
<b>p.A193S</b>						
G	97 (98,9%)	118 (96,7%)	100(100%)	0,49	0,13	0,38
T	1 (1,1%)	4 (3,3%)	0			
GG	48 (98%)	57 (90%)	50(100%)			
GT	1 (2%)	4 (6%)	0			
TT	0	0	0			
<b>rs61746113</b>						
<b>p.R196L</b>						
G	96 (97,9%)	126 (98,4%)	99 (99%)	0,62	1,00	1,00
T	2 (2,1%)	2 (1,6%)	1 (1%)			
GG	47 (96%)	62 (97%)	49 (98%)			
GT	2 (4%)	2 (3%)	1 (2%)			
TT	0	0	0			
<b>rs113487866</b>						
<b>p.R347S</b>						
C	98 (100%)	105 (99,05%)		ND	ND	1,00
A	0	1 (0,95%)				
CC	49 (100%)	52 (98%)				
CA	0	1 (2%)	ND*			
AA	0	0				
<b>rs200382790</b>						
<b>p.A359T</b>						
G	98 (100%)	105 (99,05%)		ND	ND	1,00
A	0	1 (0,95%)				
GG	49 (100%)	52 (98%)	ND			
GA	0	1 (2%)				
AA	0	0				

<sup>a</sup> Identificação dos polimorfismos do gene *NPFFR1* de acordo com o banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), baseado em população global padrão do projeto1000Genomes fase 1, liberado em maio 2011; posição de troca de aminoácidos na proteína madura.

<sup>b</sup> Valores de *p* calculados pelo teste de Fisher por comparação das proporções dos genótipos selvagens e variantes para um polimorfismos específico entre casos (HHI ou CCP) e controles e entre HHI e CCP, usando um modelo genético co-dominante. Diferenças estatisticamente significativas foram estabelecidas para  $p < 0.05$ .

p1: casos HHI *versus* controles; p2: casos PPC *versus* controles; p3: casos HHI *versus* PPC.

\* ND: não disponível

Foi realizada análise da predição do impacto funcional de todas as mutações de ponto encontradas utilizando o *software* público PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>). A variante p.I145L foi considerada provavelmente deletéria, enquanto a variante p.A193S foi possivelmente deletéria para a função da proteína; as demais variantes foram preditas como benignas (Tabela 9 e Figura 2).

Tabela 9- Resultados da análise *in silico* das variantes missense do gene *NPFFR1* com o uso do *software* público PolyPhen-2

<b>SNP</b>	<b>Score</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade</b>	<b>Interpretação</b>
<b>rs3812694 p.I145L</b>	0,999	14%	99%	Provavelmente deletéria
<b>rs61746115 p.A193S</b>	0,774	85%	92%	Possivelmente deletéria
<b>rs61746113 p.R196L</b>	0,169	92%	87%	Benigno
<b>rs113487866 p.R347S</b>	0,013	96%	78%	Benigno
<b>rs200382790 p.A359T</b>	0,005	97%	74%	Benigno



Figura 2- Resultados da análise *in silico* de três variantes missense do gene *NPFFR1* com o uso do *software* público PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>)

## 6. DISCUSSÃO

O controle e o funcionamento do sistema reprodutivo intrigam a comunidade científica há décadas.

O conhecimento sobre os mecanismos que desencadeiam a puberdade humana vem crescendo gradualmente. As bases genéticas e moleculares do hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático (HHI) estão sendo elucidadas à medida que novos genes são descritos e implicados no complexo processo de reativação dos neurônios secretores de GnRH após a pausa juvenil (58, 63, 64).

A puberdade precoce central (PPC), embora seja idiopática na maioria dos casos, demonstra uma prevalência de 27,5% de casos familiares, o que sugere a importância do componente genético em sua patogênese (65). Além disso, a preponderância de PPC idiopática no sexo feminino (55) sugere que o controle central que ativa a secreção de GnRH seja mais suscetível a distúrbios em meninas do que em meninos. A análise de segregação sugeriu um padrão de transmissão autossômico dominante com penetrância sexo-dependente incompleta (65).

O estudo molecular de casos de PPC tem confirmado o componente genético de sua fisiopatologia; a importância do gene da kisspeptina e de seu receptor foi estabelecida na PPC ao se identificar uma menina com mutação ativadora do gene *KISS1R* (46) e um menino com mutação ativadora do gene *KISS1* (48). Entretanto, essa é uma causa aparentemente muito rara de puberdade precoce. Recentemente por meio de sequenciamento de exoma inteiro (*whole-exome sequencing*) em 15 famílias com PPC, uma nova e importante causa genética para esta condição foi identificada: mutações inativadoras no gene *MKRN3* (*Makorin RING-finger protein-3*) (66). Na maioria dos casos, contudo, os mecanismos genéticos ainda não são conhecidos.

O caráter poligênico do controle neuroendócrino da puberdade e a baixa incidência de hipogonadismo central devido a defeitos em um único gene na população geral tem sido evidenciados mais recentemente. Esses fatores levaram Ojeda e colaboradores a propor um conceito segundo o qual

a liberação de GnRH necessite da ação de uma rede de genes interconectados, organizados em grupos hierárquicos, onde alguns genes exerçam um papel principal e outros sejam subordinados aos primeiros (67). Esse modelo de atuação de forma coordenada e interativa, conhecida como rede regulatória genômica, foi inicialmente desvendado em organismos menos complexos (equinodermos). Essa rede envolve genes que codificam fatores de transcrição e elementos *cis*-regulatórios que controlam a expressam de tais genes (68).

### 6.1. ESTUDO MOLECULAR DOS GENES *NPVF* E *NPFFR1*

O presente estudo procurou investigar o papel de um novo sistema aferente sobre os neurônios secretores de GnRH, o sistema RFRP3/GPR147, na regulação do desenvolvimento puberal e na capacidade reprodutiva de humanos. A descoberta de um sistema semelhante em aves, formado pelo hormônio inibidor das gonadotrofinas e seu receptor, GnIH/GPR147, causou grande impacto no campo da Endocrinologia aviária na década passada (24, 38). A identificação e caracterização de um sistema inibidor de gonadotrofinas no cérebro de mamíferos também tem ajudado a compreender os mecanismos regulatórios da função reprodutiva de algumas espécies (30, 69). Em humanos, a localização anatômica dos neurônios que expressam RFRP-3 e a expressão do RNAm do receptor na hipófise sugerem um papel neuroendócrino para este peptídeo (34), mas o significado funcional destes achados ainda é obscuro.

Inicialmente, algumas características de nossa amostra merecem considerações. Houve um número expressivo de sequenciamentos inválidos, os quais foram excluídos do estudo, principalmente no grupo de indivíduos com PPC. A limitação ao sequenciamento pode decorrer tanto das condições das amostras de DNA originais, quanto dos produtos de amplificação. Nesse sentido, no grupo com PPC, observou-se maior número de amostras com menores concentrações de DNA e menos puras. Como se trata de crianças, pode ter havido maior dificuldade na coleta da amostra de sangue,

eventualmente, hemólise, e volume pequeno de sangue coletado. Além disso, o tempo de armazenamento das amostras pode contribuir para algum grau de degradação do DNA. Em conjunto, esses fatores pré-analíticos podem ter comprometido a viabilidade de alguns sequenciamentos, que não puderam ser incluídos no estudo. Esses fatores não puderam ser controlados neste estudo.

A despeito disso, a amostra foi validada pela análise do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Observou-se que a maioria dos polimorfismos encontrados em todos os grupos de estudo encontravam-se em EHW, exceto pela distribuição do polimorfismo p.I145L do *NPFFR1* nos grupos controle e PPC. Esta discrepância, que ocorre com maior frequência para polimorfismos comuns, como esse, pode estar relacionada com o fato de que as amostras de PPC são procedentes do estado de SP, que concentra grande quantidade de imigrantes europeus e asiáticos, ou, mais provavelmente, pode estar relacionada ao tamanho reduzido da amostra estudada, uma vez que também foi encontrada no grupo controle. Trata-se de uma amostra de conveniência, procedente de um único serviço de atendimento, em que não foi possível ter acesso às informações sobre etnia dos indivíduos. Apesar disso, a maioria das variantes mostrou a distribuição esperada nessa população. Além disso, a prevalência de PPC na população em geral ainda não é conhecida em nosso país, o que limita a interpretação do tamanho amostral nesse grupo. Por outro lado, essa série compreende significativo número de pacientes com HHI, que é uma condição rara e cujos indivíduos já haviam sido extensivamente estudados para outros genes e nos quais não foi identificada nenhuma mutação patogênica. Sendo o HHI uma condição rara, e devido aos critérios rígidos de inclusão, nossa análise comparativa e abordagem caso-controle permite robustas conclusões. De modo semelhante, a série de PPC também foi cuidadosamente avaliada e selecionada segundo critérios bem definidos de inclusão e exclusão.

