



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UNICEUB**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES**  
**PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

**RAFAEL DOMINGOS GUIMARÃES GUEDES**

**ESTUDO DO GENE MKRN3 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA RESIDENTES NO  
DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

**BRASÍLIA-DF**  
**2017**



**RAFAEL DOMINGOS GUIMARÃES GUEDES**

**ESTUDO DO GENE MKRN3 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE  
PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA RESIDENTES NO  
DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

Relatório final de pesquisa de Iniciação Científica  
apresentado à Assessoria de Pós-Graduação e  
pesquisa pela Faculdade de Ciências da  
Educação e Saúde – FACES

Orientação: Fernanda Costa Vinhaes de Lima

**BRASÍLIA-DF  
2017**

## Sumário

Lista de Abreviaturas.....	4
Resumo.....	6
Introdução .....	8
Referencial teórico.....	10
Metodologia.....	15
Resultados e discussões.....	18
Considerações finais .....	23
Referencias .....	24
Anexos .....	27
Apêndices .....	39

## **Lista de Abreviaturas**

CEP - Comitê de Ética em Pesquisa  
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
DF - Distrito Federal  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
DNMP - Desenvolvimento Neuro Psico Motor  
FarMOL - Laboratório de Farmacologia Molecular  
FEPECS – Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde  
FS - Faculdade de Ciências  
GnRH - Hormônio Liberador de Gonadotrofina  
GPR54 - gene receptor da proteína kisspeptina  
HCB – Hospital da Criança de Brasília  
HHG - Hipotálamo-Hipófise-Gonodal  
HUB – Hospital Universitário de Brasília  
IO - Idade Óssea  
KISS1 – gene que expressa a proteína kisspeptina  
KISS1R – gene receptor da proteína kisspeptina  
LACEN - Laboratório de Saúde Pública do Distrito Federal  
LIN28B – lin-28 homolog B  
MKRN3 - Makorin Ring Finger Protein 3  
NR0B1- Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1  
PP - Puberdade Precoce  
PPC - Puberdade Precoce Central  
PPP - Puberdade Precoce Periférica  
RM – Ressonância Magnética  
SES – Secretaria de Estado de Saúde  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SPW - Síndrome de Prader-Willi  
SSR - Silver-Russell  
TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ]  
TS14 - Síndrome de Temple  
UI - Unidade Internacional  
UnB - Universidade de Brasília

UnB – Universidade de Brasília  
VC - Velocidade de Crescimento

## Resumo

### **ESTUDO DO GENE MKRN3 EM INDIVÍDUOS PORTADORES DE PUBERDADE PRECOCE CENTRAL IDIOPÁTICA RESIDENTES NO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO**

**Rafael Domingos Guimarães Guedes – UniCEUB, PIBIC-CNPq, aluno bolsista**  
*rafaeldomingos8c@gmail.com*

**Fernanda Costa Vinhaes de Lima – UniCEUB, professora orientadora**  
*fernanda.Lima@uniceub.br*

**Olivia Laquis De Moraes - UniCEUB, professora colaboradora**  
*livilaquis@gmail.com*

**Adriana Lofrano Alves Porto- UNB, professora colaboradora**  
*adlofrano@gmail.com*

A puberdade é a fase que marca a transição da infância para a fase adulta, sendo evidenciada por mudanças fisiológicas, psicológicas e sociais que apontam o desenvolvimento de caracteres sexuais e o amadurecimento da capacidade reprodutiva. Dentro das reações endócrinas, a reativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG) é responsável pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais e por estimular a síntese de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH). A ativação prematura do eixo HHG resulta em indivíduos com puberdade precoce central (PPC), caracterizada pela evolução puberal prematura. Como consequência dessa afecção têm-se o aumento das gônadas, antecipação da menarca, desenvolvimento mamário e aumento do número e espessura dos pelos. Um paciente é diagnosticado com PPC quando os sinais e sintomas manifestam-se em meninos menores de 9 anos e meninas menores de 8 anos de idade. Estudos demonstram que mutações nos genes KISS1, KISS1R, LIN28B, GPR54 e MKRN3 estão associadas à puberdade precoce. Mutações no gene MKRN3 são descritas em estudos como responsáveis pela PPC idiopática. O objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de mutações no gene MKRN3 em 30 pacientes previamente diagnosticados com PPC residentes no Distrito Federal e entorno. Para realização da pesquisa foram coletadas amostras de sangue periférico dos pacientes, por punção intravenosa, e extração do DNA por meio do kit da QiAgen. O material genético obtido foi submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR), sendo realizada a amplificação do gene MKRN3 por pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos. A amplificação dos produtos de PCR foi confirmada em gel de agarose a 1% e os produtos foram submetidos ao sequenciamento automático de Sanger. A análise do sequenciamento foi realizada pelo *software Sequencher®* e os resultados encontrados foram comparados com os principais bancos de dados genômicos. Foram identificados dois pacientes com mutações autossômicas dominantes de penetrância incompleta no gene MKRN3, sendo duas irmãs com mutação *missense* c.982C\_T/p.Arg.328.Cys. A primeira paciente foi incluída no estudo com 7 anos e 11 meses de idade apresentando menarca e pubarca aos 7 anos 8 meses, telarca aos 7 anos, idade óssea de 11 anos, e P2M3 na escala de Tanner. A segunda paciente, com 7 anos e 2 meses de idade apresentando telarca e axilarca aos 6 anos, e P2M2 na escala de Tanner. Os resultados do presente estudo foram fundamentais por auxiliarem no desenvolvimento de pesquisas que estabelecem a relação fisiológica entre os achados genéticos e os fenótipos de afecções, nos quais é possível a ampliação das informações descritas na literatura sobre puberdade precoce. Os dados obtidos são importantes por possibilitarem o acompanhamento genético dos pacientes e a identificação de novos casos familiares, como apontados em estudos que evidenciam a ocorrência de PPC familiar. A investigação genética de outros membros das famílias com pacientes diagnosticados é de suma importância para detectar a patogênese das mutações

e potencializar o sucesso do tratamento. Mesmo com o avanço dos estudos, a investigação das causas da puberdade precoce ainda necessita de maior aprofundamento sendo uma área de destaque para pesquisas científicas.

**Palavras-Chave:** Puberdade precoce. Desenvolvimento sexual. Gonadotrofina. Hipotálamo. MKRN3.

## Introdução

A puberdade é a fase de alterações físicas, bioquímicas e psicossociais que são reguladas por interações neuroendócrinas, gênicas e por pressões do meio externo. O início da fase púbere normal é caracterizado pelo reaparecimento de pulsos do Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH), aumento no volume das gônadas em ambos os sexos, desenvolvimento de caracteres sexuais secundários como pelos, desenvolvimento das mamas em meninas e pelos faciais em meninos. Esses processos sinalizam a maturidade sexual para a reprodução (BESSA *et al.*, 2017; OH *et al.*, 2017).

A ativação prematura do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG) resulta em indivíduos com Puberdade Precoce (PP), caracterizados pelo desenvolvimento prematuro dos caracteres sexuais secundários, como o aumento do volume das gônadas, avanço do crescimento ósseo, antecipação da menarca em meninas, da pubarca, da telarca, e atraso na estatura final. Tratando-se, então, do amadurecimento sexual prematuro em meninas com idade inferior a 8 anos e meninos a 9 anos. A puberdade precoce é classificada em Puberdade Precoce Periférica (PPP) e puberdade precoce central (PPC)(KRSTEVSKA-KONSTANTINOVA *et al.*, 2014; SIMON *et al.*, 2015).

A Puberdade Precoce Periférica dá-se pelo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários sem a ativação do eixo HHG, podendo ser estimulada por adrenaquia, que se tratam de hormônios secretados pelas glândulas adrenais, e por fatores externos ao organismo, como exposição a hormônios exógenos. Cistos ovarianos e algumas síndromes associadas ao sistema reprodutor também podem realizar essa ativação precoce, como é o caso da mutação do receptor do hormônio luteinizante (LHR), síndrome de McCune-Albright (MAS) e testotoxicose, causadora de pseudo puberdade precoce (ERSOY *et al.*, 2017; MELMED *et al.*, 2015).

