DAIANE BENEDUZZI DE DEUS

**Estudo do gene do receptor de GnRH (*GNRHR*) no
hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
normósmico e atraso constitucional do crescimento
e desenvolvimento**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Programa de: Endocrinologia
Orientadora: Dra. Letícia Ferreira Gontijo Silveira

**São Paulo
2013**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Deus, Daiane Beneduzzi de

Estudo do gene do receptor de GnRH (*GNRHR*) no hipogonadismo
hipogonadotrófico isolado normósico e atraso constitucional do crescimento e
desenvolvimento / Daiane Beneduzzi de Deus. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Letícia Ferreira Gontijo Silveira.

Descritores: 1.Hipogonadismo 2.Hormônio liberador da gonadotropina
3.Receptores GnRH 4.Deficiências do desenvolvimento 5.Efeito fundador

USP/FM/DBD-375/13

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dedicatória

À minha família

Agradecimientos

A realização desse trabalho vai muito além de uma dissertação de mestrado, um título em ciências e dos conhecimentos teóricos que adquiri, essa foi também uma fase de aprendizado social, profissional e emocional. O amor pelas ciências que me impulsionou a entrar nesse desafio, me proporcionou experiências importantíssimas que fazem parte da construção de um capítulo no livro da minha vida e como nenhum livro é escrito sem a participação de importantes personagens esse não poderia ser diferente por isso faço meus agradecimentos:

À Dra. Leticia Ferreira Gontijo Silveira, pela honra de me acolher como sua primeira aluna. Agradeço-lhe pela atenção, carinho, apoio, ensinamentos e amizade. Sua orientação e presença foram marcas muito valiosas nesses anos de construção do nosso trabalho.

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico que há cinco anos, ao receber um email de uma aluna de graduação que sonhava em conhecer o mundo das ciências me deu essa oportunidade. Agradeço pela orientação desde a iniciação científica, pela confiança em meu trabalho e dedicação em me ensinar e assim lapidar uma pesquisadora.

À Profa. Dra. Berenice Mendonça, que me recebeu no laboratório de braços abertos e ao qual eu admiro por sempre estar disponível para proporcionar as melhores palavras e ótimos conselhos em todos os momentos.

Ao grupo da Dra. Ursula Kaiser da universidade de Harvard, Boston, EUA, pela colaboração nos estudos funcionais.

À instituição de fomento FAPESP (bolsa de mestrado processo: 2011/15530-0) pelo apoio financeiro durante a realização desse trabalho.

Às funcionárias e companheiras do dia a dia: Nilda, Fran, Cristina Rossi, Mariana Funari, Mirian, Andressa, Denise, Neide, Cidinha,

Rosangele, Cida e Rosana. Aos médicos e professores: Dr Ivo, Dra Ericka Trarbach, Dr. Vinicius, Dra. Sorahia, Dra. Elaine, Dra Tania, Dra. Larissa, Dra. Milena Teles, Dra. Candida, Dr. Madson, Dr Alex, Dra. Luciani, Dra. Regina. Agradeço pela dedicação e atenção de cada um nos momentos que precisei e de cada instante em que dividimos um café e um bom papo, cada uma me ensinou algo que levarei por toda vida.

Aos amigos que me proporcionaram não só a companhia como também, conselhos, risadas e ótimas lembranças: Acácio (pela "orientação" na bancada e amizade), Tathiana Silva, Fabiana, Ricardo Paranhos, Vivian Moura, Aline Zamboni, Tamaya de Castro, Renata, Milena, Delanie, Michele Moreira, Gisele Yuri, Luciana Montenegro e minha querida amiga Cintia Tusset.

E com uma importância inestimável agradeço à minha família aqueles ao qual eu sei que poderei contar em todos os momentos. Meus pais Rafael e Elizabeth pelo amor incondicional, apoio, carinho que me guiaram e me guiam sempre que necessário. Ao meu irmão e amigo Flavio, pelos sorrisos que consegue tirar do meu rosto apenas com sua presença. A minha irmã Juliana minha grande amiga que divide comigo seu lar, seu ombro e sua companhia essencial pra mim. Minha cunhada Shirley e meu avô Dionísio pelo carinho, torcida e nossos momentos juntos. E por fim a minha pequena sobrinha Mileni que no auge de seus 8 anos já conseguiu ensinar coisas que só a pureza de uma criança ensina.

Epígrafe

“O fato é...

*Cada um de nós é a soma dos momentos
que já tivemos e de todas as pessoas que já
conhecemos. E são esses momentos que se
tornam nossa história.”*

Normalização Adotada

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

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

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

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

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Características clínicas dos distúrbios puberais	3
1.1.1 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI)	3
1.1.2 Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD)	5
1.2 Causas genéticas dos distúrbios puberais	6
1.2.1 Receptor de GnRH: Estrutura gênica e proteica	8
1.2.2 Mutações no <i>GNRHR</i>	9
2 OBJETIVOS	13
3 PACIENTES E MÉTODOS	15
3.1 Casuística	16
3.2 Avaliação hormonal	19
3.3 Avaliação molecular	19
3.3.1 Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos	19
3.3.2 Amplificação de DNA genômico por reação em cadeia da polimerase (PCR)	20
3.3.3 Sequenciamento automático	22
3.3.5 Análise <i>in vitro</i> da mutação p.Y283H	23
3.3.5.1 Mutagênese sítio-dirigida	23
3.3.5.2 Estudos de sinalização: Ensaio de fosfato de inositol	23
3.3.5 Análise de microssatélites	25
4 RESULTADOS	27
4.1 Pesquisa de mutações e polimorfismos no gene <i>GNRHR</i>	28
4.1.1 Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento	28
4.1.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado	29

4.1.2.1	<i>Estudo funcional das variantes p.Y283H e p.V134G.....</i>	32
4.1.2.2	<i>Caracterização clínica e correção genótipo-fenótipo</i>	33
4.2	Análise de efeito fundador da mutação p.R139H	35
4.2.1	Análise dos microssatélites	35
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES.....	45
7	REFERÊNCIAS	47
8	APÊNDICE	58