Dentre os polimorfismos encontrados na região codante do gene *NPVF*, destacamos a variante rs3216928 (c.212\_214del), que corresponde à deleção dos nucleotídeos 212, 213 e 214 do transcrito, sendo que os dois primeiros pertencem a um códon (ATT) e o outro, ao códon seguinte (AAG), o

qual codifica uma lisina, que é sítio de clivagem. Esta é uma deleção *in frame*, que resulta na perda de uma isoleucina na posição 71, adjacente a um suposto sítio de clivagem proteolítica no aminoácido básico lisina na posição 72 (p.I71\_K72) (Figura 3). Estes dois aminoácidos são altamente conservados entre as espécies, particularmente em mamíferos. Portanto, pode-se especular que este tipo de mutação dificultaria o reconhecimento do sítio de clivagem por proteases intracelulares, devido à modificação estrutural no peptídeo precursor. Entretanto, caprichosamente, com a deleção destes três nucleotídeos, o códon que se forma com os nucleotídeos remanescentes é AAG, ou seja, uma lisina. Aparentemente, o sítio de clivagem fica preservado, embora o acesso das proteases intracelulares a ele possa ser teoricamente comprometido pela perda do aminoácido adjacente. O impacto funcional dessa alteração, contudo, é desconhecido e está além do escopo desse estudo. De maneira geral, uma grande especificidade das enzimas proteolíticas por seus sítios de clivagem já está bem reconhecida. Mutações em aminoácidos que flanqueiam ou mesmo naqueles que se localizam distante de sítios de clivagem de pro-hormônios já foram relacionados a diversos processos fisiopatológicos (70, 71).

Um achado interessante é o fato de que os sujeitos que tem essa variante alélica estão menos propensos a desenvolver PPC (OR 0,33; IC 95% 0,09-0,89), o que reforça a suposição de um impacto dessa variante sobre a formação e/ou função do peptídeo maduro. Em consonância com esse achado, observou-se tendência a menor proporção dos alelos variantes em pacientes com PPC se comparado ao grupo com HHI (15% versus 5%, respectivamente;  $p=0.06$ ), além do fato de que não foi identificado nenhum paciente com PPC com genótipo homozigoto para o alelo deletado, a despeito de uma considerável frequência desse alelo na população (MAF: 13.8%). Em conjunto, essas informações corroboram a hipótese de um efeito protetor da variante *NPVF* p.I71\_K72 na ativação precoce do eixo reprodutivo.

```

MEIISKLFILLTLATSSLLTSNIFCADELVISNLHSKENYDKYSEPRGYPKGERSLNFE
ELKDWGPKNVIKMSTPAVNKMPHSFANPLRFGRNVQEERSSAGATANLPLRSGRN
MEVSLVRRVPNLPQRFGRTTTAKSVCRMLSDLCQGSMSHSPCANDLFYSMTCQHQ
EIQNPDQKSRLLFKKIDDAELKQEK

```

Figura 3 – Sequência de aminoácidos do peptídeo precursor do RFRP humano. As sequências do RFRP-1 (sublinhado) e do RFRP-3 (negrito e sublinhado) são demonstradas, com a sequência característica LFXRF (“X” sendo L ou Q) na porção C-terminal seguida pela glicina (G) como sinal de amidação e pela arginina (R) como aminoácido básico endoproteolítico. Os supostos sítios de clivagem são mostrados em cinza. A isoleucina (I) na posição 71 que é deletada devido à variante alélica c.212\_214 (rs3216928; I71\_K72) está destacada em vermelho [adaptado da referência (34)]

O mecanismo subjacente a este aparente efeito protetor da variante *NPVF* sobre o desenvolvimento de puberdade precoce é desconhecido e não foi objeto desta pesquisa. Curiosamente, nesta série, os dois únicos indivíduos que apresentavam a variante p.I71\_K72 em estado homocigoto tinham diagnóstico de HHI. Entretanto, considerando a frequência relatada deste SNP nos bancos de dados *1000genomes* e NCBI, este achado intrigante deve ser visto com cautela e à luz de nossa reduzida casuística. Cabe ressaltar que os bancos de dados supracitados não trazem informações sobre a época de puberdade da população rastreada. Estudos futuros com amostras maiores e com outros desenhos experimentais para elucidação dos processos envolvidos na clivagem do peptídeo precursor serão necessários para esclarecer esta questão.

No que se refere ao estudo molecular do gene *NPF1*, que codifica o GPR147, as variantes *missense* encontradas não estavam associadas aos fenótipos extremos de distúrbios puberais GnRH-dependentes aqui estudados. À análise *in silico* pelo software *PolyPhen 2*, a variante rs3812694 (p.I145L) foi a que apresentou maior probabilidade de ser deletéria para a funcionalidade do proteína em questão (score=0,999). Esta variante está localizada em aminoácido altamente conservado entre as espécies, contudo,

é uma variante conservativa, isto é, os aminoácidos substituídos têm polaridade semelhante, ambos são aminoácidos não polares.

A variante rs61746115 (p.A193S) teria um impacto funcional possivelmente deletério (score=0,774) para a proteína; neste caso trata-se de uma mutação não conservativa, na qual há uma diferença de polaridade entre os aminoácidos substituídos: alanina, não polar, substituída por serina, polar neutro. Ademais, esta substituição ocorre próximo de um sítio de glicosilação da cadeia peptídica (Figura 4), o qual é importante para a conformação estrutural secundária ou terciária da proteína. Contudo, as frequências genótípicas dessas variantes foram semelhantes nos dois grupos estudados e no grupo controle, o que enfraquece a hipótese de um significado funcional de tais variantes na fisiopatologia dos distúrbios puberais. As demais variantes foram consideradas benignas, isto é, sem impacto funcional pela análise *in silico*.

Esta pesquisa traz informação original sobre a distribuição de diversas variantes dos genes *NPVF* e *NPFFR1* em pacientes com distúrbios puberais GnRH-dependentes e em controles. Embora um papel funcional definido não possa ser confirmado ainda em seres humanos, os presentes achados acrescentam informação que suporta a necessidade de continuar investigando o papel destes neuropeptídeos no desenvolvimento e/ou função reprodutiva humana.

O conhecimento atual sobre a via GnIH/RFRP3 e seu receptor em diferentes espécies sugere um papel fisiológico mais relevante em animais que se reproduzem sazonalmente. Até o momento, não foi desenvolvido nenhum modelo animal experimental com função alterada desta via.