A puberdade precoce central é caracterizada pelo desenvolvimento púbere prematuro, decorrente da ativação precoce do eixo HHG. Esse evento pode ocorrer devido à lesões no Sistema Nervoso Central (SNC), causa orgânica da PPC (RAMOS *et al.*, 2017), ou pela ativação sem fatores diagnosticados, denominada PPC idiopática. A puberdade precoce central idiopática tem incidência de 1:5.000 a 1:10.000 e é mais frequente em indivíduos do sexo feminino, tendo uma proporção de 3-23 meninas: 1 menino diagnosticado (CAREL; LÉGER, 2008; PARTSCH;



HEGER; SIPPELL, 2002). O tipo orgânico de puberdade precoce é mais frequente em indivíduos do sexo masculino, enquanto o tipo idiopático tem predominância em indivíduos do sexo feminino, cerca de 90% dos casos (CHEN *et al.*, 2017).

Os processos envolvidos no desenvolvimento puberal ainda necessitam de estudos, mas sabe-se que fatores ambientais, genéticos, físicos e alimentares estão atreladas as respostas endócrinas do organismo. Dentre as interações genicas, as mutações destacadas pela literatura comprovam que as alterações no gene *MKRN3* (*Makorin Ring Finger Protein 3*) são associadas a PPC Idiopática. (CHEN *et al.*, 2017). A partir desta problemática o objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de mutações no gene *MKRN3* em 30 pacientes previamente diagnosticados com Puberdade Precoce Central Idiopática.)

Este estudo faz parte de um projeto maior, o qual é subsidiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) com número 462346/2014-5 (ANEXO A) e propõe-se a colaborar para o aumento da casuística da patogênese da PPC, ao estudar uma nova série de indivíduos acometidos que poderá ser somada aos casos já descritos e estudados em outros centros do país.

## Referencial teórico

O hormônio liberador de gonadotrofina é liberado do período fetal até após o nascimento do indivíduo, com a breve ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gonadal (HHG), secretando picos de GnRH. Esse processo é breve e natural, e só volta a ocorrer na fase de desenvolvimento púbere, no momento da adolescência com o retorno da sua sintetização pelo eixo HHG. Após seu estímulo são secretados, por consequência, as gonadotrofinas e os esteroides sexuais (BULCAO MACEDO; NAHIME BRITO; LATRONICO, 2014).

O GnRH é responsável pelo estímulo do Hormônio Luteinizante (LH) e do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), responsáveis respectivamente pela produção e desenvolvimento dos gametas sexuais, e pela síntese de esteroides, como o estradiol e a testosterona. A atividade gonadal é controlada pelos pulsos de GnRH e pela frequência com que esse hormônio é secretado, estando diretamente relacionado ao eixo reprodutivo (BRITO *et al.*, 1999; MELMED *et al.*, 2015; NEELY *et al.*, 1995).

O desenvolvimento púbere de indivíduos do sexo feminino inicia-se, em média entre 8 e 12 anos de idade, com pulsos de GnRH, estimulando a síntese e liberação do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e o Hormônio Luteinizante (LH) pela hipófise. O FSH é responsável pelo desenvolvimento mamário (telarca), aumento do volume e espessura de pelos pubianas (pubarca) e corporais, o aumento do volume do útero, desenvolvimento do endométrio e por estimular a secreção de estrogênio (CRINÒ *et al.*, 2008; MACEDO; ABREU; *et al.*, 2014).

O LH é responsável pelo desenvolvimento do corpo lúteo, dos folículos de Graaf e pela ovulação. A menarca ocorre com a descamação do endométrio formado, ocorrendo sem a liberação de óvulos nas menstruações iniciais. A faixa etária do aparecimento desses caracteres está relacionada a aspectos étnicos, nutricionais, condições genéticas, ambientais e a idade da menarca da mãe (GAJDOS *et al.*, 2010; MELMED *et al.*, 2015; ONG *et al.*, 2009a).

O desenvolvimento puberal de indivíduos do sexo masculino ocorre, em média, no período entre 9 e 13 anos e se assemelha ao feminino por iniciar com o estímulo de pulsos de GnRH, que estimula o desenvolvimento das gônadas masculinas por meio dos hormônios FSH e LH. Em indivíduos do sexo masculino o FSH é responsável pela maturação dos espermatozoides. E o LH estimula as células de

Leydig a produzir a testosterona. Esse eixo endócrino estimula o aumento do volume dos testículos, a telarca, aumento do volume e espessura de pelos pubianos (pubarca) e corporais, o aumento do tamanho do pênis e o engrossamento da voz (MELMED *et al.*, 2015).

A Puberdade Precoce Central é sinalizada pela ativação precoce do eixo Hipotálamo-hipófise-gonadal, na qual pulsos de GnRH de origem hipotalâmica, são liberados pela glândula pituitária. Esse hormônio é responsável por estimular a síntese e liberação das gonadotrofinas, LH e FSH. A PPC em sua condição idiopática é caracterizada pelo desenvolvimento de caracteres sexuais secundários antes do tempo médio de início da puberdade. Sabe-se que a faixa etária do começo da puberdade é influenciada pela etnia, idade de menarca da mãe, fatores genéticos e externos, como é o caso de PP por exposição a disruptores endócrinos (BESSA *et al.*, 2017; BULCAO MACEDO; NAHIME BRITO; LATRONICO, 2014).

O desenvolvimento precoce de indivíduos do sexo feminino dá-se primeiramente pela evolução das mamas e avanço na Velocidade de Crescimento (VC) em decorrência do hormônio estradiol que promove o desenvolvimento dos tecidos mamário e ósseo. Posteriormente ocorre o aparecimento de pelos pubianos e axilares, aumento do volume ovariano e do tamanho do útero com o desenvolvimento do endométrio e do corpo lúteo. A menarca é último estágio do processo de amadurecimento, onde ocorre a descamação do tecido superficial uterino (ABREU *et al.*, 2013a; RAMOS *et al.*, 2017).

Em indivíduos do sexo masculino ocorre primeiramente o aumento no volume testicular a partir de pulsos de GnRH, que promovem a estimulação da síntese de testosterona pelas células de Leydig. Posteriormente têm-se o aparecimento dos pelos pubianos e axilares e o breve desenvolvimento mamário. Ao contrário de indivíduo do sexo feminino, a evolução das mamas é cessada, e ao decorrer da puberdade ocorre a sua regressão (BULCAO MACEDO; NAHIME BRITO; LATRONICO, 2014).

As medidas das gônadas são consideradas púberes quando o volume dos ovários é maior que 2 cm<sup>3</sup> e dos testículos é maior que 4 ml. Os níveis dos hormônios LH e FSH são púberes quando estão, respectivamente, acima de 0,6 U/l e 13 U/l (BRITO *et al.*, 1999; NEELY *et al.*, 1995). Além dessas medidas é utilizada também a escala proposta por TANNER (1962) que estabeleceu parâmetros de crescimento de adolescentes, criando uma escala para mensurar os estágios de desenvolvimento

púbere de indivíduos do sexo masculino e feminino, tanto na evolução de gônadas e pelos, como no desenvolvimento mamário. A escala de Tanner é utilizada por profissionais da saúde para apontar os estágios de desenvolvimento dos caracteres sexuais, e por consequência é bastante adotado no diagnóstico de pacientes com Puberdade Precoce (CAREL; LÉGER, 2008; IMPRODA *et al.*, 2012; NEELY *et al.*, 1995).

Os hormônios sexuais são responsáveis por propor o desenvolvendo corporal, por estimularem a maturação de diversos tecidos, como é o caso dos tecidos ósseos, epiteliais e musculares. Na PP eles promovem a evolução corporal antes do período ideal para a maturação, acarretando em Idade Óssea (IO) avançada, estatura elevada para a faixa etária e caracteres sexuais já desenvolvidos com idade infantil. A perda de estatura final é consequência do avanço da Velocidade de Crescimento, onde as epífises ósseas são soldadas antes de atingir-se o período de estatura final (CRINÒ *et al.*, 2008; ERSOY *et al.*, 2017; KRSTEVSKA-KONSTANTINOVA *et al.*, 2014).

Determinadas síndromes possuem a puberdade precoce no seu quadro de sintomas, como a Síndrome de Temple (TS14) e a Síndrome de Prader-Willi (SPW). A TS14 trata-se de uma síndrome genética no cromossomo 14. Seus sinais e sintomas são hipotonia muscular, baixo peso neonatal, estatura baixa na fase adulta, mãos e pés pequenos, e puberdade precoce. Seu diagnóstico é realizado exclusivamente por análise genética (ABREU *et al.*, 2013b; CRINÒ *et al.*, 2008; IMPRODA *et al.*, 2012; KAGAMI *et al.*, 2017; LUDWIG *et al.*, 2016).

O teste para TS14 é indicado para indivíduos com atraso no desenvolvimento, tanto no período de crescimento gestacional quanto no pós-natal, para portadores das Síndromes de Prader-Willi (SPW) e Silver-Russell (SSR), para pacientes com puberdade precoce e com histórico familiar de deleções na região 14q32. Em alguns casos foram relatadas a associação de Temple com outras síndromes, como a SPW e a SSR (IOANNIDES *et al.*, 2014; KAGAMI *et al.*, 2017).

