

LUCIANA PINTO VALADARES

INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM INDIVÍDUOS COM
PUBERDADE PRECOCE CENTRAL INICIALMENTE CLASSIFICADA COMO
IDIOPÁTICA

BRASÍLIA, 2019

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

LUCIANA PINTO VALADARES

**INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM INDIVÍDUOS COM
PUBERDADE PRECOCE CENTRAL INICIALMENTE CLASSIFICADA COMO
IDIOPÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Orientadora: Professora Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

BRASÍLIA

2019

PL937i Pinto Valadares, Luciana
Investigação de alterações genéticas em indivíduos com puberdade precoce central inicialmente classificada como idiopática / Luciana Pinto Valadares; orientador Adriana Lofrano-Porto. -- Brasília, 2019.
147 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências da Saúde) --
Universidade de Brasília, 2019.

1. Puberdade precoce central. 2. Puberdade precoce central sindrômica. 3. MKRN3. 4. Genética. 5. Análise cromossômica por microarranjo. I. Lofrano-Porto, Adriana, orient. II. Título.

LUCIANA PINTO VALADARES

**INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM INDIVÍDUOS COM
PUBERDADE PRECOCE CENTRAL INICIALMENTE CLASSIFICADA COMO
IDIOPÁTICA**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 03 de dezembro de 2019

Banca Examinadora

Profa. Dra Adriana Lofrano Alves Porto (presidente)

Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Vinícius Nahime de Brito

Universidade de São Paulo - USP

Profa. Dra. Luciana Ansaneli Naves

Universidade de Brasília - UnB

Prof. Dr. Luiz Cláudio Gonçalves de Castro

Universidade de Brasília - UnB

Dra. Valdenize Tiziani

Hospital da Criança de Brasília José de Alencar - HCB

*Ao José Manoel, pelo companheirismo, apoio e paciência. Por compartilhar comigo
os meus sonhos.*

*À Laurinha, que chegou e trouxe mudanças e alegrias inimagináveis às nossas
vidas.*

À minha querida irmã Paula, para sempre presente em nossos corações...

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, professora Adriana Lofrano Alves Porto, por todas as oportunidades concedidas durante a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, pela convivência, amizade sincera e apoio, mesmo durante os momentos mais difíceis! Seu brilhantismo e sua determinação são um exemplo para todos nós e o seu entusiasmo é contagiante! Foi um privilégio tê-la como orientadora!

À Renata Santarém de Oliveira, pela amizade, apoio e pela enorme contribuição em inúmeras etapas desse trabalho. Sem a sua colaboração, a realização desse projeto não teria sido possível!

À equipe de endocrinologia pediátrica do Hospital da Criança de Brasília José de Alencar, em especial à dra. Ana Cristina Bezerra, cuja colaboração na fase de seleção dos pacientes foi essencial.

À toda a equipe do CISEP-HCB pelo apoio institucional que foi fundamental para a realização desse trabalho.

À dra. Adriana Furtado e equipe da Farmácia de Alto Custo da Secretária de Estado de Saúde do Distrito Federal, pelo auxílio na identificação dos pacientes em uso de análogo do GnRH para o tratamento da puberdade precoce central, o que facilitou a identificação dos pacientes elegíveis para o estudo.

Ao professor Dr. Luiz Guilherme Grossi Porto, pela disponibilidade e o enorme auxílio na realização da análise estatística, mesmo sendo necessária sua repetição algumas vezes.

À professora dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo, pela colaboração na realização da análise cromossômica por microarranjo e por todos os ensinamentos compartilhados na leitura e interpretação dos resultados encontrados.

À professora dra. Eliete Neves da Silva Guerra, pela parceria e os ensinamentos compartilhados durante a realização da revisão sistemática e meta-análise. Seu otimismo e entusiasmo são contagiantes e me deram forças para continuar, mesmo quando achava que as coisas não dariam certo.

Ao professor dr. Francisco de Assis da Rocha Neves, por todo o auxílio durante essa jornada, pelo dinamismo e exemplo de liderança.

Aos amigos do Farmol, em especial, à Sarah, pela paciência e disposição em ajudar com a parte da bancada. À Cinthia, pelo suporte e o grande apoio na realização da revisão sistemática. Aos demais colegas do Grupo de Pesquisa Sidney, Stela e Délia, pelo incentivo e trabalho em equipe.

Aos demais colegas, professores e funcionários do Farmol, sempre solícitos em fornecer ajuda quando necessário, deixando o ambiente mais ameno e agradável apesar de todas as adversidades com que nos deparamos no dia-a-dia.

Aos alunos de PIBIC que estiveram envolvidos nesse projeto, em especial a Cibelle e Anna Beatriz, pela ajuda prestada com os experimentos.

À Dorcelena, secretária do ambulatório de Endocrinologia do HUB, pelo auxílio com os prontuários dos pacientes para a coleta dos dados clínicos.

À presidente da Associação das Pioneiras Sociais, dra. Luciana Willadino Braga, pela concessão do apoio institucional que foi imprescindível para conciliar as atividades profissionais com a realização do doutorado.

Aos amigos da equipe de Clínica Médica do Hospital Sarah-Brasília cujo apoio, seja com as coberturas da escala quando minha ausência se fazia necessária, ou nos momentos de descontração e escuta amiga, foi fundamental.

À dra. Úrsula Kaiser e sua equipe do Brigham and Women's Hospital, pela colaboração com a realização de parte dos sequenciamentos e por terem gentilmente me recebido no seu laboratório. Embora tenha sido um período curto, foi uma oportunidade ímpar de grande aprendizado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para a realização desse projeto.

Aos pacientes e seus familiares, pela colaboração e a confiança que nos foi depositada, sem as quais a realização desse trabalho não teria sido possível.

Aos meus queridos pais, por todo incentivo e apoio concedido ao longo da vida. Pelos exemplos de altruísmo e honestidade. Aos meus queridos irmãos Patrícia e Lucas pela amizade e parceria que dão forças, mesmo à distância. À nossa irmã Paula, nossa eterna queridinha.

A toda a minha família, tias, primos, sobrinhos, cunhadas e sogros, por todo apoio e pela torcida!

A Deus, por todas as bênçãos e oportunidades que tive ao longo da vida. Por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho. E por me dar forças para seguir em frente.

“DAS UTOPIAS

*Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que triste os caminhos, se não fora
A mágica presença das estrelas.”*

Mario Quintana

RESUMO

A puberdade precoce central (PPC) resulta da reativação prematura do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e se caracteriza pelo desenvolvimento puberal antes dos 8 anos nas meninas e 9 anos nos meninos. Mutações no *MKRN3* representam a causa genética mais frequente da PPC. Outras causas monogênicas incluem mutações no *KISS1*, *KISS1R* e *DLK1*. A PPC também pode ser observada em quadros sindrômicos associados a anormalidades cromossômicas. Esse estudo buscou investigar alterações genéticas, com ênfase no estudo do *MKRN3*, em pacientes com PPC inicialmente classificada como idiopática. Na parte I, foi realizada revisão sistemática e meta-análise com o objetivo de se explorar associação genótipo-fenótipo e a prevalência global de mutações no *MKRN3* na PPC. Na segunda parte, procedeu-se à pesquisa de mutações no *MKRN3* em 63 pacientes (6 meninos) com PPC provenientes de dois centros de referência do Distrito Federal. Mutações no *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR* foram avaliados em um subgrupo de pacientes sem mutações no *MKRN3*. Subsequentemente, alterações cromossômicas foram investigadas através da análise cromossômica por microarranjo (CMA) em três pacientes com dismorfismos adicionais. Na parte I, a busca eletrônica foi conduzida em sete bases de dados. Catorze estudos, que totalizaram 857 pacientes rastreados, foram incluídos na meta-análise de prevalência e 89 pacientes com mutação no *MKRN3* foram identificados. Pacientes com mutações *missense* exibiram idade mais elevada ao diagnóstico do que os pacientes com mutações consideradas mais graves, o que sugere a possibilidade de diferença na progressão puberal conforme o subtipo de mutação. As meninas, em comparação aos meninos, exibiram idade inferior ao início da puberdade, maior avanço da idade óssea (Δ IO) e concentração de FSH basal mais elevada. A prevalência geral estimada de mutações foi 9%(IC95%0,04-0,15) e, na análise por subgrupos, as estimativas de prevalência foram maiores no sexo masculino, nos casos familiares e nos países ocidentais. Na segunda parte, mutações no *MKRN3* foram identificadas em 6 de 57 meninas da nossa casuística (10,5% das pacientes do sexo feminino). Nenhuma mutação patogênica no *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR* foi encontrada nos pacientes rastreados. As meninas com mutação exibiram, em comparação às sem mutação, idade inferior ao diagnóstico, concentrações de FSH basal e estradiol mais elevadas e maior Δ IO. A CMA revelou, em dois irmãos

com espectro autista, uma deleção patogênica em 16p11.2 e uma microduplicação em 18p11.22, classificada como variante de significado incerto (VOUS); em outro menino foi encontrada uma microduplicação em 7p15.2 (VOUS), e em uma menina com cardiopatia congênita, foram detectadas múltiplas regiões de perda de heterozigose devido à consanguinidade parental. Os resultados da parte I revelaram que as mutações no *MKRN3* representam uma causa frequente da PPC nos países ocidentais e que o impacto das mutações no fenótipo foi maior no sexo feminino. Na segunda parte, a prevalência de mutações no *MKRN3* no sexo feminino foi 10,5%, mas nenhum menino afetado foi detectado. As diferenças fenotípicas entre as meninas com e sem mutação sugerem a possibilidade de progressão puberal mais rápida nas primeiras. Por fim, ressalta-se a relevância da CMA na investigação de pacientes com PPC e dismorfismos adicionais.

Palavras-chave: puberdade precoce central; puberdade precoce central sindrômica; *MKRN3*; genética; mutação; análise cromossômica por microarranjo.

ABSTRACT

Central precocious puberty (CPP) results from premature reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and is characterized by pubertal development before the age of 8 years in girls and 9 years in boys. *MKRN3* mutations represent the most common genetic cause of CPP. Other monogenic causes include mutations in *KISS1*, *KISS1R* and *DLK1*. CPP has also been observed in syndromic conditions associated with chromosomal abnormalities. This study aims to investigate genetic alterations, focusing on the study of *MKRN3*, in patients with CPP initially classified as idiopathic. In the first part, a systematic review and meta-analysis were performed to explore genotype-phenotype associations and the overall prevalence of *MKRN3* mutations in apparently idiopathic CPP. In the second part, *MKRN3* mutations were screened in 63 patients (6 boys) from two reference services from Distrito Federal. Mutations in *KISS1*, *KISS1R* and *GNRHR* were evaluated in a subset of patients without *MKRN3* mutations. Subsequently, chromosomal abnormalities were investigated by chromosomal microarray analysis (CMA) in three patients with congenital malformations or additional dysmorphisms. In part I, the electronic search was conducted in seven databases. Fourteen studies totalizing 857 patients were included in the meta-analysis of prevalence, and 89 patients with *MKRN3* mutations were identified. Patients with missense mutations were older at diagnosis than patients with mutations predicted to be more deleterious, which suggests possible difference in pubertal progression according to mutation subtype. Girls, compared with boys, exhibited earlier age at pubertal onset, greater bone age advancement (ΔIO) and higher basal FSH levels. The pooled overall prevalence of mutations was 9% (95%CI 0.04-0.15) and, in subgroup analysis, prevalence estimates were higher in males, in familial cases, and in western countries. In the second part, *MKRN3* mutations were identified in 6 out of 57 girls (10.5% of female patients). No pathogenic mutations in *KISS1*, *KISS1R* and *GNRHR* were found in patients who were screened. Girls with mutations exhibited lower age at diagnosis compared to those without mutations, higher concentrations of basal FSH and estradiol and greater ΔIO . In two siblings with autism spectrum disorder, CMA revealed a pathogenic deletion in 16p11.2, and a microduplication in 18p11.22 that was classified as a variant of unknown significance (VOUS); in other boy, a microduplication in 7p15.2 (VOUS) was found; and in a girl

with congenital heart disease, multiples regions of loss of heterozygosity due to parental consanguinity were detected. Results of part I revealed that *MKRN3* mutations are a frequent cause of CPP in Western countries, and the impact of mutations on the phenotype was greater in females. In the second part, the prevalence of *MKRN3* mutations in females was 10.5% but no affected boy was identified. Phenotypic differences between girls with and without mutations suggest the possibility of faster pubertal progression in the former. Finally, our results underscore the relevance of CMA in the investigation of patients with CPP associated with syndromic features or congenital malformations.

Key-words: central precocious puberty; syndromic central precocious puberty; *MKRN3*; genetics; mutation; chromosomal microarray analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da proteína MKRN3.....	27
Figura 2 - Fluxograma do processo de seleção dos artigos.....	38
Figura 3 - Distribuição geográfica dos indivíduos com mutações no <i>MKRN3</i>	39
Figura 4 - Representação esquemática da proteína MKRN3 humana com a localização das mutações descritas.....	43
Figura 5 - Prevalência geral estimada de mutações no <i>MKRN3</i> em indivíduos com PPC previamente classificada como idiopática.....	44
Figura 6 - Prevalência estimada de mutações no <i>MKRN3</i> em pacientes com PPC de países asiáticos e não-asiáticos.....	45
Figura 7 - Prevalência estimada de mutações no <i>MKRN3</i> de acordo com a história familiar.....	46
Figura 8 - Prevalência estimada de mutações no <i>MKRN3</i> de acordo com o sexo.....	46
Figura 9 - Fluxograma simplificado da análise cromossômica por microarranjo.....	56
Figura 10 - Parte do cromatograma do sequenciamento do <i>MKRN3</i> com as mutações encontradas no presente estudo (A-D) e representação esquemática das mutações na proteína (E)..	61
Figura 11 - Análise de segregação familiar das meninas com mutação no <i>MKRN3</i>	65
Figura 12 - Representação das CNVs detectadas no P1.....	71

Figura 13 - Representação gráfica, visualizada pelo software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), da microduplicação (barra azul na parte superior) encontrada pelo exame de CMA no paciente P2 72

Figura 14 - Representação gráfica do cariótipo gerada pelo software ChAS v.3.0 (Affymetrix, EUA) pós processamento dos dados da CMA da paciente 3. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Causas e condições associadas ao desenvolvimento da PPC	21
Tabela 2 - Puberdade precoce central em pacientes com outros quadros sindrômicos e anormalidades cromossômicas distintas	31
Tabela 3 - Análise comparativa dos dados das meninas com mutações no <i>MKRN3</i> de países ocidentais (n = 65) e países asiáticos (n = 11).....	40
Tabela 4 - Análise comparativa dos dados das meninas (n = 76) e meninos (n = 13) com mutações no <i>MKRN3</i>	41
Tabela 5 - Análise comparativa dos dados dos pacientes com mutações no <i>MKRN3</i> de acordo com subtipo de mutação.	42
Tabela 6 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do <i>MKRN3</i>	53
Tabela 7 - Sequência dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes <i>KISS1</i> , <i>KISS1R</i> e <i>GNRHR</i>	53
Tabela 8 - Parâmetros de amplificação dos genes estudados	54
Tabela 9 - Classificação das variações de número de cópias (CNVs) cromossômicas	57
Tabela 10 - Caracterização geral dos pacientes com PPC incluídos no estudo.....	59
Tabela 11 - Prevalência de mutações no <i>MKRN3</i> nos pacientes com PPC do presente estudo	60

Tabela 12 - Caracterização clínica e bioquímica das meninas com mutação no <i>MKRN3</i>	63
Tabela 13 - Comparação das características das meninas com PPC com e sem mutação no <i>MKRN3</i>	64
Tabela 14 - Frequência alélica dos polimorfismos de nucleotídeos únicos encontrados nos genes <i>MKRN3</i> , <i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i> nos pacientes com PPC em comparação com a população geral do banco de dados do ExAC.	68
Tabela 15 - Dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico da PPC dos pacientes selecionados para a CMA	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Δ IO	Avanço da idade óssea (diferença entre a idade cronológica e a idade óssea)
CMA	Análise cromossômica por microarranjo (<i>chromosomal microarray analysis</i>)
CNV	Variação no número de cópias (<i>copy number variation</i>)
DF	Distrito Federal
DGV	<i>Database of Genomic Variation</i>
DI	Deficiência intelectual
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ExAC	<i>Exoma Aggregation Consortium.</i>
FEPECS	Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GNRHR</i>	Gene que codifica o receptor do GnRH
GWAS	Estudos de associação genômica ampla (<i>genome-wide association studies</i>)
HCB	Hospital da Criança de Brasília Jose Alencar
HHG	Hipotalâmico-hipofisário-gonadal
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IC	Intervalo de confiança
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IMC	Índice de massa corporal
IO	Idade óssea
KBP	Kilo pares de bases
<i>KISS1</i>	Gene que codifica a kisspeptina
<i>KISS1R</i>	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
LH	Hormônio luteinizante
LOH	Perda de heterozigose (<i>loss of heterozygosity</i>)
<i>MKRN3</i>	Gene que codifica a proteína <i>makorin ring finger protein 3</i>

MS-MLPA	Análise de metilação por amplificação dependente de ligação com múltiplas sondas
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PPC	Puberdade precoce central
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
RM	Ressonância magnética
RNA _m	RNA mensageiro
SES-DF	Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal
SNC	Sistema nervoso central
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único (<i>single nucleotide polymorphism</i>)
SPW	Síndrome de Prader-Willi
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEA	Transtorno de espectro autista
UTR	Região não traduzida
UnB	Universidade de Brasília
VC	Velocidade de crescimento
VOUS	Variantes de significado incerto (<i>variants of uncertain significance</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 PUBERDADE FISIOLÓGICA.....	19
1.2 PUBERDADE PRECOCE CENTRAL	20
1.3 CAUSAS MONOGÊNICAS DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL	23
1.3.1 Mutações no <i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i>	24
1.3.2 Mutações no <i>MKRN3</i>	24
1.3.3 Mutações no <i>DLK1</i>	28
1.4 <i>IMPRINTING</i> GENÉTICO E PUBERDADE	29
1.5 PUBERDADE PRECOCE EM OUTROS QUADROS SINDRÔMICOS	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 PARTE I – REVISAO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE	35
3.1 OBJETIVOS	35
3.2 MÉTODOS	35
3.2.1 Estratégia de Busca e Seleção dos Estudos, Extração dos Dados e Avaliação do Risco de Viés	35
3.2.2 Análise Estatística	36
3.3 RESULTADOS	37
3.3.1 Seleção e Características dos Estudos Incluídos	37
3.3.2 Características Demográficas e Fenótipo dos Indivíduos com Mutações no <i>MKRN3</i>	39
3.3.3 Categorização das Mutações Descritas	42
3.3.4 Prevalência de Mutações no <i>MKRN3</i>	44
4 PARTE II – INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES COM PPC	47
4.1 OBJETIVOS	47

4.1.1	Objetivos Gerais.....	47
4.1.2	Objetivos Específicos	47
4.2	MÉTODOS	49
4.2.1	Participantes do Estudo	49
4.2.2	Considerações Éticas	50
4.2.3	Análise molecular dos Genes <i>MKRN3</i> , <i>KISS1</i> , <i>KISS1R</i> e <i>GNRHR</i>	51
4.2.4	Análise <i>In Silico</i> do Impacto de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos Não Sinônimos	54
4.2.5	Análise Estatística.....	54
4.2.6	Análise Cromossômica por Microarranjo	55
4.3	RESULTADOS	58
4.3.1	Caracterização Clínica dos Participantes do Estudo	58
4.3.2	Pesquisa de Mutações no Gene <i>MKRN3</i>	60
4.3.4	Pesquisa de Mutações nos Genes <i>KISS1</i> e <i>KISS1R</i>	66
4.3.5	Pesquisa de Mutações no Gene <i>GNRHR</i>	67
4.3.6	Alterações Cromossômicas Identificadas Por Meio da Análise Cromossômica Por Microarranjo.....	69
5	DISCUSSÃO	73
5.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE O FENÓTIPO	76
5.2	SOBRE AS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO <i>MKRN3</i> E O SEU POSSIVEL MECANISMO DE AÇÃO.....	78
5.3	SOBRE A INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO <i>KISS1</i> , <i>KISS1R</i> E <i>GNRHR</i>	81
5.4	SOBRE AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NOS PACIENTES COM DISMORFISMOS ADICIONAIS	82
6	CONCLUSÃO	87
7	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 PUBERDADE FISIOLÓGICA

A puberdade é um processo biológico complexo que se caracteriza por alterações hormonais que resultarão no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, aquisição das funções reprodutivas, aceleração do crescimento linear e maturação esquelética (1–3).

Clinicamente, o aumento da velocidade de crescimento (VC) e o surgimento do broto mamário nas meninas e o aumento do volume testicular nos meninos (volume testicular superior à 4mL ou comprimento superior a 2,5 cm) representam o primeiro sinal do início da puberdade (1,3). Classicamente, os estágios puberais descritos por Marshall e Tanner são utilizados para se caracterizar a progressão da puberdade, que usualmente segue uma sequência previsível de eventos (4,5).

O desenvolvimento puberal e a reprodução humana são controlados pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HHG). O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) hipotalâmico é secretado de maneira pulsátil na eminência mediana e estimula a produção pelos gonadotrófos da adenohipófise do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) que, por sua vez, atuam nas gônadas estimulando a síntese dos esteroides sexuais e a gametogênese (2,6).

O eixo HHG encontra-se ativo no meio da gestação e nos primeiros meses de vida, numa fase conhecida como mini puberdade, na qual a secreção do GnRH e das gonadotrofinas hipofisárias pode ser observada. As concentrações séricas de gonadotrofinas declinam até por volta dos seis meses de idade, à exceção do FSH nas meninas, que pode permanecer elevado até os 3-4 anos (7). Posteriormente, segue-se uma fase de relativa quiescência hormonal durante a infância e a posterior reativação da secreção pulsátil do GnRH marcará o início da puberdade (6,8).

Os mecanismos que levam à quiescência do eixo HHG durante a infância e à sua subsequente reativação no início da puberdade ainda não são completamente esclarecidos. Sabe-se que secreção do GnRH é coordenada por uma rede neuronal complexa, constituída por neurônios secretores de fatores estimulatórios (como a

kisspeptina, glutamato, norepinefrina) e inibitórios (neuropeptídeo Y, ácido gama amino butírico, opioides endógenos, dentre outros). Acredita-se que a redução dos impulsos inibitórios, o aumento dos estímulos excitatórios e a ação concomitante de fatores permissivos resultarão na reativação dos pulsos do GnRH e, conseqüentemente, no início do desenvolvimento puberal (6,8). O controle neuroendócrino da puberdade também sofre influência de fatores genéticos, étnicos, nutricionais e ambientais, o que demonstra que o desenvolvimento puberal humano é um processo complexo e multifatorial (1,2,6).

A puberdade ocorre cerca de 1 - 2 anos mais cedo nas meninas do que nos meninos, o que demonstra a existência de dimorfismo sexual nos reguladores do início do desenvolvimento puberal (9). A puberdade também pode ocorrer mais cedo nas meninas com baixo peso ao nascer, com obesidade ou ganho excessivo de peso na infância, após adoção internacional e possivelmente após a exposição a compostos químicos desreguladores endócrinos (1,10).

1.2 PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

A puberdade é considerada precoce quando o desenvolvimento puberal inicia-se antes do esperado para o sexo e grupo étnico, sendo 2 a 2,5 desvio-padrão abaixo da média o limite de idade tipicamente aceito para esse diagnóstico (8). Assim, a puberdade é tradicionalmente considerada precoce quando inicia-se antes dos 8 anos nas meninas e antes dos 9 anos nos meninos (1,3).

A puberdade precoce central (PPC) resulta da reativação prematura do eixo HHG. A prevalência estimada é de aproximadamente 1:5.000 a 1:10.000, com clara predominância no sexo feminino, com cerca de 10 a 20 meninas afetadas para cada menino acometido (1,3,11). Contudo, dados epidemiológicos específicos da população brasileira são escassos.

A PPC pode ser idiopática, estar associada a alterações anatômicas ou lesões do sistema nervoso central (SNC) ou ter causas genéticas (Tabela 1). As formas idiopáticas representam a maioria dos casos no sexo feminino (90%). Em contrapartida, nos meninos, uma alteração neurológica pode ser detectável em até 70% a 90% dos casos (3,12). Contudo, dados recentes sugerem redução dessa

tendência e, em um estudo epidemiológico recente com 100 meninos com PPC, uma causa orgânica foi detectada em somente 26% dos casos (13).

Adoção internacional é outro fator de risco para o desenvolvimento de PPC (10). Postula-se que a privação nutricional no início da vida seguida do aumento da adiposidade após a adoção ou a exposição a desreguladores endócrinos no período pré-natal ou na infância precoce possam funcionar como gatilho para o início da puberdade (3). Um dado interessante é que o risco de puberdade precoce se mostrou maior conforme a idade mais avançada à adoção, o que sugere a possível influência da exposição a fatores ambientais (10). A reativação prematura do eixo HHG também pode ser observada após a exposição crônica a esteroides sexuais, como observado no curso do tratamento da hiperplasia adrenal congênita (3,11).

Tabela 1 - Causas e condições associadas ao desenvolvimento da PPC

Com anormalidades do SNC	Tumores: meningioma, craniofaringioma, gliomas, astrocitoma de baixo grau
	Alterações estruturais: cisto aracnoide, hamartoma hipotalâmico, hidrocefalia
	Encefalopatia crônica não progressiva
	Traumatismo craniano
	Infecções ou doenças granulomatosas
	Radioterapia do SNC
	Sem anormalidades do SNC
Causas monogênicas	MKRN3, DLK1, KISS1, KISS1R
Anormalidades cromossômicas	
Adoção internacional	
Após exposição crônica a esteroides sexuais	
Desreguladores endócrinos	

Adaptada da referência (11)

O diagnóstico da PPC baseia-se no reconhecimento do desenvolvimento puberal progressivo, concentrações púberes de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH ou análogo, aumento da velocidade de crescimento (VC) e avanço de idade óssea (IO) (1,3,14).

A avaliação por imagem do SNC, preferencialmente através da ressonância magnética (RM), é útil para o diagnóstico diferencial com as causas orgânicas da PPC e deve ser realizada rotineiramente em todos pacientes do sexo masculino. Existe controversa quanto a necessidade de realização rotineira da RM nas meninas com PPC e algumas evidências sugerem que o exame é prescindível em meninas neurologicamente normais com início da puberdade entre os 6 e 8 anos de idade (15–17).

A puberdade precoce resulta em consequências adversas à saúde da criança. Além de consequências psicossociais, a baixa estatura pode ser observada em decorrência da fusão prematura das epífises ósseas (1,3,18). Também é descrita maior frequência de doenças metabólicas na vida adulta, como resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, síndrome dos ovários policísticos e doença cardiovascular. Adicionalmente, a idade precoce da menarca é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama e outras neoplasias estrógeno-dependentes (18–20).

Os análogos do GnRH de longa duração representam o tratamento padrão da PPC. O sítio de ação destes agentes é hipofisário, levando à redução do número de receptores de GnRH na hipófise e, conseqüentemente, à redução na liberação do LH e, em menor extensão, do FSH (14,21). O resultado da administração crônica do análogo do GnRH é avaliado clinicamente pela regressão ou estabilização dos caracteres sexuais secundários, pela normalização da VC e pela redução do avanço da IO. Concentrações de LH após estímulo com GnRH ou análogo de longa duração abaixo de 4UI/L, quando dosados por métodos laboratoriais sensíveis, são usualmente aceitos como indicativos de bom controle hormonal (2,14).

1.3 CAUSAS MONOGÊNICAS DA PUBERDADE PRECOCE CENTRAL

O desenvolvimento puberal é influenciado por fatores genéticos, fato exemplificado pela idade aproximada da menarca entre mães e filhas e entre indivíduos da mesma etnia e maior concordância no início da puberdade entre os gêmeos monozigóticos em comparação aos dizigóticos (2,8).

O início da puberdade é um traço complexo e altamente poligênico e achados de estudos de associação genômica ampla (GWAS) em grande escala mostram que a influência de determinados *loci* independe da etnia (22). Algumas variações genéticas compartilhadas por meninos e meninas apresentem direção de efeito concordante, no entanto, certas variações genéticas podem exercer influência de maneira sexo-específica (22). Em GWAS recentes, polimorfismos em mais de 100 *loci*, incluindo três *loci* dos *imprinted* genes *MKRN3-MAGEL2*, *DLK1-WDR25* e *KCNK9*, foram associados à idade da menarca conforme a origem parental do alelo herdado (23,24).

A PPC pode ser considerada familiar em quase 30% dos casos, isto é, observa-se mais de um indivíduo acometido na mesma família (25), o que demonstra a relevância dos fatores genéticos na etiopatogenia desta condição. Contudo, até há alguns anos, causas genéticas da PPC não eram conhecidas.

Nos últimos anos, os avanços nas técnicas de biologia molecular e do sequenciamento do genoma permitiram a identificação de novos genes implicados na regulação neuroendócrina do eixo reprodutivo, o que propiciou um grande avanço no conhecimento de causas genéticas relacionadas à patogênese da PPC (12,26). Atualmente, as causas monogênicas da PPC incluem mutações em quatro genes distintos: *KISS1R*, *KISS1*, *MKRN3* e *DLK1* (12,27). Assim, alguns casos inicialmente considerados idiopáticos podem apresentar, de fato, uma causa genética subjacente. É possível que novas causas monogênicas possam ser identificadas à medida que novos estudos genéticos sejam realizados em mais indivíduos afetados, o que poderá resultar no declínio adicional dos casos inicialmente considerados idiopáticos.

1.3.1 Mutações no *KISS1* e *KISS1R*

A kisspeptina, uma proteína codificada pelo gene *KISS1*, é um potente estimulador da secreção do GnRH, com papel fundamental na fisiologia do eixo HHG humano. Mutações com perda de função nos genes que codificam a kisspeptina e seu receptor (*KISS1* e *KISS1R*, respectivamente) estão sabidamente associadas com hipogonadismo hipogonadotrófico normósmico (28,29).

Em 2008, uma mutação em heterozigose no *KISS1R* (p.Arg386Pro) foi detectada em uma menina brasileira adotada que apresentava telarca desde o nascimento, com progressão a partir dos sete anos de idade. O estudo funcional *in vitro* demonstrou que essa mutação levava à ativação prolongada das vias de sinalização intracelular do receptor em resposta à kisspeptina (30). O encontro dessa mutação ativadora no *KISS1R* representou a primeira causa monogênica da PPC a ser identificada.

Posteriormente, Silveira e colaboradores descreveram uma mutação em heterozigose (p.Pro74Ser) no *KISS1* em um menino com PPC com início do desenvolvimento puberal com um ano de idade. O estudo *in vitro* sugeriu que a variante p.Pro74Ser era mais resistente à degradação e resultava em maior biodisponibilidade da kisspeptina (31). A análise de segregação familiar mostrou que a mãe e a avó materna, que não possuíam antecedente de precocidade sexual, também apresentavam a mutação, o que sugeria penetrância incompleta ou sexo-dependente (31).

Apesar dos avanços obtidos com esses resultados, outras mutações com ganho de função nos genes *KISS1* e *KISS1R* não foram descritas, o que denota que as alterações nos mesmos representam causas muito raras da PPC.

1.3.2 Mutações no *MKRN3*

Em 2013, mutações com perda de função no gene *MKRN3* (*makorin ring finger protein 3*) foram identificadas em indivíduos de cinco de 15 famílias com PPC familiar que foram estudados através do sequenciamento do exoma (32).

O *MKRN3* localiza-se no cromossomo 15 (15q11-13), em uma região de *imprinting* relacionada à síndrome de Prader-Willi (SPW)(33). O gene tem *imprinting* materno, isto é, é silenciado no cromossomo materno e somente o alelo paterno é expresso. O estudo de segregação destas famílias com PPC e mutações no *MKRN3* mostrou herança autossômica dominante de transmissão paterna, condizente com o esperado pelo padrão de *imprinting* (32). Esse achado corroborou evidências anteriores a respeito do caráter autossômico dominante, com penetrância incompleta e sexo-dependente observado em pacientes com PPC familiar (25).

Em seguida, Macedo e colaboradores identificaram mutações no *MKRN3* em 8 de 207 meninas com PPC aparentemente esporádica (34). Subsequentemente, mutações no *MKRN3* foram descritas em pacientes com PPC, seja esporádica ou familiar, de diferentes regiões geográficas e atualmente representam a causa monogênica mais frequente da PPC (35,36,45,37–44). As mutações no *MKRN3* podem ser encontradas em até 46% dos casos familiares (39) e também parecem ser mais frequentes no sexo masculino (até 40% dos meninos)(46). Curiosamente, a frequência de mutações no *MKRN3* foi mais baixa na população coreana, mesmo entre os casos familiares, o que sugere variação genética entre diferentes grupos étnicos (43,47).

1.3.2.1 Fenótipo dos Pacientes com Mutações no *MKRN3*

O quadro clínico dos pacientes com mutações no *MKRN3* assemelhou-se ao dos pacientes com PPC idiopática e, a despeito da sua localização no *locus* 15q11-13, critérios maiores para o diagnóstico da SPW não foram descritos nos indivíduos afetados (32,38).

O início da puberdade ocorreu 2,25 anos abaixo do esperado nas meninas (32), ao passo que nos meninos o desenvolvimento puberal ocorreu em uma idade limítrofe (idade média 8,2 anos)(46), o que sugere que o dimorfismo sexual característico do desenvolvimento puberal não se altera (48).

Poucos estudos compararam as características dos pacientes com e sem mutação. Concentração de FSH basal mais elevada foi descrita nas meninas com mutação em um estudo (34). Simon e colaboradores também relataram que o início

da puberdade ocorreu mais precocemente nas meninas com mutação (39), e um estudo somente com meninos descreveu que o início da puberdade ocorreu com idade mais avançada naqueles com mutação em comparação aos sem mutação (8,2 anos versus 7,0 anos, respectivamente)(46). Contudo, ainda não se sabe se o fenótipo dos pacientes com mutação difere dos indivíduos sem mutação e, até o momento, não foi possível estabelecer associação genótipo-fenótipo precisa.

Adicionalmente, não está claro se a resposta ao tratamento com os análogos de GnRH, o potencial para se alcançar a estatura alvo e o prognóstico em longo prazo difere entre os pacientes com e sem mutações. Assim, a identificação e o acompanhamento de mais casos serão úteis para o esclarecimento destas questões.

1.3.2.2 Estrutura e Função da Proteína MKRN3

O *MKRN3*, inicialmente nomeado como *ZNF127* (*zinc finger protein 127*), possui apenas um exon e codifica uma proteína de 507 aminoácidos (33).

A proteína *MKRN3* pertence à família das proteínas *makorin* e apresenta um anel de zinco C3HC4 central, dois dedos de zinco CH3 na região aminoterminal, um dedo de zinco CH3 na região carboxiterminal e um arranjo Cys-His específico (Figura 1)(26,33). O arranjo dos resíduos de cisteína e histidina nos dedos de zinco permite prever algumas de suas funções, pois são identificados em proteínas de ligação ao RNA. Os domínios em dedo de zinco C3HC4, altamente conservados nas proteínas na família *makorin* entre as espécies, representam domínios de reconhecimento de E3-ligases, que são enzimas que atuam no processo de ubiquitinação, mediando a transferência da ubiquitina para substratos proteicos específicos, induzindo a sua degradação (26). A ubiquitinação também pode ser um sinal para transdução, regulação do ciclo celular, diferenciação e morfogênese. Assim, com base na sua estrutura, acredita-se a proteína *MKRN3* possui atividade de uma E3-ubiquitina ligase e de ligação ao RNA, com função na regulação da expressão genica, marcação de proteínas para degradação e modulação da função proteica (26,48).

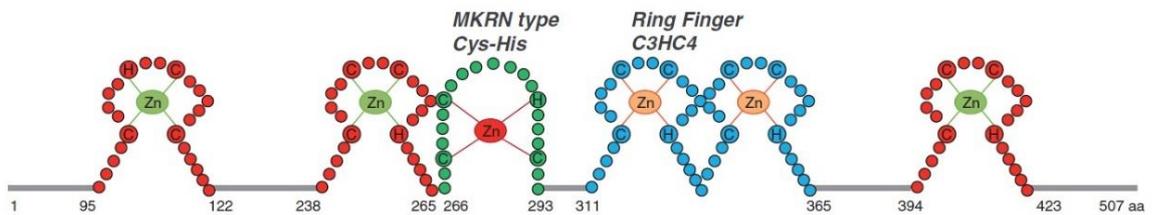


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da proteína MKRN3. Os três domínios C3H são mostrados em vermelho, o domínio C3HC4, com presumida atividade de E3-ubiquitina ligase, é ilustrado em azul e o domínio Cys-His em verde. Os números correspondem à posição dos aminoácidos na proteína. Zn: zinco; H: histidina e C: cisteína. Figura adaptada da referência (26).

O mecanismo exato pelo qual a perda da função do *MKRN3* leva ao início da puberdade ainda não está completamente esclarecido. Em camundongos, observa-se elevada expressão do RNAm do *Mkrn3* no núcleo arqueado do hipotálamo no período pré-puberal, com declínio na expressão precedendo o início da puberdade e baixa expressão na idade adulta, o que sugere um efeito inibitório sobre a secreção do GnRH (32). Assim, as mutações com perda de função favoreceriam o início da puberdade pela ação preponderante dos fatores estimulatórios (26).

Em humanos, também foi descrito o declínio da concentração sérica circulante do MKRN3 precedendo o início da puberdade, além de correlação negativa entre a concentração sérica do MKRN3 e de gonadotrofinas nas meninas pre-púberes, o que corrobora o seu papel inibitório no eixo HHG (49,50).

Posteriormente, foi constatado que o *Mkrn3* contribui para a poli-ubiquitinação da *Nptx1* (*neural pentraxin-1 precursor*), uma proteína com possível papel na plasticidade sináptica e diferenciação neural, que é altamente expressa no hipotálamo durante a puberdade. Assim, a expressão do *Nptx1* permanece normalmente baixa no período pré-puberal, com aumento à medida que ocorre a redução da expressão do *Mkrn3* com o início da puberdade (51).

1.3.3 Mutações no *DLK1*

Em 2017, uma mutação complexa no *DLK1* (*delta-like 1 homolog*) foi detectada em uma família brasileira que foi estudada pelo sequenciamento do genoma e análise de ligação, na qual quatro meninas (duas irmãs e duas meias-irmãs paternas) apresentavam o diagnóstico de PPC (52).

O *DLK1*, também conhecido por fator pré-adipócito 1 (*pre-adipocyte factor 1 – Pref-1*), é um ligante não canônico da via de sinalização Delta-Notch, com papel na inibição da diferenciação de adipócitos (53). É amplamente expresso nos tecidos embrionários e, no período pós-natal, é expresso predominantemente nas adrenais, ovários e hipófise. O gene tem *imprinting* materno e localiza-se no cromossomo 14 (14q32.2), em uma região de *imprinting* associada à síndrome de Temple, cujo quadro clínico inclui restrição do crescimento intrauterino, baixa estatura, mãos e pés pequenos, dismorfismos faciais, hipotonia, atraso do desenvolvimento motor, obesidade truncal e PPC (52,54). No entanto, essas pacientes com mutações no *DLK1* não apresentavam manifestações específicas da síndrome de Temple.

Recentemente, mutações no *DLK1* foram identificadas em 5 de 60 pacientes do sexo feminino com PPC ou com antecedente de menarca precoce, o que reforça a sua associação com a etiologia desta condição. Em especial, observou-se elevada frequência de alterações metabólicas, como obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e dislipidemia nas pacientes com mutações no *DLK1* (55).

1.4 IMPRINTING GENÉTICO E PUBERDADE

A ocorrência de *imprinting* em regiões do genoma tem como consequência a expressão de genes de maneira monoalélica, pois leva a repressão ou expressão gênica de acordo com a sua origem parental. A metilação do DNA é a principal marca epigenética no estabelecimento e manutenção do *imprinting* genômico. A maioria dos *imprinted* genes encontram-se agrupados em determinadas regiões do genoma (*clusters*) e os mecanismos que regulam a sua expressão são complexos e pouco compreendidos. Centros de *imprinting* são identificados em vários *clusters*, o que denota a possibilidade de regulação coordenada dos genes de um *cluster* por um mecanismo comum (56).