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCD	Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento
cDNA	DNA complementar
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
FGF8	Fator 8 de crescimento de fibroblastos
FGFR1	Receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GNRHR</i>	Receptor de GnRH
KISS1R	Receptor acoplado a proteína G – 54 (receptor do KISS1)
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IO	Idade óssea
IP	Fosfato de inositol
kb	Kilobases
LH	Hormônio luteinizante
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
<i>NCBI</i>	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
Pb	Pares de base
<i>PCR</i>	Reação em cadeia da polimerase
PROK2	Procinecitina 2
PROKR2	Receptor 2 da procinecitina
RIE	Radioimunoensaio
TE	Tampão de Trisaminometano e EDTA

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Localização das mutações nos domínios intracelulares de *GNRHR*11
- Figura 2** - Representação esquemática da localização dos marcadores de microssatélites ao longo do cromossomo 4.....25
- Figura 3** - Eletroferograma apresentando uma sequência selvagem e uma sequência com a troca de uma adenina por uma guanina na posição 34228
- Figura 4** - Eletroferograma das mutações identificadas no *GNRHR*.....31
- Figura 5** - Produção de IP após estímulo com *GNRHR* em células transfectadas com o *GNRHR* selvagem ou com os mutantes p.Y283H e p.V134G33
- Figura 6** - Heredograma dos pacientes portadores da mutação p.R139H e um esquema com os haplotipos obtidos pela análise de microssatélites36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características das mutações previamente descritas no <i>GNRHR</i>	10
Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes analisados nesse estudo	18
Tabela 3 - Oligonucleotídeos usados para amplificação do gene <i>GNRHR</i>	21
Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados para amplificação dos <i>microsatélites</i>	26
Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes com HHI normósmico portadores de mutações no gene <i>GNRHR</i>	30
Tabela 6 - Haplótipos apresentados pelas famílias portadoras da mutação p.R139H	37

Resumo

Deus DB. *Estudo do gene do receptor de GnRH (GNRHR) no hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Mutações inativadoras do receptor de GnRH (*GNRHR*) são a causa genética mais frequente de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) normósmico. Os genes envolvidos da patogênese do HHI, incluindo o *GNRHR*, estão associados a um amplo espectro fenotípico, variando de HHI parcial a completo. O atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD) poderia constituir uma variante fenotípica leve do HHI. Neste estudo avaliamos a frequência de mutações no gene *GNRHR* em pacientes com HHI normósmico e ACCD, bem como correlacionamos o genótipo/fenótipo nesses pacientes. Além disso, avaliamos o efeito fundador de uma mutação do *GNRHR* (p.R139H) frequente na população brasileira com HHI normósmico. Para esse estudo, selecionamos 116 pacientes com HHI normósmico e 51 com ACCD. Um grupo de 130 indivíduos com desenvolvimento puberal normal foi utilizado como controle. A região codificadora do gene *GNRHR* foi amplificada por PCR e sequenciada. Análises *in silico* e *in vitro* foram realizadas nas duas novas variantes (p.V134G e p.Y283H). Três marcadores de *microsatélites* (D4S409, D4S2387, D4S3018) foram amplificados e analisados nos pacientes portadores da mutação p.R139H, familiares e controles. No grupo de HHI normósmico, nove mutações (p.N10K, p.Q11K, p.Q106R, p.R139H, p.C200Y, p.R262Q, p.Y284C, p.Y283H, p.V134G) foram identificadas em onze pacientes (9,5%). Entre as mutações identificadas no *GNRHR*, duas foram descritas pela primeira vez no estudo atual: p.Y283H e p.V134G, cuja análise *in vitro* demonstrou inativação completa do receptor. Em geral, uma boa correlação genótipo-fenótipo foi observada. Pacientes portadores de mutações inativadoras apresentavam HHI completo e mutações com perda parcial de função causavam HHI parcial, incluindo dois pacientes que evoluíram com reversão do hipogonadismo após reposição androgênica. Por outro lado, não houve diferença fenotípica entre os casos com e sem mutação do *GNRHR*. Análise de ancestralidade genética da mutação p.R139H demonstrou que todos os casos brasileiros apresentaram o mesmo haplótipo, sugerindo que a mutação p.R139H possui um ancestral comum na população brasileira. Por outro lado o caso familiar proveniente da Polônia apresentou apenas um marcador em comum com as famílias brasileiras e estudos mais abrangentes seriam necessários para determinar a origem da mutação p.R139H em indivíduos não Brasileiros. Na casuística de ACCD apenas a mutação p.Q106R foi identificada no gene *GNRHR* em heterozigose em um paciente. Em conclusão, o *GNRHR* foi o gene mais comumente afetado, apresentando uma boa correlação genótipo-fenótipo, e deve ser o primeiro candidato para análise genética em HHI normósmico. Os resultados sugerem que a mutação p.R139H possui um ancestral comum na população brasileira. Mutações no *GNRHR* parecem não estar envolvidas na patogênese do ACCD.

Descritores: 1. Hipogonadismo 2. Hormônio liberador da gonadotropina 3. Receptores GnRH 4. Deficiências do desenvolvimento 5. Efeito fundador

Abstract

Deus DB. *Study of GNRHR gene in isolated hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty*. [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2013.