O fator genético é apontado em estudos como importante a ser investigado por estar ligado à característica familiar hereditária da afecção e à padrões de alterações no perfil gênico do paciente. Estudos apontam mutações nos genes *KISS1*, *KISS1R*, *LIN28B*, *NR0B1* e *MKRN3* associados à puberdade precoce (BULCAO MACEDO; NAHIME BRITO; LATRONICO, 2014; GAJDOS *et al.*, 2010).

O papel do gene *KISS1* foi descrito primeiramente em testes realizados com camundongos para avaliar o papel da proteína kisspeptina em tumores mamários

(LEE; WELCH, 1997). E relacionado ao eixo reprodutivo em estudos posteriores (DE ROUX *et al.*, 2003; FUNES *et al.*, 2003; SEMINARA *et al.*, 2003)

O *KISS1* (*KiSS-1 metastasis-suppressor*, Gene ID: 3814), localizado no cromossomo 1q32.1 e seu receptor *KISS1R* (Gene ID: 84634), são responsáveis pela codificação do neuropeptídeo kisspeptina e pelo seu reconhecimento. Estão diretamente envolvidos na secreção de LH dependente de GnRH e por consequência estão relacionados com o início da puberdade. Mutações nesses genes são responsáveis pela PPC por regularem o funcionamento do eixo reprodutivo. Mutações no gene *KISS1* e *KISS1R* (também nomeado como *GPR54*) são raras e a sua descrição bibliográfica é reduzida evidenciando a necessidade de estudos para melhor investigação da relação do gene com o eixo reprodutivo (OH *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2010; WEST *et al.*, 1998).

O gene *LIN28B* (*lin-28 homolog B*, Gene ID: 389421) está localizado no braço longo do cromossomo 616.3-q21, sendo expresso em grande quantidade no testículo, fígado fetal e em tumores humanos primários. Seu funcionamento está relacionado ao metabolismo de nucleotídeos, metilação de histonas e modulação da abundância de proteínas, além da ligação à RNAs mensageiros de proteínas importantes para a fosforilação oxidativa (ZHANG *et al.*, 2016).

Recentemente foram apontadas alterações no gene *LIN28B* associadas ao eixo reprodutivo, porém, apenas alguns estudos mostram que elas estão associadas a PPC (ONG *et al.*, 2009b; SULEM *et al.*, 2009). Uma pesquisa realizada com 116 indivíduos do sexo feminino portadores de puberdade precoce central, constatou a relação de meninas diagnosticadas com PPC e o gene *LIN28B*, de genótipo rs314276 (CHEN *et al.*, 2017).

O gene *NROB1* (*Nuclear Receptor Subfamily 0 Group B Member 1*, Gene ID: 190) está localizado no cromossomo X p21.2, responsável pela hipoplasia adrenal congênita ligada ao cromossomo X, caracterizada por hipogonadismo hipogonadotrófico, insuficiência adrenal e infertilidade. Uma mutação no gene *NROB1* foi identificada em um indivíduo com Puberdade Precoce, apresentando níveis elevados de testosterona e resposta elevada a gonadotrofina por exposição à GnRH, sem insuficiência adrenal. Foi identificada mutação variante *frameshift* p.Glu3fsAla \* 16 em *NROB1* (SHIMA *et al.*, 2016).

O gene *MKRN3* (*Makorin Ring Finger Protein 3*, Gene ID: 7681) está localizado no cromossomo 15 q11.2, atuando como um importante supressor hormonal no eixo

HHG. Estruturalmente está em uma região constituída por dedos de zinco, responsáveis por interações químicas e estruturais. O gene sofre *imprinting* materno e alterações em sua estrutura estão diretamente ligadas a Puberdade Precoce Central (Perry et al., 2014; NISHIOKA *et al*, 2017) e a PPC familiar. Essa região genica é constituída por 3 629 pares de bases e codificam uma proteína de 182 aminoácidos. (BESSA *et al.*, 2017; BULCAO MACEDO; NAHIME BRITO; LATRONICO, 2014; DE VRIES *et al.*, 2004).

O diagnóstico de PPC é realizado por meio de exames que irão evidenciar a evolução corporal dos caracteres púberes, dentre eles, os exames físicos são realizados para verificar o volume da mama, o tamanho dos testículos e a presença de pelos axilares e púbicos. Os exames de imagem são fundamentais, pois a partir de Raio x do punho é possível mensurar a idade óssea (PYLE; GREULICH, 1959), e com a Ressonância Magnética (RM) do crânio é possível verificar possíveis anomalias no Sistema Nervoso Central (SNC), descartando ou não o tipo orgânico da PPC. O ultrassom pélvico é solicitado para pacientes do sexo feminino para verificar o volume ovariano, uterino e a evolução do endométrio. Análises clínicas são realizadas em ambos sexos, para saber a dosagem de gonadotrofinas e verificar os níveis hormonais por estímulo de GnRH. Neste teste injeta-se o GnRH no paciente e depois são feitas 3 coletas com um intervalo de 30 minutos entre elas (IMPRODA *et al.*, 2012; MACEDO; CUKIER; *et al.*, 2014).

O tratamento mais utilizado atualmente é a administração de um análogo de GnRH, como a leuprorelina, para interromper a liberação do hormônio e por consequência cessar o estímulo de síntese de esteroides sexuais. O análogo age diretamente nos receptores do hormônio liberador de gonadotrofinas proporcionando desenvolvimento púbere normal. O tratamento se torna necessário na maioria dos casos e é de suma importância por evitar possíveis complicações futuras, melhorando a estatura final esperada e promovendo a melhora do psicossocial do paciente que é afetado pela puberdade precoce. É indicado um tratamento psicológico em paralelo ao medicamento para assistir o paciente ajudando-o a compreender as alterações físicas e fisiológicas ocorridas (MACEDO; CUKIER; *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2017; SHIMA *et al.*, 2016).

## Metodologia

Os participantes desta pesquisa foram selecionados nos ambulatórios de Endocrinologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília (HUB) e do Hospital da Criança de Brasília (HCB). Foram incluídos os pacientes residentes no DF e entorno, que tenham recebido ou estejam em uso de análogos de GnRH para tratamento da PPC por meio do programa de dispensação de análogos de GnRH da Secretaria de Saúde do Distrito Federal (SES-DF) conforme a Portaria SAS/MS número 111, que atenderam aos critérios para diagnóstico de PPC. Os respectivos responsáveis pelas crianças realizaram a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A)

Os dados clínicos relevantes, tais como anamnese, exame físico e resultados dos exames laboratoriais e radiológicos, foram obtidos a partir da análise retrospectiva dos prontuários, visto que fazem parte da rotina de investigação clínica e acompanhamento dos indivíduos portadores de PPC.

A análise molecular foi feita a partir da extração do DNA genômico foi extraído de leucócitos obtidos a partir de uma amostra de 4mL de sangue venoso colhido por punção venosa periférica em um tubo contendo o anticoagulante EDTA, procedeu-se à extração utilizando-se o kit de extração de alta pureza DNA QIAmp Kit® (Qiagen).

O DNA extraído foi submetido a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tradicional, utilizando o kit de PCR GoTaq green master mix da Promega, para amplificação do gene MKRN3 (número de acesso GenBank, NM\_032551) por meio de pares de oligonucleotídeos iniciadores específicos.

O gene *MKRN3* foi amplificado pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se três pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos. A tabela 1 mostra a sequência dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação do gene *MKRN3*.

Os oligonucleotídeos foram desenhados em dois momentos, seguindo as sequências de bases apontadas na tabela 1.

**Tabela 1-** Sequencia dos oligonucleotídeos para amplificação do gene *MKRN3*

<b>MKRN3</b>	<b>Primer (5' &gt; 3')</b>	<b>Tamanho do produto</b>
Fragmento 1	1F: GCCTCAAGCCCATAAAGAAA 1R: AGCCATCTGCTTCCTCTCAG	774 pb
Fragmento 2	2F: GGCATTTGGACAAAGCAGA 2R: CACTGGGAATGACCAATTC	847pb
Fragmento 3	3F: CCAATTGCAACCATTCCTTC 3R:CACCATAATCCTAGGGGGAAA	684pb

F: *Primer foward*; R: *primer reverso*

Os produtos das PCR's foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) para verificar a amplificação esperada e possíveis contaminações ocorridas durante o processo. As amostras que tiveram seu controle negativo amplificado, tiveram suas PCR's refeitas até não demonstrarem nenhuma contaminação. Aquelas que o controle negativo não amplificou tiveram o produto final purificado por meio do kit de purificação de produtos de PCR da QIAgen, e então encaminhados para a empresa Macrogen - Coréia para a realização do sequenciamento pelo método automático de Sanger.