Tanto o *MKRN3* quanto o *DLK1*, as principais causas monogênicas da PPC, fazem parte de clusters de genes com *imprinting*, o que reforça o papel do *imprinting* genômico na regulação do início da puberdade humana (32,52).

O papel do *MKRN3* na patogênese da SPW não é conhecido e especula-se que o mesmo é prescindível para o seu desenvolvimento, visto a descrição de pacientes com a síndrome e deleções no *locus* 15q11-13 que não incluíram o *MKRN3*. Outro dado interessante é que a SPW usualmente cursa com desenvolvimento puberal incompleto ou hipogonadismo, embora a ocorrência de PPC possa ser raramente observada (57,58).

Seria plausível considerar que a perda da expressão do alelo paterno do *MKRN3* por deleções *de novo*, dissomia uniparental materna ou defeitos de *imprinting*, à semelhança do que é observado na SPW ou em outras doenças relacionadas com *imprinted* genes, poderia estar relacionada à patogênese da PPC. No entanto, anormalidades no número de cópias e alteração no padrão de metilação no *locus* 15q11 não foram identificadas em 52 pacientes sem mutações no *MKRN3* que foram estudados pela análise de metilação por amplificação dependente de ligação com múltiplas sondas (MS-MLPA) com a utilização do kit padronizado para a SPW (34).

1.5 PUBERDADE PRECOCE EM OUTROS QUADROS SINDRÔMICOS

Além da SPW e da Síndrome de Temple, citadas anteriormente, a PPC pode fazer parte das manifestações fenotípicas de outras síndromes genéticas resultantes de anormalidades cromossômicas ou defeitos de *imprinting* (3,59). Como exemplo adicional, cita-se a síndrome de Silver-Russell, decorrente de dissomia uniparental materna do cromossomo 7 ou defeitos de *imprinting* no *locus* 11p15.5, e que caracteriza-se por restrição do crescimento intrauterino e pós-natal, baixa estatura e dismorfismos faciais (60).

A síndrome de Williams-Beuren é outra síndrome genética rara, decorrente de microdeleções no cromossomo 7 (7q11.23), cujas manifestações fenotípicas incluem dismorfismos faciais, baixa estatura, cardiopatia congênita, deficiência intelectual (DI) e PPC, que pode ser observada em até 18% a 28% das meninas (61,62).

Adicionalmente, a PPC pode ser observada em pacientes com outras condições médicas pré-existentes, como epilepsia, transtorno do espectro autista (TEA) ou outros transtornos do neurodesenvolvimento e quadros sindrômicos complexos, associada a anormalidades cromossômicas distintas, como exemplifica a tabela 2.

Tabela 2 - Puberdade precoce central em pacientes com quadros sindrômicos e anormalidades cromossômicas distintas

Anormalidade cromossômica ou síndrome genética	Manifestações clínicas	Autor, ano
Deleção 1q22.3	PPC, encefalopatia e/ou TEA	
Deleção 2q24.2 (2 casos)	PPC, deficiência intelectual grave e epilepsia	Wannes et al, 2018 (59)
Deleção 9q22.2	PPC e TEA	
Deleção Xq22.1 em mosaico	PPC e paralisia cerebral forma quadriplégica espástica	
Trissomia do 13	PPC, deficiência intelectual grave e epilepsia	
Deleção 1p36	PPC, retardo mental, epilepsia, atraso do crescimento, cardiopatia congênita e dismorfismos faciais	Kurosawa et al, 2005(63)
Translocação 7q31 e 10p14	PPC, retardo mental e comprometimento da linguagem	Kosho et al, 2008 (64)
Duplicação 9p13	PPC, baixa estatura, anomalias nas mãos e retardo mental grave	Lybaek et al, 2009 (65)
Deleção 9p	PPC, deficiência intelectual, dismorfismos faciais e polidactilia	Funderburk et al (66)
	PPC, atraso psicomotor, deficiência intelectual e dismorfismos faciais	Cistermino et al, 2013 (67)
Duplicação 17p13.3	PPC, atraso psicomotor, hiperatividade, lesões cutâneas acrômicas	Winter et al. (68)
Duplicação do cromossomo 15	PPC e atraso do desenvolvimento psicomotor (2 casos)	
Duplicação do cromossomo 11	PPC, atraso psicomotor, autismo e amaurose	
KGB Síndrome (microdeleção em 16q24.3 ou mutações no <i>ANKRD11</i>)	Macrodonia, dismorfismos faciais, baixa estatura, anomalias esqueléticas, deficiência intelectual e puberdade precoce ou adiantada em 16% dos pacientes	Goldenberg et al, 2016.(69)
Duplicação 16p13.3	PPC, deficiência intelectual, dismorfismos faciais e sindactilia	Thienpont, et al, 2009(70)

Anormalidade cromossômica ou síndrome genética	Manifestações clínicas	Autor, ano
Síndrome de deleção 22q13 e duplicação do gene <i>NOTCH1</i>	PPC, hipotonia neonatal, dismorfismos faciais, atraso motor e comprometimento cognitivo	Giannakopoulos et al, 2016 (71)
Síndrome triplo X (47 XXX)	PPC PPC, diabetes mellitus neonatal, hérnia umbilical e cardiopatia congênita	Skordis et al, 2017.(72) Grosso et al.
Duplicação Xp11.22	Puberdade precoce ou adiantada, dismorfismos faciais, deficiência intelectual, disartria, clinodactilia	Grams et al, 2015 (73)
Deleção Xp22.33	PPC e fenótipo complexo (7 pacientes de 3 famílias não relacionadas)	Canton et al, 2019(74)

2 JUSTIFICATIVA

A identificação de novos genes implicados no controle do eixo reprodutivo, em especial o *MKRN3* e subsequentemente o *DLK1*, proporcionaram um grande avanço no conhecimento das causas genéticas da PPC.

Especificamente em relação ao *MKRN3*, a principal causa monogênica da PPC e o foco principal deste trabalho, a despeito da contribuição ímpar dos estudos mais recentes, algumas lacunas ainda existem, mas que poderão ser progressivamente esclarecidas à medida que mais indivíduos acometidos forem identificados. Dentre as lacunas ainda presentes, merece destaque o entendimento dos efeitos das mutações no *MKRN3* sobre o processo de desenvolvimento puberal. Verifica-se ainda relativa carência de dados clínicos comparativos entre grupos de crianças com PPC com ou sem mutação no *MKRN3*. A caracterização e análise comparativa mais detalhada desses dados em maior número de crianças tem potencial de contribuir para o melhor entendimento dos efeitos do *MKRN3* na regulação da puberdade em seres humanos. Nesse contexto, esse trabalho foi dividido em duas partes, que serão apresentadas a seguir:

- A PARTE 1 consistiu na realização de revisão sistemática e meta-análise dos dados publicados até 04 de setembro de 2018, ocasião em que foi feita a busca sistemática em sete bases de dados, com intuito de se tentar estabelecer relação genótipo-fenótipo e avaliar a prevalência global de mutações no *MKRN3* nos indivíduos com PPC idiopática (75).
- A PARTE 2 consistiu na investigação de causas genéticas da PPC, com ênfase na pesquisa de mutações no gene *MKRN3*, em pacientes com PPC inicialmente classificada como idiopática atendidos em dois centros de referência do Distrito Federal (DF): Hospital da Criança de Brasília José de Alencar (HCB) e Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (HUB/UnB). Trata-se de estudo inédito na região centro-oeste, que objetivou assim agregar novos casos à casuística brasileira (32,34,46). Buscou-se investigar a presença de mutações em casos familiares e esporádicos, e principalmente nos meninos com PPC, cuja identificação ainda é relativamente escassa. A pesquisa de mutações nos genes *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR* foi feita em um subgrupo de pacientes sem mutações detectadas no *MKRN3* pelo

sequenciamento automático. Adicionalmente, investigou-se a presença de alterações cromossômicas submicroscópicas por meio da análise cromossômica por microarranjo (CMA) em pacientes com malformações congênicas ou dismorfismos adicionais.

3 PARTE I – REVISÃO SISTEMÁTICA E META-ANÁLISE

3.1 OBJETIVOS

- Estimar a prevalência global de mutações no gene *MKRN3* nos indivíduos com PPC classificada como idiopática.
- Investigar associações genótipo-fenótipo em indivíduos com PPC com mutações no gene *MKRN3*

3.2 MÉTODOS

A metodologia desta revisão sistemática baseou-se nas recomendações do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA)(76) e o seu protocolo foi registrado no registro internacional prospectivo de revisões sistemáticas (PROSPERO) com o seguinte número: CRD42018095144 (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>).

Estudos que investigaram a presença de mutações no *MKRN3* em pacientes com PPC idiopática foram considerados elegíveis. Foram excluídos os artigos de revisão, resumos de congressos, capítulos de livros, estudo com duplicidade de dados, artigos que não foram escritos no alfabeto romano e estudos que investigaram a presença de SNPs (polimorfismos de nucleotídeos únicos) em pacientes sem PPC confirmada.

3.2.1 Estratégia de Busca e Seleção dos Estudos, Extração dos Dados e Avaliação do Risco de Viés

A busca sistemática foi conduzida em sete base de dados (Cochrane, EMBASE, LILACS, LIVIVO, PubMed, Scopus e Web of Science) e a pesquisa na literatura cinza foi realizada pelo Google Scholar e ProQuest. Ao final da fase de

buscas, as referências bibliográficas dos artigos incluídos foram avaliadas para a identificação de possíveis estudos adicionais elegíveis. A estratégia de busca está disponível no Apêndice 2.

A seleção dos estudos foi conduzida em 2 fases. Primeiramente, os títulos e resumos foram avaliados, com exclusão daqueles que não preenchiam os critérios de inclusão. Posteriormente, os artigos foram avaliados na íntegra para se confirmar a sua elegibilidade.

Informações sobre o delineamento do estudo, número de pacientes rastreados e de pacientes com mutações no *MKRN3*, história familiar de PPC e técnica do sequenciamento foram extraídas de cada estudo. Adicionalmente, as variáveis clínicas de interesse, subtipo de mutação e informações sobre o tratamento foram recuperadas dos pacientes com mutações. Dados dos familiares adultos com diagnóstico retrospectivo de PPC com base na história clínica não foram incluídos.

A avaliação do risco de viés foi realizada de acordo com uma lista de verificação desenvolvida pelo Instituto Joanna Briggs para estudos que relatam dados de prevalência (77).

3.2.2 Análise Estatística

As possíveis diferenças entre as características de meninas e meninos com mutações no *MKRN3* e entre as meninas de países asiáticos e países ocidentais foram analisadas com o teste não paramétrico de Mann-Whitney, pois os dados não seguiram uma distribuição normal. Significância estatística foi definida como $P < 0,05$. As análises foram realizadas com o software SPSS™ v.20.

Nos estudos elegíveis para a análise de prevalência, o número de pacientes com mutações no *MKRN3* (numerador) e o número total de pacientes rastreados (denominador) foram utilizados para se estimar a prevalência. A meta-análise foi realizada com o software StataCorp Software™ version 13 com o comando “metaprop”, e o modelo de efeito aleatório (*random effect model*) foi utilizado para se estimar a prevalência combinada e o IC95% (intervalo de confiança). Possíveis fatores de heterogeneidade foram avaliados através da análise de prevalência conforme os

seguintes subgrupos: sexo, história familiar e distribuição geográfica (países asiáticos e não asiáticos). A heterogeneidade foi avaliada com o teste estatístico do I^2 , no qual 25% ou menos, 50%-75% ou acima de 75% indicam baixa, moderada e alta heterogeneidade, respectivamente.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Seleção e Características dos Estudos Incluídos

Após a busca inicial, realizada em 06 de fevereiro de 2018 e atualizada em 04 de setembro de 2018, 31 artigos foram selecionados para a segunda fase, na qual os textos foram avaliados na íntegra. Por fim, 22 estudos preencheram os critérios de inclusão e 14 estudos, que totalizaram 857 pacientes com PPC idiopática rastreados para mutações no *MKRN3*, foram incluídos na meta-análise de prevalência. O fluxograma da figura 2 mostra o processo de seleção dos estudos e o apêndice 3 sumariza as características principais dos estudos incluídos.

Com relação ao risco de viés, dois estudos foram categorizados com risco moderado de viés e 20 foram classificados com baixo risco de viés (Apêndice 4).

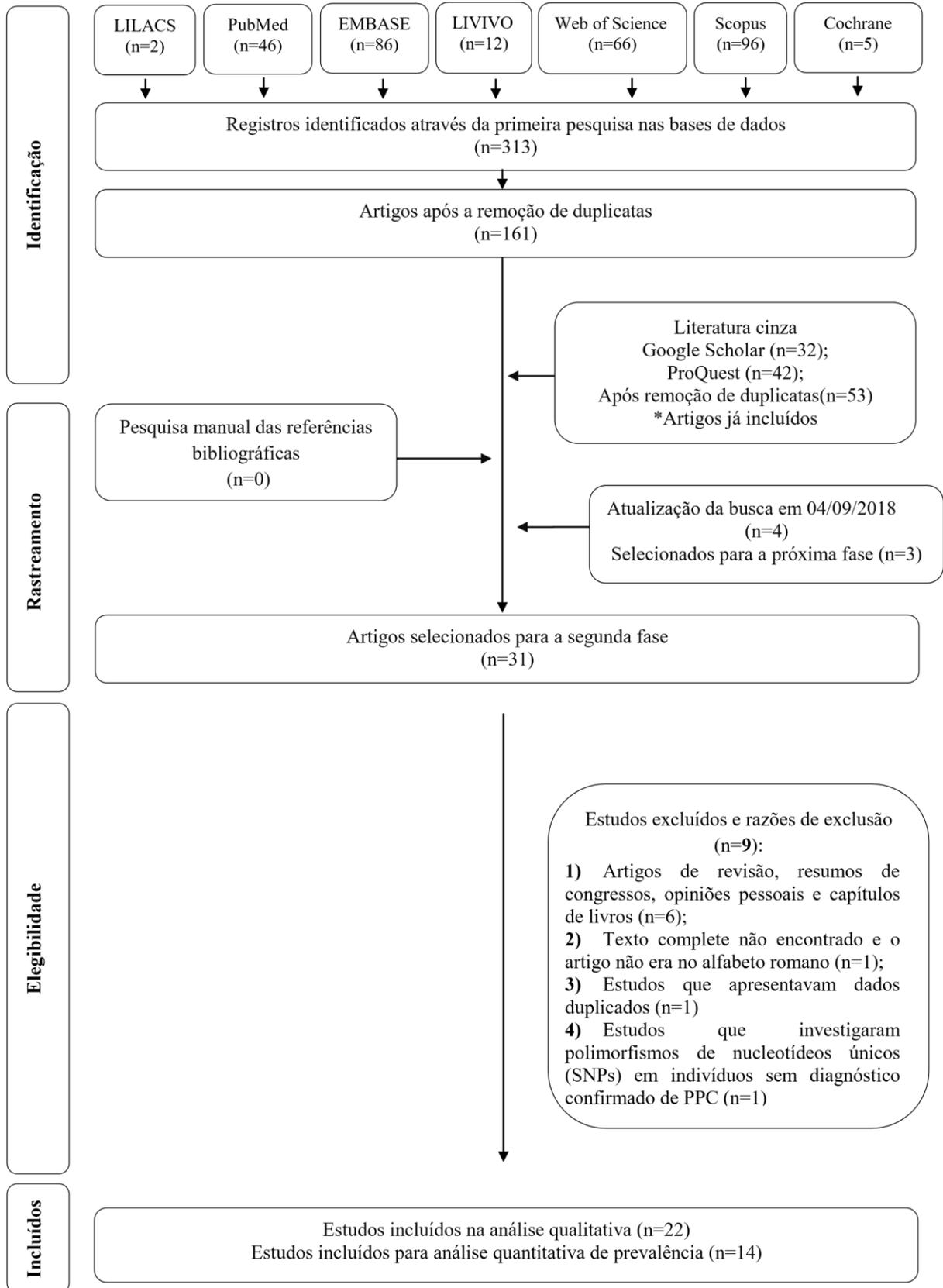


Figura 2 - Fluxograma do processo de seleção dos artigos

3.3.2 Características Demográficas e Fenótipo dos Indivíduos com Mutações no *MKRN3*

Mutações no *MKRN3* encontravam-se descritas em 89 pacientes (76 meninas e 13 meninos) com PPC de 17 países, a saber: Alemanha (36), Argentina (46), Bélgica (32), Brasil (32,34,46,78,79), Bulgária (44), Chipre (37), Coreia do Sul (43), Dinamarca (80), Espanha (45), Estados Unidos da América (32), França(39), Grécia (81,82), Israel (35), Itália (38,39,41), Japão (42), Taiwan (83) e Turquia (84)(Figura 3). Uma paciente apresentava uma deleção no promotor (78) e os demais mutações na sequência codificadora do gene.

Os pacientes com mutações no *MKRN3* exibiram o quadro clínico característico da reativação prematura do eixo HHG. Dismorfismos adicionais foram raros e incluíram esotropia em dois irmãos (32), além de clinodactilia e hiperlordose em duas meninas não relacionadas, uma das quais também com palato arqueado e anormalidades dentárias (34,38).

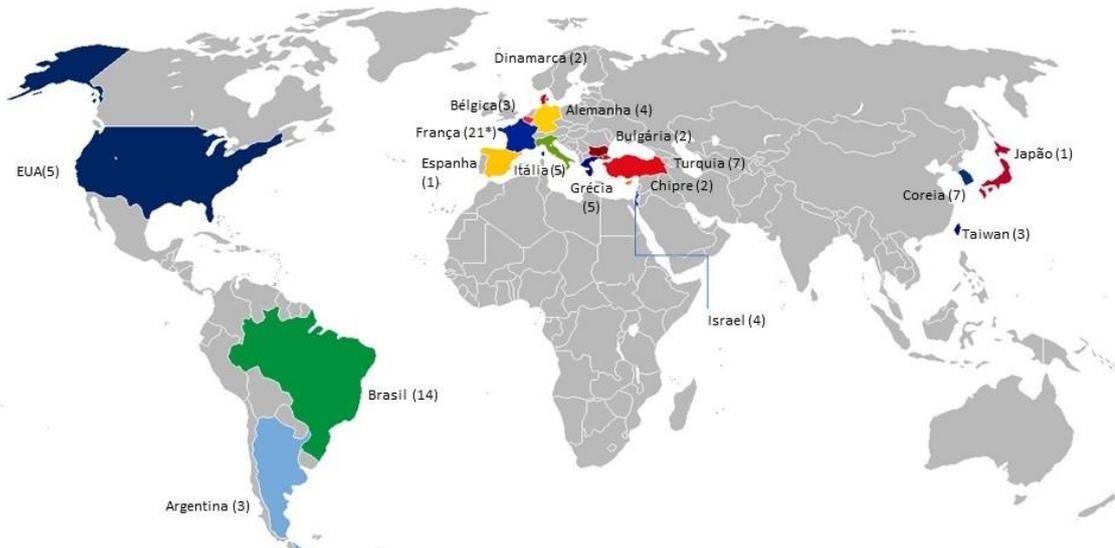


Figura 3 - Distribuição geográfica dos indivíduos com mutações no *MKRN3*

Na análise combinada, a idade mediana de início da puberdade nas meninas com mutações no *MKRN3* (n=76) foi 6,0 anos (variação de 3,0 a 7,8 anos). As meninas de países asiáticos apresentaram, em comparação às meninas de países ocidentais, idade mais elevada ao diagnóstico (mediana 8,0 anos, variação 6,8-10,3 anos, *versus* 6,7 anos, variação 3,6-8,4 anos, respectivamente $P < 0,001$), além de concentração de FSH basal mais baixa (3,0UI/L, variação de 0,8-7,64 UI/L, *versus* 4,5UI/L, variação 0,7-3,94 UI/L, respectivamente, $P = 0,042$)(Tabela 3).

Tabela 3 - Análise comparativa dos dados das meninas com mutações no *MKRN3* de países ocidentais (n = 65) e países asiáticos (n = 11).

Parâmetro	Meninas ocidentais	Meninas asiáticas	P
	Mediana (variação)	Mediana (variação)	
Idade ao início da puberdade, anos (64/6)	6,0 (3,0-7,5)	6,8 (5,0-7,80)	0,072
Idade ao diagnóstico, anos (61/11)	6,7 (3,6-8,4)	8,0 (6,8-10,3)	<0,001*
Δ IO, anos (58/11)	2,3 (-0,9-5,2)	2,1 (1,2-3,0)	0,928
FSH basal (UI/L) (58/11)	4,5 (0,7-13,94)	3,0 (0,8-7,64)	0,042*
LH basal (UI/L) (55/11)	1,1 (0,1-6,1)	1,6 (0,36-3,74)	0,454
LH pós-estímulo (UI/L) (54/9)	22,1 (4,9-95,9)	11,6 (5,6-52,5)	0,321
Estradiol (pg/mL) (52/2)	25,5 (2,0-80,0)	38,5 (29,0-48,0)	0,507

Na primeira coluna, os números entre parênteses referem-se ao número de pacientes de cada grupo com as informações disponíveis para análise comparativa; Δ IO: diferença entre idade óssea (IO) e idade cronológica (IC); * $P < 0,05$ com o teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos.

A idade mediana de início da puberdade nos meninos (n = 13) foi 8,5 anos (variação 5,9 a 9,0 anos). Em comparação aos meninos, as meninas exibiram idade mais baixa ao início da puberdade (2,0 anos abaixo do limite de idade específico para o sexo *versus* 0,5 anos abaixo desse limite nos meninos, $P = 0,001$), concentração de FSH basal mais elevada (mediana 4,3UI/L, variação 0,7-13,94 UI/L *versus* 2,45 UI/L variação 0,8-13,70UI/L nos meninos, $P = 0,003$) e maior avanço da idade óssea (Δ IO) (mediana 2,3 anos, *versus* 1,2 anos, respectivamente, $P = 0,01$)(Tabela 4).

Na análise comparativa conforme o subtipo de mutação e sua predição de gravidade, os pacientes com mutações *missense* apresentaram idade mais elevada ao diagnóstico em comparação aos pacientes com mutações que codificam códons de parada prematuros (*nonsense* e *frameshift*) e a deleção do promotor (7,72 anos, variação 3,6-10,3, *versus* 6,75 anos, variação 3,8-13,2 anos, respectivamente $P=0,028$)(Tabela 5). Digno de nota que se observou predomínio de mutações *missense* nas meninas de países asiáticos (82% dos casos), ao passo que nas meninas ocidentais, as mutações *missense* foram encontradas somente em 21 de 65 (32%) pacientes ($P=0,002$).

Tabela 4 - Análise comparativa dos dados das meninas (n = 76) e meninos (n = 13) com mutações no *MKRN3*.

Parâmetros clínicos e bioquímicos	Meninas	Meninos	P valor
	Mediana (variação)	Mediana (variação)	
Idade ao início da puberdade, anos (70/8)	6,0 (3,0- 7,8)	8,5 (5,9-9,00)	<0,001*
Δ Idade de início puberal (70/8)	2,0 (0,2-5,0)	0,5 (0,0-3,9)	0,001*
Idade ao diagnóstico, anos (72/12)	6,8 (3,6-10,3)	9,45 (8,1-13,2)	<0,001*
ΔIO, anos (69/11)	2,3 (-0,9-5,2)	1,2 (0,0-2,3)	0,01*
FSH basal (UI/L) (69/12)	4,3 (0,7-13,94)	2,45 (0,8-13,70)	0,003*
LH basal (UI/L) (66/12)	1,27 (0,1-6,1)	1,35 (0,7-5,41)	0,239
LH pós-estímulo (UI/L) (63/7)	22,0 (4,9-95,9)	13,9 (6,7-20,00)	0,089

Parâmetros clínicos e bioquímicos ao diagnóstico da PPC. Na primeira coluna, os números entre parênteses referem-se ao número de pacientes de cada grupo no qual a informação estava disponível para análise comparativa; Δ idade de início puberal expressa a diferença entre o limite inferior da normalidade específico para o sexo para o desenvolvimento puberal e a idade de início da puberdade; ΔIO diferença entre idade óssea (IO) e idade cronológica; * $P < 0,05$, utilizando o teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos.

Tabela 5 - Análise comparativa dos dados dos pacientes com mutações no *MKRN3* de acordo com subtipo de mutação.

Parâmetros clínicos e bioquímicos	Mutações graves* (n=52)	Mutações missense (n=37)	P valor
	Mediana (variação)	Mediana (variação)	
Idade ao início da puberdade, anos (51/27)	6,0 (3,0-9,0)	6,0 (3,5-8,5)	0,645
Idade ao diagnóstico, anos (48/36)	6,75 (3,8-13,2)	7,72 (3,6-10,3)	0,028*
Δ IO (44/36)	2,0 (-0,9-5,2)	2,5 (0,2-3,7)	0,166
FSH basal (UI/L) (47/34)	4,0 (0,7-13,94)	3,85 (0,8-8,9)	0,497
LH basal (UI/L) (44/34)	1,3 (0,1-6,1)	1,29 (0,2-3,74)	0,341
LH pós-estímulo (UI/L) (40/30)	20,0 (4,9-62,5)	19,75 (5,6-95,9)	0,506
Estradiol (pg/mL) (34/20)**	27,85 (5,0-80,0)	25,5 (2,0-61,0)	0,502
T (ng/mL) (5/5)***	216,0 (78,0-548,0)	198,8(41,0-466,0)	0,347

*Mutações graves incluíram as mutações *frameshift* (n = 43), *nonsense* (n = 8) e deleção do promotor (n = 1); Na primeira coluna, os números entre parênteses referem-se ao número de pacientes de cada grupo com as informações disponíveis para análise comparativa; Δ IO diferença entre idade óssea (IO) e idade cronológica; T: testosterona; *. P <0,05, com o teste U de Mann-Whitney para comparação entre os grupos. ** Análise comparativa de estradiol entre as meninas; *** A análise comparativa de testosterona entre os meninos.

Poucos estudos compararam as características dos pacientes com e sem mutações no *MKRN3* de forma que não foi possível efetuar meta-análise para avaliar associação genótipo-fenótipo.

Informações sobre o tratamento encontravam-se disponíveis em 54 casos e todos foram adequadamente tratados com análogos de GnRH, à exceção de duas meninas com antecedente de baixa adesão medicamentosa. Adicionalmente, a estatura final adulta parece estar dentro da altura alvo nos casos em que tal informação foi disponibilizada (34).

3.3.3 Categorização das Mutações Descritas

Mais de 30 mutações com perda de função na sequência codificadora (4 mutações *nonsense*, 13 *frameshift* e 22 *missense*) e uma deleção do promotor (c.-150_-147delTCAG) encontravam-se descritas em 89 pacientes com PPC (Figura 4).

As variantes *frameshift* resultaram na tradução de proteínas truncadas pela criação de códon de terminação prematuros. Digno de nota que as mutações *frameshift* identificadas em quase um terço dos pacientes (n=27) localizam-se em uma região rica em citosina entre os nucleotídeos 476 e 482, o que confirma este local como um *hotspot* gênico.

A maioria das mutações *missense* exibiram predição patogênica pela análise *in silico*. Destas, seis encontravam-se localizadas no domínio C3HC4 da proteína e cinco em domínios C3H1 (figura 4), que estão relacionados com a atividade de E3 - ubiquitina ligase e ligação ao RNA, respectivamente.

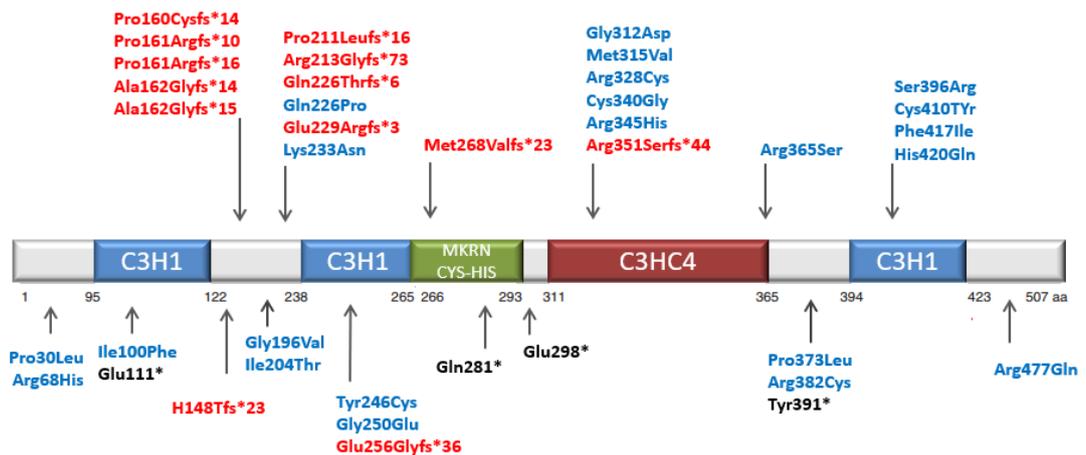


Figura 4 - Representação esquemática da proteína MKRN3 humana com a localização das mutações descritas. A numeração (1-507) corresponde à sequência dos aminoácidos na proteína. As mutações *missense* estão assinaladas em azul, as *nonsense* em preto e as mutações *frameshift* em vermelho. Notavelmente, 36% (14 de 39) das mutações estão localizadas entre dois domínios C3H1 na porção amino-terminal da proteína, sendo a maioria delas do tipo *frameshift*. O domínio C3HC4 é outra região onde as mutações tendem a se agrupar e nesse local, observa-se o predomínio de mutações *missense*.

Seis variantes *missense* apresentaram predição benigna pela análise *in silico*: p.Ile100Phe, p.Ile204Thr, p.Gln226Pro, p.Lys233Asn e p.Ser396Arg, descritas em meninas coreanas (43), e p.Arg477Gln, identificada em uma menina taiwanesa(83).

Outros mecanismos genéticos ou epigenéticos que poderiam interromper a expressão de um *imprinted* gene, como variações no número de cópias ou alterações do padrão de metilação do locus 15q11 não foram detectados (34,39), embora não tenham sido amplamente investigados.

3.3.4 Prevalência de Mutações no *MKRN3*

A prevalência geral combinada de mutações no *MKRN3* nos pacientes com PPC foi 9,0% (IC95% 0,04-0,15, I^2 80,91%, $P=0,00$; Figura 5). Curiosamente, a prevalência de mutações foi menor nos países asiáticos (2,0%, IC95% 0,01-0,04, I^2 0,0%) do que nos países não asiáticos (11,0%, IC95% 0,04-0,21, I^2 81,31%; Figura 6).

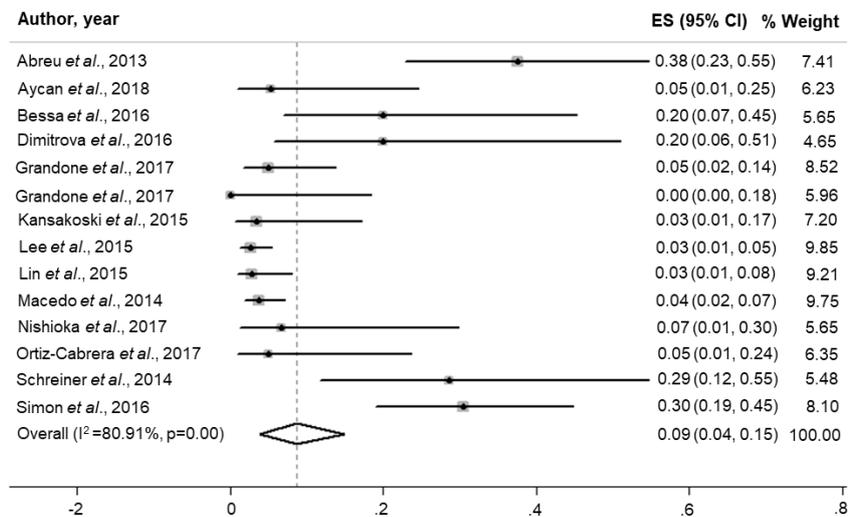


Figura 5 - Prevalência geral estimada de mutações *MKRN3* em indivíduos com PPC previamente classificada como idiopática

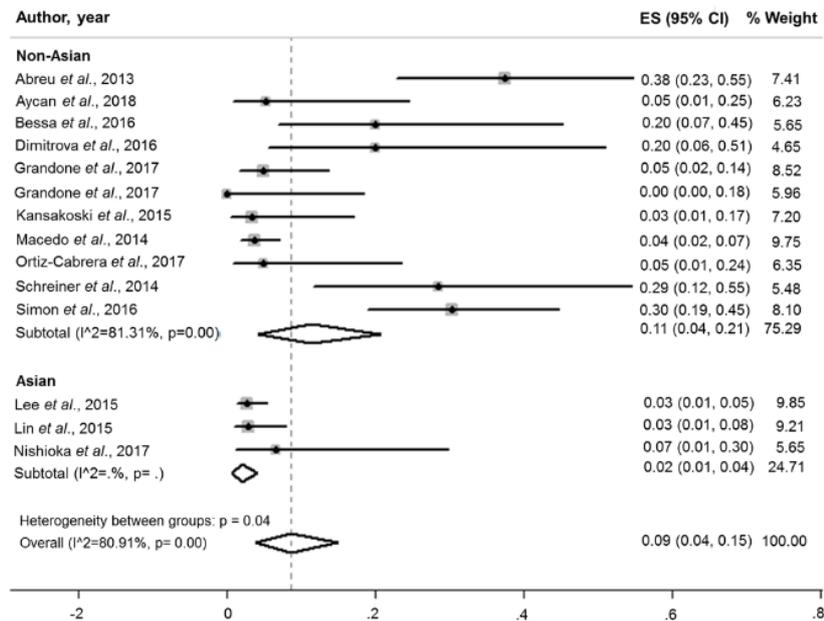


Figura 6 - Prevalência estimada de mutações no *MKRN3* em pacientes com PPC de países asiáticos e não-asiáticos.

Considerando-se a variação na prevalência de acordo com distribuição geográfica, os estudos de países asiáticos não foram incluídos na análise conforme a história familiar. A prevalência estimada de mutações no *MKRN3* nos pacientes com PPC familiar foi 19,0% (IC 95% 0,05-0,36, I^2 69,16%) e nos casos esporádicos 2,0% (IC 95% 0,01-0,04, I^2 0%) (Figura 7).

Por fim, na análise baseada no sexo, a prevalência estimada de mutações nos pacientes do sexo masculino foi maior do que no sexo feminino (22,0%, IC95% 0,0-0,62, I^2 70,19, *versus* 7,0%, IC95% 0,03-0,13, I^2 77,73), respectivamente. (Figura 8).

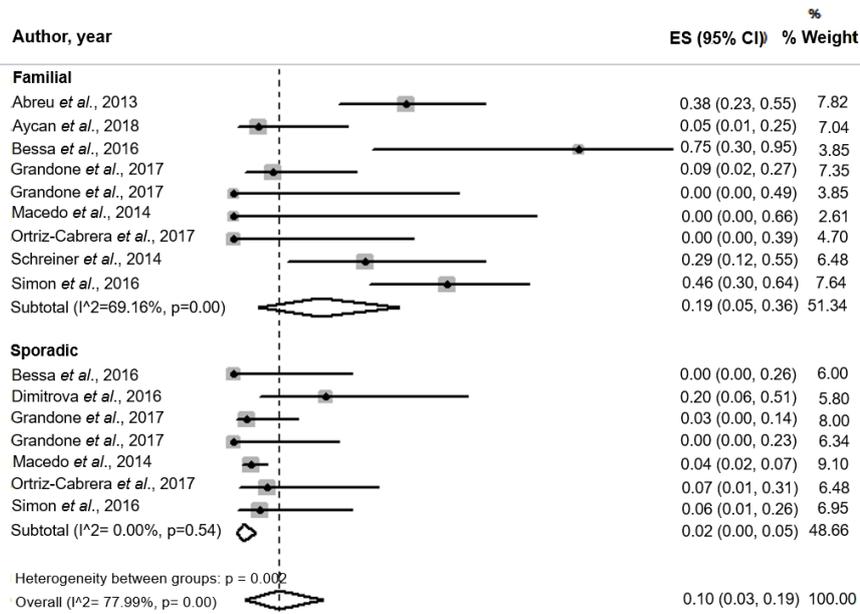


Figura 7 - Prevalência estimada de mutações no *MKRN3* de acordo com a história familiar.

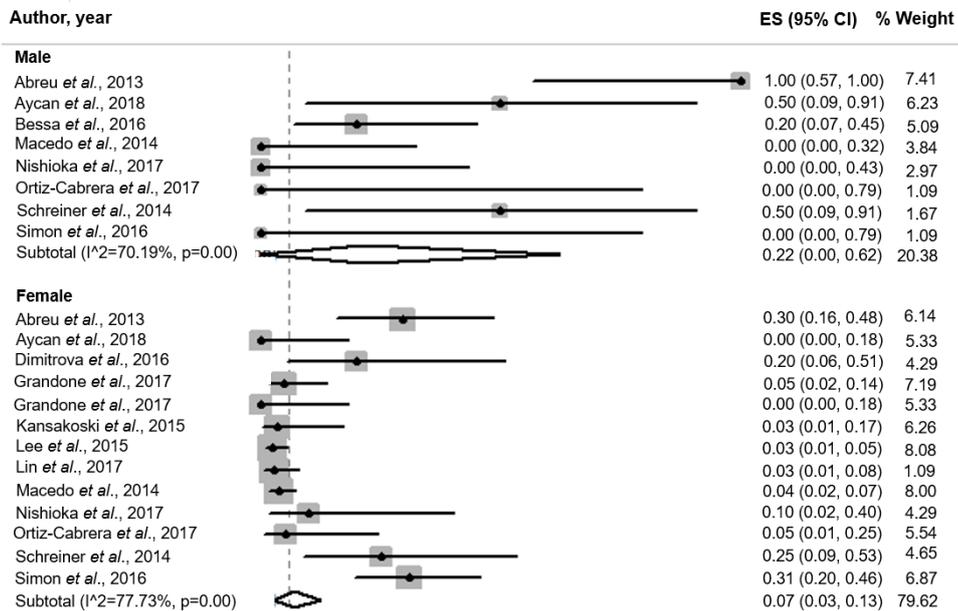


Figura 8 - Prevalência estimada de mutações no *MKRN3* de acordo com o sexo.

4 PARTE II – INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM PACIENTES COM PPC

4.1 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivos Gerais

Investigar alterações genéticas relacionadas à PPC idiopática, com ênfase no rastreamento de mutações no gene *MKRN3*, em indivíduos com PPC inicialmente classificada como idiopática atendidos nos ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital da Criança de Brasília José Alencar (HCB).

4.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de mutações no *MKRN3* e estimar a sua prevalência entre os indivíduos com PPC inicialmente classificada como idiopática atendidos nos ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica do HUB e do HCB.
- Comparar as características clínicas e bioquímicas dos indivíduos com e sem mutações no *MKRN3*, para se tentar estabelecer possível relação genótipo – fenótipo.
- Investigar a presença de mutações nos genes que codificam a kisspeptina e seu receptor (*KISS1* e *KISS1R*, respectivamente) em uma amostra de pacientes sem mutações no *MKRN3* detectadas pelo sequenciamento automático.

- Investigar a possibilidade de mutação com ganho de função no *GNRHR* em um caso específico de PPC idiopática de início precoce e refratária ao tratamento convencional em criança do sexo masculino.
- Comparar a frequência alélica dos SNPs encontrados nos genes *MKRN3*, *KISS1* e *KISS1R* entre os indivíduos com PPC e a população geral, utilizando-se como grupo controle o banco de dados do ExAC (Exoma Aggregation Consortium).
- Investigar a presença de variações do número de cópias (CNV) cromossômicas em pacientes com PPC idiopática associada a malformações congênitas ou distúrbios adicionais, nos quais mutações no *MKRN3* não tenham sido identificadas pelo sequenciamento automático.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Participantes do Estudo

Os indivíduos com PPC inicialmente classificada como idiopática foram recrutados nos ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica do HUB e do HCB. O diagnóstico da PPC foi realizado conforme os seguintes critérios: desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos de idade nas meninas e antes dos 9 anos nos meninos, aumento da VC, avanço da IO, concentração de LH basal e/ou após estímulo com GnRH ou análogo de longa duração na faixa puberal e ausência de anormalidades neurológicas.