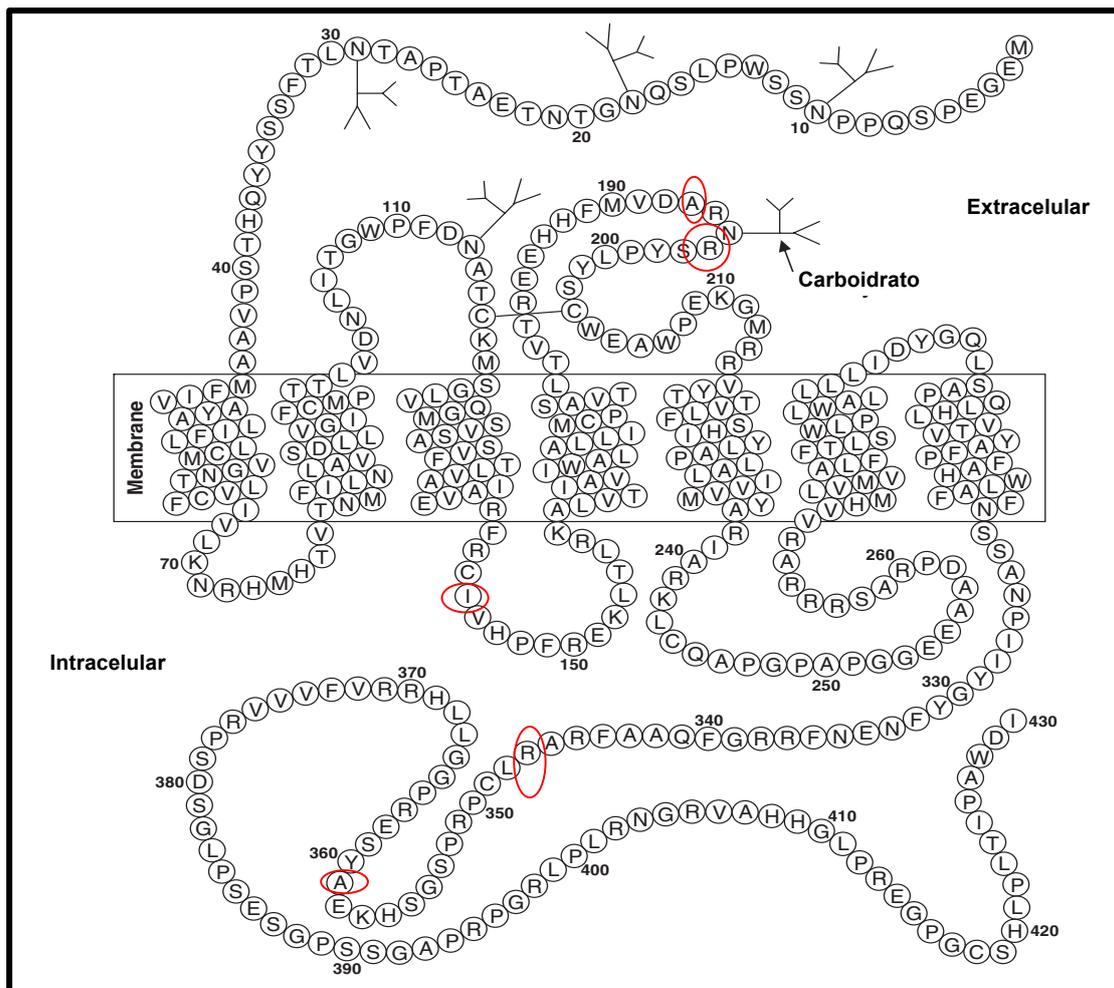


Figura 4 - Representação da estrutura secundária do receptor do RFRP humano (GPR147), com as variantes *missense* identificadas em vermelho [modificado da referência (72)]

No que se refere à sinalização celular GnIH-dependente nas células alvo, o conhecimento é também escasso. Um modelo que combina informação proveniente de pesquisas com aves (galinhas) e com mamíferos (ovelhas) sugere que após a interação com o ligante (GnIH/RFRP-3), o receptor GPR147 se acople à proteína  $G_{\alpha i}$  e iniba a adenilciclase, reduzindo o AMPc intracelular, a proteína kinase A (PKA) e a proteína ligadora do elemento responsivo ao AMPc (CRE-BP). Entretanto, alguns passos podem diferir entre as espécies (35). É interessante que estudos *in vitro* com linhagem celular de gonadotrofos de camundongo (células L $\beta$ T2) (73) e estudos *in vivo* com ratos (74) revelaram que o efeito inibitório do RFRP-3 sobre os gonadotrofos é dependente de estimulação pelo GnRH.

Os resultados desta pesquisa, somados às recentes descobertas sobre o mecanismo de sinalização celular do GnIH/RFRP-3 (75) sugerem que os genes *NPVF* e *NPFRR1* desempenhem um papel secundário na regulação da puberdade humana.

Estes resultados corroboram o conceito de rede de genes (*gene networks*) funcionalmente relacionados e hierarquicamente organizados, cuja aplicação ao controle neuroendócrino da puberdade foi proposto por Ojeda e colaboradores (67, 76). A estrutura geral da rede de genes/proteínas consiste em um núcleo central circundado por nódulos primários ou vizinhos próximos, que se conectam a nódulos secundários e estes, por sua vez, se conectam a nódulos periféricos. Depreende-se deste conceito a noção de que alguns genes tem maior importância que outros dentro de um processo biológico.

Para o controle da função reprodutiva, essencial para a perpetuação da espécie, a existência de vários genes responsáveis por uma mesma função, bem como a redundância de vias, poderia significar um mecanismo de segurança para a eventual falha de algum dos genes dentro da hierarquia.

Seja qual for o mecanismo de atuação destes genes, a condição essencial para que a puberdade seja deflagrada é o aumento da secreção de GnRH de forma pulsátil e sustentada.

A regulação transináptica excitatória da secreção de GnRH está representada por neurônios que utilizam glutamato, kisspeptina, e neuroquinina B como neurotransmissores/neuromoduladores (10, 77). Em contrapartida, as vias transinápticas inibitórias são realizadas por neurônios GABAérgicos e opiatérgicos (10) e, supostamente, pela secreção de RFRP. A importância inibitória desta via sobre a secreção de LH já foi demonstrada em espécies que se reproduzem sazonalmente, como aves (26, 78) e alguns mamíferos, sobretudo em ovelhas (32, 37). Em humanos, cuja reprodução não depende de sazonalidade, este peptídeo parece exercer um papel secundário. Seria a presença deste gene e de seu receptor no genoma humano mero resquício evolutivo? Ou o sistema RFRP/GPR147 poderia contribuir na inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal juntamente com os outros neurotransmissores inibitórios na determinação da pausa juvenil? Esta hipótese já vem sendo investigada por alguns grupos em aves (27) e em

mamíferos (79). Seria interessante o desenvolvimento de modelos animais para esclarecer estas lacunas.

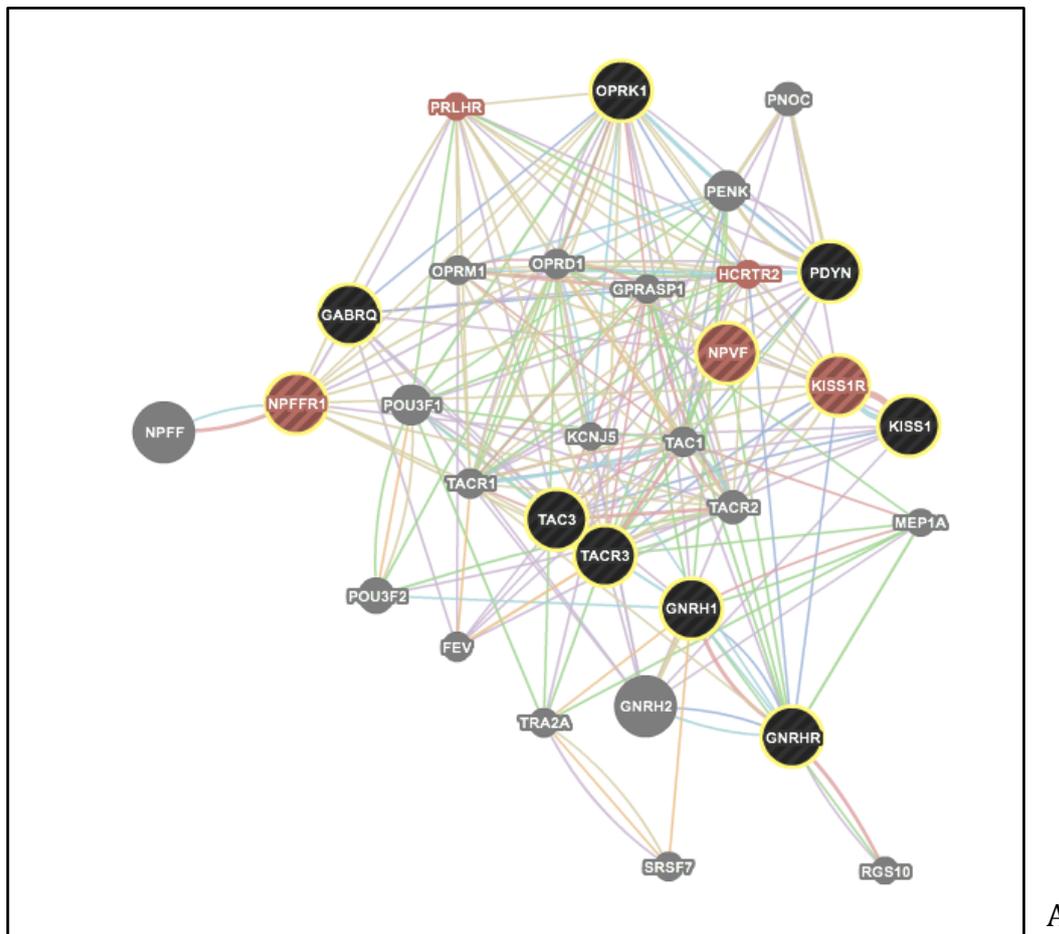
Além da integração das vias trans-sinápticas sobre a secreção de GnRH, as células gliais interagem com os neurônios secretores de GnRH através da produção de fatores de crescimento e de moléculas de adesão (80, 81). Genes que codificam tais moléculas podem estar envolvidos na patogênese de distúrbios puberais. Some-se a esses genes aqueles envolvidos no controle da função astrogliar, como o gene que codifica receptores erbB (membro da família EGFR – *Epidermal growth factor receptor*) ou fatores de transcrição, como os genes OCT2 (*octamer transcription factor2*), TTF1 (*Thyroid Transcription Factor1*) e EAP1 (*enhanced at puberty1*), além de outros genes envolvidos em processos celulares básicos (76).