GnRH receptor (*GNRHR*) inactivating mutations are the most common genetic cause of normosmic IHH. The genes involved in the IHH, including *GNRHR*, have been associated with a large phenotypic spectrum, varying from partial to complete IHH. Constitutional delay of growth and puberty (CDGP) might represent a mild phenotypic variant of IHH. In this study we investigated novel variants and characterized the frequency and phenotype-genotype correlation of *GNRHR* mutations in normosmic IHH and CDGP patients. Additionally, we determined the cause of the recurrence of *GNRHR* p.R139H mutation in patients with normosmic IHH. We studied 116 patients with normosmic IHH and 51 with CDGP. The control group was composed by 130 adults with normal pubertal development. The coding region of *GNRHR* was amplified and automatically sequenced. The two novel variants identified (p.Y283H, p.V134G) were submitted to *in silico* and *in vitro* analysis. Three microsatellite markers (D4S409, D4S2387, D4S3018) were amplified by PCR and analyzed in the patients with the p.R139H mutation. In the CDGP group, the previously described mutation p.Q106R was identified in the heterozygous state in one boy. The p.Q106R mutation has been identified in heterozygous state in individuals with normal pubertal development and does not appear to be involved in the CDGP phenotype in this patient. In the normosmic IHH group, nine variants were identified (p.N10K, p.Q11K, p.Q106R, p.R139H, p.C200Y, p.R262Q, p.Y284C, p.Y283H, p.V134G) in eleven patients (9.5%). *In vitro* analysis of the novel variants p.Y283H and the p.V134G demonstrated that both of them cause complete loss of function of the receptor. The founder effect study revealed that all the p.R139H affected Brazilian patients presented the same haplotype, suggesting that this mutation has a common ancestor in the Brazilian population. Nevertheless the affected Polish family presented a different haplotype, with only one marker in common with the Brazilian families and further studies would be necessary to determine the origin of the p.R139H mutation in the European population. In conclusion this study demonstrated that *GNRHR* was the most commonly affected gene in normosmic IHH, with a good genotype-phenotype correlation, and should be the first candidate gene for genetic screening in this condition. The results of the founder effect study suggested that the p.R139H mutation has a common ancestor in the Brazilian population. Finally, mutations in the *GNRHR* do not appear to be involved in the pathogenesis of CDGP.

Descriptors: 1. Hypogonadism 2. Gonadotropin-Releasing hormone 3. GnRH receptors 4. Developmental disabilities 5. Founder effect

1 Introdução

O desenvolvimento puberal normal é dependente da secreção e ação adequada do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido por neurônios especializados situados no hipotálamo ventromedial. O GnRH é secretado de forma pulsátil pelos neurônios hipotalâmicos e se liga ao seu receptor, *GNRHR*, na superfície dos gonadotrofos, estimulando a síntese e secreção das gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), as quais estimulam a esteroidogênese e a gametogênese nas gônadas, culminando com o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e aquisição da capacidade reprodutiva ⁽¹⁾.

Os neurônios secretores de GnRH são os únicos entre os neurônios hipotalâmicos que têm sua origem fora do sistema nervoso central. Esses neurônios são formados por células progenitoras do epitélio nasal na placa olfatória e migram em associação com os neurônios olfatórios até a placa crivosa ⁽²⁾. Na placa crivosa, as fibras olfatórias unem-se aos primórdios do bulbo olfatório, enquanto os neurônios secretores de GnRH atravessam essa estrutura até o hipotálamo. Finalmente, os neurônios secretores de GnRH projetam seus axônios para a eminência média hipotalâmica ⁽²⁾. A migração dos neurônios secretores de GnRH começa na sexta semana do desenvolvimento embrionário, sendo estes observados no hipotálamo fetal na décima semana. Por volta da décima quinta semana de gestação, esses neurônios já estão conectados ao

sistema porta-hipofisário, completando, assim, seu desenvolvimento e maturação ⁽³⁾. Em humanos, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é ativo durante o período neonatal, seguido por um período de relativa quiescência durante a infância. A reemergência dos pulsos secretores de GnRH ocorre no final da infância, desencadeando o desenvolvimento da puberdade ⁽¹⁾.

1.1 Características clínicas dos distúrbios puberais

1.1.1 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI)

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) congênito é caracterizado pela deficiência isolada de gonadotrofinas na ausência de lesões estruturais, com o restante da função hipofisária preservada. O HHI congênito é secundário a um defeito na produção ou secreção de GnRH ou pela resistência hipofisária à ação deste hormônio ⁽⁴⁾. O HHI associado a uma deficiência olfativa (anosmia ou hiposmia) caracteriza a síndrome de Kallmann, enquanto os casos com olfato normal são classificados como HHI normósmico ^(5, 6).

Clinicamente, o hipogonadismo é definido pela ausência parcial ou completa de desenvolvimento puberal após os 18 anos em meninos e 16 anos em meninas. O HHI é caracterizado por baixas concentrações de esteroides sexuais (testosterona ou estradiol) associados a valores baixos ou inapropriadamente normais de gonadotrofinas (LH e FSH). Os pacientes podem apresentar resposta ausente, parcial ou normal ao

estímulo agudo com GnRH, e a dosagem seriada de LH pode revelar ausência de pulsos ou a presença de pulsos endógenos de LH de baixa frequência e amplitude, demonstrando a variabilidade do grau de acometimento da deficiência de GnRH ^(7, 8). A secreção dos demais hormônios hipofisários encontra-se normal, bem como a ressonância magnética de região hipotalâmica-hipofisária, demonstrando a ausência de uma causa anatômica ⁽⁴⁾.

Tipicamente o HHI é diagnosticado durante a segunda ou terceira década de vida, quando os indivíduos afetados apresentam-se com retardo do desenvolvimento puberal, amenorréia primária ou infertilidade. O fenótipo pode variar de hipogonadismo parcial a completo e em alguns casos a suspeita diagnóstica pode ser aventada na infância, devido à presença de micropênis e criptorquidismo, principalmente na vigência de história familiar de hipogonadismo ^(5, 9). Os pacientes com HHI apresentam, em geral, estatura normal ou alta com proporções eunucoides devido ao atraso no fechamento das epífises ósseas, secundário à deficiência de esteroides sexuais, e consequentemente crescimento linear contínuo dos ossos longos ⁽¹⁰⁾. Ao exame físico, os pacientes do sexo masculino apresentam frequentemente testículos de tamanho reduzido para a idade, micropênis e escassez de pelos corporais. A ocorrência de micropênis e criptorquidismo sugere falência da ativação do eixo gonadotrófico na segunda metade da gestação e no período neonatal, quando ocorre maior crescimento peniano ⁽¹¹⁾. A pubarca pode ocorrer espontaneamente, porém costuma ter desenvolvimento parcial ou tardio. Ginecomastia não é frequente,

estando presente em cerca de 20% dos casos, porém sua incidência pode aumentar com o início da reposição de testosterona. As mulheres apresentam amenorreia primária, desenvolvimento mamário parcial ou ausente e a ultrassonografia pélvica revela volume uterino e ovariano reduzido para a idade ⁽¹⁰⁾. Em alguns casos de hipogonadismo parcial, pubarca e telarca espontâneas podem ser observadas em mulheres afetadas e algumas apresentam um ou dois episódios de menstruação, antes de evoluir para amenorreia definitiva ⁽¹²⁾.