A leitura do sequenciamento foi realizada com o software *Sequencher* versão 5 (GENE CODES CORPORATION, [S.d.]). As mutações identificadas de variante *missense* foram submetidas à análise pelo software *Polymorphism Phenotyping*, versão 2 (*PolyPhen2*) (ADZHUBEI *et al.*, 2010) para predição de potencial de impacto, apontando um score de nocividade da troca de base evidenciada.

A metodologia quantitativa foi optada por se tratar de uma pesquisa com dados biológicos e resultados de análises, não contendo informações de questionários ou das opiniões dos participantes. Os envolvidos não responderam a nenhum questionário, apenas consentiram com a realização da pesquisa através da assinatura do TCLE.

O grupo amostral escolhido para o projeto é composto por 30 pacientes, sendo 4 do sexo masculino e 26 do sexo feminino, que apresentam características clínicas e hormonais típicas de Puberdade Precoce Central na sua condição idiopática, sem lesões no SNC, residentes no Distrito Federal e cidades do entorno, que tenham feito ou fazem uso de análogos de GnRH atendidos pelo programa de dispensação de análogos de GnRH, leuprorrelina e triptorrelina.



A realização do estudo foi autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS-UNB) com número de parecer 1.140.009 no dia 08/07/2015. E também pelo Comitê de Ética em Pesquisa (FEPECS/SES) – Distrito Federal (DF) com número de parecer 1.152.221 no dia 13/07/2015, (ANEXO B).

## Resultados e discussões

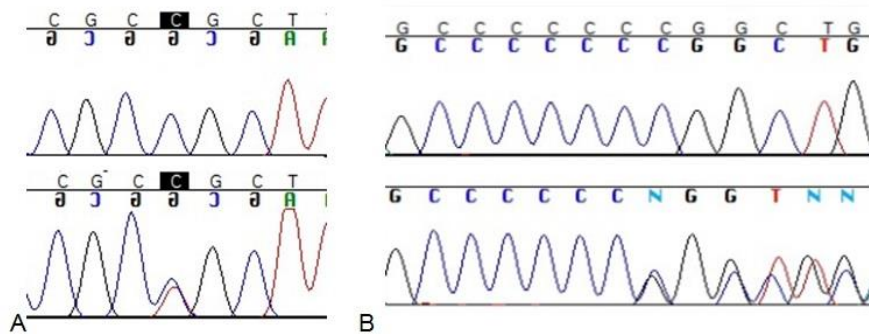
Uma mutação do tipo *missense* c.982C\_T/p.Arg.328.Cys (figura 1) foi encontrada em duas irmãs, (pacientes 1 e 2), na qual a paciente 1, natural da cidade do Gama - DF, foi atendida no ambulatório de Endocrinologia do Hospital da Criança de Brasília - UCB aos 7 anos e 11 meses com sinais e sintomas de PP. Apresentando telarca aos 7 anos, axilarca aos 7 anos e 5 meses, pubarca e menarca aos 7 anos e 8 meses. Nessa idade possuía IO de 11 anos, com estatura de 1,39 metros e peso de 49,65 Kg. Denotava pelos pubianos de estadiamento P2 e desenvolvimento das mamas no estadiamento M3 segundo a escala de Tanner (1962).

Em avaliação hormonal o nível basal de LH foi de 3,24 UI/L e de FSH foi de 5,84 UI/L, como também dosagem de estradiol de 63,33 UI/L. Não foram apresentados exames de imagens do crânio para descarte da condição orgânica de PPC. Porém em ultrassonografia pélvica foi evidenciado alto volume ovariano, ovário esquerdo (OE) medindo 4 cm<sup>3</sup> e ovário direito (OD) com 1,3 cm<sup>3</sup>.

A paciente 2 teve o início dos sintomas com 6 anos idade com telarca e axilarca em progresso. Com 7 anos e 2 meses possuía uma estatura de 132,7 metros de altura, 38,6 Kg, pelos pubianos no estadiamento P2 e desenvolvimento das mamas no estadiamento M2 segundo a escala de Tanner (1962). Não apresentou nenhum sintoma neurológico, porém está em quadro de obesidade.

A mutação encontrada de variante *missense* foi submetida a análise no software *PolyPhen – 2* (ADZHUBEI *et al.*, 2010) para verificar a predição da deleção ocorrida no gene MK. Essa mutação leva à substituição da arginina na posição 328 da cadeia polipeptídica por uma cisteína (p.Arg328Cys) e localiza-se no anel de zinco C3HC4 (figuras 4 e 5). A arginina nessa posição é altamente conservada entre as espécies. A figura 2 demonstra o alto score de impacto no organismo do indivíduo, identificando o possível comprometimento da função da proteína pela perda da base citosina, sendo uma variação de natureza patogênica.

**Figura 1** - Parte do cromatograma do sequenciamento do gene *MKRN3* com as mutações encontradas no estudo



(A) Painel superior mostra o alelo selvagem e o inferior a mutação c.982 C>T em heterozigose. A citosina é representada pela letra C e onda azul e a timina pela letra T e onda vermelha; (B) Painel superior mostra o alelo selvagem, no qual se visualiza uma sequência de 7 citosinas, representadas pelas ondas azuis; o painel inferior mostra a perda de uma citosina (c.482delC), seguida de alteração na sequência de leitura, com sobreposição das ondas após o ponto da deleção.

**Figura 2:** Predição de mutação de paciente diagnosticada com PPC familiar. Captura de tela do programa *PolyPhen-2*



A mutação *missense* p.Arg328Cys localiza-se no anel de zinco C3HC4, responsável pela atividade de ubiquitina-ligase.

A ocorrência de PP em membros da mesma família foi descrita em estudo realizado com 156 indivíduos diagnosticados com PPC idiopática. Dentre eles, 43 indivíduos apresentaram relação familiar, evidenciando uma transmissão autossômica dominante com penetrância incompleta e dependente do sexo. Casos de herança paterna são mais frequente que a materna devido a especificidade da mutação (DE VRIES et al., 2004).

A mutação encontrada no par de pacientes apontadas com PPC familiar, foi descrita anteriormente em uma paciente francesa, acometida em um estudo realizado na França e na Itália com 46 indivíduos diagnosticados com PPC, no qual 24 desses casos tinham histórico familiar de Puberdade Precoce (SIMON *et al.*, 2015).

Além da mutação já citada, foi encontrada outra mutação em mais duas pacientes, (pacientes 3 e 4) estas, ambas do sexo feminino, não estão relacionadas, mas apresentaram uma mutação do tipo *frameshift*, com a mesma deleção de uma Citosina c.482.del.C/p.Pro.161.Arg.fs\*10. A paciente 3 foi atendida no Hospital Universitário de Brasília - HUB com sintomas de PP. Teve as primeiras manifestações aos 3 anos de idade com o desenvolvimento das mamas, e axilarca aos 5 anos de idade. Nessa idade possuía estatura de 1,27 metros, IO de 9 anos e 8 meses, pelos pubianos no estadiamento P1 e desenvolvimento das mamas no estadiamento M3 segundo a escala de Tanner (1962). A paciente apresentou cefaleia bilateral e Desenvolvimento Neuro Psico Motor (DNMP) normal.

A avaliação hormonal da paciente apontou uma dosagem basal de LH de 1,76 UI/L e FSH de 8,9 UI/L. Em ultrassom teve seu volume uterino mensurado em 7,7 cm<sup>3</sup> e ovariano com 2,39 cm<sup>3</sup>. A Ressonância Magnética - RM do crânio realizada na sela túrcica não apresentou nenhuma anomalia. A paciente não possui histórico de PP na família e sua mãe teve sua menarca aos 13 anos de idade. A deleção de citosina ocorreu na posição 438 do gene MKRN3, gerando uma mutação do tipo *frameshift*, no aminoácido 161, provocando um *stop códon* 10 pares de base a frente em uma arginina.