Os dados clínicos relevantes, tais como idade de início da puberdade, idade ao diagnóstico, resultados dos exames laboratoriais e radiológicos foram obtidos a partir da análise retrospectiva dos prontuários. Os caracteres sexuais secundários foram classificados de acordo com os critérios clínicos de Marshall e Tanner (4,5). A IO foi determinada através da realização de radiografias da mão e punho não dominante pelo método de Greulich e Pyle e considerou-se avanço a diferença de ao menos 1 ano acima da idade cronológica (85).

As concentrações de LH e FSH foram determinadas por método imunofluorométrico (IFMA), imunoquimioluminescência (ICMA) ou eletroquimioluminescência (ECLIA) e as concentrações de testosterona e estradiol por quimioluminescência. As concentrações de LH basal $> 0,6\text{UI/L}$ (IFMA) ou $> 0,3\text{UI/L}$ (ICMA ou ECLIA) em ambos os sexos foram consideradas púberes (14). Nos casos em que o resultado do LH basal foi pré-púbere, procedeu-se à dosagem de LH após estímulo com GnRH (100 μg por via intravenosa no tempo zero, com coleta de sangue nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos) ou 2 horas após a aplicação do análogo do GnRH de longa duração. O ponto de corte do pico de LH adotado para o diagnóstico de PPC foi $> 5,0\text{ U/L}$ (ICMA) no caso do estímulo com GnRH e $> 8\text{ UI/}$ (ECLIA) no teste com o análogo do GnRH (2,14,85).

A ultrassonografia pélvica das meninas é útil na avaliação da forma, do comprimento uterino e do volume ovariano. O útero com aspecto piriforme, comprimento superior à 3,4 cm e aumento da espessura endometrial foi indicativo de

estimulação estrogênica persistente. Os ovários com volume superior à $1,8 \text{ cm}^3$ foram considerados como indicativos de estimulação gonadotrófica (14,85).

A avaliação por imagem do SNC, através da realização de RM de encéfalo ou sela túrcica, foi realizada rotineiramente nos sujeitos do sexo masculino e nas meninas com idade de início da puberdade inferior a 6 anos. O exame de imagem do SNC não foi realizado rotineiramente nas meninas aparentemente híginas, com início da puberdade entre 6 e 8 anos de idade e sem quaisquer sinais ou sintomas neurológicos associados (15–17,85).

A resposta ao tratamento foi considerada satisfatória quando foi observada redução da VC e da maturação óssea, estabilização ou regressão dos caracteres sexuais secundários e valores de gonadotrofinas e esteroides sexuais dentro da faixa pre-puberal. Um pico de LH obtido 2 horas após estímulo com o análogo de GnRH de longa duração $< 4,0 \text{ UI/L}$ (ICMA, ECLIA ou IFMA) foi considerado indicativo de bloqueio puberal adequado (14).

Foram excluídos os pacientes com as seguintes condições: alterações anatômicas no SNC como hidrocefalia, esquizencefalia ou tumores, encefalopatia crônica não progressiva (sequela de anóxia perinatal), pubarca isolada precoce ou telarca isolada precoce, puberdade precoce periférica (produção de esteroides independente de gonadotrofinas) e antecedente de radioterapia do SNC.

4.2.2 Considerações Éticas

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS-UnB), conforme parecer substanciado 1.140.009 emitido em 08/07/2015, e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde, Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (FEPECS/SES-DF), conforme o parecer substanciado 1.152.221 de 13/07/2015 (Anexos I e II). A aprovação seguiu as recomendações da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde.

Todos os participantes foram incluídos mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos (TCLE) pelos seus pais ou responsáveis legais. Adicionalmente, também foi obtida a assinatura do Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) pelo menor (Apêndices 5 e 6, respectivamente).

4.2.3 Análise molecular dos Genes *MKRN3*, *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR*

4.2.3.1 Extração e Quantificação do DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos obtidos a partir de uma alíquota de sangue colhido por punção venosa periférica em um tubo contendo o anticoagulante EDTA.

Nas amostras de sangue de quatro pacientes, a extração do DNA foi feita pelo método de extração a sal, a partir de protocolo adaptado de Miller e colaboradores (86). Nos demais indivíduos, procedeu-se à extração utilizando-se o kit de extração de DNA de alta pureza DNA QIAmp Kit® (Qiagen), conforme as orientações do fabricante.

A quantificação e a pureza do DNA extraído foi avaliada utilizando-se o espectrofotômetro NanoVue Plus (GE Eletronics®), que quantifica ácidos nucleicos à um comprimento de onda de 260nm. A pureza do DNA pode ser avaliada pela razão entre a quantificação a 260nm e 280nm (que corresponde à absorbância para proteínas). Quando a razão se mostrou superior a 1,7, a pureza do DNA foi considerada satisfatória. As amostras foram armazenadas a -20°C para a posterior utilização.

4.2.3.2 Amplificação dos Genes de Interesse por Reação em Cadeia da Polimerase

O gene *MKRN3* foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos (Tabela 6), em todos os participantes do estudo.

A sequência codificadora dos genes *KISS1* e *KISS1R*, bem como as junções entre os exons e introns, foram amplificadas por PCR em um subgrupo de pacientes sem

mutações patogênicas no gene *MKRN3*. O gene que codifica o receptor do GnRH (*GNRHR*) foi estudado em um menino com PPC idiopática de início precoce e refratária ao tratamento convencional, no qual mutações nos genes *MKRN3*, *KISS1* e *KISS1R* não foram encontradas. A tabela 7 mostra a sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR*.

Cada reação unitária de amplificação foi realizada em um volume final de 50µL, contendo 100ng de DNA genômico, 1,25pmol de cada *primer* e 25µL do kit GoTaq® green master mix (Promega®). As condições de amplificação de cada gene são mostradas na tabela 8.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados através de luz ultravioleta para confirmação da amplificação do produto de interesse. Foram aplicados 8µL do produto de PCR em cada poço do gel de agarose e, para a definição dos pesos moleculares, foram utilizados 4µL do marcador de peso molecular 1kb plus (Invitrogen®).

Posteriormente, procedeu-se à purificação dos produtos de PCR com a utilização do kit QIAquick PCR purification (Qiagen®), de acordo com as orientações do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram enviados para sequenciamento automático bidirecional pelo método de Sanger, com a utilização dos mesmos *primers* da reação de PCR.

A sequência referência de cada gene foi obtida do Ensembl e os resultados do sequenciamento foram analisados com o auxílio do software Sequencher v.5.0 ou 6.0 (Gene Codes Corporation®).

Tabela 6 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do *MKRN3*

GENE		Primer (5' > 3')	Tamanho do produto
MKRN3	Fragmento 1	1F: GCCTCAAGCCCATAAAGAAA 1R: AGCCATCTGCTTCCTCTCAG	774pb
	Fragmento 2	2F: GGCATTTGGACAAAGCAGA 2R: CACTGGGAATGACCAATTC	847pb
	Fragmento 3	3F: CCAATTGCAACCATTCTTC 3R: CACCATAATCCTAGGGGAAA	784pb

F: *Primer forward*; R: *primer reverso*; pb: pares de bases.

Tabela 7 - Sequência dos oligonucleotídeos para amplificação dos genes *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR*

GENE		Primer (5' > 3')	Tamanho do produto
KISS1*	Exon 2	2F: CAGATCCTGTGCCTGACCT 2R: TTGCAACAACCCACTTGCT	238pb
	Exon 3	3F: GTGTTGCAAAGCCATCTTTC 3R: TCTTTTATTGCCTCGGGTTG	500pb
KISS1R	Exon 1	1F: GCTGGGTGAATAGAGGGC 1R: GGAGTTTGCACCTCTAGC	722pb
	Exon 2	2F: CCATCCTGCTGGTCACTCG 2R: CACTGCGGAGCGCACTCC	352pb
	Exon 3	3F: TCTCAGACTCGGGGTATCAGC 3R: GAGCTATTGCGCCCATTTTCC	486pb
	Exon 4	3F: GCATCTGGAAAATGGGCGC 4R: GGAAGGCGTAGAGCAGCG	817pb
	Exon 5	5F: GGAGGACAGCAAGGCTGG 5R: AAAGTGCACCGAACGTCACA	769pb
GNRHR	Exon 1	1F: ATGCACCAGAGACACAAGGC 1R: ACAGTACTTCCTTTGATAAGACCT	655pb
	Exon 2	2F: AGAAGGCTAGCAGGTACCA 2R: CCAGCAGAAACCATTTGCCA	600pb
	Exon 3	3F: ACTTTGGCAGAAATAAGAGCA 3R: TTGAGGCTCTGAAGACTGAGTT	635pb

Exon 1 do *KISS1* não codante; F: *Primer forward*; R: *primer reverso*; pb: pares de bases

Tabela 8 - Parâmetros de amplificação dos genes estudados

Gene		Desnaturação inicial	Ciclos (desnaturação, anelamento extensão)	Extensão final
<i>MKRN3</i>	Fragmentos 1, 2 e 3	95°C 5min	(95°C 30s; 56°C 30s; 72°C 1min) x 35	72° C 10 min
	<i>KISS1</i>			
	Exon 2	94°C 5min	(94°C 30s; 57°C 30s; 72°C 45s) x 35	72° C 10 min
	Exon 3	95°C 10min	(95°C 45s; 55°C 30s; 68°C 1min) x 35	72° C 10 min
<i>KISS1R</i>	Exon 1	95°C 5 min	(95°C 45s, 58°C 45s, 72°C 1min) x 35	72° C 10 min
	Exons 2, 3 e 4	95°C 5min	(95° 45s, 62°C 45s, 72°C 1min) x 35	72° C 10 min
	Exon 5	95°C 5min	(95°C 45s, 60°C 45s, 72°C 1min) x 35	72° C 10 min
	<i>GNRHR</i>			
	Exons 1, 2 e 3	95°C 5 min	(95°C 30s; 55°C 30s; 72°C 1min) x 35	72° C 10 min

4.2.4 Análise *In Silico* do Impacto de Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos Não Sinônimos

A predição da natureza patogênica das substituições não sinônimas de nucleotídeo único foi realizada através de softwares específicos, como o PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping version 2; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e o Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>).

4.2.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS™ v.20 e o teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para a comparação dos dados clínicos e bioquímicos das pacientes com e sem mutações no *MKRN3*, visto que não foi observada uma distribuição normal dos dados. Considerou-se diferença estatisticamente significativa o valor de $P < 0,05$.

4.2.6 Análise Cromossômica por Microarranjo

A análise cromossômica por microarranjo (CMA) permite detectar, simultaneamente, microdeleções ou microduplicações em milhares de sequências-alvo do genoma humano, além de detectar regiões de perda de heterozigose ou dissomias uniparentais. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em um chip de DNA (*GeneChip*[®]).

A presença de alterações cromossômicas submicroscópicas foi investigada com a técnica da CMA em três pacientes com PPC idiopática com malformações congênitas ou dismorfismos associados e sem mutações no *MKRN3* detectadas pelo sequenciamento automático. Este estudo foi realizado no Laboratório de Genética da UnB, com a colaboração da professora Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo.

A CMA foi realizada utilizando-se a plataforma *CytoScan*[®] 750K Array (*Affymetrix*, EUA) e as configurações disponíveis no *GeneChip*[®] Scanner 3000 7G System (*Affymetrix*, EUA). Esta plataforma permite a detecção de CNVs por meio de microarranjos de DNA formados por 550 mil sondas não polimórficas para CNVs de regiões codantes e não codantes do genoma humano, cobrindo uma distância média de 4.1 Kb, e cerca de 200 mil sondas de SNPs. Desta forma, é possível cobrir 100% dos genes do ISCA (International Standard for Citogenomic Array) Consortium, 83% dos genes do *OMIM* (*Online Mendelian Inheritance in Man*) e 80% dos genes do *RefSeq* (*NCBI Reference Sequence Database*).

A figura 9 mostra a representação esquemática das etapas envolvidas na realização da CMA. Resumidamente, as amostras do DNA genômico foram digeridas com a enzima *NspI* e os fragmentos ligados com adaptadores específicos para a posterior amplificação por PCR. Na etapa subsequente, os produtos de PCR foram purificados com esferas magnéticas, fragmentados com a enzima *DNAse I* e então marcados com biotina. Na próxima etapa, o DNA biotinilado foi depositado em cada um dos *GeneChips*[®] com os oligonucleotídeos pre-arranjados. O *GeneChip*[®] com DNA é incubado no forno de hibridação a 50°, durante 16 a 18 horas, a 60 rotações por minuto. Após a incubação, as amostras são lavadas e marcadas com fluoróforos na estação automatizada de lavagem *Fluidics Station 450*. Por fim, os microarranjos

são escaneados através do *software Affymetrix GeneChip Command Console* (Affymetrix, EUA), para a detecção dos diferentes níveis de fluorescência emitidos por cada sonda no *GeneChip®* e geração dos arquivos com extensão .CEL.(87)

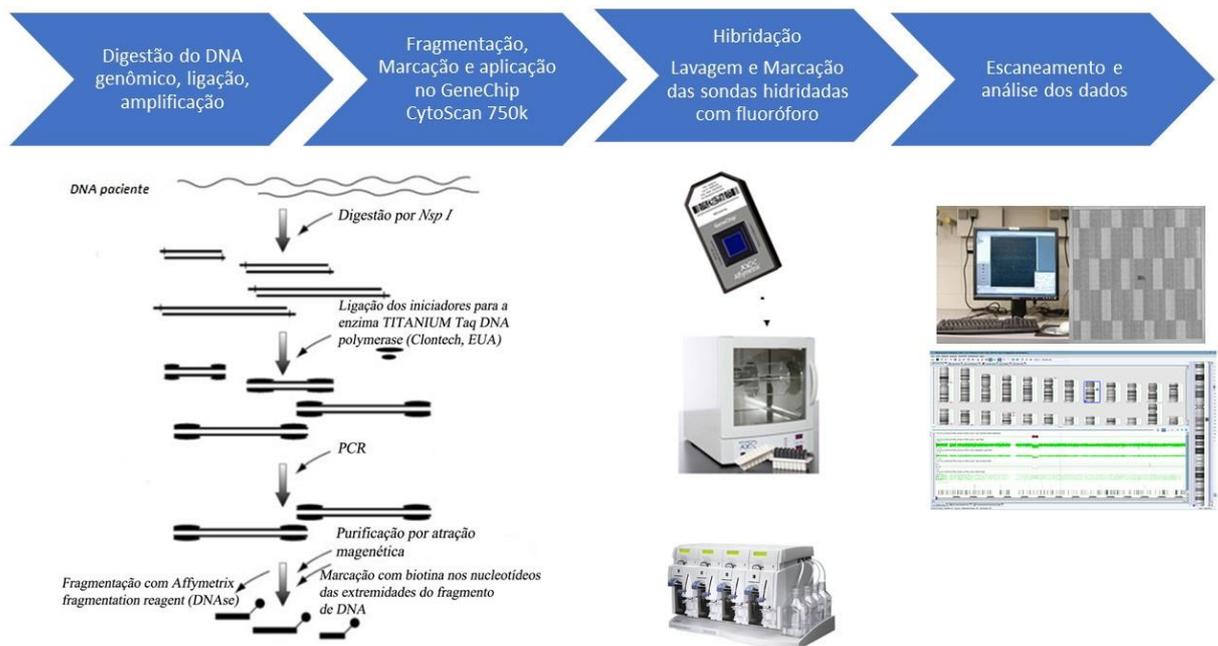


Figura 9 - Fluxograma simplificado da análise cromossômica por microarranjo. Adaptado da referência 16.

Os dados dos arquivos .CEL foram então avaliados com o *Chromosome Analysis Suite Software (ChAS)* versão 3.0 (Affymetrix, EUA). Esse software converte e normaliza os dados brutos, através da utilização de algoritmos específicos, por meio da combinação das fluorescências obtidas com os dados de fluorescência disponíveis no banco de dados de referência. O software permite que os dados resultantes da análise da hibridação sejam comparados com os dados genômicos disponíveis em banco de dados genômicos como o *OMIM*, *RefSeq*, *Database of Genomic Variants (DGV)* e o *DECIPHER* (banco que compila dados sobre alterações patogênicas em síndromes genéticas conhecidas, disponível em <https://decipher.sanger.ac.uk>).

As CNVs encontradas foram categorizadas em benignas, patogênicas e variantes de significado incerto (VOUS, *variant of uncertain significance*), conforme as

diretrizes do *American College of Medical Genetics* (88) e a classificação proposta por Srebniak e colaboradores (89) (Tabela 9).

Tabela 9 - Classificação das variações de número de cópias (CNVs) cromossômicas

Classificação da CNV	Descrição
Patogênica	A CNV é documentada como clinicamente significativa em diversas publicações, mesmo que a sua penetrância e expressividade sejam variáveis. A alteração tem clara relação com o fenótipo ou a indicação clínica.
Benigna	A CNV está presente em grandes grupos controles de indivíduos saudáveis e não parecem associadas a nenhum quadro clínico. A CNV representa um polimorfismo frequente (presente em > 1% da população geral).
VOUS	Não são observadas na população normal e contêm genes cujas funções são pouco conhecidas e não se sabe se os mesmos seriam sensíveis a dosagem.
VOUS, potencialmente benigna	A CNV não tem genes no intervalo (mas seu tamanho excede o critério adotado pelo laboratório). É descrita em número pequeno de casos nas bases de dados da população geral, mas não representa um polimorfismo frequente.
VOUS, potencialmente patogênica	Sem evidência suficiente de patogenicidade. A CNV contêm gene no intervalo com função bem definida e relevante para os achados do paciente em questão. A CNV é descrita em poucos relatos de casos, mas com <i>breakpoint</i> e fenótipo bem definido, que são relevantes para o caso em questão.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização Clínica dos Participantes do Estudo

Foram incluídos 63 pacientes com PPC inicialmente classificada como idiopática: 57 (90,4%) meninas e 6(9,5%) meninos, o que representa cerca de 9 meninas afetadas para cada menino acometido. Dos 6 pacientes do sexo masculino, 2 eram gêmeos monozigóticos.

A idade mediana de início da puberdade foi 6,3 anos (variação de 0,1 a 7,8 anos) nas meninas e 7,25 anos (variação 2,6 a 9,0 anos) nos meninos e a idade mediana ao diagnóstico da PPC foi de 8,0 anos (1,5 – 10,0) nas meninas e 9,6 anos (3,6 a 10,2) nos meninos. A tabela 10 mostra a caracterização geral das meninas e dos meninos incluídos no estudo e o apêndice 7 detalha os parâmetros de cada participante.

Malformações congênitas, dismorfismos ou outras condições pré-existentes foram infreqüentes entre os participantes do estudo e incluíram cardiopatia congênita (comunicação interatrial – 1 menina), vitiligo (uma paciente), dislexia (uma paciente), hérnia inguinal (uma menina), e um menino com transtorno do espectro autista (TEA). Adicionalmente, os meninos gêmeos monozigóticos apresentavam antecedente de hipospádia e hérnia inguinal corrigidas cirurgicamente na infância, encurtamento e deformidade angular do fêmur e ambos evoluíram com policitemia no início da segunda década de vida, para a qual fazem acompanhamento com hematologista.

História familiar de puberdade precoce encontrava-se presente em 18 (28,5%) pacientes, dos quais quatro referiam história familiar de PPC do lado materno, três do lado paterno e nos demais o padrão de herança não estava definido; 35 (55,5%) apresentavam história familiar negativa de PPC e em 10(16%) participantes os dados sobre a história familiar não eram conhecidos.

O exame de imagem do SNC (RM) foi realizado em todos os meninos e não foram detectadas alterações no SNC em nenhum deles. Com relação às meninas, 32 foram submetidas a avaliação por imagem do SNC e não foram constatadas alterações na região hipotalâmica-hipofisária em nenhuma delas. O exame de imagem foi

considerado prescindível em 25 meninas com início da puberdade entre 6 e 8 anos e que não apresentavam sinais ou sintomas neurológicos associados.

A triptorelina foi o análogo do GnRH utilizado para o tratamento na maioria dos casos. Uma menina e os meninos gêmeos monozigóticos não foram submetidos ao bloqueio puberal pelo diagnóstico tardio. Um menino, com início do desenvolvimento puberal aos 2,6 anos e o diagnóstico de PPC confirmado aos 3,6 anos, não apresentou resposta adequada à triptorelina, mesmo com a sua administração quinzenal, mantendo progressão dos caracteres sexuais secundários, VC elevada e avanço progressivo da IO. Nesse caso específico, o cetoconazol, pelo seu potencial efeito inibitório na esteroidogênese, foi associado ao esquema terapêutico na tentativa de se frear a progressão da puberdade.

Tabela 10 - Caracterização geral dos pacientes com PPC incluídos no estudo

Parâmetro avaliado	Meninas (n=53*)	Meninos (N=6)
Início da puberdade, anos	6,30 (0,1-7,8)	7,25 (2,6-9,0)
Idade ao diagnóstico, anos	8,0 (1,5-10,0)	9,6(3,6-10,2)
Estatura, Z-score	1,075(-0,07-2,94)	+0,78 (+0,39-+3,85)
Peso, Z-score	1,05 (-,25-2,69)	+0,98 (+0,39-+3,11)
IMC, Z-score	0,7(-1,53-2,63)	+1,09 (-0,12-+1,65)
IO, anos	11,0(2,7-13,6)	11,65 (9,0-13,5)
Δ IO	2,5(0,1-4,9)	3,0 (0,1-6,7)
FSH basal, UI/L	4,0(0,61-9,86)	2,55 (0,75-9,41)
LH basal, UI/L	1,49(0,02-8,73)	1,87 (0,8-2,9)
LH pos-estimulo, UI/L**	13,1(2,94-55,6)	-
Estradiol, pg/mL	29,00(0,3-119,0)	-
Testosterona ng/dL	-	196 (27-464)
Volume uterino, cm ³	6,2(1,7-44,6)	-
Volume ovariano, cm ³	3,00 (0,9-6,7)	-

Parâmetros ao diagnóstico da PPC. Dados expressos em mediana e amplitude (mínimo e máximo); IMC: índice de massa corporal; IO: idade óssea; Δ IO representa o avanço da idade óssea (diferença entre a IO e a idade cronológica); *Informações de 4 meninas não se encontravam disponíveis.**Dosagem de LH pós-estimulo foi realizada em 21 meninas.

4.3.2 Pesquisa de Mutações no Gene *MKRN3*

Mutações com perda de função no *MKRN3* foram encontradas em 6 meninas provenientes de 5 famílias. Notadamente, nenhuma mutação foi detectada nos 6 pacientes do sexo masculino. Esses resultados representam uma prevalência geral de mutações de 9,5% em nossa série. Considerando-se especificamente o sexo feminino, a prevalência de mutações no *MKRN3* foi 10,5%. Nos casos esporádicos (história familiar de puberdade precoce negativa), as mutações no *MKRN3* foram encontradas em 3 de 35 pacientes, ao passo que nos casos familiares foram encontradas em 3 de 18 indivíduos (Tabela 11).

Tabela 11 - Prevalência de mutações no *MKRN3* nos pacientes com PPC do presente estudo

Variável	Pacientes rastreados	Pacientes com mutação	Prevalência (%)
Prevalência geral	63	6	9,5%
Sexo			
Feminino	57	6	10,5%
Masculino	6	0	0%
Forma da PPC*			
Esporádica	35	3	8,6%
Familiar	18	3	16,7%

* Pacientes com HF desconhecida de PPC não foram computados para o cálculo de prevalência de acordo com a forma da PPC.

A mutação c.482delC em heterozigose foi detectada em três meninas não relacionadas com PPC aparentemente esporádica. A deleção da citosina nesse ponto leva à alteração da sequência de leitura a partir do códon 161, com geração de um códon de terminação prematuro 10 códons adiante do ponto da deleção, e resulta em uma proteína truncada de 171 aminoácidos (p.Pro161Argfs*10). Esta mutação foi previamente descrita em pacientes brasileiras e em uma menina búlgara (34,44).

Outra variante *frameshift* (475_476insC) foi encontrada em uma menina com PPC que possuía uma irmã gêmea dizigótica não afetada e carreadora do alelo selvagem. A inserção da citosina nessa posição leva à alteração da sequência de leitura a partir do códon 162 com a tradução de uma proteína truncada (p.Ala162Glyfs*14), e também foi previamente descrita (32,36).

Por fim, a mutação *missense* em heterozigose c.982C>T, que leva à substituição de uma arginina na posição 328 da cadeia polipeptídica da proteína por uma cisteína (p.Arg328Cys), foi encontrada em duas irmãs afetadas. A mutação localiza-se no anel de zinco C3HC4 e a arginina nessa posição é altamente conservada entre as espécies. Essa mutação foi considerada patogênica pelas predições *in silico* realizadas com o PolyPhen 2 e o Mutation Taster e foi previamente descrita em uma menina francesa, uma italiana e em meninos da Argentina (39,41,46)

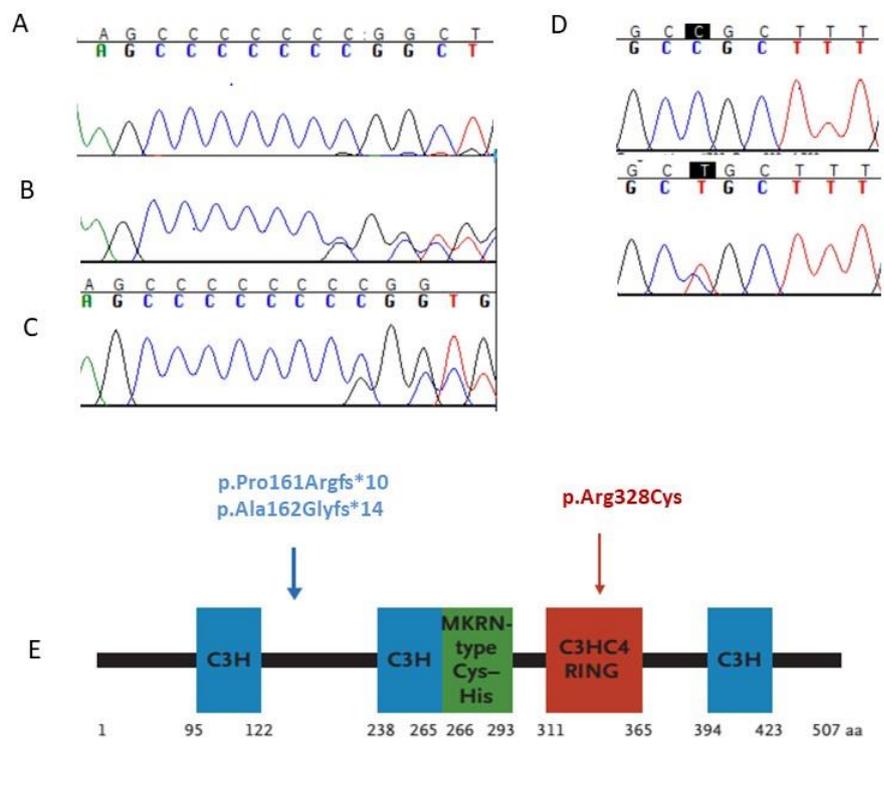


Figura 10 - Parte do cromatograma do sequenciamento do *MKRN3* com as mutações encontradas no presente estudo (A-D) e representação esquemática das mutações na proteína (E). (A) mostra parte do alelo selvagem, no qual se visualiza uma sequência rica em citosinas representadas pelas letra C e ondas azuis; (B) mostra a perda de uma citosina em heterozigose (c.482delC), com alteração da sequência de leitura a partir do ponto da deleção; (C) mostra a inserção de uma citosina (475_476insC), que também é seguida de alteração na sequência de leitura; (D) painel superior mostra o alelo selvagem e o painel inferior a mutação c.982C>T em heterozigose. (E) representação da proteína *MKRN3* com a localização das mutações assinaladas. As mutações p.Pro161Argfs*10 e p.Ala162Glyfs*14 localizam-se em uma região rica em citosina entre dois domínios C3H1 na porção aminoterminal da proteína (representados em azul); a mutação p.Arg328Cys localiza-se no anel de zinco C3HC4 (representado em vermelho).

4.3.2.1 Fenótipo das pacientes com mutações no *MKRN3*

As meninas com mutação no *MKRN3* exibiram o quadro característico da reativação prematura do eixo HHG, com desenvolvimento prematuro e progressivo dos caracteres sexuais secundários, aumento da VC e concentrações púberes do LH basal (Tabela 12). Quatro meninas apresentaram, ao diagnóstico, telarca e pubarca simultaneamente e em duas observou-se a presença de telarca isoladamente. Dismorfismos adicionais ou características sindrômicas específicas não foram observadas em nenhuma delas. A menina (paciente 6, tabela 12) que possuía uma irmã gemelar dizigótica apresentava antecedente de prematuridade (34 semanas) e atraso do desenvolvimento motor (adquiriu capacidade para marcha por volta dos 2 anos).

Nas meninas com mutação, a idade de início da puberdade variou de 3,0 a 7,0 anos, com média de 5,3 anos e mediana de 5,5 anos. A mediana do avanço da IO (Δ IO) foi 3,7 anos, com variação de 0,1 a 4,9 anos. As medianas das concentrações basais de FSH e LH ao diagnóstico foram 5,45UI/L (variação 3,50 - 9,86UI/L) e 2,33UI/L (variação 1,32 - 5,54 UI/L), respectivamente (Tabelas 12 e 13).

As meninas com mutação foram tratadas com o análogo do GnRH triptorrelina. O tratamento foi concluído em duas pacientes e as demais se encontram em uso da medicação. Uma menina (paciente 5 - Tabela 12) necessitou de redução no intervalo das doses (administração da triptorrelina a cada 21 dias) para a obtenção do bloqueio puberal adequado. As demais exibiram resposta terapêutica satisfatória com o uso da triptorrelina na dose padrão preconizada (3,75mg a cada 28 dias).

Tabela 12 - Caracterização clínica e bioquímica das meninas com mutação no *MKRN3*

Paciente / Família	Início puberal	Idade diagnóstico	Tanner	Estatura Z-score	Peso Z-score	IMC Z-score	IO	Δ IO	FSH basal UI/L	LH basal UI/L	E pg/mL	Volume uterino (cm ³)	Sequenciamento do MKRN3 (cDNA/proteína)
1 Família 1	3	5,9	M3P1	2,41	1,51	0,59	9,7	3,8	8,20	1,76	-	7,7	482delC / p.Pro161Argfs*10
2 Família 2	5	7,6	M4P2	-0,07	1,08	1,39	11,5	3,9	5,06	1,74	32	5	482delC / p.Pro161Argfs*10
3 Família 3	7	7,9	M3P2	1,9	2,69	2,63	11	3,3	5,84	3,20	63,3	32	c.982 C>T / p.Arg328Cys
4 Família 3	6	7,1	M2P2	1,57	2,35	2,11	10,5	3,6	9,86	2,90	76,8	4,95	c.982 C>T / p.Arg328Cys
5 Família 4	6	7,9	M3P1	0,11	0	-0,13	8	0,1	4,45	1,32	33	7,8	482delC / p.Pro161Argfs*10
6 Família 5	4,8	5,9	M4P2	2,8	2,08	1,31	10,7	4,9	3,50	5,54	42,1	13,8	475_476insC (Ala162Glyfs*14)

IMC: índice de massa corporal; IO: idade óssea; Δ IO: avanço da idade óssea (diferença entre a idade óssea e a idade cronológica); parâmetros ao diagnóstico da PPC

As características das pacientes com mutação no *MKRN3* foram comparadas às das meninas sem mutação. Os dados clínicos de quatro meninas não se encontravam disponíveis e, portanto, não foram incluídos na análise comparativa. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na idade de início da puberdade entre os dois grupos (mediana 5,5 anos, com variação de 3,0-7,0 anos nas meninas com mutação versus 6,7 anos, com variação de 0,1-8,0 anos, $P=0,074$), contudo, as meninas com mutação eram mais jovens ao diagnóstico do que as pacientes sem mutação (mediana 7,3 anos, variação 5,9-7,9 versus 8 anos, variação 1,5-10,0 anos, respectivamente, $P=0,014$). Adicionalmente, as pacientes com mutação exibiram concentrações de FSH basal e estradiol mais elevadas além de maior Δ IO (Tabela 13).

Tabela 13 - Comparação das características das meninas com PPC com e sem mutação no *MKRN3*

Parâmetro avaliado	Mutações	PPC	P valor
	no <i>MKRN3</i> (n=6) Mediana (variação)	Idiopática (n=47) Mediana (variação)	
Início da puberdade, anos	5,5 (3,0-7,0)	6,7 (0,1-8,0)	0,074
Idade de diagnóstico, anos	7,3(5,9-7,9)	8 (1,5-10,0)	0,014*
IMC (Z-score)	1,46(-0,13-2,63)	0,69(-1,53-2,08)	0,112
Estatura (Z-score)	1,73 (-0,07-2,8)	1,03 (0,0-2,94)	0,493
Idade óssea (IO)	10,6(8,0-11,5)	11 (2,7-13,6)	0,782
Δ IO	3,70(0,1-3,9)	2,3(0,5-4,7)	0,020*
FSH basal (UI/L)	5,45(3,5-9,86)	3,54(0,61-9,15)	0,028*
LH basal (UI/L)	2,33(1,32-5,54)	1,25(0,02-8,73)	0,068
Estradiol (pg/mL)	42,00(32,0076,79)	23,0 (0,30-119,0)	0,031*
Volume uterino (cm ³)	7,75(4,95-32,00)	6,20(1,76-44,60)	0,347
Volume ovariano (cm ³)	2,54 (1,00-4,00)	3,00 (0,90-6,70)	0,279

Parâmetros avaliados ao diagnóstico da PPC; IMC: índice de massa corporal; Δ IO: avanço da IO (diferença entre IO e idade cronológica); * $P < 0,05$ com o teste U de Mann-Whitney para comparação entre os grupos

4.3.2.2 Análise de Segregação Familiar

A análise de segregação familiar confirmou, como esperado pelo padrão de *imprinting* do *MKRN3*, a herança paterna do alelo mutado nas pacientes das famílias 2, 3 e 5 (Figura 11). Nas famílias 1 e 4, a mãe era portadora do alelo selvagem, o que sugere a herança paterna do alelo mutado. Contudo, nesses casos, o DNA dos pais não estava disponível para o estudo genético.

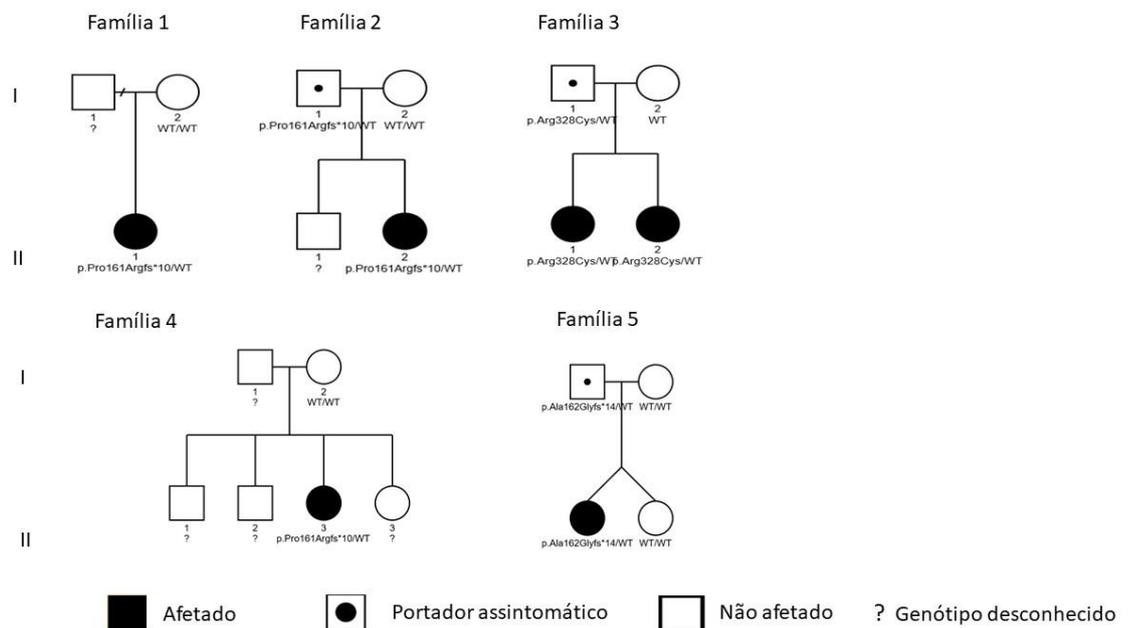


Figura 11 - Análise de segregação familiar das meninas com mutação no *MKRN3*.

4.3.2.3 Polimorfismos Sinônimos no Gene *MKRN3*

Dois polimorfismos (SNP) sinônimos no *MKRN3* foram encontrados na população estudada: c.90G>A (rs746453158) e c.663C>T (rs2239669).

O polimorfismo rs746453158 foi observado em heterozigose em uma paciente, o que corresponde a uma frequência alélica de 0,8% na nossa população. Trata-se

de polimorfismo raro, não descrito na base de dados do 1000Genomes e identificado em somente 6 de 118.110 alelos do ExAC (frequência alélica $5.08e-05$). Já a variante sinônima c.663C>T (rs2239669) foi frequente, detectada em 26(41,3%) pacientes, dos quais 6 eram homozigotos. Todavia, trata-se de variante comumente observada na população geral e a frequência alélica encontrada nos pacientes com PPC do presente estudo (25,4%) foi comparável à observada na população geral controle do banco de dados do ExAC (28,1%) (Tabela 14).

4.3.4 Pesquisa de Mutações nos Genes *KISS1* e *KISS1R*

A avaliação da sequência codificadora do *KISS1* foi realizada em 19 pacientes (2 meninos, dos quais um dos gêmeos monozigóticos) e do *KISS1R* em 17 pacientes (um menino). Todavia, nenhuma mutação que pudesse justificar a ocorrência da PPC foi encontrada nos casos avaliados.

No *KISS1*, a variante c.242C>G (rs4889), foi encontrada em 8 de 19 pacientes (42% dos casos), sendo em homozigose em 3 meninas. Essa variante, localizada no éxon 3, leva à substituição da prolina na posição 81 da cadeia polipeptídica da kisspeptina por uma arginina (p.Pro81Arg). É considerada benigna de acordo com a avaliação *in silico* realizada com o PolyPhen e com o Mutation Taster, de forma que não parece afetar a atividade biológica da kisspeptina. Adicionalmente, trata-se de polimorfismo frequente na população geral, como mostrado na Tabela 14.

Duas meninas carreadoras da variante c.242C>G no *KISS1*, uma das quais com início do desenvolvimento puberal nos primeiros meses de vida e o diagnóstico de PPC com 1,4 anos, também apresentavam a deleção de uma adenina no último nucleotídeo do éxon 3 (c.417delA / rs71745629). Essa deleção leva à substituição do códon de terminação por um triptofano (p.Ter139Trp) e resulta no alongamento da cadeia polipeptídica da kisspeptina em seis aminoácidos. No entanto, também se trata de variante frequente, cuja frequência alélica na população geral do ExAC é 29,8% (Tabela 14).

Com relação ao *KISS1R*, o polimorfismo sinônimo c.24A>G (rs10407968), localizado no éxon 1, foi encontrado 4 de 17 pacientes. Adicionalmente, a variante

c.565G>A, localizada no éxon 4 e que resulta na substituição do aminoácido alanina por uma treonina na posição 189 da cadeia polipeptídica da proteína (p.Ala189Thr, rs73507527), foi encontrada em heterozigose em uma paciente. No entanto, trata-se de variante considerada benigna pela avaliação *in silico* e com frequência alélica de 1,2% na população geral do banco de dados do ExAC.

4.3.5 Pesquisa de Mutações no Gene *GNRHR*

O estudo do *GNRHR* foi realizado no menino com PPC de início precoce (2,6 anos) e refratária ao tratamento padrão, no qual mutações nos genes *MKRN3*, *KISS1* e *KISS1R* não foram encontradas. No entanto, nenhuma mutação deletéria ou polimorfismos na sequência codificadora ou nas junções exons-introns do *GNRHR* foram encontrados.

Tabela 14 - Frequência alélica dos polimorfismos de nucleotídeos únicos encontrados nos genes *MKRN3*, *KISS1* e *KISS1R* nos pacientes com PPC em comparação com a população geral do banco de dados do ExAC.