1.1.2 Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD)

O atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento é considerado uma variação normal do desenvolvimento e ocorre quando indivíduos saudáveis entram espontaneamente na puberdade após os 13 anos para as meninas e após os 14 anos para os meninos ^(13, 14). Classicamente, os pacientes apresentam baixa estatura, atraso do desenvolvimento sexual e estirão de crescimento puberal tardio e atenuado ⁽¹³⁾. Os pacientes geralmente apresentam boa saúde e bom padrão nutricional, mas crescem mais lentamente desde a infância, apresentando altura e estadio puberal compatíveis com a idade óssea e o relato de atraso puberal em outros membros da família é comum ^(13, 15, 16).

ACCD é o principal diagnóstico diferencial do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito. A distinção entre as duas condições

pode ser difícil na prática clínica, pois em ambas as situações ocorre superposição de achados clínicos e laboratoriais ⁽¹⁷⁾. Apesar de alguns achados sugestivos de uma ou outra condição, apenas o seguimento clínico e laboratorial é capaz de confirmar o diagnóstico. A causa do ACCD é desconhecida, porém como essa condição é frequentemente identificada em membros de uma mesma família, um componente genético parece estar envolvido na sua etiologia ⁽¹⁸⁾.

1.2 Causas genéticas dos distúrbios puberais

Inúmeros genes envolvidos nos estágios do desenvolvimento e função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal foram descritos nas últimas décadas ^(19, 20). Estes genes codificam uma rede complexa de fatores de transcrição, proteínas de matriz, neurotransmissores, enzimas e receptores hormonais que apresentam ações fundamentais para a aquisição e manutenção de uma função reprodutiva normal ^(19, 20).

Atualmente cerca de 30% dos casos de HHI apresentam uma causa genética estabelecida e alguns genes já estão classicamente implicados na patogênese do HHI. Distúrbios na rota de migração dos neurônios secretores de GnRH e dos neurônios olfatórios formam a base clínico-patológica da síndrome de Kallmann. É notável que defeitos nos genes *FGFR1*, *FGF8*, *PROK2*, *PROKR2*, *CHD7* e *WDR11*, associados a defeitos na migração neuronal e assim conhecidos por causar a síndrome de Kallman, foram também associados ao HHI normósmico ^(10, 21-23). Os genes associados à secreção e ação de GnRH, tais como *GnRH*, *GNRHR*,

KISS1, *KISSR*, *TAC3*, *TAC3R*, estão implicados exclusivamente na patogênese de HHI normósmico ⁽²⁴⁾. Dentre esses, o gene *GNRHR* foi o primeiro a ser associado a essa condição e até hoje é considerado a causa genética mais comum de HHI normósmico.

No ACCD, estima-se que 50 a 75% dos pacientes apresentam história familiar de atraso puberal ⁽¹⁸⁾. Apesar de uma herança poligênica ser mais provável, causas monogênicas ou oligogênicas poderiam estar envolvidas com o fenótipo de ACCD em alguns casos. Embora variações genéticas sejam conhecidas por influenciar o espectro normal da idade do início da puberdade, nenhum gene específico foi associado com a patogênese molecular do ACCD. Dentre os estudos genéticos realizados até o momento nos indivíduos com ACCD, foram identificadas variantes em diferentes genes, tais como o receptor do secretagogo do hormônio de crescimento (*GHSR*) ⁽²⁵⁾, leptina (*L*) e receptor de Leptina (*LR*) ⁽²⁶⁾. Os genes *LIN28B*; *GPR54*; *TAC3* e *TAC3R* também foram analisados no ACCD, porém nenhuma alteração foi identificada ⁽²⁷⁻²⁹⁾.

Mutações nos genes relacionados ao HHI têm sido descritas em famílias com um amplo espectro fenotípico variando de atraso puberal a hipogonadismo completo. Dessa forma o ACCD poderia representar uma variante mais leve do HHI e defeitos no gene do *GNRHR*, levando a um prejuízo na estimulação normal das gonadotrofinas, poderiam contribuir para o fenótipo de ACCD ⁽³⁰⁾.

Vaaralahti *et al.* ⁽³⁰⁾ estudaram 146 pacientes com ACCD e identificaram uma nova deleção no gene *GNRHR* c.924_926delCTT

(p.F309del) em heterozigose em um paciente. Apesar de estar em heterozigose, essa nova variante estava ausente em 200 controles normais e segregou com o fenótipo de ACCD na família, tendo em vista que essa deleção estava presente também no pai e na irmã portadores do fenótipo e ausente no irmão e na mãe, ambos com desenvolvimento puberal normal ⁽³⁰⁾.

1.2.1 Receptor de GnRH: Estrutura gênica e proteica

O gene do receptor de GnRH (*GNRHR*) é composto por três exons que codificam uma proteína de 328 aminoácidos e se estende por uma região de 19 kb no cromossomo 4 (4q13) ⁽³¹⁾. Seu produto final é um receptor protéico expresso na superfície dos gonadotrofos. O *GNRHR* pertence à família de receptores acoplados à proteína G, formado por sete domínios transmembrana helicoidais, com um domínio amino-terminal extracelular, caracterizado pela ausência de um domínio citoplasmático carboxi-terminal intra-celular, presente em outros receptores dessa família. Além disso, o *GNRHR* exibe uma variante do motif DRY, uma tríade de aminoácidos altamente conservada na família de receptores acoplados à proteína G, localizado na junção do terceiro domínio transmembrana com a segunda alça intracelular ^(32, 33). Diferentemente da maioria dos receptores dessa família, o *GNRHR* possui uma serina (S) no lugar da tirosina (Y), substituindo o DRY por DRS ⁽³²⁾.

A ligação do GnRH ao seu receptor induz a ativação da cascata de sinalização intracelular, via ativação de fosfolipase C e produção trifosfato

de inositol, o que resulta na mobilização de Ca^{++} intracelular e liberação de LH e FSH ⁽³⁴⁾.