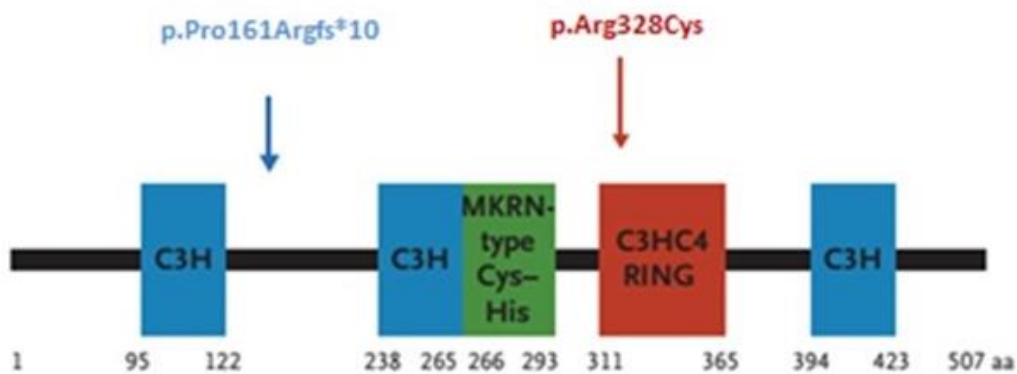
A paciente 4 foi atendida no ambulatório de Endocrinologia do Hospital da Criança de Brasília aos 6 anos e 2 meses com sinais de PP, como o desenvolvimento mamário desde os 5 anos de idade. Aos 7 anos e 7 meses de idade, apresentou estatura de 124,8 metros, peso de 30,1 Kg, IO avançada de 11 anos e 6 meses, e pelos pubianos no estadiamento P2 e as mamas no estadiamento M4 na escala de TANNER (1962). O Apêndice B demonstra os dados clínicos e moleculares das 4 pacientes que apresentaram mutação no gene MKRN3.

A mutação encontrada nas pacientes 3 e 4 ocorreu na posição 482 do gene MKRN3, gerando uma mutação do tipo *frameshift* no aminoácido 161, provocando um *stop códon* 10 pares de base a frente em uma arginina, em consequência de uma proteína truncada de 171 aminoácidos. A deleção foi descrita anteriormente em um estudo que investigou 215 pacientes diagnosticados com Puberdade Precoce Central

(MACEDO; ABREU; *et al.*, 2014). A mesma variante *frameshift* foi encontrada em uma garota búlgara em investigação do gene *MKRN3* (DIMITROVA-MLADENOVA *et al.*, 2016)

Os locus das mutações descritas estão sinalizados na figura 2, por meio de setas, indicando o local das alterações na sequência do gene *MKRN3*.

**Figura 2:** Representação esquemática da localização das mutações na proteína *MKRN3*. Figura adaptada de Abreu *et al.*, 2013



O *MKRN3* apresenta imprinting materno, ou seja, o alelo materno é metilado (silenciado) e somente o alelo de origem paterna é expresso. Desta forma, os indivíduos somente exibirão o fenótipo de PPC no caso de herança paterna do alelo mutado. Assim como a maioria dos imprinted genes descritos, o *MKRN3* localiza-se num cluster com outros imprinted genes no cromossomo 15.

O papel do gene *MKRN3* na patogênese da PPC ficou conhecido em 2013, após o estudo de pacientes com PPC familiar através do sequenciamento exômico global (ABREU *et al.*, 2013b). Atualmente as mutações com perda de função no *MKRN3* são consideradas a causa genética mais frequente de PPC idiopática, podendo ser identificadas tanto nos casos familiares quanto esporádicos.

A idade de início da puberdade dos pacientes estudados variou de 3 a 7 anos, com média de 5,25 anos e mediana de 5,5 anos. Os achados estão em contraste com o estudo realizado por Abreu *et al.*, (2013) com 40 indivíduos de 15 famílias brasileiras, apontando 15 pacientes com mutações no gene *MKRN3*, com idade média do início da puberdade precoce em meninas de 5,75 anos, variando de 5,0 a 6,5 anos. E em meninos foi de 8,1 anos, variando de 5,9 a 8,5 anos.

A dosagem do LH pós-estímulo não foi realizada em nenhum dos casos, visto que todas apresentavam concentrações basais púberes do LH. Todas apresentavam aumento do volume uterino à ecografia pélvica (mediana 12,4cm<sup>3</sup>) além de sinais de estimulação gonadotrófica ovariana ( volume ovariano > 2,0cm<sup>3</sup>).

A RNM do encéfalo foi realizada nas duas meninas com PPC esporádica e não evidenciou quaisquer anormalidades. As duas irmãs acometidas não foram submetidas à avaliação por imagem do SNC, pois não exibiam sinais ou sintomas neurológicos associados.

O tratamento foi realizado com o análogo do GnRH triptorrelina em todas. Duas meninas já concluíram o tratamento e outras duas ainda se encontram em uso da medicação, com boa resposta terapêutica até o momento.

Durante a realização das análises teve-se diversas contaminações seguidas, de causa desconhecida. Para solucionar a problemática, foi realizada a troca de materiais plásticos, ponteiros e tubos, e a submissão dos utensílios utilizados à autoclave. Porém em testes realizados após essa medida, os produtos de PCR ainda apresentaram amplificação, em banda forte, do controle negativo. Essas amostras tiveram todo o processo de PCR refeito até a sua reparação. E como última tentativa optou-se pela compra de novos primers por novo fabricante. Somente após a troca dos primers que as contaminações cessaram e pode-se seguir com as análises.

Outro fator de atraso dos estudos foi a demora na compra e entrega do material solicitado pela equipe. Alguns materiais não foram comprados e outros vieram diferentes do solicitado

## **Considerações finais**

Os achados com a realização deste estudo foram fundamentais para a casuística por estabelecem a relação fisiológica entre achados genéticos e os fenótipos de indivíduos portadores de PPC idiopática. As análises genéticas dos indivíduos coletados para o estudo foram importantes para ampliar o número de informações descritas na literatura sobre PPC.

Os dados obtidos sinalizaram a importância do aconselhamento genético dos pacientes da mesma família e a identificação de novos casos familiares, como apontados em estudos que evidenciam ocorrência de PPC familiar. A investigação genética de outros membros das famílias de pacientes diagnosticados é de suma importância para detectar a patogênese das mutações e potencializar o sucesso do tratamento.

Mesmo com o avanço dos estudos ainda não está claro se a PPC poderia ser resultado da perda da expressão do alelo paterno do *MKRN3* devido a algum dos mecanismos genéticos e/ou epigenéticos. Sua etiologia é desconhecida, em muitos casos, mesmo familiares, sugerindo que outros mecanismos, ou mesmo alterações em outros genes, possam estar envolvidos, sendo assim uma área de destaque para pesquisas.

## Referencias

- ABREU, Ana Paula *et al.* Central Precocious Puberty Caused by Mutations in the Imprinted Gene *MKRN3*. **New England Journal of Medicine** v. 368, n. 26, p. 2467–2475 , 27 jun. 2013a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23738509>>. Acesso em: 15 set. 2017.
- ABREU, Ana Paula *et al.* Central Precocious Puberty Caused by Mutations in the Imprinted Gene *MKRN3*. **New England Journal of Medicine** v. 368, n. 26, p. 2467–2475 , 27 jun. 2013b. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1302160>>. Acesso em: 13 set. 2017.
- ADZHUBEI, Ivan A *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nature Methods** v. 7, n. 4, p. 248–249 , abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20354512>>. Acesso em: 28 set. 2017.
- BESSA, Danielle S. *et al.* High Frequency of *MKRN3* Mutations in Male Central Precocious Puberty Previously Classified as Idiopathic. **Neuroendocrinology** v. 105, n. 1, p. 17–25 , 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27225315>>. Acesso em: 16 set. 2017.
- BRITO, V. N. *et al.* Diagnostic Value of Fluorometric Assays in the Evaluation of Precocious Puberty <sup>1</sup>. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 84, n. 10, p. 3539–3544 , out. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10522992>>. Acesso em: 16 set. 2017.
- BULCAO MACEDO, Delanie; NAHIME BRITO, Vinicius; LATRONICO, Ana Claudia. New Causes of Central Precocious Puberty: The Role of Genetic Factors. **Neuroendocrinology** v. 100, n. 1, p. 1–8 , 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25116033>>. Acesso em: 16 set. 2017.
- CAREL, Jean-Claude; LÉGER, Juliane. Precocious Puberty. **New England Journal of Medicine** v. 358, n. 22, p. 2366–2377 , 29 maio 2008. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMcp0800459>>. Acesso em: 28 set. 2017.
- CHEN, Yen-Chun *et al.* Association study of LIN28B in girls with precocious puberty. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism** v. 30, n. 6, p. 3063–6 , 24 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/jpem.2017.30.issue-6/jpem-2016-0101/jpem-2016-0101.xml>>. Acesso em: 16 set. 2017.
- CRINÒ, Antonino *et al.* Central precocious puberty and growth hormone deficiency in a boy with Prader-Willi syndrome. **European Journal of Pediatrics** v. 167, n. 12, p. 1455–1458 , 27 dez. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18301920>>. Acesso em: 16 set. 2017.
- DE ROUX, N. *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 100, n. 19, p. 10972–10976 , 16 set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944565>>. Acesso em: 17 set. 2017.
- DE VRIES, Liat *et al.* Familial Central Precocious Puberty Suggests Autosomal Dominant Inheritance. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 89, n. 4, p. 1794–1800 , abr. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2003-030361>>. Acesso em: 13 set. 2017.
- DIMITROVA-MLADENOVA, Mihaela S *et al.* Males with Paternally Inherited *MKRN3* Mutations May Be Asymptomatic. **The Journal of pediatrics** v. 179, p. 263–265 , 1 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27640350>>. Acesso em: 27 set. 2017.
- ERSOY, Betul *et al.* Central Precocious Puberty Secondary to Adrenocortical Adenoma in a Female Child: Case Report and Review of the Literature. **Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology** , 31 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28578183>>. Acesso em: 16 set. 2017.
- FUNES, Sandrine *et al.* The KiSS-1 receptor GPR54 is essential for the development of the murine reproductive system. **Biochemical and biophysical research communications** v. 312, n. 4, p. 1357–63 , 26 dez. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14652023>>. Acesso em: 17 set. 2017.