Dessa forma, genes aparentemente sem correlação com o controle neuroendócrino da puberdade podem constituir o núcleo da rede funcional de genes (*gene network*). De fato, o próprio gene *KISS1*, era anteriormente conhecido como um gene supressor de metástases. Corroborando essas observações, o gene *MKRN3*, que codifica a *makorin RING-finger protein 3*, foi recentemente implicado como fator causal de puberdade precoce central em um estudo de *whole-genome sequencing* envolvendo 40 membros de 15 famílias com este distúrbio puberal (66). Pouco se sabe sobre este gene, cuja proteína está envolvida em processos de ubiquitinação e sinalização celular (66), tampouco sobre o mecanismo pelo qual mutações no mesmo podem resultar em puberdade central. Trata-se de um gene que sofre naturalmente *imprinting* materno, portanto, resultando em fenótipo de PPC apenas quando a mutação é transmitida pelo pai.

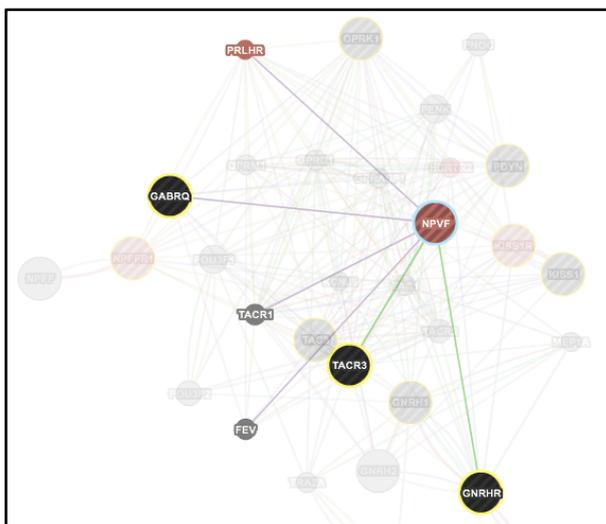
Novas ferramentas de genética molecular, como estudos de associação de genoma inteiro (GWAS; *genome-wide association studies*) e sequenciamentos genômicos amplos, com maior número de casos, incluindo os aparentemente esporádicos, podem ajudar a delinear a rede funcional de genes envolvidos na regulação neuroendócrina da puberdade.

Atualmente, também estão disponíveis *softwares* capazes de fazer a análise de conectividade dos genes, como *GeneMANIA* e *Cytoscape* (60, 61). Utilizando estes softwares, foi feita uma análise preliminar da rede de genes

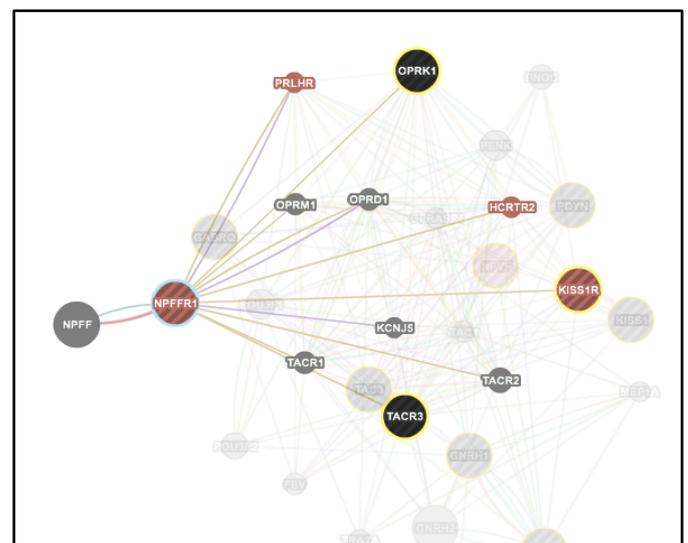
conectados aos genes *NPVF* e *NPFFR1*, relacionando os mesmos a diversos outros genes sabidamente implicados no processo puberal humano. O resultado é uma intrincada rede de genes, alguns com função desconhecida, que podem interagir por diferentes vias. A análise aprofundada destes resultados vai além do objetivo desta pesquisa, mas uma das simulações é apresentada na figura 4, na qual as relações diretas do *NPVF* e *NPFFR1* apresentam-se intimamente relacionadas a vários genes sabidamente envolvidos no controle do desenvolvimento puberal, tais como, *GnRH*, *GnRHR*, *KISS1*, *GPR54*, *TAC3*, *TACR3*, dentre outros. Destaca-se ainda a relação em alto grau (primeiro vizinho) do gene *NPVF* com o gene que codifica o receptor do GABA (ácido gama-amino-butírico), um neurotransmissor sabidamente inibitório da atividade dos neurônios de GnRH.



A



B



C

Figura 5 – A. Simulação *in silico* de uma rede de genes conectados aos genes *NPVF* e *NPFFR1* utilizando o software GeneMANIA. B. Em destaque os genes primeiros vizinhos do gene *NPVF*. C. Em destaque os genes primeiros vizinhos do gene *NPFFR1*.

Além desta complexa rede funcional de genes, sabe-se hoje da importância de mecanismos epigenéticos sobre a expressão de diversos genes. Modificações químicas do DNA ou das histonas influenciam grandemente a estrutura da cromatina e a expressão gênica. Há poucos estudos sobre a contribuição da epigenética no processo puberal, mas recentemente Lomiczi e colaboradores identificaram um grupo de silenciadores transcricionais operando no hipotálamo de ratos, que influenciam a época da puberdade da fêmea. O aumento puberal da expressão do gene *KISS1* é acompanhado de aquisição de modificações epigenéticas, tais como demetilação do DNA, recrutamento de histonas ativadoras e perda de histonas repressivas (82).

## 6.2. CONSIDERAÇÕES SOBRE GNIH/RFRP NA REPRODUÇÃO SAZONAL DE AVES E OVELHAS

As aves têm ciclo reprodutivo sazonal, de modo a procriar sob condições ambientais mais favoráveis para a sobrevivência dos filhotes. A variação sazonal na duração do dia, isto é, a fotoperiodicidade, é importante para o ajuste do momento adequado para a reprodução de aves isso é mais marcante em aves que vivem em latitudes médias e altas. A luz pode afetar o comportamento e a fisiologia das aves através dos olhos, da glândula pineal e de fotorreceptores extrarretinianos no hipotálamo, os quais se comunicam via melatonina (83).