1.2.2 Mutações no *GNRHR*

Mutações inativadoras no gene *GNRHR* foram as primeiras causas genéticas identificadas de HHI normósmico ⁽³⁵⁾. Desde a primeira descrição em 1997 por de Roux *et al.* ⁽³⁵⁾ mais de 20 mutações diferentes, em homozigose ou heterozigose composta, foram identificadas em casos de HHI normósmico esporádico ou familiar, sempre com padrão de herança autossômica recessiva (**Tabela 1**) ^(36, 37). Mutações em heterozigose já foram identificadas, porém não podem ser consideradas causadoras de fenótipo ⁽³⁸⁾. Nunca foi observado qualquer fenótipo nos pais ou irmãos heterozigotos de pacientes portadores de HHI normósmico com mutações bialélicas do *GNRHR* ⁽³⁶⁾. Esta transmissão recessiva confirma o modelo genético observado em camundongos com ablação de *GNRHR* ⁽³⁹⁾.

Tabela 1 - Características das mutações previamente descritas no *GnRHR*

Mutação Nucleotídeo	Proteína	Exon	Domínio GPCR	Expressão	Sinal	Ligação	rs	Referência
c.2T>C	p. M1T	1	N-Terminal	ND	ND	ND	CM032256	Sykitis <i>et al.</i> (2010)
c.30T>A	p.N10K	1	N-Terminal	=	↓	↓	rs104893843	Costa <i>et al.</i> (2001)
c.31C>A	p.Gln11L	1	N-Terminal	↓	↓	↓	rs142842994	Meysing <i>et al.</i> (2004)
c.95C>T	p.T32I	1	N-Terminal	ND	↓	Ausente	CM015154	Beranova <i>et al.</i> (2001) Bédécarrats <i>et al.</i> (2003)
c.268G>A	p.Glu90L	1	DT 2	ND	Ausente	Ausente	rs104893844	Soderlund <i>et al.</i> (2001)
c.286C>T	p.P96S	1	DT 2	ND	ND	ND	TMP_ESP_4_68619768	Sykitis <i>et al.</i> (2010)
c.311C>T	p.T104I	1	AE 1	ND	ND	ND	CM062766	Antelli <i>et al.</i> (2006)
c.317A>G	p.Q106R	1	AE 1	ND	↓	↓	rs104893836	De roux <i>et al.</i> (1997) Costa <i>et al.</i> (2001)
c.323A>G	p.Y108C	1	AE 1	ND	ND	ND	CM062767	Antelli <i>et al.</i> (2006)
c.386C>A	p.A129D	1	DT 3	ND	Ausente	Ausente	rs104893838	Caron <i>et al.</i> (1999)
c.416G>A	p.R139H	1	DT 3	ND	Ausente	Ausente	rs104893842	Costa <i>et al.</i> (2001) Fichna <i>et al.</i> (2011)
c.415C>A	p.R139C	1	DT 3	↓	↓	↓	CM066865	Topaloglu <i>et al.</i> (2006)
c.436C>T	p.P146S	1	DT 4	ND	ND	ND	rs144900788	Sykitis <i>et al.</i> (2010)
c.504T>A	p.S168R	1	DT 4	=	Ausente	Ausente	rs104893840	Pralong <i>et al.</i> (1999)
c.511G>A	p.A171T	1	DT 5	=	Ausente	Ausente	rs74452731	Karges <i>et al.</i> (2003)
IVS1-1G>A	del.exon 2	2	DT 4	ND	Ausente	Ausente	CS021372	Silveira <i>et al.</i> (2002)
c.599G>A	p.C200Y	2	AE 2	=	Ausente	Ausente	CM015155	Beranova <i>et al.</i> (2001)
c.651C>A	p.S217R	2	AI 3	ND	Ausente	Ausente	rs104893839	De Roux <i>et al.</i> (1999)
c.785G>A	p.R262Q	3	AI 3	=	↓	↓	rs104893837	De roux <i>et al.</i> (1997) Caron <i>et al.</i> (1999)
c.796T>G	p.L266R	3	DT 6	=	Ausente	Ausente	rs148499544	Beranova <i>et al.</i> (2001) Bédécarrats <i>et al.</i> (2003)
c.836G>A	p.C279Y	3	DT 6	=	Ausente	Ausente	CM015157	Beranova <i>et al.</i> (2001) Bédécarrats <i>et al.</i> (2003)
c.851A>G	p.Y284C	3	DT 6	=	↓	↓	rs28933074	Leaños-Miranda <i>et al.</i> (2005)
c.959T>C	p.P320L	3	DT 7	ND	Ausente	Ausente	rs104893847	Meysing <i>et al.</i> (2004)

DT: domínio transmembrana; AE: alça extracelular; AI: alça intracelular; ND: estudos não descritos, =: inalterado, ↓ reduzido (adaptado de Sekoni *et al.*, 2011 (37))

Analisando a distribuição de mutações no *GNRHR* (**Figura 1**) em uma população heterogênea de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, Beranova *et al.* ⁽⁴⁰⁾ estabeleceram uma frequência de 40% de mutações neste gene entre pacientes com HHI normósico familiar e 16,7% entre os casos esporádicos. Em sua maioria, essas mutações impedem ou reduzem a formação do complexo hormônio-receptor e a combinação alélica dessas alterações pode estar associada ao amplo espectro fenotípico apresentado por pacientes com HHI ⁽⁴¹⁾. Esses pacientes exibem características que variam de hipogonadismo hipogonadotrófico completo com criptorquidismo e ausência de desenvolvimento puberal, a hipogonadismo parcial com desenvolvimento puberal incompleto ⁽⁴²⁾.

Figura 1 - Localização das mutações descritas no *GNRHR*. Caixas com preenchimento em branco: inativação parcial de *GNRHR*; Caixas com preenchimento em cinza: inativação completa de *GNRHR* ⁽⁴³⁾

Após a descrição de mutações no *GNRHR* em HHI normósmico, vários outros genes foram associados a essa doença, porém apenas 30% dos casos tem a causa genética identificada, e mutações no *GNRHR* ainda são consideradas as mais frequentes. Nesse estudo, nos analisamos a frequência e a correlação fenótipo e genótipo de mutações no *GNRHR* nos grupos de pacientes com HHI normósmico e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento. Uma análise de efeito fundador também foi realizada em uma mutação recorrente do *GNRHR*.