GAJDOS, Zofia K.Z. *et al.* Genetic determinants of pubertal timing in the general population. **Molecular and Cellular Endocrinology** v. 324, n. 1–2, p. 21–29, 5 ago. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20144687>>. Acesso em: 27 set. 2017.

GENE CODES CORPORATION. *Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software*. Ann Arbor, MI USA: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.genecodes.com>>. Acesso em: 28 set. 2017. , [S.d.]

IMPRODA, Nicola *et al.* Precocious puberty in Turner Syndrome: report of a case and review of the literature. **Italian Journal of Pediatrics** v. 38, n. 1, p. 54, 17 out. 2012. Disponível em: <<http://ijponline.biomedcentral.com/articles/10.1186/1824-7288-38-54>>. Acesso em: 27 set. 2017.

IOANNIDES, Yiannis *et al.* Temple syndrome: improving the recognition of an underdiagnosed chromosome 14 imprinting disorder: an analysis of 51 published cases. **Journal of Medical Genetics** v. 51, n. 8, p. 495, 16 jul. 2014. Disponível em: <<http://jmg.bmj.com/content/51/8/495.abstract>>.

KAGAMI, Masayo *et al.* Temple syndrome: comprehensive molecular and clinical findings in 32 Japanese patients. **Genetics in Medicine**, 22 jun. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28640239>>. Acesso em: 16 set. 2017.

KRSTEVSKA-KONSTANTINOVA, Marina *et al.* Mutational analysis of KISS1 and KISS1R in idiopathic central precocious puberty. **Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism** v. 27, n. 1–2, p. 199–201, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23950571>>. Acesso em: 16 set. 2017.

LEE, J H; WELCH, D R. Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after transfection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1. **Cancer research** v. 57, n. 12, p. 2384–7, 15 jun. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192814>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

LUDWIG, Natasha G. *et al.* A boy with Prader-Willi syndrome: unmasking precocious puberty during growth hormone replacement therapy. **Archives of Endocrinology and Metabolism** v. 60, n. 6, p. 596–600, dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27982202>>. Acesso em: 16 set. 2017.

MACEDO, Delanie B.; CUKIER, Priscilla; *et al.* Avanços na etiologia, no diagnóstico e no tratamento da puberdade precoce central. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia** v. 58, n. 2, p. 108–117, mar. 2014. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0004-27302014000200108&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-27302014000200108&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 28 set. 2017.

MACEDO, Delanie B.; ABREU, Ana Paula; *et al.* Central precocious puberty that appears to be sporadic caused by paternally inherited mutations in the imprinted gene makorin ring finger 3. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** v. 99, n. 6, p. E1097–E1103, jun. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2013-3126>>. Acesso em: 13 set. 2017.1945-7197 (Electronic)r0021-972X (Linking).

MELMED, Shlomo *et al.* **Williams textbook of endocrinology**. [S.l: s.n.], 2015. 1936 p. Disponível em: <<https://www.elsevier.com/books/williams-textbook-of-endocrinology/melmed/978-0-323-29738-7>>. Acesso em: 27 set. 2017. .9780323341578.

NEELY, E K *et al.* Normal ranges for immunochemiluminometric gonadotropin assays. **The Journal of pediatrics** v. 127, n. 1, p. 40–6, jul. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7608809>>. Acesso em: 16 set. 2017.

OH, Yeon Joung *et al.* Genetic Variations of the KISS1R Gene in Korean Girls with Central Precocious Puberty. **Journal of Korean medical science** v. 32, n. 1, p. 108–114, jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27914139>>. Acesso em: 24 ago. 2017.

ONG, Ken K *et al.* Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. **Nature Genetics** v. 41, n. 6, p. 729–733, 17 jun. 2009a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448623>>. Acesso em: 17 set. 2017.

ONG, Ken K *et al.* Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. **Nature Genetics** v. 41, n. 6, p. 729–733, 17 jun. 2009b. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.382>>. Acesso em: 13 set. 2017.

PARTSCH, Carl-Joachim; HEGER, Sabine; SIPPELL, Wolfgang G. Management and

outcome of central precocious puberty. **Clinical Endocrinology** v. 56, n. 2, p. 129–148 , 1 fev. 2002. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1046/j.0300-0664.2001.01490.x>>. Acesso em: 28 set. 2017.

PERRY, John Rb *et al.* Parent-of-origin-specific allelic associations among 106 genomic loci for age at menarche. **Nature** v. 514, n. 7520, p. 92–97 , 2 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25231870>>. Acesso em: 15 set. 2017.

PYLE, S Idell; GREULICH, William Walter. **Radiographic Atlas of Skeletal Development of the Hand and Wrist**. Stanford: Stanford University Press, 1959. 272 p. Disponível em: <<http://www.sup.org/books/title/?id=2696>>. .

RAMOS, Carolina O *et al.* Long-term Outcomes of Patients with Central Precocious Puberty due to Hypothalamic Hamartoma After GnRH Analog Treatment: Anthropometric, Metabolic and Reproductive Aspects. **Neuroendocrinology** n. 0 , 30 maio 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28558376>>. Acesso em: 16 set. 2017.

SEMINARA, Stephanie B. *et al.* The *GPR54* Gene as a Regulator of Puberty. **New England Journal of Medicine** v. 349, n. 17, p. 1614–1627 , 23 out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14573733>>. Acesso em: 17 set. 2017.

SHIMA, Hirohito *et al.* **NR0B1**; Frameshift Mutation in a Boy with Idiopathic Central Precocious Puberty. **Sexual Development** v. 10, n. 4, p. 205–209 , 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27648561>>. Acesso em: 17 set. 2017.

SILVEIRA, L. G. *et al.* Mutations of the *KISS1* Gene in Disorders of Puberty. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** v. 95, n. 5, p. 2276–2280 , maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20237166>>. Acesso em: 17 set. 2017.

SIMON, Dominique *et al.* Mutations in the Maternally Imprinted Gene *MKRN3* Are Common in Familial Central Precocious Puberty. **European Journal of Endocrinology** v. 174, n. 1, p. EJE-15-0488 , 1 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26431553>>. Acesso em: 16 set. 2017.

SULEM, Patrick *et al.* Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. **Nature Genetics** v. 41, n. 6, p. 734–738 , 17 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448622>>. Acesso em: 17 set. 2017.

WEST, Ande *et al.* Chromosome Localization and Genomic Structure of the *KiSS-1* Metastasis Suppressor Gene (*KISS1*). **Genomics** v. 54, n. 1, p. 145–148 , 15 nov. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9806840>>. Acesso em: 28 ago. 2017.

ZHANG, Jin *et al.* *LIN28* Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. **Cell Stem Cell** v. 19, n. 1, p. 66–80 , 7 jul. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27320042>>. Acesso em: 17 set. 2017.