Polimorfismo	Gene	Substituição nucleotídeo	Substituição aminoácido	Frequência nos pacientes com PPC			Frequência na população geral (ExAC)		
				Total de alelos	Número de alelos	Frequência alélica	Total de alelos	Número de alelos	Frequência alélica
rs2239669	<i>MKRN3</i>	c.663 C>T	p.Pro221=	126	32	25.4%	120.560	33.940	28.1%
rs746453158	<i>MKRN3</i>	c.90G>A	p.Pro30=	126	1	0.8%	118.110	6	5.08e-05
rs4889	<i>KISS1</i>	c.242 C>G	p.Pro81Arg	38	11	28.9%%	49.628	16.936	34.1%
rs71745629	<i>KISS1</i>	c.417delA	p.Ter139Trp	38	4	10.5%	70.110	20.914	29.8%
rs10407968	<i>KISS1R</i>	C24A>G	p.Gly8=	34	5	14.7%	7.738	2005	25.9%
rs73507527	<i>KISS1R</i>	c.565G>A	p.Ala189Thr	34	1	2.9%	15.958	203	1.2%

4.3.6 Alterações Cromossômicas Identificadas Por Meio da Análise Cromossômica Por Microarranjo

Três pacientes com PPC idiopática sem mutações no gene *MKRN3* e com distormfismos adicionais ou malformações congênitas foram selecionados para a investigação de CNVs cromossômicas por meio da CMA, a saber (Tabela 15):

- Paciente 1 (P1): Menino com sobrepeso e transtorno do espectro autista (TEA). Apresentou início do desenvolvimento puberal aos 8 anos e o diagnóstico de PPC foi confirmado aos 8,9 anos. O seu irmão mais novo, que também apresentava TEA, posteriormente foi diagnosticado com PPC;
- Paciente 2 (P2): Menino com antecedente de hipospádia e hérnia inguinal corrigidas cirurgicamente na infância, além de deformidade angular e encurtamento do fêmur. Possuía irmão gêmeo monizogótico igualmente afetado. Ambos evoluíram com policitemia na segunda década de vida.
- Paciente 3 (P3): Menina fruto de casamento consanguíneo com cardiopatia congênita.

Tabela 15 - Dados clínicos e laboratoriais ao diagnóstico da PPC dos pacientes selecionados para a CMA

Dados clínicos	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Sexo	M	M	F
Idade de início da puberdade	8,0	6,5	7,0
Idade de diagnóstico	8,9	10,2	8,2
Tanner	3	3	3
IO	10	13	10,6
Δ IO	1,1	3	2,9
FSH basal	0,75	5,87	5,11
LH basal	0,8	1,87	2,9
Estradiol	-	-	30,22
Testosterona	2,06	4,64	-
Achados adicionais	Sobrepeso e TEA	Hipospádia, hérnia inguinal, deformidade do fêmur, policitemia	Cardiopatía congênita
História familiar	Irmão com TEA e PPC Mãe com traços autísticos	Gêmeo monozigótico com fenótipo similar	Pais consanguíneos (primos de 2º grau)

Idade expressa em anos; Tanner descreve o estágio do desenvolvimento genital (meninos) ou mamário (menina) ao diagnóstico da PPC; IO: Idade óssea; Δ IO: avanço da idade óssea, avaliado pela diferença entre IO e a idade cronológica.

No P1, foi detectada uma microdeleção de 761kbp em heterozigose em 16p11.2, considerada patogênica, e uma duplicação de 363kbp em 18p11.22, considerada uma variante de significado incerto (VOUS). As demais CNVs foram consideradas polimórficas. O irmão mais novo deste paciente, que também apresentava diagnóstico de TEA e posteriormente evoluiu com PPC, carregava as mesmas CNVs.

A região deletada em 16p11.2 engloba cerca de 40 genes e região duplicada em 18p11.22 inclui três genes (figura 12), dos quais alguns com função na organização de microtúbulos, regulação da transcrição, diferenciação celular, remodelação da cromatina, fosforilação de proteínas, desenvolvimento do mesoderma, excitose e transmissão sináptica (Apêndice 8). No entanto, nenhum dos genes contidos nessas regiões apresenta, até o momento, função conhecida relacionada ao início do desenvolvimento puberal. Digno de nota que o gene *MAZ*, que se localiza na região

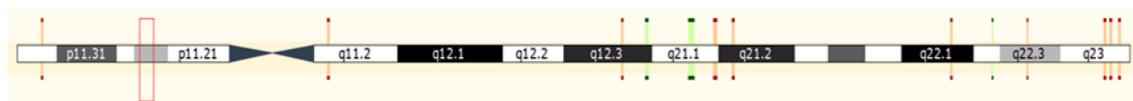
deletada em 16p11.2, codifica uma proteína em dedo de zinco que mostrou ter interação com a proteína MKRN3 (90).

- **Microdeleção em 16p11.2 (tamanho 761 kbp – 40 genes) - Patogênica**



LOC606724, BOLA2B, BOLA2, SLX1B, SLX1A, SLX1A-SULT1A3, SLX1B-SULT1A4, SULT1A3, SULT1A4, LOC613038, LOC388242, LOC440354, SLC7A5P1, SPN, QPRT, C16orf54, ZG16, KIF22, MAZ, PRRT2, PAGR1, MVP, CDIPT, CDIPTAS1, SEZ6L2, ASPHD1, KCTD13, TMEM219, TAOK2, HIRIP3, INO80E, DOC2A, C16orf92, FAM57B, ALDOA, PPP4C, TBX6, YPEL3, GDPD3, MAPK3

- **Microduplicação de 363 kbp at the 18p11.22 - VOUS**



ANKRD12, TWSG1, RALBP1

Figura 12 - Representação das CNVs detectadas no P1. Painel superior mostra a representação esquemática do cromossomo 16, com a região da microdeleção (16p11.2) assinalada e a especificação dos genes contidos no segmento da deleção. Painel inferior mostra a representação esquemática do cromossomo 18 com a região da microduplicação assinalada e a especificação dos genes contidos no segmento da duplicação. Figura adaptada de www.ensembl.org.

No P2, foi detectada uma microduplicação de 155kbp no cromossomo 7, na região 7p5.2, onde estão mapeados 3 genes (*NFE2L3, HNRNPA2B1, CBX3*), que foi classificada como VOUS. Todas as outras variações no genoma foram categorizadas como polimórficas. Interessantemente, *NFE2L3* (*Nuclear fator, erytroid 2 like 3*) é um coativador da transcrição com função eritroide-específica na ativação no gene da globina (www.uniprot.org). *HNRNPA2B1* tem ação no processamento e *splicing* do RNA e na regulação negativa da transcrição pela RNA polimerase II e o *CBX3* tem ação nos processos biológicos de organização e remodelação da cromatina resposta celular a dano no DNA.

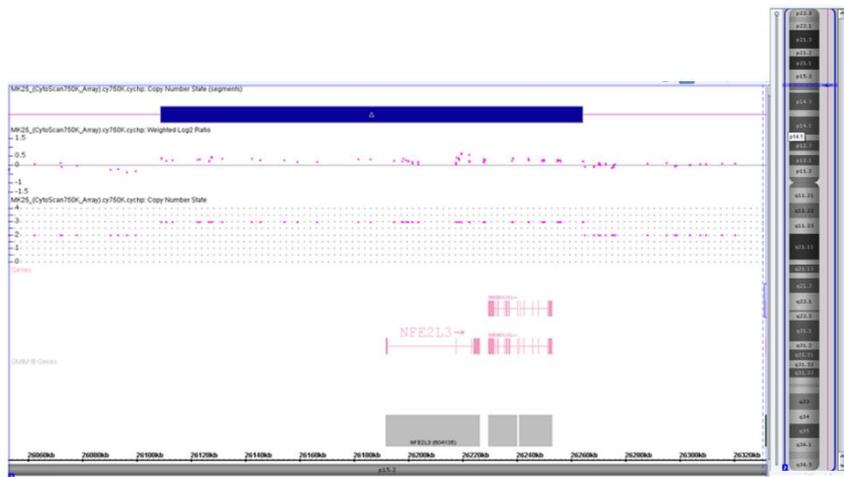


Figura 13 - Representação gráfica, visualizada pelo software ChAS versão 3.0 (Affymetrix, EUA), da microduplicação (barra azul na parte superior) encontrada pelo exame de CMA no paciente P2, afetando 155kbp da região citogenômica de 7p15.2 (arr[hg19]7p15.2(26,108,941-26,264,299)x3), que envolve os genes *NFE2L3*, *HNRNPA2B1* e *CBX3*.

Na P3, menina fruto de casamento consanguíneo com cardiopatia congênita, a CMA evidenciou múltiplas regiões no genoma de perda de heterozigose (LOH) decorrentes da consanguinidade parental (figura 14).

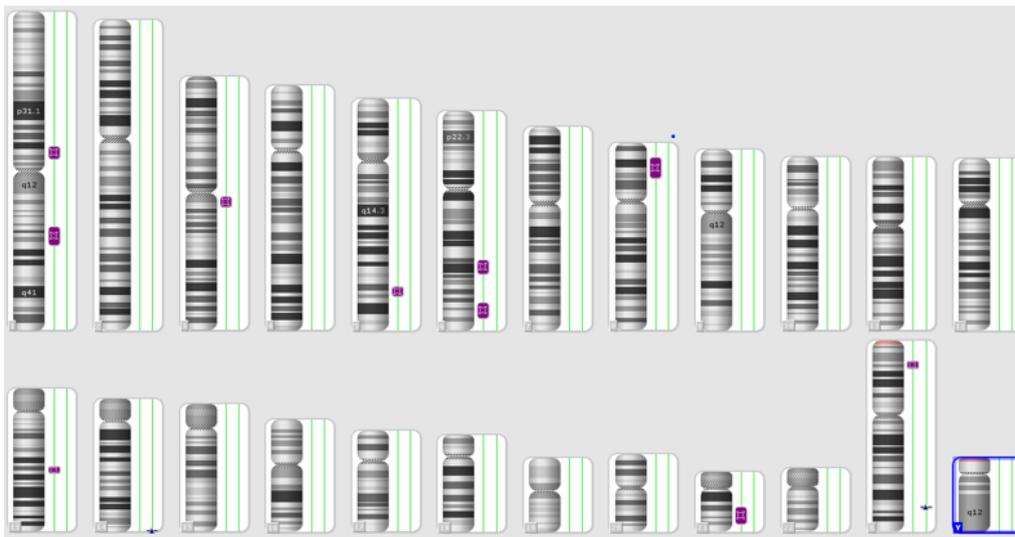


Figura 14 - Representação gráfica do cariótipo gerada pelo software ChAS v.3.0 (Affymetrix, EUA) pós processamento dos dados da CMA da paciente 3. Os segmentos cromossômicos com LOH são registradas pelas barras de cor violeta ao lado de cada cromossomo.

5 DISCUSSÃO

A PPC é uma condição rara e com consequências adversas à saúde física e psicossocial da criança (3,18). Há evidências que mostram que a incidência da PPC está aumentando em determinadas regiões (91,92). As possíveis explicações para este fato não estão claras, mas acredita-se que possa ter relação com o aumento da incidência de obesidade e a exposição a desreguladores endócrinos.

A identificação de novos genes relacionados ao controle do eixo reprodutivo e o conhecimento de causas monogênicas da PPC representa um campo fascinante na endocrinologia, com o potencial de fornecer novas informações sobre a fisiologia que podem ter repercussões na condução da doença, como por exemplo, no desenvolvimento de novas alternativas de tratamento alvo-dirigidas (12).

A constatação de que um paciente apresenta uma causa genética para a PPC é relevante pois permitirá o diagnóstico precoce de outros membros da família que possam ser afetados, garantindo o início oportuno do tratamento, com potencial de se minimizar as consequências negativas à saúde. Adicionalmente, permitirá o aconselhamento genético adequado.

As mutações no gene *MKRN3*, o principal foco deste estudo, representam a principal causa genética da PPC na atualidade (3,27). Na meta-análise realizada na primeira parte deste trabalho, que incluiu 14 estudos e 857 pacientes com PPC rastreados, a prevalência geral estimada de mutações no *MKRN3* foi de 9,0% (IC95%:0,04-0,15). Interessantemente, foi constatada variação geográfica, com predominância de mutações nos países ocidentais (prevalência estimada 11%, IC95%: 0,04-0,21) e menor prevalência nos países asiáticos (2%, 95% CI: 0,01-0,04), o que sugere variação genética de acordo com a etnia (75). Em dois estudos recentes com a população asiática, cujas publicações foram posteriores à da meta-análise realizada nesse estudo, alterações genéticas no *MKRN3* foram infrequentes, o que corrobora esses achados (93,94).

Nossa casuística incluiu 63 pacientes com PPC inicialmente classificada como idiopática que foram rastreados para mutações no *MKRN3*, o que corresponde à segunda maior série brasileira estudada. A série de Macedo e colaboradores, que avaliou 215 pacientes, dos quais 207 do sexo feminino, representa a maior casuística

nacional e a segunda casuística mundial (34). A série de Lee e colaboradores, que incluiu 260 meninas coreanas, representa a maior casuística mundial (43).

A maioria dos pacientes da nossa casuística é do sexo feminino (57 meninas *versus* 6 meninos), o que é esperado de acordo com a conhecida predominância da PPC no sexo feminino (1,12). História familiar de puberdade encontrava-se presente em 28,5% desses pacientes. Esta frequência foi próxima à descrita por De Vries colaboradores que reportaram prevalência de 27,5% de casos familiares em um estudo que incluiu 156 pacientes com PPC idiopática(25). No entanto, deve-se considerar que os dados da história familiar de 18 pacientes não se encontravam disponíveis no presente estudo. Além disso, mesmo nos casos aparentemente esporádicos, a história familiar paterna por vezes não era conhecida com precisão, de forma que não podemos descartar que a história familiar de PPC tenha sido subestimada em nossa casuística.

As mutações no gene *MKRN3* foram encontradas em 6 de 57 meninas da nossa casuística, o que representa uma prevalência de 10,5%. Esta prevalência foi maior do que a observada no outro estudo com 207 meninas brasileiras, na qual a prevalência de mutações no *MKRN3* foi 3,9%(34). No entanto, deve-se considerar que na série de Macedo e colaboradores foram incluídas meninas com PPC esporádica, o que pode justificar a diferença observada, visto que no trabalho atual foram incluídos tanto casos familiares quanto esporádicos. Em outro trabalho com um número significativo de meninas italianas (n=60), a prevalência de mutações no *MKRN3* foi 5%(41). Na meta-análise realizada na primeira parte do estudo, a prevalência estimada de mutações no *MKRN3* no sexo feminino foi 7% (IC95%: 0,03-0,13)(75).

As mutações no *MKRN3* parecem ser mais frequentes no sexo masculino e foram descritas em 8 de 20 meninos (40%) com PPC idiopática (46). Curiosamente, nenhuma mutação no *MKRN3* foi detectada nos meninos (n=6) da nossa casuística. Na meta-análise da primeira parte do estudo, a prevalência estimada de mutações no sexo masculino foi 22% (IC95%: 0,00-0,62), maior do que a encontrada entre as meninas. Uma possível explicação para essa diferença ainda não é conhecida, considerando-se que o *MKRN3* se localiza num cromossomo autossômico. É digno de nota que todos os meninos com mutação no *MKRN3* previamente publicados apresentavam história familiar de PPC e este pode ter sido um fator de confundimento, pois pode ter superestimado a prevalência de mutações na avaliação

pelo sexo. Assim, a identificação de mais meninos afetados é necessária para se esclarecer essa questão. De toda forma, as evidências disponíveis reforçam a importância do rastreamento de mutações no *MKRN3* nos meninos, especialmente naqueles com PPC familiar.

Nos casos familiares, as mutações no *MKRN3* foram encontradas em até 33% a 46% dos casos (32,39). Nessa casuística, considerando-se especificamente os casos familiares, as mutações no *MKRN3* foram encontradas em 16,7% dos casos. Esta frequência foi próxima à observada na meta-análise da primeira parte do estudo, na qual a prevalência estimada de mutações nos pacientes com PPC familiar dos países ocidentais foi 19,0% (IC 95% 0,05-0,36) com um nível moderado de heterogeneidade (I^2 69,16%). Possíveis fontes de variação podem ter sido decorrentes dos diferentes critérios de seleção dos casos familiares e pequeno tamanho da amostra em alguns estudos. Além disso, pelo padrão de herança de um gene *imprimado*, no qual uma geração pode não ser afetada, a natureza familiar pode passar despercebida se não for cuidadosamente investigada, de forma que a prevalência nos casos familiares pode ter sido subestimada em alguns estudos.

Outro dado interessante é que mais meninas (n=88, considerando-se os 76 casos compilados na revisão sistemática, 6 casos identificados nesse estudo e 6 casos posteriormente apresentados(93,95)) do que os meninos afetados (n=13) foram identificados até o momento, o que pode refletir a conhecida predominância de PPC no sexo feminino (3,12). Contudo, em algumas séries, homens afetados foram identificados retrospectivamente com base na história pregressa e no rastreamento genético, de forma que essa predominância também pode refletir um sub-diagnóstico no sexo masculino (39,40). Outra explicação possível poderia ser o *déficit* relativo de meninos na prole de homens com mutações no *MKRN3*, como observado por Simon e colaboradores, que especularam que os espermatozoides Y desses indivíduos poderiam apresentar alterações funcionais (39). Na primeira parte do trabalho, foi constatada que a prole de 41 homens com mutações no *MKRN3* consistiu de 68 (71%) meninas e 28 (29%) meninos, o que parece reforçar esta hipótese (75). No entanto, a avaliação de um grupo maior de homens afetados se faz necessária para uma conclusão definitiva.

5.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE O FENÓTIPO

Em um paciente com PPC, não há um sinal ou sintoma que seja patognomônico da presença de mutação no *MKRN3*. Os pacientes previamente descritos, assim como as pacientes desse estudo, exibiram o quadro característico da reativação prematura do HHG, com o surgimento precoce dos caracteres sexuais secundários, aceleração do crescimento, avanço da IO e concentrações púberes de LH basal e/ou pós estímulo. Dismorfismos adicionais não foram encontrados nas pacientes desse estudo e foram raros nos relatos prévios(32,34,38). Adicionalmente, critérios maiores para o diagnóstico da SPW também não foram descritos em nenhum paciente até o momento. Esses dados, em conjunto, reforçam o conceito de que as mutações no *MKRN3* se associam ao fenótipo de PPC não-sindrômica.

A idade mediana de início da puberdade nas meninas com mutação do presente estudo foi 5,5 anos (variação de 3,0 a 7,0 anos), próxima à observada em outros estudos (32,39). Na análise agrupada realizada na primeira do trabalho, a idade mediana de início da puberdade nas meninas de países ocidentais foi 6.0 anos, com variação de 3,0 a 7,5 anos (34,39,75). A idade mediana de início da puberdade observada nessas meninas sugere que o tônus inibitório sobre a secreção do GnRH ocorre normalmente no período pré-puberal, mas seria perdido prematuramente, levando à hipótese de que o *MKRN3* não seria crucial para a supressão do GnRH no período da mini puberdade, mas tem papel na reativação dos pulsos na puberdade propriamente dita (26,48).

Em nossa casuística, as pacientes com mutação apresentaram, em comparação às pacientes sem mutação, menor idade ao diagnóstico (7,3 anos, versus 8,0 anos, respectivamente, $P=0,014$), além de concentrações basais de FSH e estradiol mais elevadas e maior ΔIO . Esses resultados sugerem a possibilidade de evolução mais rápida da puberdade nas meninas com mutação. Concentração de FSH basal mais elevada nas meninas com mutação também foi descrita por Macedo e colaboradores (34), o que em conjunto com nossos achados, sugere que o *MKRN3* poderia exercer efeito distinto na liberação das gonadotrofinas hipofisárias. Menor idade ao início da puberdade foi descrita nas meninas com mutação por Simon e colaboradores, mas outras diferenças nos parâmetros clínicos ou bioquímicos não foram observadas (39). Portanto, estudos com maior número de pacientes e com

análise comparativa dos dados dos indivíduos com e sem mutação ainda são necessários para se determinar as possíveis particularidades na apresentação clínica e tentar estabelecer associação genótipo-fenótipo.

A análise comparativa dos dados realizada na primeira parte do estudo também revelou pontos interessantes sobre possíveis particularidades fenotípicas de acordo com subtipo de mutação, etnia/distribuição geográfica e sexo. Os pacientes com mutações *missense* exibiram idade mais elevada ao diagnóstico (7,72 anos, *versus* 6,75 anos, $P=0,028$) do que os pacientes com mutações categorizadas como mais graves, como as mutações que codificam proteínas truncadas e a deleção do promotor, o que sugere a possibilidade de progressão mais lenta da puberdade com as mutações *missense*.

As meninas de países asiáticos também apresentaram, em comparação com as meninas dos países ocidentais, idade mais elevada ao diagnóstico de PPC (mediana 8,0 anos *versus* 6,7 anos, $P<0.001$), concentração de FSH basal mais baixa (mediana 3,0UI/L *versus* 4,5UI/L, $P=0,042$) e tendência à idade mais elevada ao início da puberdade (6,8 anos, *versus* 6,0, $P=0,072$).

Sabe-se que o início da puberdade é influenciado por fatores genéticos, metabólicos, nutricionais, étnicos e ambientais. Em estudos recentes, a idade da menarca em meninas chinesas e coreanas foi 12,6 e 12,7 anos, respectivamente (96,97), próxima à descrita na população europeia, na qual a idade da menarca é aproximadamente 12,5 anos (98,99). Assim, acredita-se que as diferenças na apresentação das meninas asiáticas e de países ocidentais não seriam explicadas com base em fatores genéticos ou étnicos isoladamente, e a influência de fatores metabólicos, nutricionais e ambientais, como dieta ou exposição a desreguladores endócrinos, não pode ser descartada. Em particular, obesidade e adiposidade corporal estão associados ao início precoce da puberdade nas meninas (9,100,101). Infelizmente, não foi possível analisar possíveis diferenças no peso corporal pois essa informação estava ausente na maioria dos estudos. Adicionalmente, fatores metabólicos e ambientais que teriam potencial de interagir nas vias de sinalização do *MKRN3* ainda são pouco conhecidos. Outra possibilidade poderia ser atribuída ao subtipo de mutações, visto que nas meninas de países asiáticos observou-se o predomínio das mutações *missense*.

Outro dado interessante é que o impacto das mutações no *MKRN3* foi maior no sexo feminino e as meninas afetadas iniciaram a puberdade mais precocemente do que os meninos (mediana de 2,0 anos abaixo do limite de idade específico para o sexo *versus* 0,5 anos abaixo desse limite, respectivamente, $P=0,001$) e também apresentaram concentração de FSH basal mais elevada e maior ΔIO . Como a proporção de indivíduos com estágio 3 ou 4 de Tanner ao diagnóstico foi maior entre os meninos (76% *versus* 58% nas meninas), essa diferença não parece refletir a puberdade mais avançada nas meninas. A predominância do FSH é descrita durante a mini puberdade e a puberdade feminina, em comparação aos meninos (7,102). Também foi observada diferença na concentração sérica de *MKRN3* no período pre-puberal, com os meninos exibindo valores cerca de 50% mais baixos do que as meninas, e correlação negativa entre as concentrações séricas de *MKRN3* e gonadotrofinas foi observada somente entre as meninas (49,50). Os mecanismos subjacentes a essas diferenças ainda não são compreendidos e uma possível ação sexualmente dimórfica do *MKRN3* não está descartada. Interessantemente, diferença no fenótipo puberal de acordo com o sexo também foi observada em camundongos em resposta à superexpressão do *Mkrm3*, com atraso puberal nas fêmeas, fato não constatado nos machos, o que também sugere que o *Mkrm3* tenha um maior impacto no sexo feminino (103).

Por fim, ainda não se sabe se as mutações no *MKRN3* conferem maior risco para o desenvolvimento de complicações metabólicas na idade adulta, à semelhança do observado nas pacientes com mutações no *DLK1* (55). Insuficiência ovariana prematura foi descrita na avó com mutação de uma menina italiana afetada (38). Embora possa ser um achado incidental, disfunção gonadal é descrita na SPW (104,105). O acompanhamento em longo prazo das pacientes afetadas será necessário para se avaliar a possível associação com a ocorrência de insuficiência ovariana prematura e o risco de eventos adversos na idade adulta.

5.2 SOBRE AS MUTAÇÕES ENCONTRADAS NO *MKRN3* E O SEU POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO

Mais de 30 mutações na sequência codificadora do *MKRN3* e uma deleção do promotor foram descritas. Mais recentemente, mutações em heterozigose na

região promotora e uma mutação na região 5'-UTR do gene foram descritas em sete meninas não relacionadas com PPC, o que reforça o papel de defeitos na região regulatória do *MKRN3* no desenvolvimento da PPC (106).

As mutações, especialmente as *frameshift*, tendem a se agrupar em uma região rica em citosina entre os nucleotídeos 476-482, que representa um *hotspot* gênico (3,26,75). As duas mutações *frameshift* (p.Ala162Glyfs*14 e p.Pro161Argfs*10) identificadas em 4 meninas dessa casuística localizam-se nessa região. Ambas foram previamente descritas e resultam na tradução de proteínas truncadas (32,34,44), com predição de impacto funcional deletério.

O anel de zinco C3HC4, responsável pela atividade de ubiquitina-ligase, foi identificado como outro local onde as mutações, especialmente as *missenses*, tendem a se agrupar (75). Isso pode refletir a localização de aminoácidos funcionalmente importantes e que variantes nesta região teriam maior probabilidade de causar efeitos deletérios na função da proteína. A mutação *missense* p.Arg328Cys, encontrada em duas irmãs afetadas da nossa série, localiza-se neste domínio. Essa mutação apresenta predição de patogenicidade à avaliação *in silico* e foi previamente descrita em pacientes da França, Itália e Argentina, mas não na população brasileira (39,41,46).

Digno de nota que seis mutações *missense* detectadas em meninas asiáticas apresentaram predição de benignidade pela avaliação *in silico* (43,82). Entretanto, considerando o fenótipo das meninas com essas variantes, é razoável assumir seu papel na patogênese da PPC, mas estudos funcionais seriam necessários para se comprovar o possível impacto funcional das mesmas.

Dois SNPs no *MKRN3* foram encontrados em nossa casuística: rs2239669 e rs746453158. A frequência alélica do polimorfismo rs2239669 na nossa amostra foi próxima à observada na população geral controle do ExAC (25,4% *versus* 28,1%, respectivamente). Já o polimorfismo rs746453158, encontrado em uma menina, é um polimorfismo raro, cuja frequência alélica na população geral do ExAC foi muito baixa ($5.08e-05$) e não está descrito na base de dados do 1000Genomes. Contudo, esse polimorfismo sinônimo localizado na porção aminoterminal da proteína difere dos SNPs no *MKRN3* previamente associados à idade da menarca (23,24) e possivelmente não teve impacto no fenótipo.

A ausência de mutações no *MKRN3* em número expressivo de meninos na nossa amostra (n=6) sugere que outros mecanismos genéticos ou epigenéticos, ou mesmo defeitos em outros genes ou em regiões regulatórias poderiam estar implicados. Notadamente, a possibilidade de mutações no promotor ou na região 5'-UTR do *MKRN3* não foram investigadas. Adicionalmente, outros mecanismos que poderiam levar a perda da expressão de um gene *imprimado*, como alterações do número de cópias e do padrão de metilação, também não foram pesquisados e não podem ser descartadas, embora ainda não tenham sido descritos (34,39,93).

Embora a relevância do *MKRN3* na modulação do eixo HHG esteja estabelecida, o seu mecanismo preciso de ação ainda não foi esclarecido e estudos funcionais para caracterizar o impacto funcional das mutações *missense* ainda não estão disponíveis (26). Estudos recentes com a utilização de células tronco pluripotentes humanas geneticamente modificadas e modelos animais nocautes com avaliação do transcriptoma e proteoma trouxeram avanços no conhecimento a respeito da interação do *MKRN3* com outras proteínas e o seu possível papel na plasticidade neuronal hipotalâmica (90,103,107).

Notadamente, observou-se que o *MKRN3* foi dispensável para a diferenciação de neurônios que expressam *GNRH1* a partir de células tronco pluripotentes humanas com o nocaute bi-alélico do *MKRN3*, e também não alterou diretamente a expressão do *GNRH1* (90). Adicionalmente, foi constatado que a proteína *MKRN3* interage com cerca de 20 proteínas codificadas por genes associados ao início da puberdade, dentre os quais o *LIN28B*, previamente associado à idade da menarca, o *OTUD4*, um gene que codifica uma deubiquitinase e previamente associado com hipogonadismo hipogonadotrófico (90,108), e com outros genes que codificam fatores de transcrição do tipo dedos de zinco (ZNFs), os quais são repressores da transcrição que podem ter papel na regulação da puberdade (90).

Naule e colaboradores também não observaram diferença na expressão hipotalâmica do *Gnrh1*, *Kiss1*, *Tac2* e *Tac1* em camundongos com a deleção do alelo paterno do *Mkrn3* em comparação aos animais sem a deleção. A análise do transcriptoma e do proteoma do núcleo arqueado desses animais mostrou diferença na expressão de genes e proteínas envolvidas na organização da matriz celular, adesão celular e transporte axonal que possuem efeito no controle do desenvolvimento neuronal e plasticidade sináptica (107).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o *MKRN3* possa regular a puberdade indiretamente, como um repressor genético da transcrição através da sua interação com outras proteínas envolvidas no desenvolvimento puberal, e também possa atuar como um importante regulador da plasticidade neuronal hipotalâmica (90,107). Contudo, estudos adicionais ainda se fazem necessários para a melhor compreensão desses processos e dos mecanismos envolvidos no silenciamento do *MKRN3* precedendo o início da puberdade.

5.3 SOBRE A INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO *KISS1*, *KISS1R* E *GNRHR*

Nesse trabalho, a pesquisa de mutações no *KISS1* e *KISS1R* foi feita em um subgrupo de pacientes (19 e 17 pacientes, respectivamente) sem mutações no *MKRN3*. Como o início da puberdade ocorreu ainda no primeiro ano de vida nos casos nos quais as mutações no *KISS1* e *KISS1R* foram descritas, procurou-se priorizar o estudo desses genes nos pacientes com início precoce do desenvolvimento puberal, como uma menina com telarca no primeiro mês de vida e na qual a PPC foi diagnosticada com 1,4 anos de idade e um menino com início do desenvolvimento puberal aos 2,6 anos. Contudo, nenhuma mutação deletéria no *KISS1* e *KISS1R* foi identificada nos pacientes avaliados.

Curiosamente, em duas meninas, incluindo essa paciente com PPC diagnosticada com 1,4 anos de idade, o estudo do *KISS1* revelou duas variantes: p.Pro81Arg e p.Ter139Trp. A variante p.Pro81Arg apresenta predição de benignidade à avaliação *in silico* e foi frequente na população geral do ExAC (frequência alélica 34,1%); já a mutação p.Ter139Trp resultará no alongamento da cadeia polipeptídica da kisspeptina pela substituição do códon de terminação por um triptofano. Contudo, também se trata de variante frequente na população geral (frequência alélica 29,1%), de forma que a associação de ambas não parece ter relação com o fenótipo dessas pacientes.

Embora o número de pacientes rastreados para mutações no *KISS1* e *KISS1R* tenha sido pequeno, nossos achados são similares aos de outros estudos (109,110) e reforçam que as mutações no sistema da kisspeptina, embora altamente relevante do ponto de vista fisiopatológico, são causas muito raras da PPC.

A possibilidade teórica de mutação ativadora no *GNRHR* foi aventada no menino que teve início da puberdade aos 2,6 anos de idade, visto a resposta insatisfatória ao bloqueio puberal com análogo do GnRH e a ausência de mutações no *MKRN3*, *KISS1* e *KISS1R*. Todavia, nenhuma variante patogênica ou polimórfica foi detectada, de forma que os possíveis mecanismo subjacentes à reativação prematura do eixo HHG e à resposta inadequada ao tratamento padrão ainda não estão claros.

5.4 SOBRE AS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS NOS PACIENTES COM DISMORFISMOS ADICIONAIS

Ganhos ou perdas de material genômico, coletivamente conhecidos como variações no número de cópias (CNVs), podem envolver partes de genes, genes inteiros, vários genes em sequência ou elementos regulatórios, alterando o balanço biológico da diploidia e dosagem gênica. As consequências clínicas são variáveis e relacionam-se com a localização, tamanho e os genes contidos no segmento envolvido(111). Assim, as CNVs podem causar uma ampla variedade de fenótipos específicos ou complexos, resultantes de alterações na dosagem normal dos genes, como múltiplas malformações congênitas, deficiência intelectual (DI), transtornos do neurodesenvolvimento e quadros dismórficos (87,112). No entanto, a presença de uma CNV pode não ter significado clínico e muitas podem representar variações polimórficas benignas que contribuem para a variabilidade genética entre os indivíduos(111).

A CMA permite a identificação de alterações no número de cópias do genoma com uma resolução muito superior à análise citogenética padrão (cariótipo com banda G) e trouxe grandes avanços no conhecimento das alterações genéticas relacionadas a muitas patologias (87). Contudo, considerando-se a presença de CNVs benignas no genoma e a descoberta continua de novas variantes, a avaliação do significado clínico de uma CNV encontrada num contexto específico pode ser um desafio.

As plataformas que combinam sondas para avaliação de CNVs e SNPs, como a utilizada nesse trabalho, também permitem a identificação de longas sequências contíguas de perda de heterozigiosidade (LOH) no genoma, que pode ser indicativo de dissomia uniparental, quando restrita a um cromossomo ou parte dele, ou ser

consistente com consanguinidade parental, quando envolve múltiplos cromossomos. As dissomias uniparentais podem ter relevância clínica se o segmento envolvido contém genes *imprintados* e resultar no desenvolvimento de desordens de *imprinting*, como a SPW e Síndrome de Temple (56). Já a consanguinidade parental está associada ao risco aumentado de anomalias congênicas e doenças autossômicas recessivas (113).

Atualmente a CMA é considerada o teste citogenético de primeira linha na investigação diagnóstica de pacientes com DI, TEA e múltiplas malformações congênicas (87,112). CNVs com provável associação causal também têm sido reportadas em pacientes com outras condições patológicas como epilepsia, esquizofrenia e transtorno bipolar, dentre outros (114). Contudo, dados sobre a sua utilização na avaliação de pacientes com PPC associada a quadros sindrômicos, transtornos do neurodesenvolvimento ou com condições médicas pré-existentes ainda são relativamente escassos.

Recentemente, Canton e colaboradores, em um estudo com 32 pacientes com PPC associada a fenótipos complexos investigados por meio da CMA, identificaram 3 pacientes com dissomia uniparental maternal do cromossomo 14 (Síndrome de Temple), um paciente com a síndrome de Willians-Beuren e 7 pacientes, de três famílias não relacionadas, com deleções em Xp22.23, sugerindo que esse possa representar um novo *locus* implicado na PPC(74).

Nesse contexto, considerou-se que a CMA poderia ser uma ferramenta útil na investigação de pacientes com PPC associada a malformações congênicas, dismorfismos adicionais ou transtornos do neurodesenvolvimento, nos quais mutações no gene *MKRN3* não haviam sido detectadas. Assim, três pacientes foram selecionados para a investigação por meio da CMA: uma menina com cardiopatia congênita, um menino com autismo familiar e um menino com dismorfismos e policitemia, o qual possuía um gêmeo monozigótico igualmente afetado.

Na menina com PPC associada a cardiopatia congênita, a CMA revelou a presença de múltiplos segmentos no genoma de LOH, decorrentes da consanguinidade parental. Sabe-se que a consanguinidade está associada a aumento do risco de anomalias congênicas, o que possivelmente explica o caso em

questão, embora não tenha sido possível se associar um determinado gene ou região cromossômica específica ao fenótipo da PPC.

No menino com antecedente de hipospádia, deformidade esquelética e policitemia, o qual possuía irmão gemelar monozigótico com fenótipo similar, a CMA revelou uma microduplicação de 155kbp em 7p5.2, classificada como VOUS. A região duplicada engloba três genes: *NFE2L3*, *HNRNPA2B1* e *CBX3*. Interessantemente, *NFE2L3* (*Nuclear fator, erytroid 2 like 3*) é um coativador da transcrição com função eritroide-específica na ativação do gene da globina (www.uniprot.org). Desta forma, especula-se que essa duplicação possa ter associação com a policitemia, mas seu possível papel no desenvolvimento da PPC ainda não pode ser estabelecido.

No menino com TEA, a CMA revelou uma microdeleção de 761 kbp em 16p11.2, considerada patogênica, e uma duplicação de 363kbp em 18p11.22, classificada como VOUS. Seu irmão mais novo, que também apresentava TEA e posteriormente evoluiu com PPC, carregava as mesmas CNVs.

A PPC tem sido descrita em pacientes com autismo, com ou sem anormalidades cromossômicas associadas (59,68). Contudo, dados específicos sobre a prevalência de PPC nessa população ainda não estão disponíveis, de forma que não é possível se determinar se seria uma associação fortuita ou uma condição associada a um maior risco para o desenvolvimento puberal prematuro.

Microdeleções ou microduplicações em 16p11.2 estão associadas ao TEA, o que justifica esse achado em ambos os irmãos (115). Sobrepeso ou obesidade, usualmente de início da adolescência, anomalias vertebrais, crises convulsivas ou epilepsia, discinesia e atraso da linguagem também podem ser observados nos pacientes com a síndrome de microdeleção 16p11.2 (116,117). A deleção 16p11.2 pode ocorrer *de novo* ou ser herdada de forma autossômica dominante, como suspeita-se que seja o caso, visto que ambos os irmãos carregavam as mesmas CNVs. Como a mãe apresentava traços autísticos, suspeita-se da herança materna da deleção 16p11.2, mas será necessária a realização dos exames dos pais para se comprovar a origem parental de cada CNV.

Embora a patogenicidade da deleção 16p11.2 não esteja em discussão, seu possível efeito na patogênese da PPC não está claro. A região deletada contém cerca de 40 genes, alguns com efeito na transmissão sináptica, regulação da transcrição,

transporte de proteínas e ubiquitinação, mas nenhum com função diretamente relacionada ao controle do eixo HHG. Interessantemente, o gene *MAZ*, localizado na região deletada em 16p11.2 codifica um fator de transcrição em dedo de zinco que mostrou ter interação com a proteína MKRN3, embora as possíveis consequências dessa interação ainda não sejam conhecidas (90). Os três genes presentes na região duplicada em 18p11.22 (*ANKRD12*, *TWSG1* e *RALBP1*), classificada como VOUS, também não apresentam relação conhecida com o controle do eixo HHG.

A ocorrência de PPC nos pacientes com a síndrome de deleção 16p11.2 não foi previamente descrita e pode representar uma manifestação fenotípica inédita, mas ainda não se pode descartar que tenha sido incidental. Contudo, o fato do irmão mais novo, com mesmo genótipo, ter evoluído com PPC, sugere possível associação causal. Digno de nota que as demais causas monogênicas de PPC não foram excluídas nesses casos específicos. Contudo, a possibilidade de mutações no *KISS1* e *KISS1R* é improvável, visto a sua extrema raridade na patogênese da PPC e a idade de início da puberdade apresentada por esses meninos (por volta dos 8 anos), que contrasta com a observada nos casos previamente descritos com mutações no *KISS1* e *KISS1R* (30,31). TEA não foi observado nos pacientes com mutações no *DLK1*, de forma que essa possibilidade também parece pouco provável. Ainda assim, não seria possível dizer se o fenótipo de PPC estaria relacionado à deleção em 16p11.2 ou à duplicação em 18p.11.22. Também não é possível descartar algum efeito aditivo decorrente da interação de ambas as variantes e estudos adicionais ainda são necessários para se tentar confirmar uma provável associação causal entre essas CNVs e o fenótipo da PPC.

Especificamente com relação ao cromossomo 16, PPC também foi descrita em um paciente com DI e distúrbios leves que apresentava uma microduplicação em 16p13.3 (70) e puberdade precoce ou adiantada foi observada em 5/32 (16%) pacientes com microdeleções em 16q24.3(69).

É importante ainda considerar que alguns estudos sugerem que o valproato ou outros anticonvulsivantes poderiam contribuir para o desenvolvimento puberal prematuro, embora uma associação definitiva ainda não tenha sido estabelecida (118–120). Contudo, não há descrição de uso anticonvulsivantes por esses meninos com TEA.