2 Objetivos

- 2.1- Avaliar a frequência de mutações no gene *GNRHR* em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento.
- 2.2- Correlacionar o genótipo-fenótipo nesses pacientes.
- 2.3- Avaliar o efeito fundador da mutação p.R139H do *GNRHR* em pacientes brasileiros com HHI normósmico.

3 Pacientes e Métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP/aprovação nº 755/05) e o consentimento informado formal foi concedido pelos pacientes ou responsáveis.

3.1 Casuística

Foram selecionados 116 pacientes não relacionados, portadores de HHI normósmino (74 homens e 42 mulheres), sendo 21 casos familiares. Adicionalmente, foram selecionados 51 pacientes com atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (42 meninos e 9 meninas). Os dados dos pacientes estudados estão resumidos na **Tabela 2.**

Os pacientes com diagnóstico de HHI são provenientes dos ambulatórios da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da USP - São Paulo (HCFMUSP), da Divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da USP-Ribeirão Preto (HCFMRP-USP), da Divisão de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da UNICAMP-Campinas, da Unidade de Endocrinologia e Laboratório de Farmacologia Molecular - HUB/FS/UnB e alguns casos isolados de outros locais do país.

Os critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico de HHI foram o desenvolvimento ausente ou incompleto de caracteres sexuais

secundários após os 16 anos nas meninas e 18 anos nos meninos, valores de esteróides sexuais abaixo do limite normal para a idade associado a concentrações inapropriadamente normais ou baixas de LH e FSH, basais ou após estímulo com GnRH. Os critérios de exclusão foram hipogonadismo hipergonadotrófico, presença de anosmia ou hiposmia nos testes olfatórios, evidência de deficiência hipofisária combinada, evidências de anormalidades na ressonância magnética do sistema nervoso central.

Os pacientes com diagnóstico de atraso constitucional do desenvolvimento puberal são provenientes do ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da USP - São Paulo (HCFMUSP). O atraso puberal foi caracterizado pela ausência dos caracteres sexuais secundários até os 13 anos nas meninas e 14 anos nos meninos, evoluindo posteriormente com o desenvolvimento puberal espontâneo completo.

As dosagens hormonais e o estudo molecular foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42 do HCFMUSP.

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes analisados nesse estudo

	Atraso Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento		Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado normósmico	
	Masculino	Feminino	Masculino	Feminino
Número de pacientes (%)	42 (82%)	9(18%)	74 (74%)	42 (26%)
Casos familiares (%)	12 (29%)	6 (67%)	13 (18%)	8 (19%)
Consanguinidade (%)	1 (2,4%)	0	6 (8%)	3 (7%)
Idade do diagnóstico*	14,2	12,2	24,4	23,2
Idade óssea*	12	10	15,5	13,5
Início da puberdade*	15,1	13,4	ND	ND
Escore-Z da altura*	-3,0	-3,2	-1,3	-0,7
LH (U/L) *	<0,6	<0,6	0,5	0,5
FSH (U/L) *	1,5	2,3	1,2	1,2
T (ng/dL)* / E2 (pg/mL) *	23	16,15	56,1	22,6
Início da puberdade (anos) *	15,1	13,4	ND	ND
Pelos pubianos (Tanner) *	1	1	3	4
Mamas (Tanner) *	ND	1	1	3
Testículos (cm)/ ovários (mL) *	ND	ND	1,9 x 1,7	1,8
Pênis (cm) *	ND	ND	4	ND
Criptorquidia (%)	0%	ND	21%	ND

*Mediana dos valores; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônios folículo estimulante; T: Testosterona; E2: Estradiol; ND: Valores não disponíveis nesse grupo de pacientes.

3.2 Avaliação hormonal

No período do estudo foram utilizados dois métodos de dosagens para as gonadotrofinas séricas (LH e FSH): o radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo (*Wallac, Turku, Finlândia*) até 1991 e, após essa data, o ensaio imunofluorométrico (IFMA) (*Perkin Elmer, Wallac, Finlândia*). O coeficiente de variação foi inferior a 5% para todos os ensaios. Para estudo de Testosterona (T) e Estradiol (E2) foi utilizado o método de Fluoroimunoensaio (FIA) (kits AutoDELFIA, *Perkin Elmer*).

3.3 – Avaliação Molecular

3.3.1 - Extração do DNA genômico de leucócitos periféricos

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos eriféricos pela técnica de *salting out* ⁽⁴⁴⁾. Uma amostra de 15 mL de sangue venoso foi coletado em tubos com ácido etileno diaminoacético (EDTA), de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da USP, São Paulo.

O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se um volume de solução de lise (NH_4Cl a 114nM, NH_4HCO_3 a 1nm) duas vezes maior que o volume de sangue, incubado a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 4.000 g, sendo desprezado o sobrenadante. O procedimento

da lise de glóbulos vermelhos foi repetido uma vez. O botão de células brancas foi suspenso em 9ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCL 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 10mM pH 8,0) com 180 µL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 µL de proteinase K na concentração de 10mg/mL (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), e incubado a 37°C por 18 horas. Após este período, foi adicionado 3,6 mL de solução saturada de NaCl a 6 M, seguido de agitação vigorosa durante 15 segundos e centrifugação por 15 minutos a 4.000 g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e o DNA foi precipitado acrescentando-se dois volumes de etanol absoluto gelado, homogeizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo. Em seguida, lavado em etanol a 70% durante 5 minutos, repetindo-se a operação por mais três vezes. Finalmente, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seguido de secagem por centrifugação a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após o procedimento, o DNA foi ressuspenso em tampão TE a 10:0,1 (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0).