Em mamíferos fotoperiódicos já se conhecia a importância das variações no ciclo anual da secreção noturna de melatonina para controlar o período reprodutivo. Entretanto, em aves, havia um dogma segundo o qual a secreção de melatonina não seria responsável por coordenar seus processos reprodutivos (84, 85). Apesar disto, surgiram evidências para contrariar este dogma (86), as quais, somadas aos efeitos inibitórios do GnIH sobre a secreção de gonadotrofinas, motivaram a investigação de uma possível conexão entre melatonina, GnIH e a sazonalidade reprodutiva das aves.

Ubuka e colaboradores descreveram, em 2005, a relação da melatonina com a expressão de GnIH no cérebro de codornas. Demonstrou-se que a melatonina é um potente indutor da expressão de GnIH, cujos neurônios expressam receptores de melatonina do subtipo Mel<sub>1c</sub>. A ação inibitória do GnIH sobre a secreção de gonadotrofinas seria uma das causas da regressão gonadal que ocorre em aves durante períodos de dias mais curtos (SD; *short day photoperiods*), nos quais há uma maior secreção de melatonina. Estes achados abriram uma nova perspectiva de estudo do ciclo reprodutivo aviário (27).

Posteriormente foi demonstrado que, além de induzir a expressão gênica de GnIH, a melatonina estimula a secreção deste peptídeo, inibindo as concentrações plasmáticas de LH na codorna (87).

O conhecimento atual indica que, além da melatonina, outros sistemas hormonais e neuronais interagem para a regulação da secreção de gonadotrofinas em aves com reprodução sazonal. Os hormônios tireoidianos e os esteroides sexuais também regulam a expressão de GnRH e de seu receptor em aves, por mecanismos ainda não totalmente esclarecidos (83).

Aves apresentam duas formas de GnRH: GnRH-I, que difere do GnRH de mamíferos apenas por um aminoácido arginina na posição 8, e GnRH-II, com aminoácidos diferentes nas posições 5, 7 e 8; as duas formas apresentam distribuição e função diversas no hipotálamo das aves (88, 89). À luz do conhecimento atual, acredita-se que o GnRH-1 seja o regulador dominante da liberação de gonadotrofinas, ativando a reprodução, enquanto o GnRH-II estaria relacionado ao comportamento reprodutivo das aves. Ambas as formas são inibidas pelo GnIH (83).

De fato, diversos artigos ratificam a importância do sistema GnIH/GPR147 na fisiologia reprodutiva das aves. Talvez isto esteja relacionado à ausência dos genes da kisspeptina e de seu receptor, GPR54, nos genomas aviários até o momento analisados (90). Recentemente, foi comparada a prevalência dos neuropeptídeos reprodutivos codificados pelo genoma de galinhas com o que se conhece de outros vertebrados, principalmente mamíferos. Sugere-se que, enquanto as aves retiveram o sistema GnIH/GPR147 funcionando, os mamíferos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, um sistema estimulador dos neurônios secretores de

GnRH através dos neurônios KNDy (91). Estes compreendem uma subpopulação de neurônios do núcleo arqueado do hipotálamo que colocam três neuropeptídeos, kisspeptina (K), neurokinina B (N) e dinorfina (Dy) e que parecem exercer um papel essencial na regulação fisiológica dos neurônios GnRH, intermediando o feedback dos esteroides sexuais (77). O genoma de galinhas não apresenta os genes da kisspeptina e de seu receptor, *KISS1*, *Kiss2*, *Gpr54-1*, *Gpr54-2*; sequências que codificam a dinorfina e seu receptor (genes *Pdyn* e *Kor*, respectivamente), e que codificam a neurokinina e seu receptor (*Tac3* e *Tac3R*, respectivamente) estão presentes, mas o papel funcional desses genes permanece desconhecido em aves (91).

Em mamíferos, como já foi dito, já se conhecia a importância da secreção noturna de melatonina na regulação do ciclo reprodutor, mas por mecanismos ainda obscuros (92). Em 2008, foi demonstrado, em hamsters sírios, que o gene que codifica o RFRP é regulado por fotoperíodo, via melatonina, mas os resultados mostraram-se conflitantes quando comparado a ovinos (93).

Grande parte do conhecimento sobre a fisiologia do RFRP em mamíferos vem de estudos com ovinos, que têm reprodução sazonal, estando sexualmente ativos durante fotoperíodos de dias curtos (*short-day breeders*). Nessa espécie há maior expressão do gene que codifica o RFRP e maior conexão entre os neurônios secretores de GnRH e RFRP na estação não reprodutiva; essas alterações sazonais ocorrem de forma reciprocamente oposta ao gene da kisspeptina (32). Há cada vez mais evidências, em ovinos, de que o RFRP e a kisspeptina são neuro-hormônios importantes na alternância de períodos reprodutivos e não reprodutivos, atuando em direções opostas, ou seja, a kisspeptina estimulando a secreção de GnRH e gonadotrofinas e o RFRP inibindo (31, 37, 47).

O grande conjunto de informações disponíveis atualmente apontam para um componente evolutivo bastante evidente nas funções do sistema RFRP/GPR147 entre as diferentes espécies. Esses achados e o papel já tão bem documentado e significativo desse sistema no controle inibitório da reprodução em vários mamíferos motivou a realização desse estudo.

No presente estudo, a ausência de mutações patogênicas dos genes *NPVF* e *NPFFR1* sugere que em seres humanos, tal qual outras espécies que não têm reprodução sazonal, o papel destes genes seria secundário. Após a puberdade, essas espécies, incluindo a espécie humana, estão sempre aptas a reproduzir. Não se justificaria, portanto, a persistência de um sistema inibidor do GnRH e das gonadotrofinas funcionante. Por outro lado, o sistema estimulador, através dos neurônios KNDy adquire maior importância, como se pode atestar por distúrbios puberais em humanos com mutações nos genes da kisspeptina, neurokinina B e seus respectivos receptores (43, 44, 46, 48, 94).

Nota-se na literatura uma escassez de trabalhos envolvendo mamíferos com reprodução não sazonal para que se possa corroborar essa hipótese.

### 6.3. LIMITAÇÕES TÉCNICAS DO ESTUDO

A utilização da reação de polimerização em cadeia (PCR) seguida de sequenciamento pelo método de Sanger para rastreamento mutacional em duas populações distintas, relativamente grandes, considerando a prevalência do HHI e da PPC, constitui método de custo elevado, e que muitas vezes requer repetições de reações e confirmações. Considerando o número inicial de pacientes e controles, e o número de exons e produtos de PCR obtidos (no mínimo 9 reações por sujeito do estudo, totalizando pelo menos 1629 sequenciamentos), o custo do estudo foi um fator limitante à sua realização integralmente. Houve alguma dificuldade no ajuste dos parâmetros de PCR para cada gene e na eficiência do *kit* de insumos para PCR utilizado na fase inicial do estudo, o que implicou na necessidade de várias repetições de experimentos até que fossem obtidos resultados absolutamente confiáveis. Isso consumiu tempo e material, inclusive DNA, que em alguns casos não pôde ser repostado, resultando em impossibilidade de avaliar todos os exons de todos os pacientes.

Após a substituição dos kits de PCR e maior treinamento do grupo de colaboradores que trabalharam em conjunto nos experimentos, verificou-se maior rapidez e eficiência na padronização das reações, com resultante melhor qualidade nos sequenciamentos e menor número de repetições. Embora o novo material fosse significativamente mais caro, sua eficiência nitidamente superior compensou o custo. Esse fato, aliado a problemas em equipamentos (termocicladores) e outras limitações de infraestrutura do laboratório contribuíram para um alto custo do estudo, que sofreu limitações orçamentárias como, por exemplo, para a análise de todas as variantes no grupo controle e com maior número de indivíduos, como inicialmente planejado.

Além disso, a reduzida disponibilidade de sequenciadores acessíveis ao projeto, o alto custo do sequenciamento em nossa cidade e a demora na obtenção dos resultados tornaram necessária a contratação de serviço de sequenciamento privado, internacional, o que também contribuiu para a restrição orçamentária. Apesar disso, é importante ressaltar a importância do estudo ter sido contemplado com financiamento do CNPq, edital Universal, 2011/2013, com o montante de R\$20.000,00, o qual, embora insuficiente, possibilitou a obtenção e submissão para publicação dos resultados originais aqui descritos.