Em suma, esses dados mostram que é importante se considerar a possibilidade de anormalidades cromossômicas nos pacientes com PPC associada a transtornos do neurodesenvolvimento, malformações congênitas e/ou quadros sindrômicos. Nesse contexto clínico, a CMA representa uma ferramenta útil para a investigação diagnóstica. Embora em alguns casos não seja possível tirar conclusões definitivas sobre causalidade entre as CNVs cromossômicas e o desenvolvimento da PPC, a CMA tem o potencial de permitir a identificação de novos *loci* candidatos e também poderá trazer informações relevantes ao permitir a realização de um diagnóstico mais preciso, com implicações para o seguimento do paciente e o aconselhamento genético adequado.

6 CONCLUSÕES

Parte 1

- De acordo com a meta-análise, a prevalência geral estimada de mutações no *MKRN3* nos pacientes com PPC foi 9,0% (IC 95%: 0,04-0,15).
- Foi observada variação nas estimativas de prevalência conforme o sexo, forma da PPC (familiar ou esporádica) e a distribuição geográfica, com maior frequência no sexo masculino, na PPC familiar e nos países ocidentais, respectivamente. No entanto, não podemos descartar que a prevalência de mutações no sexo masculino tenha sido superestimada, visto que todos os meninos afetados apresentavam PPC familiar.
- Embora não tenha sido possível estabelecer associações genótipo-fenótipo definitivas em indivíduos com mutações no *MKRN3* em comparação aos sem mutação, a idade mais elevada ao diagnóstico dos indivíduos com mutações *missense*, em comparação àqueles com mutações consideradas mais graves (*frameshift*, *nonsense* ou deleção do promotor), sugere a possibilidade de progressão mais lenta da puberdade com as primeiras.
- As meninas foram afetadas mais precocemente, exibiram concentração de FSH basal mais elevada e maior ΔIO , o que sugere que o impacto das mutações no *MKRN3* é maior no sexo feminino.

Parte 2

- Na nossa casuística, a prevalência de mutações no *MKRN3* nas meninas com PPC inicialmente classificada como idiopática foi 10.5%. Notadamente, nenhuma mutação foi encontrada no sexo masculino.
- A ausência de dismorfismos nos pacientes desta casuística, associada a baixa frequência de dismorfismos nos casos compilados na revisão

sistemática, corroboram o conceito de que as mutações no *MKRN3* estão associadas ao fenótipo de PPC não sindrômica.

- Não foram identificadas mutações patogênicas no *KISS1*, *KISS1R* e *GNRHR* nos pacientes rastreados.
- As meninas com mutação exibiram menor idade ao diagnóstico, além de concentrações de FSH basal e estradiol mais elevadas e maior ΔIO , o que sugere a possibilidade de progressão mais rápida da puberdade nas pacientes com mutações.
- Alterações cromossômicas foram detectadas nos três casos que foram submetidos ao estudo por meio da CMA.
- Embora não tenha sido possível se estabelecer associação de causalidade entre as CNVs encontradas e a ocorrência da PPC, esses dados reforçam que é importante se considerar a presença de anormalidades cromossômicas nos pacientes com PPC associada a distúrbios adicionais, transtornos do neurodesenvolvimento ou quadros sindrômicos. Nesse contexto, a CMA representa uma ferramenta útil na investigação diagnóstica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carel JC, Léger J. Precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;358(22):2366–77.
2. Macedo DB, Cukier P, Mendonca BB, Latronico AC, Brito VN. Avanços na etiologia, no diagnóstico e no tratamento da puberdade precoce central. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2014;58(2):108.17.
3. Latronico AC, Brito VN, Carel J-C. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;8587(15):1–10.
4. Marshall W a., Tanner JM. Variations in the Pattern of Pubertal Changes in Boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13–23.
5. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291–303.
6. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;4(3):254–64.
7. Kuiri-Hanninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Infancy : minipuberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;82:73–80.
8. Palmert MR, Boepple P a. Commentary: Variation in the timing of puberty: Clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2364–8.
9. Bianco SDC. A potential mechanism for the sexual dimorphism in the onset of puberty and incidence of idiopathic central precocious puberty in children: Sex-specific kisspeptin as an integrator of puberty signals. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(DEC):1–15.
10. Teilmann G, Pedersen CB, Skakkebak NE, Jensen TK. Increased Risk of Precocious Puberty in Internationally Adopted Children in Denmark. *Pediatrics*. 2015;118(2):391–9.
11. Cantas-Orsdemir S, Eugster EA. Update on central precocious puberty: from etiologies to outcomes. *Expert Rev Endocrinol Metab*. 2019;14(2):123–30.

12. Aguirre RS, Ph MDD, Eugster EA. Central Precocious Puberty: From Genetics to Treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2018;32(4):343–54.
13. Alikasifoglu A, Vuralli D, Gonc EN, Ozon A, Kandemir N. Changing Etiological Trends in Male Precocious Puberty: Evaluation of 100 Cases with Central Precocious Puberty over the Last Decade. *Horm Res Paediatr.* 2015;340–4.
14. Brito VN, Spinola-Castro AM, Kochi C, Kopacek C, Alves da Silva PC, Guerra Jr. G. Central Precocious puberty: revisiting the diagnosis and therapeutic management. *Arch Endocrinol Metab.* 2016;60(2):163–72.
15. Cantas-Orsdemir S, Garb JL, Allen HF. Prevalence of cranial MRI findings in girls with central precocious puberty: A systematic review and meta-analysis. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2018;31(7):701–10.
16. Pedicelli S, Alessio P, Scirè G, Cappa M, Cianfarani S. Routine screening by brain magnetic resonance imaging is not indicated in every girl with onset of puberty between the ages of 6 and 8 years. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(12):4455–61.
17. Kaplowitz PB. Do 6-8 year old girls with central precocious puberty need routine brain imaging? *Int J Pediatr Endocrinol.* 2016;2016(1):10–3.
18. Fuqua JS. Treatment and outcomes of precocious puberty: An update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(6):2198–207.
19. Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, et al. Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(12):4953–60.
20. Gong T-T, Wang Y-L, Ma X-X. Age at menarche and endometrial cancer risk: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep.* 2015;5(1):14051.
21. Eugster EA. Treatment of Central Precocious Puberty. *J Endocr Soc.* 2019;3(May):965–72.
22. Palmert MR, Cousminer DL, Wide E. The genetics of pubertal timing in the general population: recent advances and evidence for. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 2016;23(1):57–65.

23. Day FR, Thompson DJ, Helgason H, Chasman DI, Finucane H, Sulem P, et al. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. *Nat Genet.* 2017;49(6):834–41.
24. Perry JRB, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, et al. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature.* 2014;514(7520):92–7.
25. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1794–800.
26. Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC, Finger R. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. *J Mol Endocrinol.* 2015;54:131–9.
27. Pinheiro A, Canton M, Seraphim CE, Brito VN, Latronico AC. Pioneering studies on monogenic central precocious puberty. *Arch Endocrinol Metab.* 2019;500(5):0–6.
28. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr. JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 Gene as a Regulator of Puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1614–27.
29. Topaloglu a. K, Tello J a., Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Mutation and Hypogonadotropic Hypogonadism. *N Engl J Med.* 2012;366(7):629–35.
30. Teles M, Bianco S, Nahime Brito V, Trarbarch EB, Kuohung W, Shu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008;358:709–15.
31. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto a. P, Abreu a. P, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2276–80.
32. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl*

- J Med. 2013 Jun 27;368(26):2467–75.
33. Jong MTC, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, et al. A novel imprinted gene , encoding a RING zinc-finger protein , and overlapping antisense transcript in the Prader – Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet.* 1999;8(5):783–93.
 34. Macedo DB, Abreu AP, Reis ACS, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene MAKORIN ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(6):1097–103.
 35. de Vries Liat, Gat-Yablonsky G, Dror N, Singer A PM. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod.* 2014;October(00):1–6.
 36. Schreiner F, Hamm M. MKRN3 Mutations in Familial Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr.* 2014;82:122–6.
 37. Neocleous V, Shammas C, Phelan MM, Nicolaou S, Phylactou LA. In silico analysis of a novel MKRN3 missense mutation in familial central precocious puberty. 2015;1–5.
 38. Grandone A, Cantelmi G, Cirillo G, Marzuillo P, Luongo C, Miraglia E, et al. A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the makorin RING finger protein 3 gene. *BMC Endocr Disord.* 2015;1–4.
 39. Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, et al. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol.* 2016;174(1):1–8.
 40. Simsek E, Demiral M, Ceylaner S, Kirel B. Two Frameshift Mutations in MKRN3 in Turkish Patients with Familial Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr.* 2016;
 41. Grandone A, Capristo C, Cirillo G, Sasso M. Molecular Screening of MKRN3 , DLK1 , and KCNK9 Genes in Girls with Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr.* 2017;88((3-4)):194–200.
 42. Nishioka J, Shima H, Fukami M, Yatsuga S, Matsumoto T, Ushijima K, et al. The

- first Japanese case of central precocious puberty with a novel MKRN3 mutation. *Hum Genome Var.* 2017;(March):2016–8.
43. Lee HS, Jin H, Shim YS, Jeong HR, Kwon E, Choi V, et al. Low Frequency of MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty Among Korean Girls. *Horm Metab Res.* 2016;48(2):118–22.
 44. Dimitrova-Mladenova MS, Stefanova EM, Glushkova M, Todorova AP, Todorov T, Konstantinova MM, et al. Males with Paternally Inherited MKRN3 Mutations May Be Asymptomatic. *J Pediatr.* 2016;15–7.
 45. Ortiz-Cabrera N, Rivieiro-Álvarez R, López-Martinez M, Pérez-Segura P, Aragón-Gómez I, Trujillo-Tiebas M, et al. Clinical Exome Sequencing Reveals MKRN3 Pathogenic Variants in Familial and Nonfamilial Idiopathic Central Precocious Puberty. *Horm Res Paediatr.* 2017;87(2):88–94.
 46. Bessa DS, Macedo B, Brito VN, França M, Claudia A. High Frequency of MKRN3 Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic. *Neuroendocrinology.* 2016;2017(5):17–25.
 47. Jeong HR, Lee HS, Hwang JS. Makorin ring finger 3 gene analysis in Koreans with familial precocious puberty. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(11):1197–201.
 48. Bulcao Macedo D, Nahime Brito V, Latronico AC. New Causes of Central Precocious Puberty: The Role of Genetic Factors. *Neuroendocrinology.* 2014;100(1):1–8.
 49. Busch AS, Hagen CP, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 levels decline during puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(6):2588–93.
 50. Hagen CP, Sørensen K, Mieritz MG, Johannsen TH, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 Levels Decline Prior to Pubertal Onset and Through Puberty: A Longitudinal Study of Healthy Girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(February):1920–6.
 51. Liu H, Kong X, Chen F. Mkrn3 functions as a novel ubiquitin E3 ligase to inhibit Nptx1 during puberty initiation. *Oncotarget.* 2017;8(49):85102–9.

52. Dauber A, Cunha-Silva M, MacEdo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally Inherited DLK1 deletion associated with familial central precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(5):1557–67.
53. Smas CM, Sul HS. Pref-1, a protein containing EGF-like repeats, inhibits adipocyte differentiation. *Cell.* 1993;73(4):725–34.
54. Ioannides Y, Lokulo-Sodipe K, Mackay DJG, Davies JH, Temple IK. Temple syndrome: Improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: An analysis of 51 published cases. *J Med Genet.* 2014;51(8):495–501.
55. Gomes LG, Cunha-Silva M, Crespo RP, Ramos CO, Montenegro LR, Canton A, et al. DLK1 Is a Novel Link Between Reproduction and Metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019;104(6):2112–20.
56. Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet.* 2014;15(8):517–30.
57. Lee HS, Hwang JS. Central precocious puberty in a girl with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2013;26(11–12):1201–4.
58. Crinò A, Di Giorgio G, Schiaffini R, Fierabracci A, Spera S, Maggioni A, et al. Central precocious puberty and growth hormone deficiency in a boy with Prader-Willi syndrome. *Eur J Pediatr.* 2008;167(12):1455–8.
59. Wannes S, Elmaleh-Bergès M, Simon D, Zénaty D, Martinerie L, Storey C, et al. High prevalence of syndromic disorders in patients with non-isolated central precocious puberty. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(6):373–80.
60. Wakeling EL, Lokulo-sodipe O, Salem J, Bliet J, Canton APM, Chrzanowska KH, et al. Diagnosis and management of Silver–Russell syndrome: first international consensus statement. *Nat Rev Endocrinol.* 2017;13(2):105–24.
61. Partsch CJ, Japing I, Siebert R, Gosch A, Wessel A, Sippell WG, et al. Central precocious puberty in girls with Williams syndrome. *J Pediatr.* 2002;141(3):441–4.
62. Levy-Shraga Y, Gothelf D, Pinchevski-Kadir S, Katz U, Modan-Moses D. Endocrine manifestations in children with Williams–Beuren syndrome. *Acta*

- Paediatr Int J Paediatr. 2018;107(4):678–84.
63. Kurosawa K, Kawame H, Okamoto N, Ochiai Y, Akatsuka A, Kobayashi M, et al. Epilepsy and neurological findings in 11 individuals with 1p36 deletion syndrome. *Brain Dev.* 2005;27(5):378–82.
 64. Kosho T, Sakazume S, Kawame H, Wakui K, Wada T, Okoshi Y, et al. De-novo balanced translocation between 7q31 and 10p14 in a girl with central precocious puberty, moderate mental retardation, and severe speech impairment. *Clin Dysmorphol.* 2008;17(1):31–4.
 65. Lybæk H, Ørstavik KH, Prescott T, Hovland R, Breilid H, Stansberg C, et al. An 8.9Mb 19p13 duplication associated with precocious puberty and a sporadic 3.9Mb 2q23.3q24.1 deletion containing NR4A2 in mentally retarded members of a family with an intrachromosomal 19p-into-19q between-arm insertion. *Eur J Hum Genet.* 2009;17(7):904–10.
 66. Funderburk S, Sparkes R. The 9p- syndrome. *J Med Genet.* 1979;16(1):75–9.
 67. Cisternino M, Della Mina E, Losa L, Madè A, Rossetti G, Bassi LA, et al. Idiopathic Central Precocious Puberty Associated with 11 Mb De Novo Distal Deletion of the Chromosome 9 Short Arm . *Case Rep Genet.* 2013;2013:1–6.
 68. Winter S, Durand A, Brauner R. Precocious and Early Central Puberty in Children With Pre-existing Medical Conditions: A Single Center Study. *Front Pediatr.* 2019;7(February):1–8.
 69. Goldenberg A, Riccardi F, Tessier A, Pfundt R, Busa T, Cacciagli P, et al. Clinical and molecular findings in 39 patients with KBG syndrome caused by deletion or mutation of ANKRD11. *Am J Med Genet Part A.* 2016;170(11):2847–59.
 70. Thienpont B, Béna F, Breckpot J, Philip N, Menten B, Van Esch H, et al. Duplications of the critical Rubinstein - Taybi deletion region on chromosome 16p13.3 cause a novel recognisable syndrome. *J Med Genet.* 2010;47(3):155–61.
 71. Giannakopoulos A, Fryssira H, Tzetis M, Xaidara A, Kanaka-Gantenbein C. Central precocious puberty in a boy with 22q13 deletion syndrome and NOTCH-1 gene duplication. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2016;0(0):1–5.

72. Skordis N, Ferrari E, Antoniadou A, Phylactou LA, Fanis P, Neocleous V. GnRH-dependent precocious puberty manifested at the age of 14 months in a girl with 47,XXX karyotype. *Hormones*. 2017;16(3):318–21.
73. Grams SE, Argiropoulos B, Lines M, Chakraborty P, McGowan-Jordan J, Geraghty MT, et al. Genotype-phenotype characterization in 13 individuals with chromosome Xp11.22 duplications. *Am J Med Genet Part A*. 2016;170(4):967–77.
74. Canton A, Brito V, Montenegro L, Krepischi A, Rosenberg C, Costa S, et al. OR17-2 Comprehensive genetic investigation of patients with central precocious puberty associated with complex phenotype. *J Endocr Soc*. 2019;3(Supplement_1 April-May):OR17-2.
75. Valadares LP, Meireles CG, De Toledo IP, Santarem de Oliveira R, Gonçalves de Castro LC, Abreu AP, et al. MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Endocr Soc*. 2019;3(5):979–95.
76. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *Int J Surg*. 2010;8(5):336–41.
77. Munn Z, Moola S, Riitano D, Lisy K. The development of a critical appraisal tool for use in systematic reviews addressing questions of prevalence. *Int J Heal Policy Manag*. 2014;3(3):123–8.
78. Macedo D, França MM, Montenegro L, Cunha-Silva M, Bessa DS, Abreu AP, et al. Central Precocious Puberty Caused By a Heterozygous Deletion in the Mkrn3 Promoter Region. *Neuroendocrinology*. 2018;107(2):127–32.
79. Stecchini MF, Macedo DB, Reis ACS, Abreu AP, Moreira AC, Kaiser UB, et al. Time Course of Central Precocious Puberty Development Caused by an MKRN3 Gene Mutation : A Prismatic Case. *Horm Res Paediatr*. 2016;
80. Käsäkoski J1, 2, Raivio T1, 2, Juul A3, Tommiska J1 2. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with earlypuberty. *Pediatr Res*. 2015;78(6):709–11.
81. Settas N, Dacou-voutetakis C, Karantza M, Kanaka-gantenbein C, Chrousos

- GP, Voutetakis A. Central Precocious Puberty in a Girl and Early Puberty in Her Brother Caused by a Novel Mutation in the. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(April 2014):647–51.
82. Christoforidis A, Skordis N, Fanis P, Dimitriadou M. A novel MKRN3 nonsense mutation causing familial central precocious puberty. *Endocrine.* 2017;1–4.
83. Lin W, Wang C, Tsai F. Letter to the Editor Genetic screening of the makorin ring finger 3 gene in girls with idiopathic central precocious puberty. *Clin Chem Lab Med.* 2015;0–3.
84. Ayca Z, Savaş-erdeve Ş, Çetinkaya S. Investigation of MKRN3 Mutation in Patients with Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2018;10(3):223–9.
85. Kopacek C, Elnecave RH, Krug BC, Amaral KM. Puberdade Precoce Central. *Protoc Clínico e Diretrizes Ter.* 2010;507–23.
86. Miller S a., Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
87. Scionti F, Di Martino MT, Pensabene L, Bruni V, Concolino D. The cytoscan HD array in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. *High-Throughput.* 2018;7(3):1–12.
88. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. *Genet Med.* 2011;13(7):680–5.
89. Srebniak MI, Diderich KEM, Govaerts LCP, Joosten M, Riedijk S, Galjaard RJH, et al. Types of array findings detectable in cytogenetic diagnosis: A proposal for a generic classification. *Eur J Hum Genet.* 2014;22(7):856–8.
90. Yellapragada V, Liu X, Lund C, Käsäkoski J, Pulli K, Vuoristo S, et al. MKRN3 Interacts With Several Proteins Implicated in Puberty Timing but Does Not Influence GNRH1 Expression. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(February).
91. Kim SH, Huh K, Won S, Lee KW, Park MJ. A significant increase in the incidence of central precocious puberty among Korean girls from 2004 to 2010. *PLoS One.*

- 2015;10(11):1–8.
92. Le Moal J, Rigou A, Le Tertre A, De Crouy-Channel P, Léger J, Carel JC. Marked geographic patterns in the incidence of idiopathic central precocious puberty: A nationwide study in France. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(1):33–41.
 93. Suzuki E, Shima H, Kagami M, Soneda S, Tanaka T, Yatsuga S, et al. (Epi) genetic defects of MKRN3 are rare in Asian patients with central precocious puberty. *Hum Genome Var.* 2019;(Jan):7–10.
 94. Chen T, Chen L, Wu H, Xie R, Wang F, Chen X, et al. Low Frequency of MKRN3 and DLK1 Variants in Chinese Children with Central Precocious Puberty. *Int J Endocrinol.* 2019;2019(Figure 1):1–6.
 95. Abreu AP, Garcia L, Pereira S, Macedo DB, Magnusson M, Gagliardi PC, et al. Mutations in the Maternally Imprinted Genes, MKRN3 and DLK1, Associated with Central Precocious Puberty. In: *Journal of the Endocrine Society.* 2019. p. SUN-264.
 96. Meng X, Li S, Duan W, Sun Y, Jia C. Secular Trend of Age at Menarche in Chinese Adolescents Born From 1973 to 2004. *Pediatrics.* 2017;140(2):e20170085.
 97. Lee MH, Kim SH, Oh M, Lee KW, Park MJ. Age at menarche in Korean adolescents: Trends and influencing factors. *Reprod Health.* 2016;13(1):1–7.
 98. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Secular trends in age at menarche in women in the UK born 1908-93: Results from the breakthrough generations study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011;25(4):394–400.
 99. Papadimitriou A, Fytanidis G, Douros K, Bakoula C, Nicolaidou P, Fretzayas A. Age at menarche in contemporary Greek girls: Evidence for levelling-off of the secular trend. *Acta Paediatr Int J Paediatr.* 2008;97(6):812–5.
 100. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(3):254–64.
 101. Takahashi LAR, Dos Santos Figueiredo FW, Benedet J, De Vasconcelos FDAG, Adami F. Influence of sexual maturation status on the relationship between body

- adiposity indicators and age: A cross-sectional study. *BMC Res Notes*. 2019;12(1):1–8.
102. Johannsen TH, Main KM, Ljubicic ML, Jensen TK, Andersen HR, Andersen MS, et al. Sex-Differences in Reproductive Hormones during Mini-Puberty in Infants with Normal and Disordered Sex Development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(August):3028–37.
 103. Roberts S, Chouman S, Johnson M, Navarro VM, Carroll RS, Kaiser U. Elucidating the mechanisms of action of Mkrn3 in a novel mouse model of delayed puberty. *J Endocr Soc*. 2019;3(Supplement_1):ORO7-2.
 104. Gross-tsur V, Hirsch HJ, Benarroch F, Eldar-geva T. The FSH-inhibin axis in prader-willi syndrome: heterogeneity of gonadal dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol [Internet]*. 2012;10(1):1. Available from: ???10/1477-7827-10-39
 105. Radicioni AF, Di Giorgio G, Grugni G, Cuttini M, Losacco V, Anzuini A, et al. Multiple forms of hypogonadism of central, peripheral or combined origin in males with Prader-Willi syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;76(1):72–7.
 106. Fanis P, Skordis N, Toumba M, Papaioannou N, Makris A, Kyriakou A, et al. Central Precocious Puberty Caused by Novel Mutations in the Promoter and 5'-UTR Region of the Imprinted MKRN3 Gene. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10(October):0–10.
 107. Naule L, Abreu AP, Gassaway B, Kim HK, Liang J, Carrol R, et al. The Role of Neuronal Plasticity in the timing of puberty onset: insights from a Mkrn3 deficient mouse model. *J Endocr Soc*. 2019;3(Supplement_1, April-May 2019):ORO8-3.
 108. Margolin DH, Kousi M, Chan Y-M, Lim ET, Schmahmann JD, Hadjivassiliou M, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med*. 2013 May 23;368(21):1992–2003.
 109. Tommiska J, Sørensen K, Aksglaede L, Koivu R, Puhakka L, Juul A, et al. LIN28B, LIN28A, KISS1, and KISS1Rin idiopathic central precocious pubertycentral precocious puberty. *BMC Res Notes*. 2011;4(1):363.
 110. Leka-Emiri S, Louizou E, Kambouris M, Chrousos G, De Roux N, Kanaka-Gantenbein C. Absence of GPR54 and TACR3 mutations in sporadic cases of

- idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;81(3):177–81.
111. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2015;16(3):172–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg3871>
 112. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: Revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901–9.
 113. Fan YS, Ouyang X, Peng J, Sacharow S, Tekin M, Barbouth D, et al. Frequent detection of parental consanguinity in children with developmental disorders by a combined CGH and SNP microarray. *Mol Cytogenet*. 2013;6(1):2–7.
 114. Conrad DF, Pinto D, Redon R, Feuk L, Gokcumen O, Zhang Y, et al. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*. 2010;464(7289):704–12.
 115. Weiss LA, Shen Y, Korn JM, Arking DE, Miller DT, Fossdal R, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med*. 2008;358(7):667–75.
 116. Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, et al. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet*. 2010;47(3):195–203.
 117. Miller DT, Chung W, Nasir R, Shen Y, Steinman KJ, Wu BL, et al. 16p11.2 Recurrent Microdeletion. *GeneReviews*(R). 1993;1–16.
 118. Choonara I, Rosenbloom L, Smith S. Clonazepam and sexual precocity. *N Engl J Med*. 1985;312(3):185.
 119. Zaiem A, Aouinti I, Lakhoua G, Kastalli S, Daghfous R, Lakhal M, et al. Precocious puberty in an epileptic child treated with valproate. *Therapie*. 2012;67(6):537–8.
 120. Nalin A, Galli V, Ciccarone V, Grandi F, Baraldi E, Carani C. Antiepileptic drugs and puberty. *Brain Dev*. 1988;10(3):192–4.

121. Grandone A, Cirillo G, Sasso M, Capristo C, Tornese G, Marzuillo P, et al. MKRN3 levels in girls with central precocious puberty and correlation with sexual hormone levels : a pilot study. *Endocrine*. 2017;1–6.

MKRN3 Mutations in Central Precocious Puberty: A Systematic Review and Meta-Analysis

Luciana Pinto Valadares,¹ Cinthia Gabriel Meireles,¹ Isabela Porto De Toledo,² Renata Santarem de Oliveira,^{3,4,5} Luiz Cláudio Gonçalves de Castro,⁴ Ana Paula Abreu,⁶ Rona S. Carroll,⁶ Ana Claudia Latronico,⁷ Ursula B. Kaiser,⁶ Eliete Neves Silva Guerra,² and Adriana Lofrano-Porto^{1,3}

¹Molecular Pharmacology Laboratory, Health Sciences Faculty, University of Brasilia, Brasilia, DF 70904970, Brazil; ²Laboratory of Oral Histopathology, Health Sciences Faculty, University of Brasilia, Brasilia, DF 70904970, Brazil; ³Gonadal and Adrenal Diseases Clinics, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia, Brasilia, DF 70840901, Brazil; ⁴Pediatric Endocrinology Unit, Department of Pediatrics, University Hospital of Brasilia, Faculty of Medicine, University of Brasilia, DF 70840901, Brazil; ⁵Jose Alencar Brasilia Children's Hospital, State Secretary of Health, Brasilia, DF 70684381, Brazil; ⁶Division of Endocrinology, Diabetes and Hypertension, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115; and ⁷Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM42, Hospital das Clínicas, Disciplina Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, SP 05403900, Brazil

ORCID numbers: 0000-0002-4848-306X (L. P. Valadares); 0000-0002-9590-163 (A. Lofrano-Porto).

MKRN3 mutations represent the most common genetic cause of central precocious puberty (CPP) but associations between genotype and clinical features have not been extensively explored. This systematic review and meta-analysis investigated genotype-phenotype associations and prevalence of *MKRN3* mutations in CPP. The search was conducted in seven electronic databases (Cochrane, EMBASE, LILACS, LIVIVO, PubMed, Scopus, and Web of Science) for articles published until 4 September 2018. Studies evaluating *MKRN3* mutations in patients with CPP were considered eligible. A total of 22 studies, studying 880 subjects with CPP, fulfilled the inclusion criteria. Eighty-nine subjects (76 girls) were identified as harboring *MKRN3* mutations. Girls, compared with boys, exhibited earlier age at pubertal onset (median, 6.0 years; range, 3.0 to 7.0 vs 8.5 years; range, 5.9 to 9.0; $P < 0.001$), and higher basal FSH levels (median, 4.3 IU/L; range, 0.7 to 13.94 IU/L vs 2.45 IU/L; range, 0.8 to 13.70 IU/L; $P = 0.003$), and bone age advancement (Δ BA; median, 2.3 years; range, -0.9 to 5.2 vs 1.2 years; range, 0.0 to 2.3; $P = 0.01$). Additional dysmorphisms were uncommon. A total of 14 studies evaluating 857 patients were included for quantitative analysis, with a pooled overall mutation prevalence of 9.0% (95% CI, 0.04 to 0.15). Subgroup analysis showed that prevalence estimates were higher in males, familial cases, and in non-Asian countries. In conclusion, *MKRN3* mutations are associated with nonsyndromic CPP and manifest in a sex-dimorphic manner, with girls being affected earlier. They represent a common cause of CPP in western countries, especially in boys and familial cases.

Copyright © 2019 Endocrine Society

This article has been published under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial, No-Derivatives License (CC BY-NC-ND; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Freeform/Key Words: central precocious puberty, *MKRN3*, systematic review, meta-analysis

Precocious puberty is traditionally defined by the onset of progressive pubertal development before the age of 8 years in girls and 9 years in boys. Central precocious puberty (CPP), also known as gonadotropin-dependent precocious puberty, is a condition resulting from the early

Abbreviations: BA, bone age; CPP, central precocious puberty; E3, ubiquitin-protein ligase; *MKRN3*, makorin ring finger protein 3; PWS, Prader-Willi syndrome.

Received 30 January 2019
Accepted 19 March 2019
First Published Online 25 March 2019

May 2019 | Vol. 3, Iss. 5
doi: 10.1210/qs.2019-00041 | Journal of the Endocrine Society | 979–995

reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [1, 2]. In the absence of central nervous system abnormalities, CPP is classified as idiopathic, and it predominantly affects girls. Idiopathic CPP is familial in as many as 27.5% of the cases, emphasizing the genetic origin of this disorder [3].

The involvement of the makorin ring finger protein 3 (*MKRN3*) gene in the pathogenesis of CPP was first described by Abreu *et al.* in 2013 after evaluating patients with familial CPP using whole-exome sequencing [4]. Subsequently, mutations in *MKRN3* have been described in multiple patients with CPP from different countries [5–16].

MKRN3, previously known as *ZNF127*, is an intronless and imprinted gene located on chromosome 15q11-q13, in the Prader-Willi syndrome (PWS) region [17]. Because of maternal imprinting, only the paternal allele is expressed. Therefore, CPP can be expected only if the mutated allele is paternally inherited [2, 4, 18]. It encodes a protein belonging to the Makorin family of zinc finger proteins with proposed ubiquitin-protein ligase (E3) activity, based on its structure and on activity of the other members of the makorin family. The findings of loss of function mutations in *MKRN3* associated with the pattern of the hypothalamic *Mkfn3* mRNA expression in mice suggest that *MKRN3* acts to inhibit puberty initiation [4, 18], though its exact mechanism of action remains to be elucidated.

Currently, *MKRN3* mutations are recognized as the main genetic cause of CPP and appear to be particularly common in familial cases (up to 33% to 46%) [7, 18], although no mutations were described in the subgroup of Korean girls with familial CPP [12]. In the sporadic form of CPP, the prevalence was 3.9% in a large cohort of Brazilian girls [5], however it was variable in other reports, ranging from 0% to 20% in small cohorts of Italian and Bulgarian girls, respectively [19, 20]. Thus, the exact prevalence of mutations in patients with CPP and possible geographical differences worldwide has not been explored.

Patients carrying *MKRN3* mutations exhibit typical clinical and biochemical features of premature reactivation of the reproductive axis. Few studies compared data of patients with and without mutations, and higher levels of basal FSH and an earlier age at pubertal onset had been described among girls with mutations [5, 7], whereas affected boys exhibited later pubertal onset in comparison with those with CPP and no mutations [15]. Thus, it is still not known whether their phenotype differs from those without mutations. Therefore, we performed a systematic review and meta-analysis aiming to identify and synthesize data on *MKRN3* mutations in CPP, to investigate genotype-phenotype associations, and to estimate the worldwide prevalence of *MKRN3* mutations in patients with idiopathic CPP.

1. Methods

The methodology of this systematic review was based on the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses [21]. The protocol was registered at the international prospective register of systematic reviews with the number CRD42018095144 (<http://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/>).

A. Eligibility Criteria

Observational human studies and clinical trials evaluating *MKRN3* mutations in patients with idiopathic CPP were considered eligible. Idiopathic CPP was defined by progressive pubertal development before the age of 8 years in girls and 9 years in boys, pubertal basal and/or GnRH-stimulated LH levels, advancement of BA as assessed by the Greulich and Pyle method, and absence of central nervous system abnormalities on MRI.

Exclusion criteria were defined as follows: (i) review articles, letters, conference abstracts, personal opinions, and book chapters; (ii) articles that were not in the Latin (Roman) alphabet; (iii) studies that had duplicate data; and (iv) studies investigating single nucleotide polymorphisms in patients without a confirmed diagnosis of CPP.

B. Search Strategy and Study Selection

A systematic electronic search was conducted in seven databases with neither language nor year restriction (Cochrane, EMBASE, LILACS, LIVIVO PubMed, Scopus, and Web of Science). The grey literature [22] search was performed using Google Scholar and ProQuest. At the end of the search phases, the bibliographies of selected articles were manually screened for the identification of additional eligible studies. The details of search strategy are important to the comprehension of this study [23].

Two independent authors (L.P.V. and C.G.M.) conducted the study selection. First, titles and abstracts were evaluated and publications that did not fulfill the inclusion criteria were discarded. In the second phase, full texts of selected articles were reviewed independently by the same authors (L.P.V. and C.G.M.) to confirm their eligibility. Any disagreement between reviewers was resolved by consensus. A third author (I.P.D.T) was consulted if disagreements between the two initial evaluators were not resolved by consensus.

C. Data Extraction

The following data were extracted from each study: first author, year and country of publication, study design, sample size, number of patients with *MKRN3* mutations, family history of CPP, and sequencing technique. In addition, clinical variables of interest including sex, age at pubertal onset, Tanner stage, BA, hormonal parameters at diagnosis, type of *MKRN3* mutation, and information regarding treatment were extracted for individual patients. Data and genetic analyses from adult parents with a diagnosis of CPP based on past medical history were not included.

D. Risk of Bias in Individual Studies

Critical appraisal of included studies was performed independently by two authors (L.P.V. and C.G.M.) according to a checklist developed by Joanna Briggs Institute for Studies Reporting Prevalence Data [24]. Disagreements in the assessment of the risk of bias were resolved by discussion, with the involvement of a third reviewer author if necessary.

E. Statistical Analysis

We pooled the predefined clinical and biochemical features that were more frequently reported in the selected studies (age at pubertal onset and at diagnosis, Tanner stage, BA, basal and poststimulated LH, basal FSH, estradiol, testosterone, and type of *MKRN3* mutation).

Possible differences between data of girls and boys with *MKRN3* mutations, and of Asian girls and girls from western countries, were analyzed using the nonparametric Mann-Whitney test because data did not follow a normal distribution. Statistical significance was defined as $P < 0.05$. Analyses were performed using SPSS, version 20.

In studies eligible for analysis of prevalence, the number of patients screened positive for *MKRN3* mutations (numerator) and the total number of CPP patients screened (denominator) were used to estimate prevalence. Meta-analysis was performed using StataCorp Software, version 13 (College Station, TX) with the “metaprop” command; a random effect model was used to estimate the pooled prevalence of *MKRN3* mutations and the 95% CIs. Potential sources of heterogeneity were examined by performing a series of pre-specified subgroup analyses for the following variables: sex, family history of CPP, and geographical distribution (Asian and non-Asian countries). Heterogeneity was assessed using the I^2 statistic, where $\leq 25\%$, 50% , and $\geq 75\%$ indicated low, moderate, and high heterogeneity, respectively.

2. Results

A. Study Selection

The initial search through the electronic databases was conducted on 6 February 2018 and resulted in a total of 161 studies after removing duplicates. Four other articles were identified through updated search on 4 September 2018. No additional study was included from the references of the retrieved articles or from grey literature. After a comprehensive evaluation of titles and abstracts, 31 articles were considered for the second phase, in which the full texts were reviewed. Finally, 22 studies complied with the inclusion criteria. A flow chart detailing the selection process is shown in Fig. 1.

B. Study Characteristics

The main study characteristics are summarized elsewhere [23]. All studies were published between 2013 and 2018 in the English language. Of them, 7 were case reports, 2 were case series, 11 were cross-sectional, and 2 studies were classified as cross-sectional and translational. The 14 studies included in the quantitative synthesis (meta-analysis) of prevalence comprised a total of 857 patients with idiopathic CPP screened for *MKRN3* mutations. In the study of Bessa *et al.* [15], data of some patients had been previously published [4] and therefore were counted only once for the analysis of prevalence.

Regarding risk of bias by Joanna Briggs Institute Critical Appraisal Checklist for Studies Reporting Prevalence Data, 2 studies were classified as carrying moderate risk of bias [25, 26] and 20 were classified as with low risk of bias [4–16, 19, 20, 23, 27–31].

C. Demographic and Phenotypic Characteristics Associated With *MKRN3* Mutations

MKRN3 defects were described in 89 patients (76 girls and 13 boys) with CPP from 17 countries: Argentina [15], Belgium [4], Brazil [4, 5, 15, 16, 31], Bulgaria [20], Cyprus [25, 26], Denmark [28], France [7], Germany [9], Greece [6], Israel [8], Italy [7, 10, 19, 27], Japan [14], Korea [12], Spain [13], Taiwan [29], Turkey [11, 30], and United States of America [4]. Eighty-eight patients harbored mutations in the coding sequence and one exhibited a deletion in the promoter region of the gene.

Patients with *MKRN3* mutations presented with signs and symptoms of early reactivation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis, represented by precocious development of sexual characteristics, BA advancement, and pubertal levels of basal or poststimulated LH. The detailed clinical and hormonal profiles of patients with *MKRN3* mutations identified are shown elsewhere [23].

In the pooled analysis, the median age at pubertal onset of girls with *MKRN3* mutations (n = 76) was 6.0 years (range, 3.0 to 7.8). Median basal and poststimulated LH levels were 1.27 IU/L (range, 0.1 to 6.1) and 22.0 IU/L (range, 4.0 to 95.9), respectively. Asian girls were significantly older at diagnosis (8.0 years; range, 6.8 to 10.3 years) in comparison with girls from western countries (6.7 years; range, 3.6 to 8.4; $P < 0.001$) and tended to be older at pubertal onset (6.8 years; range, 5.0 to 7.8 years *vs* 6.0 years; range, 3.0 to 7.5 years; $P = 0.072$). In addition, Asian girls presented with lower basal FSH levels than western girls (3.0 IU/L; range, 0.8 to 7.64 IU/L *vs* 4.5 IU/L; range, 0.7 to 13.94 IU/L, respectively; $P = 0.042$), as shown in Table 1.

The median age at pubertal onset of boys (n = 13) was 8.5 years (range, 5.9 to 9.0). In comparison with boys, girls exhibited a significantly earlier age at pubertal onset (2.0 years below the sex-specific lower age limit *vs* 0.5 years below this limit in boys, $P = 0.001$), higher basal FSH levels (median, 4.3 IU/L; range, 0.7 to 13.94 IU/L *vs* 2.45 IU/L; range, 0.8 to 13.70 IU/L in boys; $P = 0.003$), and greater Δ BA (median, 2.3 years; range, -0.9 to 5.2 years *vs* 1.2 years; range, 0.0 to 2.3 years, respectively; $P = 0.01$) (Table 2).