3.3.2 Amplificação do gene GNRHR por reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA genômico obtido foi utilizado como substrato para a amplificação dos três exons do *GNRHR* (número de acesso NM_000406.2) por reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de oligonucleotídeos intrônicos específicos (**Tabela 3**). Os oligonucleotídeos

específicos foram desenhados utilizando-se o software Primer3 (http://fokker.wi.mit.edu/primer3/primer3_code.html).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos usados para amplificação do gene *GNRHR*

Região	Oligonucleotídeo 5'→3'	Tamanho do Fragmento	Temperatura do Anelamento
Exon1	F - CACAAGGCTTGAAGCTCTGTCC R - AGACCTTATATCAAATTTAGATAGGA	626pb	56°C
Exon2	F- CTAGCAGAGTACCAAAGAGAAACTT R- AAAGTGGCCACAAATGACACT	336pb	56°C
Exon3	F- CACCTCGTCTTTTCTCTATCCAACA R - ACATTTGTGTTAATCATTCCCAGA	350pb	56°C

As reações foram realizadas em um volume final de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,25 U de enzima Taq polimerase (*Amersham Pharmacia, Upsala, Suécia*) e tampão da reação fornecido pelo fabricante contendo 1,5 mM de MgCl₂. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (*Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA*) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento variando de 55 a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com 0,8 µg/mL de SYBR safe DNA Gel Stain (*Life Technologies Corporation,*

Carlsbad, CA, EUA) e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

3.3.3 Sequenciamento automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada a partir da comparação da intensidade de sinal emitido pelos fragmentos de um marcador de peso molecular de concentração conhecida em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática, utilizando-se o produto comercial EXO-SAP contendo as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* e *exonuclease I* (*Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA*). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o produto comercial *ABI Prism™ BigDye Terminator* (*Perkin Elmer, Foster City, CA, EUA*). Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer* (*Perkin Elmer, Foster City, CA*).

As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information (NCBI)*, utilizando-se o software *Sequencher4.7* (http://bip.weizmann.ac.il/toolbox/target/dna/Sequencher_4.7_PC_User_Manual.pdf).

3.3.4 Análise in vitro das mutações p.V134G e p.Y283H

Os estudos funcionais foram desenvolvidos em colaboração com a Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Hipertensão do Brigham and Women's Hospital, da Harvard Medical School, Boston, EUA.

3.3.4.1 Mutagênese sítio-dirigida

As mutações p.V134G e p.Y283H foram geradas no vetor pcDNA3 contendo o *GNRHR* humano por mutagênese sítio dirigida utilizando-se o produto comercial QuikChange Site-Directed. Mutagenesis Kit (*Agilent Technologies, Wilmington, DE*). As mutações foram confirmadas por sequenciamento direto (*Dana-Farber/Harvard Cancer Center Sequencing Facility, Boston, MA*).

3.3.4.2 Estudos de sinalização: Ensaio de fosfato de inositol

Células de rim de macacos verdes africanos (COS-7) foram mantidas em cultura com meio DMEM (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*), suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos penicilina (100 U/ml) e de estreptomicina (100 mg/ml) em placas de 6 poços e incubadas a 37° C, em ar umidificado com 5% de CO₂. As células foram transfectadas transitoriamente em placas de 6 poços com o *GNRHR* selvagem, *GNRHR* mutantes (p.Y283H ou p.V134G) ou vetor vazio (pcDNA3) como controle negativo, utilizando-se o produto comercial *GenePorter Transfection Reagent* (*Gelantis, San Diego, CA*). Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultura foi substituído por

DMEM sem inositol, as células foram incubadas a 37°C por duas horas e em seguida, 2 µCi/ml de mioinositol marcado com trício (myo-[2-3]-inositol) (*Perkin Elmer, Waltham, MA*) foi adicionado às células, seguido de 10 mM de cloreto de lítio após 15 minutos. Após incubação por 12 a 18 horas, a produção de IP foi estimulada através da adição de concentrações crescentes de GnRH (10^{-10} a 10^{-7} M) por uma hora. As células foram extraídas com ácido fórmico, os lisados foram neutralizados para pH 7,5 com 300 µl de 7.5mM HEPES contendo 150 mM KOH, centrifugados e tiveram seu conteúdo protéico quantificado. O sobrenadante de cada poço foi carregado em colunas de resina para troca de ânions AG 1-X8 (*Bio-Rad, Hercules, CA*). As colunas foram lavadas quatro vezes e o inositol total foi eluído. Líquido de cintilação foi adicionado ao eluato. O acúmulo de inositol total radioativo foi medido um contador beta (*Beckman, Danvers, MA*), e corrigido pelo conteúdo de proteínas totais das células. O ensaio foi realizado com amostras em triplicata, e cada experimento foi repetido pelo menos três vezes. Os ensaios de sinalização foram analisados pelo teste de ANOVA bidirecional, seguido do teste de Bonferroni para análise comparativa. A concentração efetiva média (EC₅₀) e o valor máximo de estímulo para as curvas de dose resposta foram calculados com o programa *GraphPad Prism* (*San Diego, CA, EUA*). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.3.5 Análise de microssatélites

O estudo consistiu na análise de três marcadores de microssatélites: D4S409, D4S2387 e D4S3018. Esses marcadores selecionados estão localizados ao longo do cromossomo 4. A posição e distância em relação ao gene *GNRHR* estão representadas na **Figura 2**.

Figura 2 - Representação esquemática da localização dos marcadores de microssatélites ao longo do cromossomo 4. * representa a distância do marcador em relação ao gene *GNRHR*

O DNA genômico dos pacientes e de seus familiares com material genético disponível foi amplificado utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada marcador (**Tabela 4**). Para determinar a frequência dos haplótipos na população brasileira 45 controles com desenvolvimento puberal normal foram analisados. Todos os oligonucleotídeos diretos

foram marcados com um isômero de carboxifluoresceína (FAM) em suas extremidades 5'. As reações foram realizadas em um volume total de 25 µL, utilizando-se de 100 a 300 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP), 15 pmol de cada oligonucleotídeo, tampão da reação (KCl 50 mM; MgCl₂ 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 9,0) e 1 unidade da enzima "Taq" DNA polimerase (5 U/µL) (*Promega Corporation, WI, EUA*).

O protocolo básico de amplificação consistiu em uma temperatura inicial de 94°C durante cinco minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C, temperatura de hibridação variável de acordo com os oligos (**Tabela 4**) e 72°C durante 30 segundos para cada temperatura, mais um ciclo final de extensão a 72°C por 30 minutos, realizado em um termociclador (*9700, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*).