A PCR gene a gene sempre terá seu valor como ferramenta básica de biologia molecular, sobretudo na confirmação de variantes identificadas em sequenciamento de genoma inteiro (*whole-genome sequencing*) ou de exoma inteiro (*whole-exome sequencing*). Estas técnicas mais robustas deverão ser utilizadas com maior frequência para rastreamento populacional, em casos familiares e esporádicos, e espera-se que as mesmas estejam mais amplamente disponíveis em nosso país em breve.

## 7.CONCLUSÕES

- Foi identificada uma variante alélica no exon 2 do gene *NPVF*, que corresponde à deleção dos nucleotídeos 212, 213 e 214 do transcrito (c.212\_214del) e que leva à perda de uma isoleucina na posição 71 do peptídeo precursor (p.I71\_K72), adjacente a um sítio de clivagem. Essa variante aparenta ter efeito protetor sobre a ativação precoce do eixo reprodutivo (OR 0,33; IC 95% 0,09-089).

- Foram identificados cinco polimorfismos *missense* do gene *NPFFR1* sem associação com fenótipos extremos de distúrbios puberais GnRH-dependentes.

- Não foram identificadas mutações patogênicas nos genes *NPVF* e *NPFFR1*, que codificam respectivamente o peptídeo precursor RFRP e seu receptor GPR147, nesta série de indivíduos portadores de puberdade precoce central e de hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico.

Em conjunto, esses achados apontam para um papel secundário, modulador do sistema RFRP/GPR147 na fisiopatogenia dos distúrbios puberais em seres humanos. Além disso, um efeito da variante p.I71\_K72 do gene *NPVF* no controle negativo da ativação do eixo gonadotrófico em humanos é proposto, porém estudos funcionais futuros são necessários para sua comprovação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Low, MJ. Neuroendocrinology. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM, editors. Williams Textbook of Endocrinology. 12th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 149-157.
2. Baba Y, Matsuo H, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. II. Confirmation of the proposed structure by conventional sequential analyses. *Biochem Biophys Res Commun*1971 Jul 16;44(2):459-63.
3. Matsuo H, Baba Y, Nair RM, Arimura A, Schally AV. Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*1971 Jun 18;43(6):1334-9.
4. Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, et al. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A*1972 Jan;69(1):278-82.
5. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*1989 Mar 9;338(6211):161-4.
6. Ronnekleiv OK, Resko JA. Ontogeny of gonadotropin-releasing hormone-containing neurons in early fetal development of rhesus macaques. *Endocrinology*1990 Jan;126(1):498-511.
7. Lopez FJ, Merchenthaler IJ, Moretto M, Negro-Vilar A. Modulating mechanisms of neuroendocrine cell activity: the LHRH pulse generator. *Cell Mol Neurobiol*1998 Feb;18(1):125-46.
8. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, et al. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science*1971 Sep 10;173(4001):1036-8.
9. Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, et al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology*1981 Aug;109(2):376-85.

10. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*2001 Feb;22(1):111-51.
11. Shivers BD, Harlan RE, Morrell JI, Pfaff DW. Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones. *Nature*1983 Jul 28-Aug 3;304(5924):345-7.
12. Herbison AE. Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev*1998 Jun;19(3):302-30.
13. Skinner DC, Caraty A, Allingham R. Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no colocalization with gonadotropin-releasing neurons. *Endocrinology*2001 Feb;142(2):573-9.
14. Huang X, Harlan RE. Absence of androgen receptors in LHRH immunoreactive neurons. *Brain Res*1993 Oct 8;624(1-2):309-11.
15. Price DA, Greenberg MJ. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. *Science*1977 Aug 12;197(4304):670-1.
16. Dockray GJ, Reeve JR, Jr., Shively J, Gayton RJ, Barnard CS. A novel active pentapeptide from chicken brain identified by antibodies to FMRFamide. *Nature*1983 Sep 22-28;305(5932):328-30.
17. Yang HY, Fratta W, Majane EA, Costa E. Isolation, sequencing, synthesis, and pharmacological characterization of two brain neuropeptides that modulate the action of morphine. *Proc Natl Acad Sci U S A*1985 Nov;82(22):7757-61.
18. Perry SJ, Yi-Kung Huang E, Cronk D, Bagust J, Sharma R, Walker RJ, et al. A human gene encoding morphine modulating peptides related to NPFF and FMRFamide. *FEBS Lett*1997 Jun 16;409(3):426-30.
19. Hinuma S, Shintani Y, Fukusumi S, Iijima N, Matsumoto Y, Hosoya M, et al. New neuropeptides containing carboxy-terminal RFamide and their receptor in mammals. *Nat Cell Biol*2000 Oct;2(10):703-8.
20. Bonini JA, Jones KA, Adham N, Forray C, Artymyshyn R, Durkin MM, et al. Identification and characterization of two G protein-coupled receptors for neuropeptide FF. *J Biol Chem*2000 Dec 15;275(50):39324-31.
21. Elshourbagy NA, Ames RS, Fitzgerald LR, Foley JJ, Chambers JK, Szekeres PG, et al. Receptor for the pain modulatory neuropeptides FF and AF is an orphan G protein-coupled receptor. *J Biol Chem*2000 Aug 25;275(34):25965-71.

22. Yoshida H, Habata Y, Hosoya M, Kawamata Y, Kitada C, Hinuma S. Molecular properties of endogenous RFamide-related peptide-3 and its interaction with receptors. *Biochim Biophys Acta* 2003 Feb 17;1593(2-3):151-7.
23. Fukusumi S, Fujii R, Hinuma S. Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP. *Peptides* 2006 May;27(5):1073-86.
24. Tsutsui K, Saigoh E, Ukena K, Teranishi H, Fujisawa Y, Kikuchi M, et al. A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem Biophys Res Commun* 2000 Aug 28;275(2):661-7.
25. Satake H, Hisada M, Kawada T, Minakata H, Ukena K, Tsutsui K. Characterization of a cDNA encoding a novel avian hypothalamic neuropeptide exerting an inhibitory effect on gonadotropin release. *Biochem J* 2001 Mar 1;354(Pt 2):379-85.
26. Bentley GE, Perfito N, Ukena K, Tsutsui K, Wingfield JC. Gonadotropin-inhibitory peptide in song sparrows (*Melospiza melodia*) in different reproductive conditions, and in house sparrows (*Passer domesticus*) relative to chicken-gonadotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 2003 Aug;15(8):794-802.
27. Ubuka T, Bentley GE, Ukena K, Wingfield JC, Tsutsui K. Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Feb 22;102(8):3052-7.
28. Ikemoto T, Park MK. Chicken RFamide-related peptide (GnIH) and two distinct receptor subtypes: identification, molecular characterization, and evolutionary considerations. *J Reprod Dev* 2005 Jun;51(3):359-77.
29. Yin H, Ukena K, Ubuka T, Tsutsui K. A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J Endocrinol* 2005 Jan;184(1):257-66.
30. Kriegsfeld LJ, Mei DF, Bentley GE, Ubuka T, Mason AO, Inoue K, et al. Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Feb 14;103(7):2410-5.
31. Clarke IJ, Sari IP, Qi Y, Smith JT, Parkington HC, Ubuka T, et al. Potent action of RFamide-related peptide-3 on pituitary gonadotropes

indicative of a hypophysiotropic role in the negative regulation of gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2008 Nov;149(11):5811-21.

32. Smith JT, Coolen LM, Kriegsfeld LJ, Sari IP, Jaafarzadehshirazi MR, Maltby M, et al. Variation in kisspeptin and RFamide-related peptide (RFRP) expression and terminal connections to gonadotropin-releasing hormone neurons in the brain: a novel medium for seasonal breeding in the sheep. *Endocrinology* 2008 Nov;149(11):5770-82.

33. Ubuka T, Lai H, Kitani M, Suzuuchi A, Pham V, Cadigan PA, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone identification, cDNA cloning, and distribution in rhesus macaque brain. *J Comp Neurol* 2009 Dec 20;517(6):841-55.

34. Ubuka T, Morgan K, Pawson AJ, Osugi T, Chowdhury VS, Minakata H, et al. Identification of human GnIH homologs, RFRP-1 and RFRP-3, and the cognate receptor, GPR147 in the human hypothalamic pituitary axis. *PLoS One* 2009;4(12):e8400.