There was no difference among the age at pubertal onset, Δ BA, and hormonal data when comparing patients harboring different subtypes of *MKRN3* mutations, according to their predicted severity. However, patients with missense mutations were older at diagnosis than

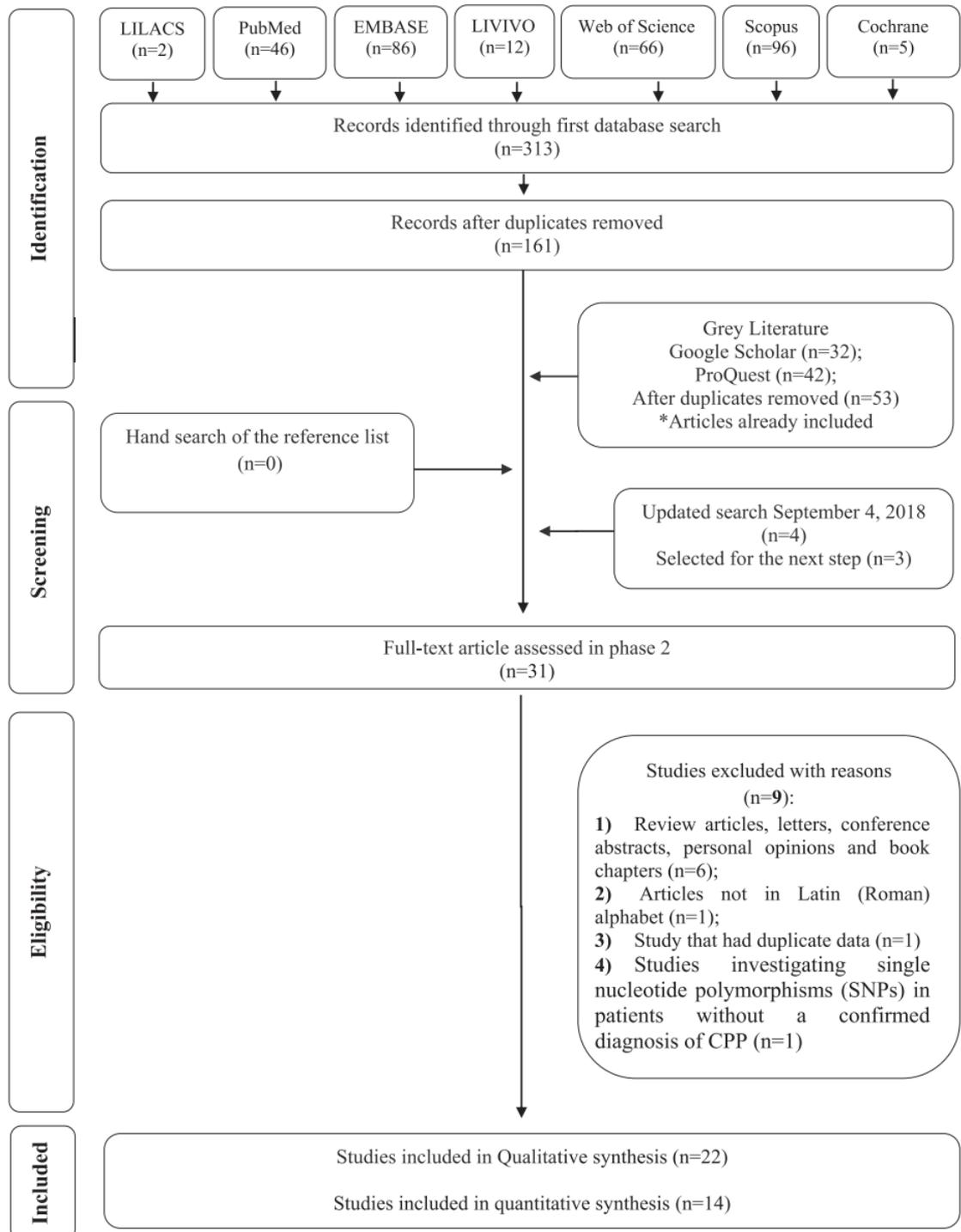


Figure 1. Flow chart for identifying eligible studies.

patients with mutations that encode premature stop codons (nonsense and frameshift) and a promoter deletion (7.72 years; range, 3.6-10.3 vs 6.75 years; range, 3.8 to 13.2, respectively). This finding may suggest a slower rate of puberty progression associated with mutation subtype (Table 3). Notably, the majority of mutations found in Asian girls were missense [9 of 11 (82%)] whereas in girls from western countries missense mutations were found only in 21 of 65 (32%) of the patients ($P = 0.002$).

Table 1. Pooled Comparative Analysis of Clinical and Biochemical Data of Girls From Western Countries (n = 65) and Girls From Asian Countries (n = 11)

Clinical and Biochemical Data	Western Girls, Median (Range)	Asian Girls, Median (Range)	P Value
Age at pubertal onset, y (64/6)	6.0 (3.0–7.5)	6.8 (5.0–7.80)	0.072
Age at diagnosis, y (61/11)	6.7 (3.6–8.4)	8.0 (6.8–10.3)	<0.001 ^a
ΔBA-CA, y (58/11)	2.3 (–0.9 to 5.2)	2.1 (1.2–3.0)	0.928
Basal FSH, IU/L (58/11)	4.5 (0.7–13.94)	3.0 (0.8–7.64)	0.042 ^a
Basal LH, IU/L (55/11)	1.1 (0.1–6.1)	1.6 (0.36–3.74)	0.454
Poststimulated LH, IU/L (54/9)	22.1 (4.9–95.9)	11.6 (5.6–52.5)	0.321
Estradiol, pg/mL (52/2)	25.5 (2.0–80.0)	38.5 (29.0–48.0)	0.507

In the first column, numbers in parentheses refer to the number of patients from each group in which the information was available for comparative analysis.

Abbreviation: ΔBA-CA, difference between bone age and chronological age.

^a $P < 0.05$, using the Mann-Whitney U test for comparison between the groups.

Additional dysmorphisms were rare and include esotropia detected in two affected siblings [18], and clinodactyly and lumbar hyperlordosis in two unrelated girls, one of whom also exhibited a high-arched palate and dental abnormalities [5, 10]. Premature ovarian failure was reported by Grandone *et al.* [10] in the mutated grandmother of the index case, although it could be an incidental finding.

There were few studies comparing data of patients with and without *MKRN3* mutations. Macedo *et al.* [5] described higher levels of basal FSH in girls with *MKRN3* mutations compared with nonmutated girls (median, 4.9 IU/L; ranging from 4.4 to 10 IU/L vs 3.6 IU/L; range, 1.0 to 9.8 IU/L; $P = 0.016$). Simon *et al.* [7] found that girls with *MKRN3* mutations were younger at puberty onset than nonmutated ones [median age, 6.0 years (range, 5.4 to 6.0) vs 7.0 years (range, 6.0 to 7.0), $P = 0.01$], but no additional differences regarding hormonal levels, uterus length, Tanner Stage, and ΔBA were observed between the groups. Data of male patients are limited because of the small number of reported boys with *MKRN3* mutations (n = 13). Data from Bessa *et al.* [15] suggested a later pubertal onset in mutated boys (median age, 8.2 years vs 7.0 years in boys with CPP without *MKRN3* mutations; $P = 0.033$), although no differences in hormonal status were identified between the groups.

Younger carriers of *MKRN3* mutations identified by family screening before the development of pubertal signs have also been described [7, 11], and their clinical follow-up are still not known. Stecchini *et al.* reported a case of a girl identified as a carrier of *MKRN3* mutation at the age of 4 because of a positive family history, who was diagnosed with CPP at the age of 6.7 years [16].

Table 2. Pooled Comparative Analysis of Clinical and Biochemical Data of Girls (n = 76) and Boys (n = 13) With *MKRN3* Mutations

Clinical and Biochemical Data	Girls, Median (Range)	Boys, Median (Range)	P Value
Age at pubertal onset, y (70/8)	6.0 (3.0–7.8)	8.5 (5.9–9.00)	<0.001 ^a
Δ Age at pubertal onset (70/8)	2.0 (0.2–5.0)	0.5 (0.0–3.9)	0.001 ^a
Age at diagnosis, y (72/12)	6.8 (3.6–10.3)	9.45 (8.1–13.2)	<0.001 ^a
ΔBA-CA, y (69/11)	2.3 (–0.9–5.2)	1.2 (0.0–2.3)	0.01 ^a
Basal FSH, UI/L (69/12)	4.3 (0.7–13.94)	2.45 (0.8–13.70)	0.003 ^a
Basal LH, UI/L (66/12)	1.27 (0.1–6.1)	1.35 (0.7–5.41)	0.239
Poststimulated LH, UI/L (63/7)	22.0 (4.9–95.9)	13.9 (6.7–20.00)	0.089

In the first column, numbers between parentheses refer to the number of patients from each group in which the information was available for comparative analysis; Δ age at pubertal onset express the difference between the sex-specific lower age limit for pubertal development and the age at onset of puberty.

^a $P < 0.05$, using the Mann-Whitney U test for comparison between the groups.

Table 3. Pooled Comparative Analysis of Clinical and Biochemical Data of Patients With *MKRN3* Mutations According to Subtype of Mutation

Clinical and Biochemical Data	Severe Mutations ^a (n = 52) Median (Range)	Missense Mutations (n = 37), Median (Range)	P Value
Age at pubertal onset, y (51/27)	6.0 (3.0–9.0)	6.0 (3.5–8.5)	0.645
Age at diagnosis, y (48/36)	6.75 (3.8–13.2)	7.72 (3.6–10.3)	0.028
ΔBA-CA (44/36)	2.0 (–0.9 to 5.2)	2.5 (0.2–3.7)	0.166
Basal FSH, UI/L (47/34)	4.0 (0.7–13.94)	3.85 (0.8–8.9)	0.497
Basal LH, UI/L (44/34)	1.3 (0.1–6.1)	1.29 (0.2–3.74)	0.341
Poststimulated LH, UI/L (40/30)	20.0 (4.9–62.5)	19.75 (5.6– 95.9)	0.506
Estradiol, pg/mL (34/20) ^b	27.85 (5.0–80.0)	25.5 (2.0–61.0)	0.502
T, ng/mL (5/5) ^c	216.0 (78.0–548.0)	198.8 (41.0–466.0)	0.347

In the first column, numbers in parentheses refer to the number of patients from each group in which the information was available for comparative analysis.

Abbreviation: T, testosterone.

^aSevere mutations encompassed frameshift mutations (n = 43), nonsense mutations (n = 8) and promoter deletions (n = 1).

^bEstradiol comparative analysis was performed between girls.

^cT comparative analysis was performed between boys; *P* < 0.05, using the Mann-Whitney *U* test for comparison between the groups.

Ultimately, information regarding treatment was available only for 54 patients and all were treated with GnRH analog. A satisfactory therapeutic response was described in all but two girls who were noncompliant with treatment. One Turkish girl whose parents refused treatment had menarche at the age of 8.9 years [11]. However, menarche seemed to occur in an appropriate age after an adequate treatment adherence with GnRH analog. In addition, the predicted final height appeared to be within the target height in the few cases in which this information was available [5].

D. *MKRN3* Mutations

To date, 39 inactivating mutations in the coding sequence of *MKRN3* have been described, including 4 nonsense, 13 frameshift, and 22 missense mutations (Fig. 2).

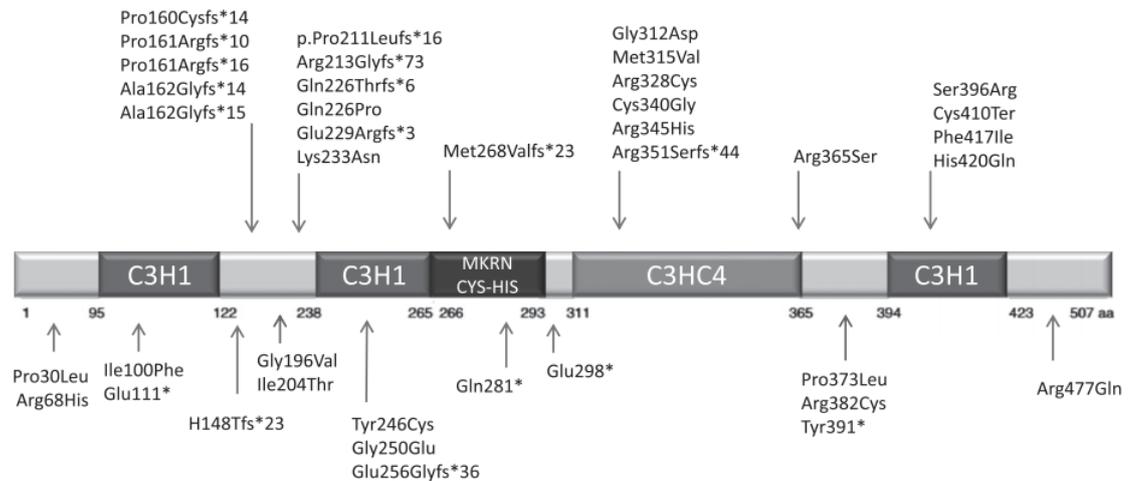


Figure 2. Structure of the *MKRN3* human protein showing the location of the mutations in coding sequence identified to date. Notably, 36% (14 of 39) of mutations are located in the loop structure between 2 C3H1 zinc finger motifs in the aminoterminal region of the protein and these are almost all frameshift mutations, thereby affecting protein structure. The C3HC4 is the second domain where mutations tend to cluster; this area has mostly missense mutations.

Frameshift variants are predicted to result in the translation of truncated proteins by creation of premature stop codons. Notably, 5 frameshift mutations, identified in almost one-third of the patients ($n = 27$), are located in a cytosine-rich region between nucleotides 476 and 482, confirming this site as a hotspot.

Most of the missense mutations were predicted to be pathogenic by *in silico* analysis. Of these, six are located within the C3HC4 ring zinc finger domain of the protein (p.Gly312Asp, p.Met315Val, p.Arg328Cys, p.Cys340Gly, p.Arg345His, p.Arg356Ser) and five within a C3H zinc finger motif (p.Tyr246Cys, p.Gly250Glu, p.Cys410Ter, p.Phe417Ile, p.His420Gln). These domains are related to the E3 ubiquitin-ligase activity and RNA-binding, respectively, and seem to be essential for protein function. Six missense variants were predicted to be benign or neutral by *in silico* analysis (p.Ile100Phe, p.Ile204Thr, p.Gln226Pro, p.Lys233Asn, and p.Ser396Arg), which were detected in Korean girls, and p.Arg477Gln, detected in a single Taiwanese girl [12, 29]. However, the lack of *in vitro* analysis of the missense mutations may be a possible limitation of interpretation.

In addition to defects in the coding sequence, a heterozygous 4-nucleotide deletion (c.-150_147delTCAG) in the promoter region of *MKRN3* was recently described in 1 of 110 patients with CPP without mutations in the coding sequence. This deletion is predicted to cause the loss of a binding site to a putative transcriptional factor for *MKRN3* expression. Using an *in vitro* luciferase reporter assay, the authors showed a substantial reduction of *MKRN3* promoter activity in cells transfected with a plasmid encoding the deletion [32].

Other genetic or epigenetic mechanisms that could disrupt the expression of an imprinted gene, such as copy number variations or methylation abnormalities, of the 15q11 locus were not detected in 52 patients evaluated by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification [5]. In addition, partial or complete *MKRN3* deletions were not found in 32 CPP patients without *MKRN3* mutations investigated through a quantitative PCR gene dosage assay [7].

E. Prevalence of *MKRN3* Mutations in Idiopathic CPP

MKRN3 mutations have been described in patients with familial and sporadic CPP from multiple countries and may account for a substantial proportion of familial cases (33% to 46%) [4, 7]. However, *MKRN3* mutations were not identified in a subgroup of Korean girls with familial CPP [12], and a lower frequency of mutations in familial cases was also described in other series (8.7% and 5.3%, respectively) [27, 30]. In addition, the frequency of *MKRN3* mutations appears to be higher among males (40% in one report) [15].

The pooled overall prevalence of *MKRN3* mutations in patients with idiopathic CPP was 9.0% (95% CI, 0.04 to 0.15; I^2 , 80.91%; $P = 0.00$; Fig. 3). Interestingly, the pooled prevalence of *MKRN3* mutations was much lower in patients from Asian countries (2.0%; 95% CI, 0.01 to 0.04; I^2 , 0.0%) than in those from non-Asian countries (11.0%; 95% CI, 0.04 to 0.21; I^2 , 81.31%) (Fig. 4).

Considering the variation in the prevalence of *MKRN3* mutations according to the geographical distribution and the lack of information regarding family history in some reports, studies from Asian countries were not included in the subanalysis by family history. The pooled prevalence of *MKRN3* mutations in patients with familial CPP was 19.0% (95% CI, 0.05 to 0.36; I^2 , 69.16%). Considering the sporadic cases, the estimated pooled prevalence was 2.0% (95% CI, 0.01 to 0.04; I^2 , 0%) (Fig. 5).

Afterward, in sex-based subanalysis, the pooled prevalence of *MKRN3* mutations in males (22.0%; 95% CI 0.0 to 0.62; I^2 , 70.19) was higher than in females (7.0%; 95% CI, 0.03 to 0.13; I^2 , 77.73%) (Fig. 6).

3. Discussion

This systematic review and meta-analysis investigated data of patients with CPP caused by *MKRN3* mutations, and, to our knowledge, it represents the most comprehensive review of the reported data published to date. In addition, it provides qualitative and quantitative analysis of published data, expanding the knowledge on the epidemiology of *MKRN3* mutations.

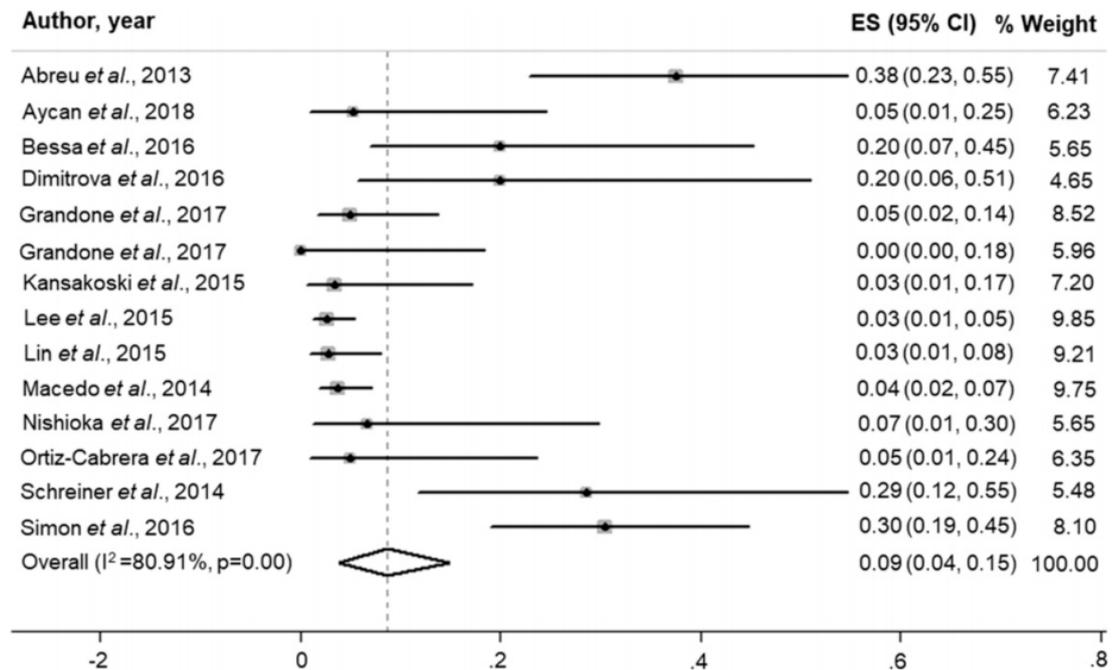


Figure 3. Pooled overall prevalence of *MKRN3* mutations in patients with central precocious puberty (9.0%; 95% CI, 0.04 to 0.15; I^2 , 80.91%; $P = 0.00$). ES, prevalence estimate.

There was no specific clinical or laboratory finding that identified a patient with CPP as a carrier of a *MKRN3* mutation. In one report, higher basal FSH levels were the only parameter found to differ between girls with and without *MKRN3* mutations [5]. In another study, lower age at puberty onset was recorded in the subgroup of girls with mutations in *MKRN3* compared with girls without mutations [7]. On the other hand, later age at pubertal onset is described in mutated boys compared with those without mutations [15].

Additional dysmorphisms were rare (described in only four patients worldwide) and major criteria for PWS were not described in any patient, reinforcing the hypothesis that *MKRN3* mutations are associated with the phenotype of nonsyndromic CPP. Curiously, premature ovarian failure was described in the grandmother of an Italian girl identified as a carrier of *MKRN3* gene mutation. Although it could be an incidental finding, gonadal dysfunction has been described in patients with PWS [33, 34], and long-term follow-up of mutated girls is necessary to evaluate a possible relationship between *MKRN3* mutations and premature ovarian failure.

The onset of physiologic puberty in girls occurs 1 to 2 years earlier than in boys, which is consistent with sexual dimorphism of the major drivers of puberty [35]. The pooled analysis of available data showed that mutations in *MKRN3* appear to affect pubertal onset in a sex-dimorphic manner, with girls entering puberty at a younger age than boys (median age, 2 years *vs* 0.5 years, below their sex-specific lower age limit, respectively; $P = 0.001$). In addition, girls with CPP exhibited higher basal FSH levels and greater Δ BA in comparison with boys. These differences do not reflect a more advanced stage of puberty at the time of diagnosis in girls than in boys; rather, the proportion of subjects with Tanner stages 3 and 4 was higher in boys than in girls (76% *vs* 58%, respectively). Moreover, FSH predominance is routinely seen during minipuberty [36] and female puberty [37], whether it is precocious or normally timed. A marked sex difference in circulating *MKRN3* levels was also reported, with prepubertal boys displaying a 50% lower mean serum *MKRN3* level compared with prepubertal girls [38]. Of note, serum levels of *MKRN3* negatively correlated with circulating FSH and LH in prepubertal girls [39], albeit no substantial correlation were observed between *MKRN3* and gonadotropin levels in boys. The mechanisms underlying this sex

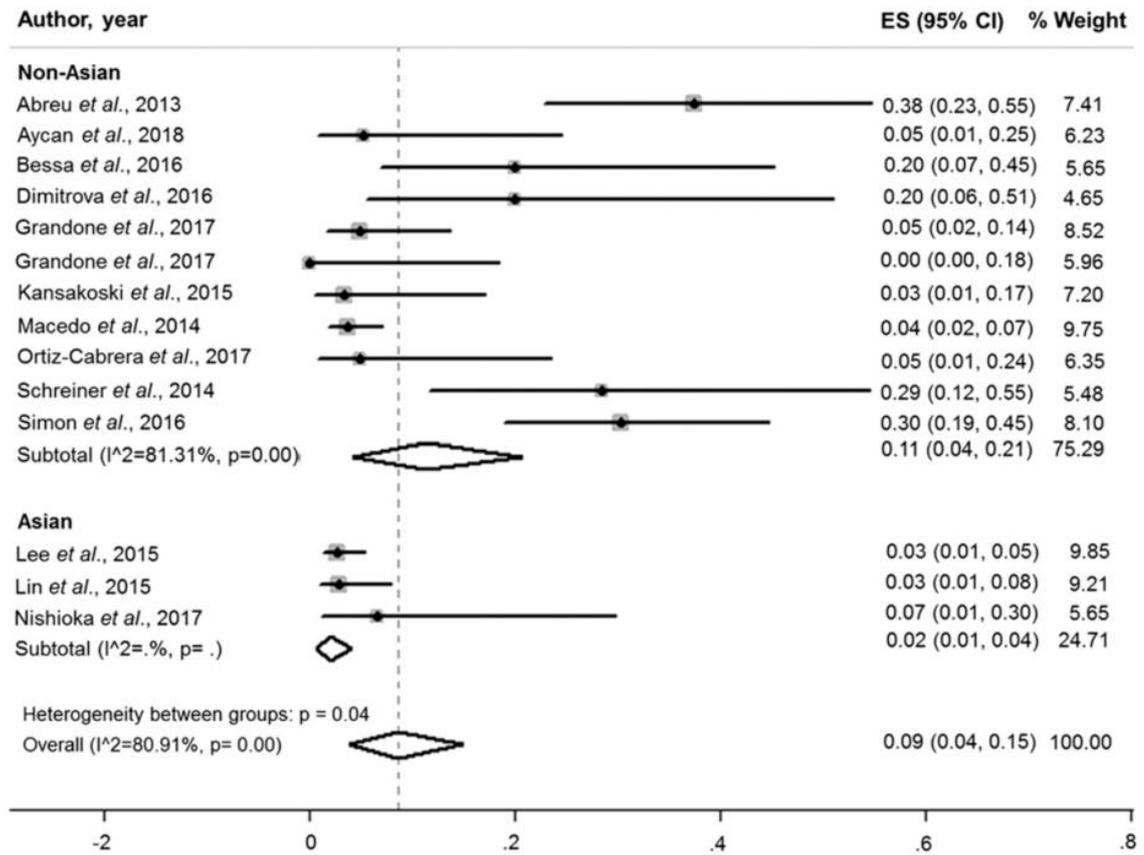


Figure 4. Pooled prevalence of *MKRN3* mutations among central precocious puberty patients from Asian (2.0%; 95% CI, 0.01 to 0.04; *I*², 0.0%) and non-Asian countries (11.0%; 95% CI, 0.04 to 0.21; *I*², 81.31%).

difference are not yet understood, and a sex-specific action of *MKRN3* on signaling pathways with a role on GnRH secretion cannot be ruled out. However, more studies are needed to clarify a putative sexually dimorphic action of *MKRN3*.

Girls from Asian countries with *MKRN3* mutations exhibited a tendency of older age at pubertal onset than girls from western countries (median, 6.8 years *vs* 6.0 years), older age at diagnosis (median, 8.0 years *vs* 6.7 years), and lower FSH levels (median, 3.0 IU/L *vs* 4.5 IU/L). It is well known that pubertal timing is influenced by genetic, metabolic, nutritional, and ethnic factors. In previous reports, menarche in Asian girls occurred later than in girls from western countries (at an average age of 14.5 years) [40]. However, two recent Asian studies reported that the mean age at menarche of Chinese and Korean girls declined to 12.6 and 12.7 years, respectively, throughout the past decade [41, 42]. These recent findings are similar to European and American studies, in which the reported mean age at menarche was near 12.5 years [43, 44]. The differences in clinical presentation of Asian girls with *MKRN3* mutations from that of girls from western countries may have been influenced by the difference observed in mutation subtypes, ethnicity, and environmental factors, such as diet and exposure to endocrine disruptors. In particular, higher body mass index and body adiposity are associated with earlier onset of puberty in girls [35, 45]. Unfortunately, it was not possible to analyze differences in body mass index between the groups because this information was absent in most of the reports. Additionally, interactions of metabolic and environmental factors that could potentially coregulate *MKRN3* signaling pathways are still under investigation. Other possibility may be attributed to selection bias. For example, selection criteria for *MKRN3* testing may have been more comprehensive for Asian studies compared with western studies.

Regarding treatment-related outcomes, patients with CPP caused by *MKRN3* mutations seem to be satisfactorily treated with GnRH analogs, although information regarding

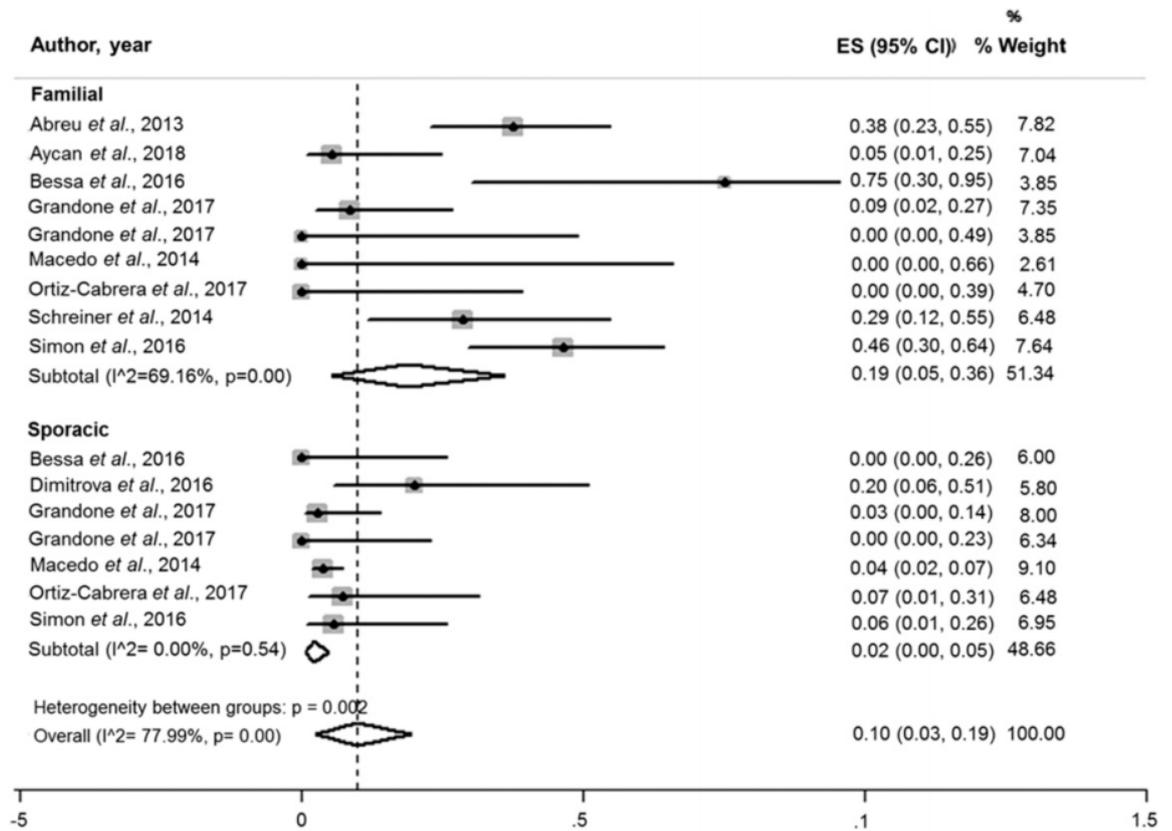


Figure 5. Pooled prevalence of *MKRN3* mutations according to family history. The pooled prevalence of *MKRN3* mutations in patients with familial CPP was 19.0% (95% CI, 0.05 to 0.36; I^2 , 69.16%). Considering the sporadic cases, the pooled estimates for prevalence was 2.0% (95% CI, 0.01 to 0.04; I^2 , 0%).

response to treatment was absent in almost one-third of the cases [4, 6, 9, 10, 12, 13, 15, 29]. The predicted final height appears to be preserved; however, the limited number of patients in whom this information was available precludes a definite conclusion about the potential of achieving target height [5, 12].

Early pubertal timing and menarche have been associated with an increased risk of obesity, type 2 diabetes, cardiovascular disease, and estrogen-dependent cancers [2, 46, 47]. It is still not known if *MKRN3* mutations are associated with a higher risk for adverse health outcomes in later life in comparison with patients without mutations. Long-term clinical follow-up of these patients is necessary to clarify this issue.

MKRN3 is expressed ubiquitously in human tissues. The human protein has 507 amino acids and contains a typical C3HC4 RING zinc finger motif and several C3H zinc finger motifs with predicted E3 ubiquitin-ligase activity and RNA-binding activity, respectively [18]. To date, 39 inactivating mutations in the coding sequence (including nonsense, missense, and frameshift mutations) and 1 promotor deletion have been described in 89 patients worldwide. The fact that more girls (n = 76) than boys (n = 13) have been identified to harbor such mutations may reflect the well-known higher prevalence of precocious puberty in girls than in boys [2]. Recent familial CPP studies have demonstrated that affected males were retrospectively identified based on medical history and genetic analysis and perhaps this prevalence might reflect an under diagnosis of CPP in the male group [7, 11]. Another explanation could be the relative deficit of boys among the offspring of men with *MKRN3* mutations, as observed by Simon *et al.*, who speculated that Y-bearing sperm cells carrying *MKRN3* mutations may be defective [7]. Accordingly, in this systematic review, the offspring of 41 *MKRN3* mutated men consists of 68 (71%) girls and 28 (29%) boys, supporting this hypothesis. However, confirmation in a larger group of men with *MKRN3* mutations is required for a definitive conclusion.

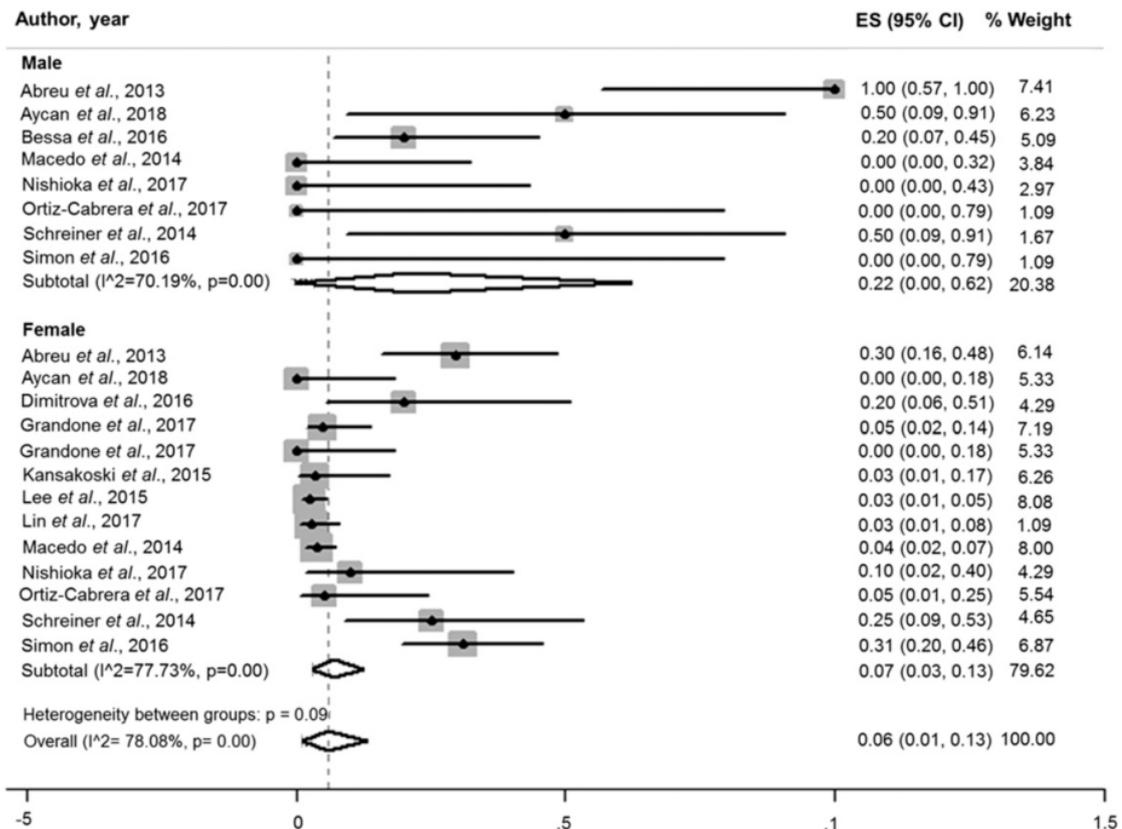


Figure 6. Pooled prevalence of *MKRN3* mutations according sex. The prevalence of *MKRN3* mutations in males was 22.0% (95% CI, 0.0 to 0.62; I^2 , 70.19) and in females 7.0% (95% CI, 0.03 to 0.13; I^2 , 77.73%).

Mutations are distributed over the entire coding region, but tend to cluster in the loop structure between two C3H zinc finger motifs in the aminoterminal region of the protein. Notably, the poly-C region between nucleotides 476 and 482 seems to be a mutation hotspot, comprising 5 of the common frameshift mutations identified in almost one-third of the patients. In particular, the p.Ala162Glyfs15* mutation was identified in 8 families from France and Italy [7], suggesting a possible founder effect among individuals from those countries.

The C3HC4 RING zinc finger motif, which is responsible for the ubiquitin-ligase activity, was recognized as another region where mutations, especially missense mutations, tend to cluster. This may reflect the location of functionally important amino acid residues within the protein and suggests that variants in this domain are more likely to cause deleterious effects on protein function. It is notable that six of the missense mutations were predicted to be benign according to *in silico* analysis [12, 29]. However, considering the typical phenotype of the girls harboring these missense variants, it is reasonable to assume their role in the pathogenesis of CPP, but complementary functional studies would strengthen this association.

Abnormalities in the regulatory region of *MKRN3* may be rarely implicated in the pathogenesis of CPP because a deletion in the promotor region has been recently identified in one girl [31]. Other genetic or epigenetic mechanisms that could disrupt the expression of imprinted genes, such as deletions, uniparental disomy or alterations in DNA methylation markers within the imprinted cluster have not been detected so far, indicating these abnormalities may represent very rare mechanisms in this disorder, although they have not been widely investigated to date [5, 7].

Currently, *MKRN3* mutations represent the main genetic cause of CPP. The prevalence is quite variable, ranging from 0 in a small sample from Italy [19] to 46% considering

the subgroup of patients with familial CPP reported by Simon *et al.* [7]. In the current meta-analysis of 14 studies including 857 patients with CPP, the pooled overall prevalence of *MKRN3* mutations was 9.0% (95% CI, 0.04 to 0.15). Interestingly, our data set demonstrates geographic predominance of *MKRN3* mutations in patients from western countries (prevalence estimates of 11%; 95% CI, 0.04 to 0.21) and a lower frequency of mutations in patients from Asian countries (2%; 95% CI, 0.01 to 0.04), suggesting genetic variation according to ethnic background. In addition, it is noteworthy that specific single nucleotide polymorphisms near the paternal allele of *MKRN3* have also been associated with earlier age at menarche in large populational dataset studies, although those articles were not included in our meta-analysis because they did not fulfill the inclusion criteria [48, 49].

Our meta-analysis also supports the previous observation that the frequency of *MKRN3* mutations is higher among boys with CPP than in girls (pooled prevalence of 22%; 95% CI, 0.00 to 0.62 vs 7%; 95% CI, 0.03 to 0.13, respectively). Considering that *MKRN3* is located on an autosomal chromosome, the reasons underlying the predominance of mutations in males are still not understood. Of note, all mutated boys exhibited a positive family history of precocious puberty; these data highlight the importance of evaluating boys, especially those with familial CPP, for *MKRN3* mutations.

The prevalence of mutations in familial cases was variable among different studies. Our meta-analysis showed a pooled prevalence of 19.0% (95% CI, 0.05 to 0.36) in patients with familial CPP from western countries, with a moderate level of heterogeneity (I^2 , 69.16%). Potential sources of variation could be due to different criteria of selection of familial cases and small sample sizes in some reports. In addition, considering the imprinted pattern of inheritance in which a generation can be skipped, the familial nature may be underrecognized if not carefully investigated, whereas the prevalence of *MKRN3* mutations in familial cases might have been underestimated in some series.

Our study also had some potential limitations. First, a meta-analysis of specific association between genotype and phenotype was not possible because of the limited number of studies comparing clinical data of patients with and without *MKRN3* mutations. Second, the number of affected boys identified so far is still small and information about pubertal onset was absent in some of them. Further limitations relate to the type of studies, with exclusively observational data, including case reports and case series, to the small sample size of some reports and to inconsistency of study designs. Thus, larger studies evaluating patients with idiopathic CPP and with comparative phenotypic analysis of individuals with and without mutations are needed to establish a more precise genotype-phenotype relationship.

In summary, our meta-analysis shows that *MKRN3* mutations are associated with the phenotype of nonsyndromic CPP. Girls are more severely affected than boys and exhibit an early age at pubertal onset, higher basal FSH levels, and greater Δ BA. Overall, the pooled estimated prevalence of *MKRN3* mutations in CPP was 9.0% (95% CI, 0.04 to 0.15), with variations according to sex, family history, and geographical distribution. Additional studies are needed to establish a precise genotype-phenotype relationship and long-term follow-up of patients harboring *MKRN3* mutations is necessary to clarify whether they exhibit higher risks of adverse health outcomes later in life.

Acknowledgments

The authors thank Luiz Guilherme Grossi Porto, Professor of Applied Physiology to Physical Education at the Faculty of Physical Education, University of Brasilia, Brazil, for his contribution in statistical analysis.

Financial Support: This work was supported by National Institutes of Health Grant R01 HD082314, the Brigham and Women's Hospital Women's Brain Initiative (to U.B.K.), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Grant 462346/2014-5 (to A.L.-P.).