## Anexos

### ANEXO A – Termo de aceitação de apoio financeiro



9872508749953646

#### TERMO DE ACEITAÇÃO DE APOIO FINANCEIRO A PROPOSTA DE NATUREZA CIENTÍFICA, TECNOLÓGICA E/OU DE INOVAÇÃO

Processo: 462346/2014-5

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

Instituição de Vínculo: Universidade de Brasília/UNB-DF

CNPJ: 00038174000143

Instituição de Execução: Universidade de Brasília

CNPJ: 00038174000143

Chamada: MCTI/CNPQ/Universal 14/2014 - Faixa A - até R\$ 30.000,00

Eu, Adriana Lofrano Alves Porto, 539.985.371-04, declaro conhecer, concordar e atender integralmente às exigências Nº CPF (ou PASSAPORTE, se estrangeiro) da Chamada acima especificada e às Condições Gerais para Apoio Financeiro que regem a concessão dos recursos especificados abaixo:

#### AUXÍLIO FINANCEIRO

**Custeio:** R\$ 30.000,00

**Valor Global:** R\$ 30.000,00

Tenho ciência:

- a) de que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura deste Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente; e
- b) das disposições legais e procedimentos para a adequada utilização de recursos financeiros e a correta prestação de contas (Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas).

#### 1. DA CONCESSÃO:

1.1. Ao aceitar o apoio financeiro, o BENEFICIÁRIO declara formalmente:

- a) dedicar-se às atividades pertinentes à proposta aprovada;
- b) observar o disposto nas Leis nº 8.666/93 e nº 10.973/04, nos Decretos nº 93.872/86 e nº 5.563/05 e na Lei nº 8.112/90, no que couber, bem como os demais instrumentos legais pertinentes;
- c) conhecer o Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre a instituição de execução do projeto/plano de trabalho e o CNPq, publicado no Diário Oficial da União;
- d) conhecer e cumprir as exigências da Chamada à qual a proposta está relacionada, como também as normas do CNPq, ora em validade, relativas à modalidade de apoio financeiro aprovado, ciente que a eventual mudança dessas normas não afeta, altera ou incide sobre o presente documento, exceto quando proposta pelo CNPq e formalmente aceita pelo BENEFICIÁRIO;
- e) possuir anuência formal da instituição de execução do projeto/plano de trabalho, seja sob a forma de vínculo empregatício ou funcional ou, na ausência deste, sob a forma de declaração de autoridade institucional competente, segundo modelo disponível na página do CNPq na Internet;
- f) dispor das autorizações legais cabíveis de instituições como Instituto Brasileiro de Meio Ambiente - IBAMA, Fundação do

Nacional do Índio - FUNAI, Comitê de Ética na Pesquisa - CEP, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, das Comissões de Ética em pesquisa com animais, Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN e outras, no caso em que a natureza do projeto, as exigir;

g) manter os documentos referidos nas alíneas "e" e "f" em seu poder até cinco anos após a aprovação final das contas do CNPq pelo Tribunal de Contas da União, não sendo necessária sua remessa ao CNPq;

h) ter ciência de que esta declaração é feita sob pena da incidência nos artigos [297-299 do Código Penal Brasileiro](#), sobre a falsificação de documento público e falsidade ideológica, respectivamente; e

i) estar ciente que o prazo para utilização dos recursos financeiros começa a vigorar a partir da data da assinatura do Termo de Aceitação, pelo período constante na Chamada correspondente, devendo ser aplicados exclusivamente para a proposta aprovada.

**1.2. O BENEFICIÁRIO compromete-se, ainda, a:**

a) responsabilizar-se pela adequada implementação e aplicação dos recursos financeiros aprovados, atendendo aos aspectos normativos definidos para a(s) modalidade(s) concedida(s), podendo estar previsto apenas recursos de capital e custeio, como também recursos para bolsas;

b) utilizar os recursos financeiros em acordo com os critérios e procedimentos estabelecidos no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas ;

c) assumir todas as obrigações legais decorrentes de contratações eventuais necessárias à consecução do objeto, não tendo tais contratações qualquer vínculo com o CNPq;

d) apresentar, nos prazos que lhe forem determinados, informações ou documentos referentes tanto ao desenvolvimento quanto à conclusão do projeto ou plano de trabalho aprovado;

e) se necessárias, propor alterações ao projeto/plano de trabalho, sujeitas à prévia análise e autorização do CNPq, e de entidade co-financiadora quando for o caso, desde que não se altere o objeto do projeto/plano de trabalho, e não implique remanejamento de despesas entre rubricas (capital para custeio e vice-versa);

f) permitir e facilitar ao CNPq o acesso aos locais de execução do projeto/plano de trabalho, o exame da documentação produzida e a vistoria dos bens adquiridos;

g) apresentar o relatório técnico final das atividades desenvolvidas em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas;

h) apresentar a prestação de contas financeira em até 60 (sessenta) dias após o término da vigência do projeto/plano de trabalho, em conformidade com o disposto no Manual de Utilização de Recursos Financeiros e Prestação de Contas, via Plataforma Carlos Chagas; e

i) se necessário, solicitar prorrogação de prazo de execução do projeto/plano de trabalho, via Plataforma Carlos Chagas, no prazo mínimo de 30 (trinta) dias antes do término da vigência.

**1.3. É vedado**

a) utilizar o recurso financeiro para fins distintos dos aprovados originalmente na proposta, sendo permitidas despesas exclusivamente com itens financiáveis estabelecidos nas normas de bolsas e auxílios individuais do CNPq, convênios e/ou Chamadas;

b) transferir a terceiros as obrigações assumidas sem prévia autorização do CNPq;

c) executar despesas em data anterior à vigência do benefício; e

d) efetuar pagamento em data posterior à vigência do benefício, salvo se expressamente autorizado pela autoridade competente do CNPq e desde que o fato gerador da despesa tenha ocorrido durante a vigência do Termo de Aceitação. Despesas realizadas fora do prazo de aplicação dos recursos serão glosadas.

## **2. DA GUARDA E DOAÇÃO DOS BENS**

**2.1. O BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto responderão pela manutenção do bem em perfeito estado de conservação e funcionamento.**

**2.2. Em caso de roubo, furto ou outro sinistro envolvendo o bem, o BENEFICIÁRIO ou a instituição de execução do projeto, após a adoção das medidas cabíveis, deverá comunicar imediatamente o fato ao CNPq, por escrito, juntamente com a justificativa e a prova de suas causas, anexando cópia autenticada da Ocorrência Policial, se for o caso.**

**2.3. É vedada a transferência dos bens para outro local ou estabelecimento, sem prévia e expressa autorização do CNPq.**

Todas as despesas decorrentes da transferência dos bens e os eventuais danos causados correrão por conta e risco do BENEFICIÁRIO e da instituição de execução do projeto.

**2.4.** A doação dos bens patrimoniais adquiridos com apoio financeiro do CNPq deverá ser efetuada conforme estabelecido em norma específica e com o disposto no Protocolo de Cooperação Técnica.

### **3. DA PROPRIEDADE INTELECTUAL / CRIAÇÃO PROTEGIDA**

Caso os resultados do projeto ou o relatório em si venham a ter valor comercial ou possam levar ao desenvolvimento de um produto ou método envolvendo o estabelecimento de uma patente, a troca de informações e a reserva dos direitos, em cada caso, dar-se-ão de acordo com o estabelecido na Lei de Inovação, nº 10.973, de 2 de dezembro de 2004, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005 e pela RN-013/2008.

### **4. DAS PUBLICAÇÕES E DIVULGAÇÃO**

**4.1.** Trabalhos publicados e sua divulgação, sob qualquer forma de comunicação ou por qualquer veículo, de resultados obtidos com recursos do projeto, deverão, obrigatoriamente, no idioma da divulgação, fazer menção expressa ao apoio recebido do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil, bem como mencionar quaisquer outras entidades/órgãos financiadores, especialmente aqueles que participaram no apoio do projeto em conjunto com o CNPq.

**4.2.** Material de divulgação de eventos, impressos em geral, publicações e a publicidade relativa a eles, de trabalhos e atividades apoiadas ou financiadas pelo CNPq, deverão trazer a logomarca deste em lugar visível, de fácil identificação em escala e tamanho proporcionais à área de leitura. Esclarecimentos a respeito e os padrões a observar devem ser objeto de consulta prévia junto à área de comunicação social do CNPq (comunicacao@cnpq.br).

**4.2.1.** Os mesmos materiais de divulgação de eventos, impressos em geral, publicações e a publicidade relativa a eles deverão trazer a logomarca de outras entidades/órgãos financiadores, em lugar visível, de fácil identificação, e em escala e tamanho proporcionais à área de leitura. (NR)

**4.3.** As ações publicitárias atinentes a propostas financiadas com recursos da União deverão observar rigorosamente as disposições contidas no § 1º do art. 37 da Constituição Federal, como também aquelas consignadas em Instrução Normativa da Secretaria de Comunicação de Governo e Gestão Estratégica da Presidência da República.