35. Tsutsui K, Bentley GE, Bedecarrats G, Osugi T, Ubuka T, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) and its control of central and peripheral reproductive function. *Front Neuroendocrinol* Jul;31(3):284-95.

36. Clarke IJ, Cummins JT. The temporal relationship between gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion in ovariectomized ewes. *Endocrinology* 1982 Nov;111(5):1737-9.

37. Smith JT, Young IR, Veldhuis JD, Clarke IJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH) secretion into the ovine hypophyseal portal system. *Endocrinology* Jul;153(7):3368-75.

38. Tsutsui K, Ubuka T, Bentley GE, Kriegsfeld LJ. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH): discovery, progress and prospect. *Gen Comp Endocrinol* Jul 1;177(3):305-14.

39. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 1996 Dec 4;88(23):1731-7.

40. Kotani M, Detheux M, Vandenberghe A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001 Sep 14;276(37):34631-6.

41. Clements MK, McDonald TP, Wang R, Xie G, O'Dowd BF, George SR, et al. FMRamide-related neuropeptides are agonists of the orphan G-protein-coupled receptor GPR54. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Jun 29;284(5):1189-93.
42. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001 May 31;411(6837):613-7.
43. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Sep 16;100(19):10972-6.
44. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003 Oct 23;349(17):1614-27.
45. Messenger S, Chatzidaki EE, Ma D, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, et al. Kisspeptin directly stimulates gonadotropin-releasing hormone release via G protein-coupled receptor 54. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 Feb 1;102(5):1761-6.
46. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 2008 Feb 14;358(7):709-15.
47. Smith JT, Li Q, Yap KS, Shahab M, Roseweir AK, Millar RP, et al. Kisspeptin is essential for the full preovulatory LH surge and stimulates GnRH release from the isolated ovine median eminence. *Endocrinology* Mar;152(3):1001-12.
48. 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* May;95(5):2276-80.
49. Messenger S. Kisspeptin and its receptor: new gatekeepers of puberty. *J Neuroendocrinol* 2005 Oct;17(10):687-8.
50. Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009 Oct;30(6):713-43.
51. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 2002;57 Suppl 2:2-14.

52. Clarke IJ. Control of GnRH secretion: one step back. *Front Neuroendocrinol* Aug;32(3):367-75.
53. Sorensen K, Mouritsen A, Aksglaede L, Hagen CP, Mogensen SS, Juul A. Recent secular trends in pubertal timing: implications for evaluation and diagnosis of precocious puberty. *Horm Res Paediatr*;77(3):137-45.
54. Carel JC, Leger J. Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med* 2008 May 29;358(22):2366-77.
55. 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.
56. Harrington J, Palmert MR. Clinical review: Distinguishing constitutional delay of growth and puberty from isolated hypogonadotropic hypogonadism: critical appraisal of available diagnostic tests. *J Clin Endocrinol Metab* Sep;97(9):3056-67.
57. Palmert MR, Dunkel L. Clinical practice. Delayed puberty. *N Engl J Med* Feb 2;366(5):443-53.
58. Silveira LF, Latronico AC. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* May;98(5):1781-8.
59. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988 Feb 11;16(3):1215.
60. Warde-Farley D, Donaldson SL, Comes O, Zuberi K, Badrawi R, Chao P, et al. The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization and predicting gene function. *Nucleic Acids Res* Jul;38(Web Server issue):W214-20.
61. Montojo J, Zuberi K, Rodriguez H, Kazi F, Wright G, Donaldson SL, et al. GeneMANIA Cytoscape plugin: fast gene function predictions on the desktop. *Bioinformatics* Nov 15;26(22):2927-8.
62. Ryckman K, Williams SM. Calculation and use of the Hardy-Weinberg model in association studies. *Curr Protoc Hum Genet* 2008 Apr;Chapter 1:Unit 1 18.
63. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* 2009 Oct;5(10):569-76.

64. Silveira LF, Trarbach EB, Latronico AC. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Mol Cell Endocrinol* Aug 5;324(1-2):30-8.
65. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab* 2004 Apr;89(4):1794-800.
66. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med* Jun 27;368(26):2467-75.
67. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, et al. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology* 2006 Mar;147(3):1166-74.
68. Davidson EH, Rast JP, Oliveri P, Ransick A, Caletani C, Yuh CH, et al. A genomic regulatory network for development. *Science* 2002 Mar 1;295(5560):1669-78.
69. Smith JT, Clarke IJ. Gonadotropin inhibitory hormone function in mammals. *Trends Endocrinol Metab* Apr;21(4):255-60.
70. Scamuffa N, Calvo F, Chretien M, Seidah NG, Khatib AM. Proprotein convertases: lessons from knockouts. *FASEB J* 2006 Oct;20(12):1954-63.
71. Chen Y, Molloy SS, Thomas L, Gambie J, Bachinger HP, Ferguson B, et al. Mutations within a furin consensus sequence block proteolytic release of ectodysplasin-A and cause X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jun 19;98(13):7218-23.
72. Ubuka T, Son YL, Tobar Y, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone action in the brain and pituitary. *Front Endocrinol (Lausanne)*;3:148.
73. Son YL, Ubuka T, Millar RP, Kanasaki H, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone inhibits GnRH-induced gonadotropin subunit gene transcriptions by inhibiting AC/cAMP/PKA-dependent ERK pathway in LbetaT2 cells. *Endocrinology* May;153(5):2332-43.
74. Rizwan MZ, Poling MC, Corr M, Cornes PA, Augustine RA, Quennell JH, et al. RFamide-related peptide-3 receptor gene expression in GnRH and kisspeptin neurons and GnRH-dependent mechanism of action. *Endocrinology* Aug;153(8):3770-9.

75. Ubuka T, Son YL, Bentley GE, Millar RP, Tsutsui K. Gonadotropin-inhibitory hormone (GnIH), GnIH receptor and cell signaling. *Gen Comp Endocrinol* Sep 1;190:10-7.
76. Ojeda SR, Dubay C, Lomniczi A, Kaidar G, Matagne V, Sandau US, et al. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty. *Mol Cell Endocrinol* Aug 5;324(1-2):3-11.
77. Lehman MN, Coolen LM, Goodman RL. Minireview: kisspeptin/neurokinin B/dynorphin (KNDy) cells of the arcuate nucleus: a central node in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* Aug;151(8):3479-89.
78. Ubuka T, Kim S, Huang YC, Reid J, Jiang J, Osugi T, et al. Gonadotropin-inhibitory hormone neurons interact directly with gonadotropin-releasing hormone-I and -II neurons in European starling brain. *Endocrinology* 2008 Jan;149(1):268-78.
79. Poling MC, Kim J, Dhamija S, Kauffman AS. Development, sex steroid regulation, and phenotypic characterization of RFamide-related peptide (Rfrp) gene expression and RFamide receptors in the mouse hypothalamus. *Endocrinology* Apr;153(4):1827-40.
80. Ojeda SR, Lomniczi A, Sandau U. Contribution of glial-neuronal interactions to the neuroendocrine control of female puberty. *Eur J Neurosci* Dec;32(12):2003-10.
81. Ojeda SR, Prevot V, Heger S, Lomniczi A, Dziedzic B, Mungenast A. Glia-to-neuron signaling and the neuroendocrine control of female puberty. *Ann Med* 2003;35(4):244-55.
82. Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, et al. Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci* Mar;16(3):281-9.
83. Ubuka T, Bentley GE, Tsutsui K. Neuroendocrine regulation of gonadotropin secretion in seasonally breeding birds. *Front Neurosci*;7:38.
84. Juss TS, Meddle SL, Servant RS, King VM. Melatonin and photoperiodic time measurement in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Proc Biol Sci* 1993 Oct 22;254(1339):21-8.
85. Bentley GE. Unraveling the enigma: the role of melatonin in seasonal processes in birds. *Microsc Res Tech* 2001 Apr 1;53(1):63-71.