Correspondence: Adriana Lofrano-Porto, MD, PhD, University of Brasilia, Campus Darcy Ribeiro, Health Science Faculty, Molecular Pharmacology Laboratory, Asa Norte, Brasilia, DF 70904-970, Brazil. E-mail: adlofrano@gmail.com.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References and Notes

1. Carel JC, Léger J. Clinical practice. Precocious puberty. *N Engl J Med*. 2008;**358**(22):2366–2377.
2. Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;**4**(3):265–274.
3. de Vries L, Kauschansky A, Shohat M, Phillip M. Familial central precocious puberty suggests autosomal dominant inheritance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;**89**(4):1794–1800.
4. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, Cukier P, Thompson IR, Navarro VM, Gagliardi PC, Rodrigues T, Kochi C, Longui CA, Beckers D, de Zegher F, Montenegro LR, Mendonca BB, Carroll RS, Hirschhorn JN, Latronico AC, Kaiser UB. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med*. 2013;**368**(26):2467–2475.
5. Macedo DB, Abreu AP, Reis ACS, Montenegro LR, Dauber A, Beneduzzi D, Cukier P, Silveira LF, Teles MG, Carroll RS, Junior GG, Filho GG, Gucev Z, Arnhold IJ, de Castro M, Moreira AC, Martinelli CE Jr, Hirschhorn JN, Mendonca BB, Brito VN, Antonini SR, Kaiser UB, Latronico AC. Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;**99**(6):E1097–E1103.
6. Settas N, Dacou-Voutetakis C, Karantza M, Kanaka-Gantenbein C, Chrousos GP, Voutetakis A. Central precocious puberty in a girl and early puberty in her brother caused by a novel mutation in the MKRN3 gene. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;**99**(4):E647–E651.
7. Simon D, Ba I, Mekhail N, Ecosse E, Paulsen A, Zenaty D, Houang M, Jesuran Perelroizen M, de Filippo GP, Salerno M, Simonin G, Reynaud R, Carel JC, Léger J, de Roux N. Mutations in the maternally imprinted gene MKRN3 are common in familial central precocious puberty. *Eur J Endocrinol*. 2016;**174**(1):1–8.
8. de Vries L, Gat-Yablonski G, Dror N, Singer A, Phillip M. A novel MKRN3 missense mutation causing familial precocious puberty. *Hum Reprod*. 2014;**29**(12):2838–2843.
9. Schreiner F, Gohlke B, Hamm M, Korsch E, Woelfle J. MKRN3 mutations in familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2014;**82**(2):122–126.
10. Grandone A, Cantelmi G, Cirillo G, Marzuillo P, Luongo C, Miraglia del Giudice E, Perrone L. A case of familial central precocious puberty caused by a novel mutation in the makorin RING finger protein 3 gene. *BMC Endocr Disord*. 2015;**15**(60):60.
11. Simsek E, Demiral M, Ceylaner S, Kirel B. Two frameshift mutations in MKRN3 in Turkish patients with familial central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2017;**87**(6):405–411.
12. Lee HS, Jin HS, Shim YS, Jeong HR, Kwon E, Choi V, Kim MC, Chung IS, Jeong SY, Hwang JS. Low frequency of MKRN3 mutations in central precocious puberty among Korean girls. *Horm Metab Res*. 2016;**48**(2):118–122.
13. Ortiz-Cabrera NV, Riveiro-Álvarez R, López-Martínez MÁ, Pérez-Segura P, Aragón-Gómez I, Trujillo-Tiebas MJ, Soriano-Guillén L. Clinical exome sequencing reveals MKRN3 pathogenic variants in familial and nonfamilial idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2017;**87**(2):88–94.
14. Nishioka J, Shima H, Fukami M, Yatsuga S, Matsumoto T, Ushijima K, Kitamura M, Koga Y. The first Japanese case of central precocious puberty with a novel MKRN3 mutation. *Hum Genome Var*. 2017;**4**(4):17017.
15. Bessa DS, Macedo DB, Brito VN, França MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, Silveira LG, Hummel T, Bergadá I, Braslavsky D, Abreu AP, Dauber A, Mendonca BB, Kaiser UB, Latronico AC. High frequency of MKRN3 mutations in male central precocious puberty previously classified as idiopathic. *Neuroendocrinology*. 2017;**105**(1):17–25.
16. Stecchini MF, Macedo DB, Reis ACS, Abreu AP, Moreira AC, Castro M, Kaiser UB, Latronico AC, Antonini SR. Time course of central precocious puberty development caused by an MKRN3 gene mutation: a prismatic case. *Horm Res Paediatr*. 2016;**86**(2):126–130.
17. Jong MTC, Gray TA, Ji Y, Glenn CC, Saitoh S, Driscoll DJ, Nicholls RD. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region. *Hum Mol Genet*. 1999;**8**(5):783–793.
18. Abreu AP, Macedo DB, Brito VN, Kaiser UB, Latronico AC. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene. *J Mol Endocrinol*. 2015;**54**(3):R131–R139.
19. Grandone A, Cirillo G, Sasso M, Capristo C, Tornese G, Marzuillo P, Luongo C, Rosaria Umamo G, Festa A, Coppola R, Miraglia Del Giudice E, Perrone L. MKRN3 levels in girls with central precocious puberty and correlation with sexual hormone levels: a pilot study. *Endocrine*. 2018;**59**(1):203–208.

20. Dimitrova-Mladenova MS, Stefanova EM, Glushkova M, Todorova AP, Todorov T, Konstantinova MM, Kazakova K, Tincheva RS. Males with paternally inherited MKRN3 mutations may be asymptomatic. *J Pediatr*. 2016;**179**:263–265.
21. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Int J Surg*. 2010;**8**(5):336–341.
22. The Twelfth International Conference on Grey Literature, Prague. 2010. Available from: <https://guides.mclibrary.duke.edu/sysreview/greylit>.
23. Valadares LP, Meireles CG, Toledo IP, Oliveira RS, Castro LCG, Abreu AP, Carrol RS, Latronico AC, Kaiser UB, Guerra ENS, Lofrano-Porto A. Supplemental material of MKRN3 mutations in central precocious puberty: a systematic review and meta-analysis. figshare 2018. figshare 2018. *Deposited* 19 November 2018. 10.6084/m9.figshare.7339700.v1.
24. Munn Z, Moola S, Riitano D, Lisy K. The development of a critical appraisal tool for use in systematic reviews addressing questions of prevalence. *Int J Health Policy Manag*. 2014;**3**(3):123–128.
25. Neocleous V, Shammas C, Phelan MM, Nicolaou S, Phylactou LA. In silico analysis of a novel MKRN3 missense mutation in familial central precocious puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;**84**(1):80–84.
26. Christoforidis A, Skordis N, Fanis P, Dimitriadou M, Sevastidou M, Phelan MM, Neocleous V, Phylactou LA. A novel MKRN3 nonsense mutation causing familial central precocious puberty. *Endocrine*. 2017;**56**(2):446–449.
27. Grandone A, Capristo C, Cirillo G, Sasso M, Umamo GR, Mariani M, Miraglia Del Giudice E, Perrone L. Molecular screening of MKRN3, DLK1, and KCN9 genes in girls with idiopathic central precocious puberty. *Horm Res Paediatr*. 2017;**88**(3-4):194–200.
28. Käänsköske J, Raivio T, Juul A, Tommiska J. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty. *Pediatr Res*. 2015;**78**(6):709–711.
29. Lin WD, Wang CH, Tsai FJ. Genetic screening of the makorin ring finger 3 gene in girls with idiopathic central precocious puberty. *Clin Chem Lab Med*. 2016;**54**(3):e93–e96.
30. Aycan Z, Savaş-Erdeve Ş, Çetinkaya S, Kurnaz E, Keskin M, Muratoğlu Şahin N, Bayramoğlu E, Ceylaner G. Investigation of MKRN3 mutation in patients with familial central precocious puberty. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2018;**10**(3):223–229.
31. Macedo DB, França MM, Montenegro LR, Cunha-Silva M, Best DS, Abreu AP, Kaiser UB, Mendonça BB, Jorge AAL, Brito VN, Latronico AC. Central precocious puberty caused by a heterozygous deletion in the MKRN3 promoter region [published correction appears in *Neuroendocrinology*. 2018;**107**:313–314]. *Neuroendocrinology*. 2018;**107**(2):127–132.
32. Bulcao Macedo D, Nahime Brito V, Latronico AC. New causes of central precocious puberty: the role of genetic factors. *Neuroendocrinology*. 2014;**100**(1):1–8.
33. Gross-Tsur V, Hirsch HJ, Benarroch F, Eldar-Geva T. The FSH-inhibin axis in prader-willi syndrome: heterogeneity of gonadal dysfunction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2012;**10**(1):39.
34. Radicioni AF, Di Giorgio G, Grugni G, Cuttini M, Losacco V, Anzuini A, Spera S, Marzano C, Lenzi A, Cappa M, Crinò A. Multiple forms of hypogonadism of central, peripheral or combined origin in males with Prader-Willi syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012;**76**(1):72–77.
35. Bianco SD. A potential mechanism for the sexual dimorphism in the onset of puberty and incidence of idiopathic central precocious puberty in children: sex-specific kisspeptin as an integrator of puberty signals. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;**3**(149):149.
36. Johannsen TH, Main KM, Ljubicic ML, Jensen TK, Andersen HR, Andersen MS, Petersen JH, Andersson A-M, Juul A. Sex differences in reproductive hormones during mini-puberty in infants with normal and disordered sex development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;**103**(8):3028–3037.
37. Styne DM, Grumbach MM. Puberty: Ontogeny, Neuroendocrinology, Physiology, and Disorders. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, and Kronenberg HM, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier/Saunders; 2011:1054–1201.
38. Busch AS, Hagen CP, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 levels decline during puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;**101**(6):2588–2593.
39. Hagen CP, Sørensen K, Mieritz MG, Johannsen TH, Almstrup K, Juul A. Circulating MKRN3 levels decline prior to pubertal onset and through puberty: a longitudinal study of healthy girls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;**100**(5):1920–1926.
40. Ahn JH, Lim SW, Song BS, Seo J, Lee JA, Kim DH, Lim JS. Age at menarche in the Korean female: secular trends and relationship to adulthood body mass index. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2013;**18**(2):60–64.

41. Lee MH, Kim SH, Oh M, Lee KW, Park MJ. Age at menarche in Korean adolescents: trends and influencing factors. *Reprod Health*. 2016;**13**(1):121.
42. Meng X, Li S, Duan W, Sun Y, Jia C. Secular trend of age at menarche in Chinese adolescents born from 1973 to 2004. *Pediatrics*. 2017;**140**(2):e20170085.
43. Morris DH, Jones ME, Schoemaker MJ, Ashworth A, Swerdlow AJ. Secular trends in age at menarche in women in the UK born 1908-93: results from the Breakthrough Generations Study. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2011;**25**(4):394–400.
44. Papadimitriou A, Fytanidis G, Douros K, Bakoula C, Nicolaidou P, Fretzayas A. Age at menarche in contemporary Greek girls: evidence for levelling-off of the secular trend. *Acta Paediatr*. 2008;**97**(6): 812–815.
45. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2016;**4**(3): 254–264.
46. Gong T-T, Wang Y-L, Ma X-X. Age at menarche and endometrial cancer risk: a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Sci Rep*. 2015;**5**(1):14051.
47. Lakshman R, Forouhi NG, Sharp SJ, Luben R, Bingham SA, Khaw KT, Wareham NJ, Ong KK. Early age at menarche associated with cardiovascular disease and mortality. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;**94**(12):4953–4960.
48. Day FR, Thompson DJ, Helgason H, Chasman DI, Finucane H, Sulem P, Ruth KS, Whalen S, Sarkar AK, Albrecht E, Altmaier E, Amini M, Barbieri CM, Boutin T, Campbell A, Demerath E, Giri A, He C, Hottenga JJ, Karlsson R, Kolcic I, Loh PR, Lunetta KL, Mangino M, Marco B, McMahon G, Medland SE, Nolte IM, Noordam R, Nutile T, Paternoster L, Perjakova N, Porcu E, Rose LM, Schraut KE, Segrè AV, Smith AV, Stolk L, Teumer A, Andrusis IL, Bandinelli S, Beckmann MW, Benitez J, Bergmann S, Bochud M, Boerwinkle E, Bojesen SE, Bolla MK, Brand JS, Brauch H, Brenner H, Broer L, Brüning T, Buring JE, Campbell H, Catamo E, Chanock S, Chenevix-Trench G, Corre T, Couch FJ, Cousminer DL, Cox A, Crisponi L, Czene K, Davey Smith G, de Geus EJC, de Mutsert R, De Vivo I, Dennis J, Devilee P, Dos-Santos-Silva I, Dunning AM, Eriksson JG, Fasching PA, Fernández-Rhodes L, Ferrucci L, Flesch-Janys D, Franke L, Gabrielson M, Gandin I, Giles GG, Grallert H, Gudbjartsson DF, Guénel P, Hall P, Hallberg E, Hamann U, Harris TB, Hartman CA, Heiss G, Hoening MJ, Hopper JL, Hu F, Hunter DJ, Ikram MA, Im HK, Järvelin MR, Joshi PK, Karasik D, Kellis M, Kutalik Z, LaChance G, Lambrechts D, Langenberg C, Launer LJ, Laven JSE, Lenarduzzi S, Li J, Lind PA, Lindstrom S, Liu Y, Luan J, Mägi R, Mannermaa A, Mbarek H, McCarthy MI, Meisinger C, Meitinger T, Menni C, Metspalu A, Michailidou K, Milani L, Milne RL, Montgomery GW, Mulligan AM, Nalls MA, Navarro P, Nevanlinna H, Nyholt DR, Oldehinkel AJ, O'Mara TA, Padmanabhan S, Palotie A, Pedersen N, Peters A, Peto J, Pharoah PDP, Pouta A, Radice P, Rahman I, Ring SM, Robino A, Rosendaal FR, Rudan I, Rueedi R, Ruggiero D, Sala CF, Schmidt MK, Scott RA, Shah M, Sorice R, Southey MC, Sovio U, Stampfer M, Steri M, Strauch K, Tanaka T, Tikkanen E, Timpson NJ, Traglia M, Truong T, Tyrer JP, Uitterlinden AG, Edwards DRV, Vitart V, Völker U, Vollenweider P, Wang Q, Widen E, van Dijk KW, Willemsen G, Winqvist R, Wolffenbuttel BHR, Zhao JH, Zoledziwska M, Zygumt M, Alizadeh BZ, Boomsma DI, Ciullo M, Cucca F, Esko T, Franceschini N, Gieger C, Gudnason V, Hayward C, Kraft P, Lawlor DA, Magnusson PKE, Martin NG, Mook-Kanamori DO, Nohr EA, Polasek O, Porteous D, Price AL, Ridker PM, Snieder H, Spector TD, Stöckl D, Toniolo D, Ulivi S, Visser JA, Völzke H, Wareham NJ, Wilson JF, Spurdle AB, Thorsteindottir U, Pollard KS, Easton DF, Tung JY, Chang-Claude J, Hinds D, Murray A, Murabito JM, Stefansson K, Ong KK, Perry JRB; LifeLines Cohort Study; InterAct Consortium; kConFab/AOCS Investigators; Endometrial Cancer Association Consortium; Ovarian Cancer Association Consortium; PRACTICAL consortium. Genomic analyses identify hundreds of variants associated with age at menarche and support a role for puberty timing in cancer risk. *Nat Genet*. 2017;**49**(6):834–841.
49. Perry JRB, Day F, Elks CE, Sulem P, Thompson DJ, Ferreira T, He C, Chasman DI, Esko T, Thorleifsson G, Albrecht E, Ang WQ, Corre T, Cousminer DL, Feenstra B, Franceschini N, Ganna A, Johnson AD, Kjellqvist S, Lunetta KL, McMahon G, Nolte IM, Paternoster L, Porcu E, Smith AV, Stolk L, Teumer A, Tšernikova N, Tikkanen E, Ulivi S, Wagner EK, Amin N, Bierut LJ, Byrne EM, Hottenga JJ, Koller DL, Mangino M, Pers TH, Yerges-Armstrong LM, Zhao JH, Andrusis IL, Anton-Culver H, Atsma F, Bandinelli S, Beckmann MW, Benitez J, Blomqvist C, Bojesen SE, Bolla MK, Bonanni B, Brauch H, Brenner H, Buring JE, Chang-Claude J, Chanock S, Chen J, Chenevix-Trench G, Collée JM, Couch FJ, Couper D, Coveillo AD, Cox A, Czene K, D'Adamo AP, Smith GD, De Vivo I, Demerath EW, Dennis J, Devilee P, Dieffenbach AK, Dunning AM, Eiriksdottir G, Eriksson JG, Fasching PA, Ferrucci L, Flesch-Janys D, Flyger H, Foroud T, Franke L, Garcia ME, García-Closas M, Geller F, de Geus EEJ, Giles GG, Gudbjartsson DF, Gudnason V, Guénel P, Guo S, Hall P, Hamann U, Haring R, Hartman CA, Heath AC, Hofman A, Hoening MJ, Hopper JL, Hu FB, Hunter DJ, Karasik D, Kiel DP, Knight JA,

Kosma VM, Kutalik Z, Lai S, Lambrechts D, Lindblom A, Mägi R, Magnusson PK, Mannermaa A, Martin NG, Masson G, McArdle PF, McArdle WL, Melbye M, Michailidou K, Mihailov E, Milani L, Milne RL, Nevanlinna H, Neven P, Nohr EA, Oldehinkel AJ, Oostra BA, Palotie A, Peacock M, Pedersen NL, Peterlongo P, Peto J, Pharoah PD, Postma DS, Pouta A, Pylkäs K, Radice P, Ring S, Rivadeneira F, Robino A, Rose LM, Rudolph A, Salomaa V, Sanna S, Schlessinger D, Schmidt MK, Southey MC, Sovio U, Stampfer MJ, Stöckl D, Storniolo AM, Timpson NJ, Tyrer J, Visser JA, Vollenweider P, Völzke H, Waeber G, Waldenberger M, Wallaschofski H, Wang Q, Willemsen G, Winqvist R, Wolffenbittel BH, Wright MJ, Boomsma DI, Econs MJ, Khaw KT, Loos RJ, McCarthy MI, Montgomery GW, Rice JP, Streeten EA, Thorsteinsdottir U, van Duijn CM, Alizadeh BZ, Bergmann S, Boerwinkle E, Boyd HA, Crisponi L, Gasparini P, Gieger C, Harris TB, Ingelsson E, Järvelin MR, Kraft P, Lawlor D, Metspalu A, Pennell CE, Ridker PM, Snieder H, Sørensen TI, Spector TD, Strachan DP, Uitterlinden AG, Wareham NJ, Widen E, Zygmont M, Murray A, Easton DF, Stefansson K, Murabito JM, Ong KK; Australian Ovarian Cancer Study; GENICA Network; kConFab; LifeLines Cohort Study; InterAct Consortium; Early Growth Genetics (EGG) Consortium. Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. *Nature*. 2014;**514**(7520):92–97.

APÊNDICE 2 - ESTRATÉGIAS DE BUSCA COM AS PALAVRAS CHAVES E TERMOS MESH

Base de dados	Estratégia de busca
Cochrane (06/02/2018)	<i>'puberty OR "puberty, precocious" OR "precocious puberty" OR "central precocious puberty" OR "familial central precocious puberty" OR "idiopathic central precocious puberty" OR "gonadotropin-dependent precocious puberty" in Title, Abstract, Keywords and "MKRN3 protein, human" OR "makorin, ring finger protein, 3, human" OR "makorin ring finger 3 gene" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3" OR "makorin ring finger protein 3" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3 gene" OR "MKRN3 mutation" OR "MKRN3 polymorphism" in Title, Abstract, Keywords in Trials'</i>
EMBASE (06/02/2018)	(precocious AND ('puberty'/exp OR puberty) OR 'central'/exp OR central) AND precocious AND ('puberty'/exp OR puberty) AND mkrn3
LILACS via BVS (06/02/2018)	"PRECOCIOUS PUBERTY" [Palavras] and "MKRN3" [Palavras]
LIVIVO (06/02/2018)	TI=((puberty OR "puberty, precocious" OR "precocious puberty" OR "central precocious puberty" OR "familial central precocious puberty" OR "idiopathic central precocious puberty" OR "gonadotropin-dependent precocious puberty")) AND TI=(("MKRN3 protein, human" OR "makorin, ring finger protein, 3, human" OR "makorin ring finger 3 gene" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3" OR "makorin ring finger protein 3" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3 gene" OR "MKRN3 mutation" OR "MKRN3 polymorphism"))
PubMed (MEDLINE) (06/02/2018)	#1 ("puberty"[MeSH Terms]) OR "puberty, precocious"[MeSH Terms] OR puberty) OR "precocious puberty") OR "central precocious puberty") OR "familial central precocious puberty") OR "idiopathic central precocious puberty") OR "gonadotropin-dependent precocious puberty"); #2(("MKRN3 protein, human"[Supplementary Concept] OR "makorin, ring finger protein, 3, human" OR "makorin ring finger 3 gene" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3" OR "makorin ring finger protein 3" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3 gene" OR "MKRN3 mutation")) OR MKRN3 polymorphism)); #3 (#1 AND #2) (((("puberty"[MeSH Terms]) OR "puberty, precocious"[MeSH Terms] OR puberty) OR "precocious puberty") OR "central precocious puberty") OR "familial central precocious puberty") OR "idiopathic central precocious puberty") OR "gonadotropin-dependent precocious puberty")) AND (((("MKRN3 protein, human"[Supplementary

	Concept] OR "makorin, ring finger protein, 3, human" OR "makorin ring finger 3 gene" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3" OR "makorin ring finger protein 3" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3 gene" OR "MKRN3 mutation")) OR MKRN3 polymorphism))
Scopus (06/02/2018)	TITLE-ABS-KEY(<i>puberty</i> OR " <i>puberty, precocious</i> " OR " <i>precocious puberty</i> " OR " <i>central precocious puberty</i> " OR " <i>familial central precocious puberty</i> " OR " <i>idiopathic central precocious puberty</i> " OR " <i>gonadotropin-dependent precocious puberty</i> ") AND (" <i>MKRN3 protein, human</i> " OR " <i>makorin, ring finger protein, 3, human</i> " OR " <i>makorin ring finger 3 gene</i> " OR " <i>makorin ring finger protein 3 gene</i> " OR " <i>MKRN3</i> " OR " <i>makorin ring finger protein 3</i> " OR " <i>makorin ring finger protein 3 gene</i> " OR " <i>MKRN3 gene</i> " OR " <i>MKRN3 mutation</i> " OR " <i>MKRN3 polymorphism</i> ") AND (LIMIT-TO (DOCTYPE , "ar"))
Web of Science(06/02/2018)	TS=(puberty OR "puberty, precocious" OR "precocious puberty" OR "central precocious puberty" OR "familial central precocious puberty" OR "idiopathic central precocious puberty" OR "gonadotropin-dependent precocious puberty") AND ("MKRN3 protein, human" OR "makorin, ring finger protein, 3, human" OR "makorin ring finger 3 gene" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3" OR "makorin ring finger protein 3" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3 gene" OR "MKRN3 mutation" OR "MKRN3 polymorphism")
Literatura cinza	
Google, Scholar (06/02/2018)	allintitle: precocious puberty MKRN3
ProQuest (06/02/2018)	TI,AB(puberty OR "puberty, precocious" OR "precocious puberty" OR "central precocious puberty" OR "familial central precocious puberty" OR "idiopathic central precocious puberty" OR "gonadotropin-dependent precocious puberty") AND TI,AB("MKRN3 protein, human" OR "makorin, ring finger protein, 3, human" OR "makorin ring finger 3 gene" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3" OR "makorin ring finger protein 3" OR "makorin ring finger protein 3 gene" OR "MKRN3 gene" OR "MKRN3 mutation" OR "MKRN3 polymorphism")

*A busca foi realizada em 06/02/2018 e atualizada em 04/09/2018.

APÊNDICE 3 – SUMÁRIO DAS CARACTERÍSTICAS DESCRITIVAS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA (N=22)

Autor, país, Ano	Delineamento	Tamanho da amostra	Forma da PPC	Idade mediana ao início da puberdade dos pacientes com mutações no <i>MKRN3</i> , anos*	Achados adicionais	Técnica do sequenciamento	Tipo de mutação
Abreu <i>et al.</i> , 2013, EUA, Brasil e Bélgica (32).	Transversal e translacional.	32 pacientes de 15 famílias.	Familiar.	Meninas: 5.75 anos (variação 5.0 a 6.0 anos) Meninos: 8.1anos (5.9 a 8.5 anos).	Esotropia (2 irmãos). Cisto renal, (1 paciente.)	Sequenciamento do exoma	Nonsense (p.Tyr391*) Missense (p.Arg365Ser) Frameshift (p.Arg213Glyfs*73, p.Ala162Glyfs*14).
Aycan <i>et al.</i> , 2018, Turquia (84).	Transversal.	19 pacientes de 10 famílias.	Familiar.	Cerca de 9.0 anos (idade do menino afetado).	-	NGS.	Frameshift (p.Pro211Leufs*16).
Bessa <i>et al.</i> , 2016, Brasil, Argentina, EUA (46).	Transversal.	20 meninos (6 previamente descritos).	9 casos familiares.	8.2 anos (variação 5.9 a 8.6).	-	Sanger.	Missense (p.Arg328Cys, p.Arg365Ser) Frameshift (p.Arg213Glyfs*73, p.Ala162Gly*fs14).
Christoforidis <i>et al.</i> , 2016, Grécia (82).	Relato de caso	3 irmãs afetadas.	Familiar.	5.6 anos (variação 5.1 a 6.5).	-	Sanger.	Nonsense (p.Glu298*).
De Vries <i>et al.</i> , 2014, Israel (35).	Relato de caso	4 irmãos afetados (1 menino).	Familiar.	Meninas: 5.5 anos (variação 4.5 a 5.5) Menino: desconhecida.	-	Sequenciamento do exoma	Missense (p.His420Gln).
Dimitrova-Mladenova <i>et al.</i> , 2016, Bulgária (44).	Série de casos.	10 meninas.	Aparentemente esporádico.	4.85 anos (variação 3.8 a 4.6).	-	Sanger	Frameshift (p.Arg351Serfs*44, p.Pro161Argfs*10).
Grandone <i>et al.</i> , 2015, Itália (38).	Relato de caso.	2 meninas.	Familiar	5.5 anos (variação 5.0 a 6.0).	Clinodactilia e hiperlordose em uma menina. Menopausa precoce na avó com mutação.	Sanger	Frameshift (p.Pro160Cysfs*14).
Grandone <i>et al.</i> , 2017, Itália(41).	Transversal	60 meninas	23 familiares 37 esporádico.	6.0 anos(variação 5.5 a 6.0).	-	Sanger	Missense (p.Arg328Cys, p.Cys410Tyr) Frameshift (p.Pro160Cysfs*14).
Grandone <i>et al.</i> , 2017, Itália(121).	Transversal.	17 meninas.	4 familiares 13 esporádico	-	-	Sanger	-

Autor, país, Ano	Delineamento	Tamanho da amostra	Forma da PPC	Idade mediana ao início da puberdade dos pacientes com mutações no <i>MKRN3</i>, anos*	Achados adicionais	Técnica do sequenciamento	Tipo de mutação
Kansakoski <i>et al.</i> , 2015, Dinamarca(80).	Transversal.	29 meninas	Indeterminada	6.0 anos (idade da menina afetada).	-	Sanger	Missense (p.Arg345His).
Lee <i>et al.</i> , 2015, Coreia do Sul(43).	Transversal.	260 meninas.	23 familiares	7.2 anos (variação 6.6 a 7.8)**.	-	Sanger	Nonsense (p.Gln281*) Missense (p.Gly196Val p.Ile100Phe p.Ile204Thr p.Gln226Pro p.Lys233Asn p.Ser396Arg).
Lin <i>et al.</i> , 2015, Taiwan(83).	Transversal	105 meninas.	Indeterminada	6.9 anos (variação 5.6 a 7.5).	-	Sanger	Missense (p.Arg477Gln; p.Gly250Glu; p.Gly196Val).
Macedo <i>et al.</i> , 2014, Brasil(34).	Transversal	215 (8 meninos).	213 esporádicos	6.0 anos (variação 3.0 a 6.4).	Palato arqueado e anormalidades dentárias, clinodactilia e hiperlordose em uma menina.	Sanger	Missense (p.Phe417Ile) Frameshift (p.Pro161Argfs*10p.Pro161Argfs*16; p.Gln226Thrfs*6; p.Glu256Glyfs*36).
Macedo <i>et al.</i> , 2018, Brasil(78).	Transversal e translacional	110 (1 menino).	25% de casos familiares	7.0 anos (idade da menina afetada).	-	Sanger.	Deleção do promotor (c.-150_-147delTCAG).
Neocleous <i>et al.</i> , 2015, Chipre(37).	Relato de caso.	2 meninas	Familiar	5.85 anos (variação 5.7 a 6.0).	-	Sanger.	Missense (p.Gly312Asp).
Nishioka <i>et al.</i> , 2017, Japão(42).	Relato de caso.	15 (5 meninos).	Indeterminada.	5.0 anos (idade da menina afetada).	-	Sequenciamento do exoma.	Frameshift (p.Glu229Argfs*3).
Ortiz-Cabrera <i>et al.</i> , 2017, Espanha(45).	Relato de caso.	20 (1 menino).	6 casos familiares 14 esporádicos	7.75 (idade à apresentação da menina afetada).	-	Sequenciamento do exoma.	Missense (p.Arg68His).
Schreiner <i>et al.</i> , 2014, Alemanha(36).	Transversal.	14 (2 meninos) de 7 famílias	Familiar (exceto em 1 menino)	Meninas: 6.8 anos (variação 6.1 a 7.5). Menino afetado: cerca de 9.0	-	Sanger	Nonsense(p.Glu111*) Frameshift (p.Ala162Glyfs*14).
Settas <i>et al.</i> , 2014, Grécia(81).	Relato de caso.	2 irmãos (1menino).	Familiar	6.0 anos (idade da menina afetada).	-	Sanger	Missense (p.Cys340Gly).

Autor, país, Ano	Delineamento	Tamanho da amostra	Forma da PPC	Idade mediana ao início da puberdade dos pacientes com mutações no <i>MKRN3</i> , anos*	Achados adicionais	Técnica do sequenciamento	Tipo de mutação
Simon <i>et al.</i> , 2016, França e Itália(39).	Transversal.	46 (1 menino).	28 casos familiares 18 esporádicos	6.0 anos (variação 5.4 a 6.0).	-	Sanger	Missense (p.Met315Val; p.Arg328Cys; p.Pro373Leu; p.Pro30Leu; p.Tyr246Cys) Frameshift (p.Ala162Glyfs*15; p.Met268Valfs*23).
Simsek <i>et al.</i> , 2016, Turquia(40).	Serie de casos.	6 meninas de 2 famílias	Familiar.	Meninas: 5.7 anos (variação 5.0 a 7.0).	-	NGS.	Frameshift (p.His148Thrfs*32; p.Met268Valfs*23).
Stecchini <i>et al.</i> , 2016, Brasil(79).	Relato de caso.	1menina	Familiar	6.7 anos (idade ao diagnóstico).	-	Sanger.	Frameshift (p.Pro161Argfs*16).

Abreviaturas: PPC: Puberdade precoce central; NGS: Sequenciamento de nova geração (Next Generation Sequencing); SPW: Síndrome de Prader Willi; * Se somente um paciente com mutação foi relatado, a idade do paciente afetado foi descrita; **Idade de início da puberdade ausente em 5 meninas com mutações missense com predição benigna à avaliação in silico.

APÊNDICE 4 – RISCO DE VIÉS DOS ESTUDOS INCLUÍDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA.

O risco de viés foi avaliado conforme a lista de verificação do Instituto Joanna Briggs para avaliação crítica de estudos que relatam dados de prevalência(77).

Risk of bias was categorized as High when the study reached up to 49% score “yes”, Moderate when the study reached 50% to 69% score “yes”, and Low when the study reached more than 70% score “yes”.

Author, Year	Q1*	Q2*	Q3*	Q4*	Q5*	Q6*	Q7*	Q8*	Q9*	Q10*	Score/Risk (the Not Applicable (NA) items were excluded from the sum).
Abreu et al., 2013(32)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	NA	88.88% Baixo
Aycan et al., 2018(84)	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	87.50% Baixo
Bessa et al., 2016(46)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	100% Baixo
Christoforidis et al., 2017(82)	N	NA	N	N	Y	Y	Y	NA	Y	NA	57.14% Moderado
De Vries et al., 2014(35)	N	NA	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	71.42% Baixo
Dimitrova et al., 2016(44)	N	Y	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	75% Baixo
Grandone et al., 2015(38)	N	NA	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	71.45% Baixo
Grandone et al., 2017(41)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	100% Baixo
Grandone et al., 2017(121)	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	88.88% Baixo
Kansakoski et al., 2015(80)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NA	87.50% Baixo
Lee et al., 2016(43)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NA	87.50% Baixo
Lin et al., 2015(83)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NA	87.50% Baixo
Macedo et al., 2014(34)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	100% Baixo
Macedo et al., 2017(78)	Y	Y	Y	N	Y	Y	Y	NA	Y	NA	87.50 Baixo
Neocleous et al., 2015(37)	N	NA	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	62.5% Moderado
Nishioka et al., 2017(42)	Y	NA	N	N	Y	Y	Y	NA	Y	NA	71.42% Baixo
Ortiz Cabrera et al., 2017(45)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	100% Baixo
Schreiner et al., 2014 (36)	Y	Y	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	77.77% Baixo
Settas et al., 2014(81)	N	NA	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	71.45% Baixo
Simon et al., 2016(39)	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	NA	100% Baixo
Simsek et al., 2016(40)	N	NA	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	71.42% Baixo
Stecchini et al., 2016(79)	N	NA	N	Y	Y	Y	Y	NA	Y	NA	71.42% Baixo

Q1*: Was the sample representative of the target population?

Q2*: Were study participant recruited in an appropriate way?

Q3*: Was the sample size adequate?

Q4*: Were the study subjects and the setting described in detail?

Q5*: Was the data analysis conducted with sufficient coverage of the identified sample?

Q6*: Were objective, standard criteria used for the measurement of the condition?

Q7*: Was the condition measured reliably?

Q8*: Was there appropriate statistical analysis?

Q9*: Are all important confounding factors/ subgroups/ differences identified and accounted for?

Q10*: Were subpopulations identified using objective criteria?

APÊNDICE 5 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) a participar, como voluntário(a), da pesquisa clínica intitulada “Estudo do gene *MKRN3* em indivíduos portadores de puberdade precoce central idiopática residentes no Distrito Federal e entorno”, realizada pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – FS/UnB.

O objetivo desse projeto é investigar a presença de alterações genéticas em indivíduos com o diagnóstico de puberdade precoce central. Sabe-se que o desenvolvimento da puberdade precoce pode ser causado por problemas genéticos que podem ser herdados em pessoas da mesma família, isto é, possivelmente por uma mutação genética. Os médicos responsáveis por esta pesquisa estão tentando descobrir o tipo de alteração genética que causa essa doença e a sua participação poderá contribuir para o melhor entendimento das causas da puberdade precoce.

O procedimento de coleta do material para o estudo genético será da seguinte forma: uma pequena amostra de sangue (cerca de 10 mL, o equivalente a duas colheres de chá) será coletada de uma veia do antebraço, utilizando uma agulha e seringa descartáveis. A partir dessa amostra do sangue, serão cultivadas as células brancas do seu sangue para obter o DNA (seu código ou identidade genética), para que nele sejam estudados alguns genes que estão relacionados ao desenvolvimento da puberdade precoce.

O DNA será usado única e exclusivamente para o presente projeto de pesquisa, porém poderá ser devidamente armazenado para possíveis desdobramentos deste projeto. Caso haja a necessidade de outros estudos, diferentes dos que foram explicados aqui, você será contatado novamente para conceder ou não a autorização para uso do material armazenado e quando não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O material somente será utilizado mediante a aprovação do novo projeto pelo CEP e, se for o caso, pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Existe um desconforto e risco mínimo para a coleta da amostra de sangue e as complicações que podem ocorrer devido a este procedimento são: leve dor no local da punção, inchaço, inflamação ou uma mancha "preto-azulada" no local da picada (hematoma). Para minimizar esse risco, a coleta será realizada por um profissional da área de saúde capacitado e esse procedimento será realizado durante a sua consulta ambulatorial de rotina ou no momento da coleta de outros exames que fazem parte do seu acompanhamento clínico.

O benefício para você é que os resultados desta pesquisa poderão esclarecer se existe causa genética para a sua doença. Caso seja encontrada uma mutação genética, isso poderá ser útil para o diagnóstico de outros membros da sua família, ou ainda, para o esclarecimento da doença de outras pessoas que tenham o mesmo problema.

O seu acompanhamento clínico continuará seguindo normalmente conforme a rotina do Ambulatório de acompanhamento. A sua participação não irá interferir na forma como o seu tratamento deverá ser continuado. No caso de ser encontrada alguma mutação genética, também será oferecido o encaminhamento ao ambulatório de Genética do Hospital Universitário de Brasília, para o aconselhamento genético, e os seus parentes de primeiro grau poderão ser convidados a participarem do estudo, mediante a assinatura de um documento semelhante a este. Você poderá, ao final da pesquisa, saber do resultado do seu estudo genético.

Todas as informações deste projeto de pesquisa serão confidenciais e nem você ou seu (sua) filho (a) serão identificados, em nenhum momento, durante o desenvolvimento desta pesquisa. Seu sangue será processado de tal forma que a sua privacidade e a sua identidade seja totalmente preservada, ou seja, somente nossa equipe saberá que o sangue é seu, ninguém mais ficará sabendo. Assim, o seu nome não será divulgado em nenhuma circunstância. Essas medidas visam garantir a proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva. Para manter esta confidencialidade, a equipe do pesquisador responsável arquivará uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) assinado em sigilo absoluto, e atribuirá um número de identificação para o seu sangue ou seu DNA. Os dados individuais, resultados de exames e testes, bem como dados dos prontuários eletrônicos, somente serão acessíveis aos pesquisadores do estudo, e não será permitido, em hipótese nenhuma, o acesso a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Os resultados da pesquisa poderão ser divulgados no Hospital da Criança Jose de Alencar de Brasília, no Hospital Universitário de Brasília, podendo ser publicados em revistas científicas especializadas posteriormente. Seu nome ou o material que indique a sua participação não serão liberados e você não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento e a sua recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não será disponível nenhum pagamento pela sua participação como voluntário (a) nessa pesquisa. Todos os procedimentos necessários serão feitos durante a sua vinda ao hospital para as consultas médicas ou a realização dos seus exames de rotina, de forma que a sua participação não acarretará em gastos extras para você. Excepcionalmente, caso seja necessário que você compareça ao hospital em horário diferente da sua consulta ou exames de rotina, os custos do transporte de sua casa até o hospital (ida e volta) e alimentação serão ressarcidos. Os custos dos exames da pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador.

O risco de dano decorrente dessa pesquisa é mínimo, no entanto, no caso de você sofrer algum dano que possa ser atribuído direta ou indiretamente à sua participação, será disponibilizado o serviço médico ambulatorial e de emergência do Hospital Universitário de Brasília e você poderá ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é assinado em duas vias de igual teor: uma via deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Farmacologia Molecular da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília e outra será fornecida a você.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP/FS) da Universidade de Brasília. O CEP é composto por profissionais de diferentes áreas cuja função é defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou os direitos do participante da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL

Eu, _____
 _____, fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O(a) pesquisador(a) _____ e o(a) professor(a) co-orientador(a) _____ certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais. Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar as dras Luciana Pinto Valadares, Renata Santarem de Oliveira ou a professora orientadora Dra Adriana Lofrano Alves Porto, no endereço: SGAN 605, avenida L2 Norte, Ambulatório de Endocrinologia do HUB (quintas-feiras de 14:00 às 18:00horas), telefone (61) 3448-5255 ou pelo e-mail lvaladares@unb.br. Estou ciente que também poderei consultar a qualquer momento o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB através do telefone (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horário de atendimento de 10:00hs às 12:00hs e de 13:30hs às 15:30hs, de segunda a sexta-feira , localizado na Faculdade de Ciências da Saúde, campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Asa Norte.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma via deste termo de consentimento livre e esclarecido, feito em duas vias de igual teor e assinadas, e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Data: / /

Nome:

Assinatura do Participante ou responsável _____

Nome:

Assinatura do pesquisador _____

APÊNDICE 6 - TERMO DE ASSENTIMENTO PARA MENORES DE 18 ANOS

Você está sendo convidado para participar da pesquisa clínica “Estudo do gene *MKRN3* em indivíduos portadores de puberdade precoce central idiopática residentes no Distrito Federal e entorno”, realizada pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília – FS/UnB). Seus pais foram consultados e permitiram que você participe.