### **5. DA DESISTÊNCIA E SUSPENSÃO**

**5.1.** Quando o BENEFICIÁRIO desistir da execução do projeto/plano de trabalho, antes do seu início, os recursos serão devolvidos ao CNPq, com justificativa plausível da desistência, no prazo de 30 (trinta) dias de seu recebimento. A não observância desse prazo implicará a correção do valor originalmente concedido, na forma da legislação aplicável aos débitos da Fazenda Nacional.

**5.2.** O BENEFICIÁRIO deverá comunicar formalmente ao CNPq qualquer descontinuidade do plano de trabalho ou do projeto de pesquisa, acompanhada da devida justificativa. No prazo de 30 (trinta) dias da comunicação da descontinuidade, deverão ser apresentados o relatório técnico e a prestação de contas, como também deverá ser devolvido ao CNPq eventual saldo financeiro. A não observância desse prazo implicará a correção do valor originalmente concedido, na forma da legislação aplicável aos débitos da Fazenda Nacional.

**5.3.** A liberação dos recursos do apoio financeiro ao projeto/plano de trabalho, bem como de quaisquer outros benefícios aprovados pelo CNPq, será suspensa quando ocorrer uma das seguintes impropriedades, constatada, inclusive, por procedimentos de fiscalização realizados pelo CNPq, Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, Secretaria Federal de Controle Interno - SFCI ou Tribunal de Contas da União - TCU:

- a) não comprovação da utilização adequada da parcela anteriormente recebida, na forma da legislação pertinente, quando solicitada;
- b) verificação de desvio de finalidade na utilização dos recursos ou dos bens patrimoniais adquiridos no projeto;
- c) atrasos não justificados no cumprimento das etapas ou fases programadas no projeto/plano de trabalho; e
- d) quando for descumprida qualquer condição deste instrumento.

**5.3.1.** A suspensão dos benefícios persistirá até a correção da causa verificada.

**5.4.** O BENEFICIÁRIO, cuja prestação de contas e relatório técnico final do projeto/plano de trabalho, com vigência expirada não forem aprovados, será considerado inadimplente e terá suspenso o pagamento de projetos/planos de trabalho, vigentes, bem como a concessão de novas modalidades de apoio, sem prejuízo de outras medidas julgadas necessárias pelo CNPq e previstas na lei.

## 6. DAS DISPOSIÇÕES FINAIS

- 6.1. As presentes condições gerais referem-se a proposta a ser financiada com recursos do CNPq. Se financiada com recursos de outras fontes, poderão prevalecer disposições específicas constantes em Chamadas, Convênios e outros regulamentos pertinentes.
- 6.2. O Termo de Aceitação só será válido na vigência do Protocolo de Cooperação Técnica firmado entre o CNPq e a instituição de execução do projeto/plano de trabalho, indicada pelo proponente na solicitação.
- 6.3. O apoio financeiro aprovado pelo CNPq não gera vínculo de qualquer natureza ou relação de trabalho, constituindo doação com encargos feita ao BENEFICIÁRIO.
- 6.4. O pessoal envolvido na execução do projeto/plano de trabalho, não possuirá vínculo de qualquer natureza com o CNPq e deste não poderá demandar quaisquer pagamentos, sendo estes de inteira responsabilidade do BENEFICIÁRIO/instituição de execução do projeto/plano de trabalho, que o tiver empregado na sua execução.
- 6.4.1. Se eventualmente o CNPq for demandado pelo pessoal utilizado nos trabalhos, o BENEFICIÁRIO e a instituição de execução do projeto/plano de trabalho, o ressarcirão das despesas que em decorrência realizar, atualizadas monetariamente.
- 6.5. O processo somente será encerrado após as aprovações do relatório técnico final e da prestação de contas e desde que cumpridas todas as condições previstas neste instrumento e nas normas aplicáveis.
- 6.6. O descumprimento de qualquer condição constante deste instrumento e a inobservância de dispositivos legais aplicáveis implicará o encerramento imediato do apoio financeiro aprovado e obrigará o BENEFICIÁRIO a ressarcir integralmente o CNPq de todas as despesas realizadas, atualizadas nos termos da legislação, sem prejuízo da aplicação de penalidades cabíveis.
- 6.6.1. A recusa ou omissão do BENEFICIÁRIO, quanto ao ressarcimento de que trata este item, ensejará a consequente abertura de tomada de contas especial e a decorrente inscrição do BENEFICIÁRIO e do débito no Cadastro de Inadimplência Institucional - CADIN e do Tesouro Nacional.
- 6.7. O BENEFICIÁRIO reconhece que ao CNPq compete exercer a autoridade normativa de controle e fiscalização sobre a execução do projeto/plano de trabalho, bem como assumir ou transferir a responsabilidade pela mesma, no caso da paralisação ou de fato relevante que venha a ocorrer, de modo a evitar a descontinuidade das atividades.

## 7. ACEITE

Declaro ainda que li e aceitei integralmente os termos deste documento, comprometendo-me a cumpri-los fielmente, não podendo, em nenhuma hipótese, deles alegar desconhecimento.

*Termo de aceitação registrado eletronicamente por meio da internet junto ao CNPq, pelo agente receptor 10.0.2.19(srv255.cnpq.br), mediante uso de senha pessoal do Beneficiário em 02/12/2014, originário do número IP 200.130.33.73(200.130.33.73) e número de controle 2747831527478315:3776561161-2476978287.*

*Para visualizar este documento novamente ou o PDF assinado digitalmente, acesse: <http://efomento.cnpq.br/efomento/termo?numeroAcesso=9872508749953646>.*

## ANEXO B – Parecer consubstanciado CEP/FS - UNB.



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA  
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE  
BRÁSILIA - 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), é 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



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 a 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, disomia 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, leuprorrelina e triptorrelina, 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





(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



Continuação do Parecer: 1.140.089

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 faz parte da região estudada nesse kit. (SALSA MLPA ME 028 MRCHolland,Amsterdam, The Neatherlands).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 200.000SNPs 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 hipotálamico-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 E-mail: cephunb@gmail.com  
Telefone: (51)3107-1047



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.



Continuação do Parecer: 1.140.080

**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 documentação o modelo de Termo de Assentimento para participantes de pesquisa menores de 18 anos. **PENDÊNCIA ATENDIDA**
2. O TCLE deveria ser adequado ao item V, da Res. CNS 340/2004, quanto a:
  - 2.a) explicitação clara dos exames e testes que serão realizados, indicação dos genes/segmentos do DNA ou do RNA ou produtos genéticos que serão estudados e sua relação com eventual condição do participante da pesquisa. Ainda, segundo Carta Circular No 041/2015/CONEP/CNS/MS, se for o caso, o pesquisador poderá descrever os genes estudados de forma agrupada segundo funcionalidade ou efeito (exemplo: genes relacionados ao aparecimento do câncer, inflamação, morte celular, resposta ao tratamento, etc.), não sendo necessário listá-los individualmente; **PENDÊNCIA ATENDIDA**
  - 2.b) garantia de sigilo, privacidade e, quando for o caso, anonimato; **PENDÊNCIA ATENDIDA**
  - 2.c) plano de aconselhamento genético e acompanhamento clínico, com a indicação dos

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro  
Bairro: Asa Norte CEP: 70.510-900  
UF: DF Município: BRASÍLIA  
Telefone: (61) 3107-1047 E-mail: cepfsunb@gmail.com



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, subitem "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 e qual o papel do CEP, bem como a atualização de seus dados de



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



Continuação do Parecer: 1.140.089

contato: telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail [ceps@unb.br](mailto:ceps@unb.br) ou [cepsunb@gmail.com](mailto:cepsunb@gmail.com), horário de atendimento de 10:00hs as 12:00hs e de 13:30hs as 15:30hs, de segunda a sexta-feira, localizado na Faculdade de Ciências da Saúde, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, 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.

BRASÍLIA, 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: BRASÍLIA  
Telefone: (61)3107-1947 E-mail: [cepsunb@gmail.com](mailto:cepsunb@gmail.com)

## Apêndices

### APENDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE)

Página 1 de 3

#### **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

---

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante ou responsável legal

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

---

Rubrica do pesquisador

Rubrica do participante ou responsável legal



e-mail [cepfs@unb.br](mailto:cepfs@unb.br) ou [cepfsunb@gmail.com](mailto: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](mailto: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](mailto:cepfs@unb.br) ou [cepfsunb@gmail.com](mailto: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 \_\_\_\_\_

---

\_\_\_\_\_  
Rubrica do pesquisador  
Rubrica do participante ou responsável legal