86. Rozenboim I, Aharony T, Yahav S. The effect of melatonin administration on circulating plasma luteinizing hormone concentration in castrated White Leghorn roosters. *Poult Sci*2002 Sep;81(9):1354-9.
87. Chowdhury VS, Yamamoto K, Ubuka T, Bentley GE, Hattori A, Tsutsui K. Melatonin stimulates the release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus. *Endocrinology* Jan;151(1):271-80.
88. King JA, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. II. Isolation and characterization. *J Biol Chem*1982 Sep 25;257(18):10729-32.
89. King JA, Millar RP. Structure of chicken hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone. I. Structural determination on partially purified material. *J Biol Chem*1982 Sep 25;257(18):10722-8.
90. Um HN, Han JM, Hwang JI, Hong SI, Vaudry H, Seong JY. Molecular coevolution of kisspeptins and their receptors from fish to mammals. *Ann N Y Acad Sci* Jul;1200:67-74.
91. Joseph NT, Tello JA, Bedecarrats GY, Millar RP. Reproductive neuropeptides: Prevalence of GnRH and KNDy neural signalling components in a model avian, *Gallus gallus*. *Gen Comp Endocrinol*2013 Sep 1;190:134-43.
92. Goldman BD. Mammalian photoperiodic system: formal properties and neuroendocrine mechanisms of photoperiodic time measurement. *J Biol Rhythms*2001 Aug;16(4):283-301.
93. Revel FG, Saboureau M, Pevet P, Simonneaux V, Mikkelsen JD. RFamide-related peptide gene is a melatonin-driven photoperiodic gene. *Endocrinology*2008 Mar;149(3):902-12.
94. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol* Dec;56(9):646-52.

**APÊNDICE A - TABELAS DAS RAZÕES DE PROBABILIDADE E  
RESPECTIVOS INTERVALOS DE CONFIANÇA 95%**

Tabela A1- Distribuição comparativa da frequência alélica da deleção *NPVF* c.212\_214 (p.I71\_K72) em pacientes com HHI and PPC e da frequência alélica menor (MAF) disponível no banco de dados NCBI, com as razões de probabilidade e respectivos intervalos de confiança 95%

<b>Alelos</b>	<b>HHI n (%)</b>	<b>MAF n (%)</b>	<b>Odds ratios<sup>b</sup></b>	<b>IC 95%</b>
<b>TAA</b>	68 (85%)	1868 (86,2%)		
-	12 (15%)	299 (13,8%)	1,11	(0,54 – 2,08)
	<b>PPC n (%)</b>	<b>MAF n (%)</b>	<b>Odds ratios<sup>b</sup></b>	<b>IC 95%</b>
<b>TAA</b>	76 (95%)	1868 (86,2%)		
-	4 (5%)	299 (13,8%)	0,33	(0,09 – 0,89) *
	<b>HHI n (%)</b>	<b>PPC n (%)</b>	<b>p<sup>c</sup></b>	
<b>TAA</b>	68 (85%)	76 (95%)	0,06	
-	12 (15%)	4 (5%)		

\* n= número de alelos analisados (sequências de alta qualidade)

<sup>a</sup> Identificação dos polimorfismos do gene *NPVF* de acordo com os bancos de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), baseado em população global padrão do projeto 1000Genome fase 1, liberado em maio 2011

<sup>b</sup> Razões de probabilidade (*odds ratio*) e respectivos intervalos de confiança 95% estimados por análise de regressão logística

<sup>c</sup> valor *p* calculado usando o teste exato de Fisher (*two-sided*); significância estatística foi estabelecida para  $p < 0,05$

Tabela A2. Razões de probabilidades (*odds ratio*) e respectivos intervalos de confiança 95% para os polimorfismos do gene *NPFFR1*

<b>Identificação do polimorfismo</b>	<b>OR-1 (IC 95%)<sup>a</sup></b>	<b>OR-2 (IC 95%)<sup>b</sup></b>
<b>rs3812694</b>		
<b>p.I145L</b>		
A		
C		
AA	0,64 (0,23- 1,49)	1,08 (0,59-1,85)
AC		
CC		
<b>rs61746115</b>		
<b>p.A193S</b>		
G		
T		
GG	1,14 (0,03-7,25)	3,73 (0,91-11,38)
GT		
TT		
<b>rs61746113</b>		
<b>p.R196L</b>		
G		
T		
GG	0,18 (0,02-0,74)	0,13 (0,02-0,56)
GT		
TT		
<b>rs113487866</b>		
<b>p.R347S</b>		
C		
A		
CC		
CA	0,0 (0,00-1,36)	0,33 (0,008-1,95)
AA		
<b>rs200382790</b>		
<b>p.A359T</b>		
G		
A		
GG	NA	NA
GA		
AA		

<sup>a</sup> Razões de probabilidade (*odds ratio*) e respectivos intervalos de confiança 95% estimados por análise de regressão logística.

<sup>a</sup> OR-1: HHI *versus* controles (MAF data); <sup>b</sup> OR-2: PPC *versus* controles (MAF data).

**ANEXO A - CARTA DE COLABORAÇÃO ENTRE HC-FMUSP E HUB-UNB**

São Paulo, 14 de fevereiro de 2011

Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

Faculdade de Medicina

Universidade de Brasília

SHIN - QI 12 - conjunto 02 - casa 16

CEP 71525-220

Brasília-DF

Informo meu grande interesse científico em colaborar com o projeto de pesquisa intitulado: “Estudo dos genes do GnIH e seu receptor (GPR147) em indivíduos portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico e puberdade precoce central”, sob a coordenação da médica investigadora Dra. Adriana Lofrano Alves Porto. Nesse interessante e relevante projeto o meu grupo de pesquisa participará com fornecimento dos dados clínicos e hormonais, assim como amostras de DNA extraído de sangue periférico, de pacientes com distúrbios do desenvolvimento puberal central de origem idiopática, incluindo hipogonadismo e precocidade sexual, com o intuito de investigar potenciais variantes gênicas.

Agradeço a oportunidade de participar desse valioso projeto de pesquisa que trará certamente novos achados moleculares e uma importante contribuição na elucidação da etiologia dos distúrbios puberais em humanos.

Atenciosamente,



Ana Claudia Latronico, M.D.

Professora Associada

Departamento de Clínica Médica - Endocrinologia e Metabologia

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Telefones: 55 11 30697512, FAX: 55 11 30697519

E-mail: [anacl@usp.br](mailto:anacl@usp.br)

**ANEXO B – APROVAÇÃO DA CASUÍSTICA UTILIZADA PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA DO HC-FMUSP**

## ***APROVAÇÃO***

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 13.04.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **020/05**, intitulado: "Estudo do Gene *GPR54* nos Distúrbios Puberais Humanos Idiopáticos" apresentado pelo Departamento de **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Ana Cláudia Latrônico**

Pesquisador(a) Executante: **Dra. Milena Gurgel Teles Bezerra**

CAPPesq, 13 de Abril de 2005.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

## ANEXO B – APROVAÇÃO DA CASUÍSTICA UTILIZADA PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA DO HC-FMUSP



### APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 28.07.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **166/05**, intitulado: "Determinação da base molecular do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito." apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parcial e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Claudia Latronico

Pesquisador(a) Executante: Dr<sup>a</sup> Ericka Barbosa Trarbach

CAPPesq, 28 de Julho de 2005.

V Endocrinologia  
04, 08, 05  
AR. Ribeiro  
.....  
ANDRÉA RIBEIRO DOS SANTOS  
Secretaria do Departamento de Clínica Médica da FMUSP

  
PROF. DR. CLAUDIO LEONE  
Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa

## ANEXO B – APROVAÇÃO DA CASUÍSTICA UTILIZADA PELA COMISSÃO DE ÉTICA PARA ANÁLISE DE PROJETOS DE PESQUISA DO HC-FMUSP



### APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 26.10.06, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **983/06**, intitulado: **“Mecanismos moleculares envolvidos no início da puberdade humana: Análise dos Genes EAP-1 e TTF-1 em crianças com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas”**, apresentado pelo Departamento de **Clínica Médica**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra “c”)

Pesquisador(a) Responsável: **Profa. Dra. Ana Claudia Latronico**

Pesquisadores Executantes: Priscila Cukier

CAPPesq, 26 de Outubro de 2006.

**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Presidente da Comissão de Ética para Análise  
de Projetos de Pesquisa