Queremos saber se existem alterações genéticas nas pessoas com puberdade precoce. Sabemos que o desenvolvimento da puberdade é influenciado por fatores genéticos, ou seja, por genes que passam da mãe e do pai para os filhos. Os médicos responsáveis por essa pesquisa estão querendo saber se alguma alteração em um desses genes poderia ter feito com que você tenha desenvolvido a puberdade mais cedo do que o normal.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir. A pesquisa será feita no próprio local onde você faz as suas consultas e os exames de sangue necessários para o controle do seu tratamento. Para isso, só será preciso colher uma pequena amostra de sangue (cerca de uma colher de sopa), para que nele sejam estudados alguns genes relacionados ao desenvolvimento da puberdade. Você pode sentir uma dor leve ou uma picada no momento da coleta do sangue e, no local, pode se formar uma pequena mancha roxa, que desaparecerá em poucos dias. Para que você tenha menos desconforto, a coleta será feita por um profissional treinado, aproveitando o momento da sua consulta ou da coleta de outros exames que você precisar fazer. Ou seja, você não vai precisar comparecer ao hospital mais vezes por causa da pesquisa e os seus pais não terão nenhum gasto extra por causa da sua participação.

A vantagem é que o resultado dessa pesquisa poderá esclarecer se existe alguma causa genética para o seu problema. Isso pode ajudar os médicos a entenderem melhor o que causa a puberdade precoce e também pode ajudar a identificar outras pessoas da sua família que também podem apresentar o mesmo problema.

Se precisar, os seus pais poderão nos procurar Ambulatório de Endocrinologia do HUB (quintas-feiras de 14:00 às 18:00 horas), ligar no telefone (61) 3448-5255 ou fazer contato no e-mail lvaladares@unb.br.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que forem obtidas do seu caso. Os resultados da pesquisa vão ser publicados em revistas médicas, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa, você e a sua família, poderão receber esses resultados, se quiserem.

Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar às pesquisadoras Luciana Pinto Valadares, Renata Santarem de Oliveira ou à professora Dra Adriana Lofrano Porto.

Eu _____ aceito participar da pesquisa “Estudo do gene *MKRN3* em indivíduos portadores de puberdade precoce central

idiopática residentes no Distrito Federal e entorno”, que tem o objetivo de estudar se existe alteração em algum gene que poderia ser a causa desse problema. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar com raiva e eu não serei prejudicado. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma via deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

Brasília, ____ de _____ de _____.

Assinatura do menor

Assinatura do(a) pesquisador(a)

APÊNDICE 7 – CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E BIOQUÍMICA DOS INDIVÍDUOS COM PPC INICIALMENTE CLASSIFICADA COMO IDIOPÁTICA INCLUÍDOS NO ESTUDO.

Paciente	Sexo	Início Puberdade	Idade diagnóstico	Tanner	Estatura Z-score	Peso Z-score	IMC Z-score	IO	Δ IO	FSH basal UI/L	LH basal UI/L	LH pós estímulo	E pg/mL	T ng/mL	Sequenciamento MKRN3 (c.DNA/proteína)
1	M	2,6	3,6	G3P3	3,85	3,11	1,48	10,3	6,7	1,38	1,24			1,86	c.663 C>T (P=)
2	F	6,1	8	M3P3	1,02	0,27	0,47	8,3	0,9	3,82	0,98		40,9		WT
3	F	3	5,9	M3P1	2,41	1,51	0,59	9,7	3,8	8,2	1,76				482delC / p.Pro161Argfs*10
4	F	5,5	6,8	M3P1	0,7	0,63	0,4	8,3	1,4	1,45	0,64		20		c.663 C>T (p=)
5*	F	7	8,2	M3P4	1,89	1,36	0,73	10,6	2,9	5,11	2,97		30,22		WT
6	F	4,9	5,8	3	ND	ND	ND	8,5	2,7	6,79	2,42		17,97		WT
7	F	6	7,6	3	1,12	0,74	0,22	9	2,6	2,4	<0,07	8,6	<11,8		WT
8	F	7	8,9	M4P2	2,27	1	-0,01	12	3,1	4,1	2,8		25,7		c.90G>A (p=) e c.663 C>T (p=)
9	F	6,3	7,3	M3P1	1,55	1,22	0,7	10,3	2,4	3,1	0,5	21,55	39,3		c.663 C>T (p=)
10	F	4	7,7	M3P2	1,36	1,25	0,85	9,5	1,6	4,07	2,1		36	0,14	WT
11	F	7	8,8	M3P4	0,66	1,61	1,66	11	2,2	2,94	0,43	16,73	10		WT
12	F	7	8	M3	ND	ND	ND	11,00	2,00	ND	ND		ND		WT
13	F	7,8	8,3	M3P2	1,19	0,91	0,5	11	2,7	4,93	0,2	5,13	18		WT
14	F	5	7,6	M4P2	-0,07	1,08	1,39	11,5	3,9	5,06	1,74	5,7	32		482delC / p.Pro161Argfs*10
15	F	7	8	M4P2	0,86	1,12	0,96	11	3,2	2,5	1,66		11		WT
16	F	8	8,9	M3P3	0,75	0,56	0,28	11	2,1	1,78	0,51	5,74	36		WT
17	F	ND	5	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND				WT
18	F	7	8,3	M3P1	0,71	0,76	0,28	10	1,7	3,38	0,54	23,13	15		WT
19	F	3	8,4	M3P3	1,11	1,34	1,15	11	2,6	7,19	0,89	55,6	44		WT
20	F	6,8	7,7	M3P3	0,360	0,57	0,52	9,5	2,2	5,36	0,8			0,11	WT
21	F	7,4	8,5	M3P4	0,660	0,79	0,69	11	1,6	4,18	3,3		53		WT
22	F	7	7,1	M3P2	1,19	1,92	1,78	10	1,8	3,48	<0,1	4,8	16,3		WT
23	F	7,5	8,8	M3P3	1,82	2,3	1,97	11	2,2	3,54	1,11		29		WT
24*	M	6,5	10,2	G3P4	0,92	0,39	-0,12	13,00	3,00	5,87	1,87			4,64	c.663 C>T (p=)

Paciente	Sexo	Início Puberdade	Idade diagnóstico	Tanner	Estatura Z-score	Peso Z-score	IMC Z-score	IO	Δ IO	FSH basal UI/L	LH basal UI/L	LH pós estímulo	E pg/mL	T ng/mL	Sequenciamento MKRN3 (c.DNA/proteína)
25	M	6,5	10,2	G3P4	0,63	0,79	0,71	13,5	3,5	9,41	2,21			2,8	c.663 C>T (p=)
26	F	7,5	8,1	M4P3	1,03	0,82	0,45	11	2,9	2,7	0,3	24,01	20,7		WT
27	F	7	8,8	M4P3	0,02	0,89	1,16	12	3,3	5,61	8,73		15,2		c.663 C>T (p=)
28	F	6	7,7	M3P1	1,03	0,24	-0,55	9,5	1,6	3,1	1,6	28,33	33		WT
29	F	6,7	7,2	M3P1	0,89	0,52	0,03	8,8	1,8	5,5	1,48	30,2	0,3		WT
30	F	6,7	7,5	M3P1	1,04	0,8	0,37	9	1,7	9,15	1,49	18	65		c.663 C>T (p=)
31	F	0,1	1,5	M2P3				2,7	1,5	4	2		119	0,22	WT
32	F	7	8,5	M3P2	0,56	1,02	1,02	11	2,5	2,8	3,22		10		WT
33	F	5,3	6,3	M3P3	0,05	1,42	1,82	11	4,7	4	0,94		20	0,14	c.663 C>T (p=)
34	M	9	10		0,48	1,63	1,65	13	3	1,7				2,70	c.663 C>T (p=)
35	F	7	7	ND	ND	ND	ND	8	1						c.663 C>T (p=)
36	F	6	8,8	M3P1	1,39	0,31	0,57	11	3	1,58	<0,1	7,29	< 10		c.663 C>T (p=)
37	F	ND	ND	ND	ND	ND	ND	11	2						WT
38	F	7	8,7	M2P3	0,89	0,84	0,62	10	1,3	1,33	0,1	18,79	<10,0		WT
39	F	6	8,7	M3P1	0	0,75	1	11	2,3		1,87				c.663 C>T (p=)
40	F	5	7,8	M4P1	0,28	-0,25	-0,7	10	2,2	0,61	0,02	9,24	11		c.663 C>T (p=)
41*	M	8	8,9	G3P1	0,39	1,13	1,56	10	1,1	0,75	0,8			2,06	WT
42	F	7	8,5	M3P3	2,12	2	1,53	10	1,5	6,9	3,8		38		WT
43	F	4,5	8,5	M4P3	2,04	2,47	2,08	11	2,5	4,2	1,4		39,4		c.663 C > T (p=)
44	F	7	7,9	M3P2	1,9	2,69	2,63	11	3,3	5,84	3,2		63,33		c.663 C>T (p=) c.982 C>T / p.Arg328Cys
45	F	7	8,5	M3P2	2,12	1,75	1,2	11	2,5	5,22	2,62		32		c.663 C>T (p=)
46	F	6	7,1	M2P2	1,57	2,35	2,11	10,5	3,6	9,86	2,9		76,79		c.663 C>T (p=) c.982 C>T / p.Arg328Cys
47	F	6,9	8	M3P1	2,94	1,59	0,39	11	3	2,31	0,31	4,39	13		c.663 C>T (p=)
48	F	6	8,1	M3P3	1,97	1,74	1,23	11	2,9	5,71	2,35		50		c.663 C>T (p=)
49	F	5,5	8	M4P2	0,62	0,49	0,19	8	0,8						c.663 C>T (p=)
50	F	6	7,9	M3P4	0,95	1,53	1,43	11	3,1	0,82	0,15	ND	10		WT

Paciente	Sexo	Início Puberdade	Idade diagnóstico	Tanner	Estatura Z-score	Peso Z-score	IMC Z-score	IO	Δ IO	FSH basal UI/L	LH basal UI/L	LH pós estímulo	E pg/mL	T ng/mL	Sequenciamento MKRN3 (c.DNA/proteína)
51	F	7,5	7,7	M3P3				11	3,3						c.663 C>T (p=)
52	F	6,3	7,9	M3P2				10	2,1	0,9	0,1	3,41	5		WT
53	F	7,5	10,3	M4P4	0,14	-0,22	-0,2	11	0,4	6,66	4,53	56			c.663C>T (p=)
54	F	6	7,9	M3P1	0,11	0	-0,13	8	0,1	4,45	1,32		33		482delC / p.Pro161Argfs*10
55	F	2	8,5	M4P4	2,19	2,41	1,97	13,6	4,7	8,67	3,29		56,2		WT
56	F	6,9	8,7	M2P1	1,43	-0,14	-1,53	11,00	2,00	2,4	0,3	13,1	19,9		WT
57	F	6,4	7,4	M3P1	1,78	1,33	0,7	10	2,6	5,32	1,9		17,79		c.663 C>T (p=)
58	F	ND	8,5	M4P2				11	2,8						WT
59	F	6	8	M3P1	1,58	1,68	1,33	11	3	1,24	<0,1	2,94	11,8		c.663 C>T (p=)
60	F	5,9	6,1	M3P1	2,55	2,14	1,21	10,5	3,7	1,83	0,44	<5			WT
61	F	6	8	M3P1	0,45	0,23	-0,07	10	2,3	2,3	0,1	27,56	25,9		WT
62	F	4,8	5,9	M4P2	2,8	2,08	1,31	10,7	4,9	3,5	5,54		22,86		475_476insC (p.Ala162Glyfs*14)
63	M	8,4	9,2	G2P2	1,63	0,82	0,38	9		3,4	2,9			1,19	c.663 C>T (p=)

M: Masculino; F: Feminino; Tanner refere-se ao estágio puberal de Marshal e Tanner à ocasião do diagnóstico, sendo M o estágio puberal do desenvolvimento mamário, P o estágio dos pelos pubianos e G o estágio do desenvolvimento genital masculino; IO: idade óssea e ΔIO refere-se ao avanço da IO (diferença entre a idade óssea e idade cronológica à ocasião do diagnóstico); Dosagens hormonais à ocasião do diagnóstico; E: estradiol e T: testosterona; ND: não disponível; WT (wild type) alelo selvagem; Os pacientes nos quais mutações patogênicas no *MKRN3* foram encontradas através do sequenciamento automático estão assinalados em vermelho. Os pacientes selecionados para a análise cromossômica por microarranjo estão assinalados com * (pacientes 5, 24 e 41).

APÊNDICE 8 – RELAÇÃO DOS GENES CONTIDOS NO SEGMENTOS DELETADOS E DUPLICADOS DETECTADOS NOS IRMÃOS COM PPC ASSOCIADA A TEA, COM OS SEUS RESPECTIVOS PROCESSOS BIOLÓGICOS

CNV	Gene	Descrição	Processo biológico
16p11.2x1* (761kpb)	<i>BOLA2</i>	<i>bolA Family member 2</i>	Maturação proteica por transferência de ferro-enxofre
	<i>SPN</i>	<i>Sialophorin</i>	Resposta imune, quimiotaxia, regulação negativa da adesão celular, migração de células T
	<i>QPRT</i>	<i>quinolinate phosphoribosyltransferase</i>	Atividade catalítica, biossíntese de NAD, metabolismo do quinolinato,
	<i>KIFF22</i>	<i>kinesin family member 22</i>	Movimento de microtúbulos, reparo do DNA, movimentação de cromossomos durante divisão celular
	<i>MAS</i>	<i>MYC associated zinc finger protein</i>	Regulação da transcrição e da expressão genica, proliferação celular
	<i>PRRT2</i>	<i>Proline-rich transmembrane protein 2</i>	Transmissão sináptica
	<i>PAGR1</i>	<i>PAXIP1 associated glutamate rich protein</i>	Reparo do DNA, metilação de histona, regulação da transcrição
	<i>MVP</i>	<i>Major vault protein</i>	Transporte de proteínas e do RNAm, degranulação de neutrófilos
	<i>CDIPT</i>	<i>CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase</i>	Metabolismo lipídico, biossíntese de fosfatidil-inositol, metabolismo de fosfolipídeos
	<i>KCTD13</i>	<i>potassium channel tetramerization domain containing 13</i>	Migração celular, ubiquitinação, transmissão sináptica e replicação do DNA
	<i>TAOK2</i>	<i>Tao kinase 2</i>	Regulação do crescimento celular, fosforilação de proteínas, ativação da atividade proteína-quinase, organização de citoesqueleto de actina,
	<i>HIRIP3</i>	<i>HIRA interacting protein 3</i>	Remodelação da cromatina
	<i>DOC2A</i>	<i>double C2 domain alpha</i>	Excitose, transmissão sináptica, desenvolvimento do SNC
	<i>FAM57B</i>	<i>TLC domain containing 3B</i>	Metabolismo lipídico, biossíntese de ceramida
	<i>ALDOA</i>	<i>aldolase, fructose-bisphosphate A</i>	Síntese de ATP, gliconeogênese, metabolismo de frutose, via glicolítica
<i>PPP4C</i>	<i>Protein phosphatase 4, catalytic subunit</i>	Organização de microtúbulos, reparo do DNA e desfosforilação de proteínas	

CNV	Gene	Descrição	Processo biológico
	<i>TBX6</i>	<i>T-box transcription factor 6</i>	Desenvolvimento do mesoderma, regulação da transcrição, regulação negativa no desenvolvimento de projeções neurais.
	<i>YPEL3</i>	<i>yippee like 3</i>	senescência celular
	<i>MAPK3</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>	Ativação da atividade MAPK, fosforilação de proteínas, regulação da expressão genica, apoptose
18p11.22x3 (363kpb)	<i>TWSG1</i>	<i>Twisted gastrulation BMP signaling modulator 1</i>	Formação do mesoderma, diferenciação celular, sinalização via BMP, ossificação
	<i>ANKR12</i>	<i>Ankyrin repeat domain 12</i>	Ligação proteica
	<i>RALBP1</i>	<i>ralA-binding protein 1</i>	Endocitose, transdução de sinal, transporte transmembrana

Pseudogenes e genes que não constam na base de dados do OMIM não foram incluídos na tabela.

ANEXO 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do gene MKRN3 em indivíduos portadores de puberdade precoce central idiopática residentes no Distrito Federal e entorno

Pesquisador: Adriana Lofrano Alves Porto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 43171815.8.0000.0030

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.140.009

Data da Relatoria: 08/07/2015

Apresentação do Projeto:

A puberdade precoce dependente de gonadotrofinas, também conhecida como puberdade precoce central (PPC), e decorrente da ativação prematura do eixo hipotálamo-hipofise-gonadal e se caracteriza pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos nas meninas e 9 anos nos meninos. A forma idiopática caracteriza-se pela ausência de lesões orgânicas no SNC e representa a maioria dos casos de PPC no sexo feminino (90%). O diagnóstico da PPC baseia-se no reconhecimento de desenvolvimento puberal progressivo, concentrações puberes de LH em condição basal e/ou após estímulo com GnRH e avanço de idade óssea.

Diversas evidências apontam para uma influência genética no início da puberdade: idade semelhante da menarca entre mães e filhas e entre membros de um mesmo grupo étnico. Uma análise de 156 pacientes com PPC idiopática identificou prevalência de 27,5% de casos familiares, o que sugere a relevância dos fatores genéticos na sua patogênese. A análise de segregação dessas famílias sugeriu modo de herança autossômica dominante com penetrância incompleta, sexo-dependente. Até recentemente, raras mutações nos genes da kisspetina e seu receptor (KISS1 e KISS1R, respectivamente) haviam sido relacionadas a patogênese da PPC. Mais recentemente, Abreu e cols. identificaram mutações inativadoras no gene MKRN3 (makorin ring finger 3) em 5

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.140.009

de 15 famílias com PPC estudadas por sequenciamento exômico global. Esse gene sofre imprinting materno, isto é, o gene é silenciado no cromossomo de origem materna e ativo no cromossomo paterno. O gene MKRN3 localiza-se no braço longo do cromossomo 15, em uma região de imprinting relacionada à síndrome de Prader-Willi (15q11). O estudo de segregação dessas famílias demonstrou herança autossômica dominante de transmissão paterna visto que o alelo materno é silenciado. Esse achado corroborou evidências anteriores a respeito do caráter autossômico dominante, com penetrância incompleta e sexo-dependente da PPC. O produto do gene MKRN3 participa da degradação de proteínas por processo de ubiquitinação, mas o mecanismo exato pelo qual a sua inativação leva ao início da puberdade ainda não é conhecido. Outro dado que aponta o MKRN3 como um fator central para a ativação eixo hipotálamo-hipofise-gonadal e o início da puberdade é a observação de níveis elevados do mRNA desse gene no núcleo arqueado do hipotálamo dos camundongos em idade pré-puberal e diminuição do mesmo imediatamente antes e após o início da puberdade. Em conjunto, esses achados sugerem que o produto desse gene tenha um papel inibitório na secreção do GnRH, de forma que mutações inativadoras favoreceriam o início da puberdade pela ação preponderante dos fatores estimulatórios. Como o gene MKRN3 apresenta imprinting materno, não se sabe se a PPC poderia ser resultado de perda da expressão do alelo paterno por deleções de novo, dissomia uniparental materna ou defeitos de imprinting, a semelhança do que é observado na Síndrome de Prader-Willi e outras doenças. Em outro estudo mais recente, mutações no MKRN3 foram identificadas em 8 de 215 meninas com PPC aparentemente esporádica. No entanto, anormalidades no número de cópias e alteração no padrão de metilação no locus 15q11 não foram identificadas em uma parcela selecionada de pacientes sem mutações no MKRN3 detectadas pelo sequenciamento automático. O achado de mutações no gene MKRN3 representa uma nova causa de PPC, altamente relevante do ponto de vista fisiopatológico, e estabelece, de forma definitiva, a importância do componente genético na fisiopatologia dessa condição. Adicionalmente, abre-se uma perspectiva para identificação de outros defeitos genéticos no entendimento do desenvolvimento puberal prematuro).

Metodologia: Serão incluídos cerca de 150 pacientes, residentes no DF e entorno, que tiverem recebido ou estejam em uso de análogos de GnRH através do programa de dispensação de análogos de GnRH, leuprorelina e triptorelina, da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SESDF) conforme a Portaria SAS/MS número 111, de 26 de abril de 2011, que atenderam aos critérios para diagnóstico de puberdade precoce central, a saber: - meninas abaixo de 6 anos: aparecimento de caracteres sexuais secundários, idade óssea avançada, aumento da velocidade de crescimento

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.140.009

(VC), LH basal ou no teste de estímulo com GnRH em nível puberal, ecografia com aumento dos volumes ovariano e uterino; - meninas entre 6-8 anos – aparecimento de caracteres sexuais secundários e rapidamente progressivos, idade óssea avançada, aumento da VC, comprometimento da estatura final, LH basal ou no teste de estímulo com GnRH em nível puberal, ecografia com aumento dos volumes ovariano e uterino;

- meninos com idade inferior a 9 anos – aparecimento de caracteres sexuais secundários e rapidamente progressivos, aumento da VC, idade óssea avançada, comprometimento da estatura final, LH basal ou no teste de estímulo em nível puberal.

Os dados clínicos relevantes, tais como anamnese, exame físico, dosagens hormonais, resultados de exames de imagem e ecografias serão obtidos a partir de revisão dos prontuários, visto que fazem parte da rotina clínica de investigação e acompanhamento dos pacientes com PPC. A análise molecular do gene MKRN3 será feita utilizando-se DNA genômico extraído de leucócitos obtidos de amostra de 15 a 20 ml de sangue total, colhido por punção venosa periférica.

A extração de DNA será realizada utilizando-se a técnica de Salting-Out ou sistemas (kits) de extração de DNA de alta pureza (Kit Qiagen DNAeasy). O DNA genômico será utilizado como substrato para amplificação do gene MKRN3 por PCR (reação de polimerização em cadeia), utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers) desenhados especificamente para o estudo e o kit de PCR GoTaq green master mix (promega). Também serão amplificados e analisados os genes que codificam a kisspeptina (KISS1) e seu receptor (KISS1R), causas raras, porém, importantes de PPC. Para confirmação da amplificação do fragmento de interesse, os produtos de PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5 g/mL), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados. Os produtos da amplificação serão purificados por meio enzimático (sistema "EXOSAP") ou separação em micro-colunas de sílica (kit de purificação de produtos de PCR - Qiagen) e em seguida serão enviados para sequenciamento automático pelo método de Sanger.

A análise, alinhamentos e comparações entre as sequências serão realizadas com o auxílio do software Sequencher v.5.0 ou 6.0 (Gene Codes corporation). Os resultados do sequenciamento serão analisados e correlacionados com as características clínicas dos indivíduos afetados. Caso sejam identificadas mutações novas, que ainda não constem nos bancos de dados de variações genéticas (1000 genomes, NCBI), as mesmas serão rastreadas em um grupo de 100 indivíduos adultos saudáveis, que não apresentem história de precocidade sexual, isto é, que tenham apresentado menarca após os 9 anos, para o sexo feminino, ou início de desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos após os 9 anos, para o sexo masculino. Para a investigação de

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **E-mail:** cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.140.009

deleções, inserções ou alteração no padrão de metilação do gene MKRN3, será utilizado o kit de MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) já padronizado para a Síndrome de Prader-Willi, o qual o qual faz parte da região estudada nesse kit. (SALSA MLPA ME 028 MRCHolland, Amsterdam, The Netherlands). A presença de alterações cromossômicas submicroscópicas serão estudadas utilizando a plataforma CytoScan™ 750K (Affymetrix). Essa plataforma possui cerca de 750.000 sondas sendo 550.000 sondas de CNVs e 200.000 SNPs que permitem uma alta resolução tanto de variações no número de cópias quanto de heterozigose podendo assim detectar também dissomias uniparentais.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral desse estudo será investigar a presença de mutações no gene MKRN3 e outros genes envolvidos na ativação prematura do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (KISS1, KISS1R e outros que vierem a ser identificados) em uma série de pacientes portadores de puberdade precoce central idiopática, residentes no Distrito Federal e entorno.

Como objetivos secundários, o presente projeto de pesquisa visa Analisar a correlação das mutações eventualmente identificadas com a apresentação clínica dos pacientes com puberdade precoce central idiopática. Avaliar se deleções, defeitos de imprinting ou dissomia uniparental materna no locus 15q11 poderiam estar relacionadas a patogênese da PPC em uma amostra de pacientes nos quais mutações no MKRN3 não forem identificadas pelo sequenciamento automático.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os riscos são descritos da seguinte forma: Existe um desconforto e risco mínimo para a coleta da amostra de sangue venoso periférico necessária para o estudo molecular e as complicações que podem ocorrer devido a este procedimento são: leve dor ou desconforto, edema ou formação de hematoma no local da punção. A coleta da amostra para o estudo genético será realizada, preferencialmente, durante o momento de coleta de outros exames que fazem parte da rotina do acompanhamento ambulatorial do indivíduo, para se minimizar a ocorrência de risco ou desconforto adicional.

Benefícios: De acordo com o descrito no projeto de pesquisa, o benefício para os participantes é que os resultados da pesquisa poderão esclarecer se existe causa genética para a doença. Caso seja encontrada uma mutação genética, isso poderá ser útil para o diagnóstico de outros membros da família e também para o aconselhamento genético no que se diz respeito a futura prole. Adicionalmente, ao estudar a ocorrência de mutações no MKRN3 em uma série de indivíduos portadores de PPC idiopática no Distrito Federal, espera-se aumentar a casuística disponível na

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.140.009

literatura, composta pelos dados do estudo genético de pouco mais de 200 pacientes, a maioria proveniente do estado de São Paulo. Espera-se, ao estudar novas mutações do MKRN3 em casos familiares e/ou esporádicos, contribuir para maior elucidação do papel desse gene na regulação da ativação do eixo gonadotrófico em seres humanos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo observacional, exploratório e descritivo no qual serão avaliados pacientes com diagnóstico de puberdade precoce central idiopática atendidos no Distrito Federal., referente ao projeto de doutorado da aluna Luciana Pinto Valadares sob responsabilidade da pesquisadora Adriana Lofrano Alves Porto, Prof. Adjunto da Faculdade de Ciências da Saúde da UnB.

O projeto está redigido de maneira clara, permitindo a avaliação ética por parte deste CEP. Alguns pontos devem ser destacados uma vez que a população alvo da pesquisa envolve crianças com idades entre 6 a 9 anos. Dessa forma, é necessária a apresentação Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) a ser aplicado a essa população, ainda que os responsáveis estejam de acordo com o TCLE.

Tanto no TCLE quanto no projeto estão descritos os riscos relacionados a participação na pesquisa, que incluem “leve dor no local da punção, inchaço, inflamação ou uma mancha “preto-azulada” no local da picada (hematoma)”. No entanto, não está descrito o que será feito para minimizar os riscos. Os autores somente informam que “risco de dano decorrente dessa pesquisa é mínimo, no entanto, no caso de você sofrer algum dano que possa ser atribuído a sua participação, será disponibilizado o serviço médico ambulatorial do Hospital Universitário de Brasília.”

No TCLE não consta o parágrafo que garante o ressarcimento de gastos relativos a pesquisa e a indenização de danos diretos e indiretos decorrentes da participação no estudo, conforme previsto no item IV.3h da Resolução CNS/MS 466/12.

Ainda não consta no projeto e no TCLE, a garantia de que o DNA genômico extraído após realização da presente pesquisa será descartado assim como qualquer outra parte do material biológico obtido. É importante que o investigador deixe claro que caso seja de interesse do grupo de pesquisa avaliar qualquer outro evento não estabelecido no presente projeto, deverá ser obtido um novo TCLE.

Nos documentos apresentados, alguns são assinados pela pesquisadora Luciana Pinto Valadares, como a carta de encaminhamento ao CEP; e outros pela Professora Dra. Adriana Lofrano Alves Porto, como a folha de rosto.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.140.009

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para análise da pendências foram analisados os seguintes documentos:

- Informações Básicas do Projeto: _PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_365965.pdf, postado em 11/06/2015.
- Outros: _ANEXO II - Procedimento Operacional Padrao.docx, postado em 11/06/2015;
- Projeto Detalhado: _Projeto Estudo do gene MKRN3 PPC_FINAL .docx, postado em 11/06/2015
- TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: _TCLE PPC MKRN3_FINAL.docx postado em, 11/06/2015;
- Outros: _Anexo I- armazenamento SANGUE.xlsx, postado em 11/06/2015;
- Outros: _Regimento Interno Coleta, Armazenamento amostras Grupo de Pesquisa em Endocrinologia.doc postado em 11/06/2015
- Projeto Detalhado: _Projeto Estudo do gene MKRN3 PPC_Modif .docx, postado em 11/06/2015
- TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: _TCLE PPC MKRN3_Modif.docx, postado em 11/06/2015
- Outros: _Termo de Assentimento para menores de 18 anos.docx, postado em 11/06/2015
- Outros: _CartaRespPendencias CEPFS Projeto MKRN3 .pdf. postado em 11/06/2015

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Análise das respostas às pendências apontadas no parecer No. 1.065.030:

1. Solicita-se incluir na documentacao o modelo de Termo de Assentimento para participantes de pesquisa menores de 18 anos. **PENDÊNCIA ATENDIDA**
2. O TCLE devera ser adequado ao item V, da Res. CNS 340/2004, quanto a:
 - 2.a) explicitacao clara dos exames e testes que serao realizados, indicacao dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos genicos que serao estudados e sua relacao com eventual condicao do participante da pesquisa. Ainda, segundo Carta Circular No 041/2015/CONEP/CNS/MS, se for o caso, o pesquisador podera descrever os genes estudados de forma agrupada segundo funcionalidade ou efeito (exemplo: genes relacionados ao aparecimento do cancer, inflamacao, morte celular, resposta ao tratamento, etc.), nao sendo necessario lista-los individualmente; **PENDÊNCIA ATENDIDA**
 - 2.b) garantia de sigilo, privacidade e, quando for o caso, anonimato; **PENDÊNCIA ATENDIDA**
 - 2.c) plano de aconselhamento genetico e acompanhamento clinico, com a indicacao dos

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.140.009

responsáveis, sem custos para os participantes da pesquisa;PENDÊNCIA ATENDIDA

2.d) tipo e grau de acesso aos resultados por parte do sujeito, com opção de tomar ou não conhecimento dessas informações; PENDÊNCIA ATENDIDA

2.e) no caso de armazenamento do material, a informação deve constar do TCLE, explicitando a possibilidade de ser usado em novo projeto de pesquisa. É indispensável que conste também que o participante será contatado para conceder ou não autorização para uso do material em futuros projetos e que quando não for possível, o fato será justificado perante o CEP. Explicitar também que o material somente será utilizado mediante aprovação do novo projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP; PENDÊNCIA ATENDIDA

2.f) informação quanto a medidas de proteção de dados individuais, resultados de exames e testes, bem como do prontuário, que somente serão acessíveis aos pesquisadores envolvidos e que não será permitido o acesso a terceiros (seguradoras, empregadores, supervisores hierárquicos etc.); PENDÊNCIA ATENDIDA

2.g) informação quanto a medidas de proteção contra qualquer tipo de discriminação e/ou estigmatização, individual ou coletiva; PENDÊNCIA ATENDIDA

2.h) em investigações familiares deverá ser obtido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de cada indivíduo estudado.

3. Quanto ao TCLE, solicita-se ainda:

3.a) informar em medidas caseiras a quantidade de sangue a ser coletado. Por exemplo: 4mL = aproximadamente 1 colher de chá. PENDÊNCIA ATENDIDA

3.b) Solicita-se explicitar garantia de ressarcimento e indenização conforme item IV.3, subitens "g" e "h", e item IV.4, subitem "c", da Res. CNS 466/2012. PENDÊNCIA ATENDIDA

3.c) Solicita-se incluir no projeto e no TCLE, as medidas que serão realizadas para minimização dos riscos. PENDÊNCIA ATENDIDA

3.d) Solicita-se substituir o termo "cópia" por "via", conforme item IV.3, subitem "f", e item IV.5, subitem "d", da Res. CNS 466/2012. PENDÊNCIA ATENDIDA

3.e) Para preservar a integridade do documento, solicita-se numerar suas páginas. Por exemplo, página 1 de 2, página 2 de 2. Ainda, o TCLE deverá ser rubricado em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela (s) pessoa (s) por ele delegada (s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. PENDÊNCIA ATENDIDA

3.f) Solicita-se informar o que é e qual o papel do CEP, bem como a atualização de seus dados de

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 1.140.009

contato: "telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br ou cepfsunb@gmail.com, horario de atendimento de 10:00hs as 12:00hs e de 13:30hs as 15:30hs, de segunda a sexta-feira, localizado na Faculdade de Ciencias da Saude, Campus Universitario Darcy Ribeiro, Universidade de Brasilia, Asa Norte. PENDÊNCIA ATENDIDA

3.g) Solicita-se retirar os campos para preenchimento de RG e CPF. PENDÊNCIA ATENDIDA

Pendências sanadas.

Protocolo de pesquisa em conformidade com a Resolução CNS 466/2012 e complementares.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em acordo com a Resolução 466/12 CNS, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

BRASILIA, 06 de Julho de 2015

Assinado por:
Marie Togashi
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.910-900

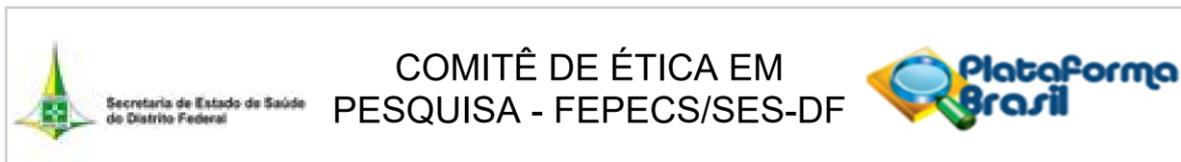
UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3107-1947

E-mail: cepfsunb@gmail.com

ANEXO 2



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do gene MKRN3 em indivíduos portadores de puberdade precoce central idiopática residentes no Distrito Federal e entorno

Pesquisador: Adriana Lofrano Alves Porto

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 43171815.8.3001.5553

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.152.221

Data da Relatoria: 13/07/2015

Apresentação do Projeto:

Na data de 06/07/2015, o projeto número:1.140.009 foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro, da Universidade de Brasília. Na mesma data o protocolo deu entrada no CEP/FEPECS para participar a SES/DF que ela seria co-participante da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

"O objetivo geral desse estudo sera investigar a presença de mutacoes no gene MKRN3 e outros genes envolvidos na ativacao prematura do eixo hipotalamico-hipofisario-gonadal (KISS1, KISS1R e outros que vierem a ser identificados) em uma serie de pacientes portadores de puberdade precoce central idiopática, residentes no Distrito Federal e entorno.

Como objetivos secundarios, o presente projeto de pesquisa visa:

- Analisar a correlacao das mutaçoões eventualmente identificadas com a apresentacao clinica dos pacientes com puberdade precoce central idiopática.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS

Bairro: ASA NORTE

CEP: 70.710-904

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3325-4955

Fax: (33)3325-4955

E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.152.221

- Avaliar se deleções, defeitos de imprinting ou dissomia uniparental materna no locus 15q11 poderiam estar relacionadas a patogênese da PPC em uma amostra de pacientes nos quais mutações no MKRN3 não foram identificadas pelo sequenciamento automático."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

"Riscos: Os riscos são descritos da seguinte forma: Existe um desconforto e risco mínimo para a coleta da amostra de sangue venoso periférico necessária para o estudo molecular e as complicações que podem ocorrer devido a este procedimento são: leve dor ou desconforto, edema ou formação de hematoma no local da punção. A coleta da amostra para o estudo genético será realizada, preferencialmente, durante o momento de coleta de outros exames que fazem parte da rotina do acompanhamento ambulatorial do indivíduo, para se minimizar a ocorrência de risco ou desconforto adicional.

Benefícios: De acordo com o descrito no projeto de pesquisa, o benefício para os participantes e que os resultados da pesquisa poderão esclarecer se existe causa genética para a doença. Caso seja encontrada uma mutação genética, isso poderá ser útil para o diagnóstico de outros membros da família e também para o aconselhamento genético no que se diz respeito a futura prole. Adicionalmente, ao estudar a ocorrência de mutações no MKRN3 em uma série de indivíduos portadores de PPC idiopática no Distrito Federal, espera-se aumentar a casuística disponível na literatura, composta pelos dados do estudo genético de pouco mais de 200 pacientes, a maioria proveniente do estado de São Paulo. Espera-se, ao estudar novas mutações do MKRN3 em casos familiares e/ou esporádicos, contribuir para maior elucidação do papel desse gene na regulação da ativação do eixo gonadotrófico em seres humanos."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

"Metodologia: Serão incluídos cerca de 150 pacientes, residentes no DF e entorno, que tiverem recebido ou estejam em uso de análogos de GnRH através do programa de dispensação de análogos de GnRH, leuprorelina e triptorelina, da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SESDF) conforme a Portaria SAS/MS número 111, de 26 de abril de 2011, que atenderam aos critérios para diagnóstico de puberdade precoce central, a saber: - meninas abaixo de 6 anos: aparecimento de caracteres sexuais secundários, idade óssea avançada, aumento da velocidade de crescimento (VC), LH basal ou no teste de estímulo com GnRH em nível puberal, ecografia com aumento dos volumes ovariano e uterino; - meninas entre 6-8 anos – aparecimento de caracteres sexuais secundários e rapidamente progressivos, idade óssea avançada, aumento da VC, comprometimento da estatura final, LH basal ou no teste de estímulo com GnRH em nível puberal, ecografia com aumento dos

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.152.221

volumes ovariano e uterino;

- meninos com idade inferior a 9 anos – aparecimento de caracteres sexuais secundários e rapidamente progressivos, aumento da VC, idade óssea avançada, comprometimento da estatura final, LH basal ou no teste de estímulo em nível puberal. Os dados clínicos relevantes, tais como anamnese, exame físico, dosagens hormonais, resultados de

exames de imagem e ecografias serão obtidos a partir de revisão dos prontuários, visto que fazem parte da rotina clínica de investigação e acompanhamento dos pacientes com PPC. A análise molecular do gene MKRN3 será feita utilizando-se DNA genômico extraído de leucócitos obtidos de amostra de 15 a 20 ml de sangue total, colhido por punção venosa periférica. A extração de DNA será realizada utilizando-se a técnica de Salting-Out ou sistemas (kits) de extração de DNA de alta pureza (Kit Qiagen DNAeasy). O DNA genômico será utilizado como substrato para amplificação do gene MKRN3 por PCR (reação de polimerização em cadeia), utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (primers) desenhados especificamente para o estudo e o kit de PCR GoTaq green master mix (promega). Também serão amplificados e analisados os genes que codificam a kisspeptina (KISS1) e seu receptor (KISS1R), causas raras, porém, importantes de PPC. Para confirmação da amplificação do fragmento de interesse, os produtos de PCR são submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% corados com brometo de etídio (0,5 g/mL), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados. Os produtos da amplificação serão purificados por meio enzimático (sistema "EXOSAP") ou separação em micro-colunas de sílica (kit de purificação de produtos de PCR - Qiagen) e em seguida serão enviados para sequenciamento automático pelo método de Sanger."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

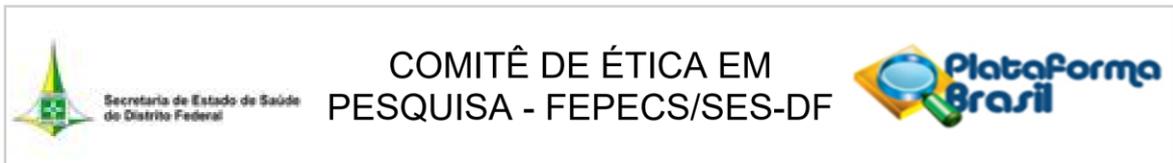
Foram apresentados adequadamente ao CEP/FS os termos:

- Folha de Rosto assinada
- Termo de concordância assinados
- Currículo vitae participantes
- Avaliação de riscos e benefícios, de acordo com a Resolução CNS/MS 466/12
- Projeto de pesquisa completo com cronograma e planilha de orçamento

Recomendações:

Todas as pendências elencadas ao pesquisador pelo CEP/FS/UNB são extremamente importantes e concordantes com este CEP/FEPECS. O pesquisador atendeu, no papel, a estas pendências. Recomendamos ao pesquisador que as cumpra, criteriosamente, uma a uma, na execução deste

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.152.221

projeto de pesquisa em todas as instituições em que foram alocados pacientes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado como instituição e CEP co-participante.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 16 de Julho de 2015

Assinado por:
Helio Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com