Tabela 4 - Oligonucleotídeos usados na amplificação dos microssatélites

Marcadores	Oligonucleotídeo 5'→3'	Tamanho do Fragmento	Temperatura de Anelamento
D4S409	F - CTTGCCGTCAGACTCAAAC R - CAACCTTTCAATGTTAGGGC	275 – 305 pb	55°C
D4S3018	F - GCTTTCAATACCAGCAGGG R - ATGCCGAGGTGTTCCA	187 – 227 pb	55°C
D4S2387	F - GAACATCACACACCAGGGTT R - CTGACCTGGTTCCATTCCT	257 – 266 pb	55°C

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese capilar no sequenciador automático *ABI Prism 310 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) e analisadas pelo programa *GeneScan* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*).

4 Resultados

4.1 Pesquisa de mutações e polimorfismos no gene *GNRHR*

4.1.1 *Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento*

Dentre os 51 casos com ACCD estudados, identificamos a variante p.Q106R (**Figura 3**) em heterozigose em um paciente do sexo masculino, que foi avaliado aos 14 anos de idade com quadro de baixa estatura e atraso no desenvolvimento puberal. O paciente, filho de pais não consanguíneos, não apresentava casos semelhantes na família. Ao exame físico, apresentava estatura de 137,3 cm (Z -2,8), peso de 33,2 kg (IMC 17,6; Z -0,7), proporções corporais normais e estadio puberal Tanner 2. A idade óssea era de 12,6 anos. A avaliação laboratorial mostrou LH: 0,8 U/L, FSH: 1,4 U/L, testosterona: 68 ng/dL, IGF1 e IGFBP-3 normais e pico de GH no teste de estímulo: 8,3 mcg/L. O paciente não foi tratado e altura adulta foi de 161,5 cm (estatura alvo 172,5 cm). O DNA dos pais não estava disponível para estudo de segregação familiar.

Figura 3 - Eletroferograma mostrando a troca de uma adenina por uma guanina no nucleotídeo 342 em heterozigose, em comparação com uma sequência selvagem

4.1.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico

Entre os 116 pacientes portadores de HHI normósmico analisados, foram identificadas nove variantes raras no gene *GNRHR* (p.N10K, p.Q11K, p.Q106R, p.R139H, p.C200Y, p.R262Q, p.Y283H, p.V134G, p.Y284C) em onze pacientes com HHI normósmico (9,5%). (**Tabela 5**). As variantes p.[N10K+Q11K], p.Q106R, p.R139H, p.C200Y, p.R262Q, p.Y284C foram previamente descritas e caracterizadas funcionalmente *in vitro* (40, 45, 46). As mutações p.R139H, p.C200Y e p.Y284C causam perda total de função do receptor, enquanto as mutações [p.N10K;p.Q11K], p.Q106R e p.R262Q são parcialmente inativadoras (35, 46, 47). As variantes p.Y283H, p.V134G foram descritas nesse estudo (**Figura 4**) e estavam ausentes no grupo controle. Todas as mutações identificadas se apresentavam em homozigose ou heterozigose composta (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Dados clínicos dos pacientes com HHI normósmico portadores de mutações no gene *GNRHR*

	Sexo	Idade	Fenótipo	HF	Mamas (Tanner)	Testículos (cm)	Ovários (ml)	Pênis (cm)	LH (U/L)	FSH (U/L)	T (ng/dl)	E2 (pg/ml)	Método	Mutação
1	F	18	HHI Completo	+	I	-	3	-	3.6*	2.6	-	11	RIA	p.[R139;R139H]
2	M	19	HHI Completo	+	I	1,0x1,0	-	4,0x1,0	<0.6	<1	33	-	IFMA	p.[R139;R139H]
3	M	38	HHI Completo	+	I	1,0x0,5	-	7,5x1,5	0.3	-	30	-	IFMA	p.[R139; R139H]
4	M	18	HHI Parcial Reversão	-	I	1,5x0,9	-	3,5x1,5	0.9	2.6	30	-	IFMA	p.[R139H]; [Q106R]
5	F	16	HHI Completo	+	I	-	1.5	-	<0.6	<1	-	<13	IFMA	p.[C200Y; C200Y]
6	F	19	HHI Parcial	+	III	-	1,3 x1,0	-	9	8.5	-	<50	RIA	p.[N10K;Q11K]; [Q106R]
7	M	16	HHI Completo	-	I	1,5x1,0	-	7,0x2,0	0.17	0.7	20	-	IFMA	p.[N10K;Q11K]; [Y283H]
8	M	17	HHI Parcial	-	III	2,6x1,5	-	8,0x2,0	2,5	<1	58	-	IFMA	p.[V134G]; [R262Q]
9	M	17	HHI Completo	-	I	1,5x1,0	-	5,0	0,3	0.7	110	-	IFMA	p.[V134G]; [Q106R]
10	M	26	HHI Parcial Reversão	+	I	2,8x1,6	-	4,0	0,95	1,86	-	-	IFMA	p.[Q106R;Q106R]
11	M	18	HHI Completo	+	I	2,0x1,5	-	10x2,7	-	-	-	-	IFMA	p.[Y284C;Y284C]

F: feminino; M: masculino; HF: História Familiar; (+) familiar; (-) esporádico; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônios folículo estimulante; T: testosterona; E2: estradiol; RIA: Radioimunoensaio; IFMA: imunofluorescencia; ND: não disponível

Figura 4 - Eletroferograma das mutações identificadas no *GNRHR*

4.1.2.1 Estudo funcional *in vitro* das variantes p.V134G e p.Y283H

As novas variantes p.V134G e p.Y283H afetam resíduos bem conservados entre as espécies e análise *in silico* sugeriu que ambas são mutações deletérias. A variante p.V134G está descrita no banco de dados do *1000 Genome Project* em apenas um indivíduo, porém sem dados sobre o fenótipo do carreador. A variante p.Y283H não está descrita em bancos de dados.

Baseado nesses dados, estudo funcional *in vitro* foi realizado com a finalidade de avaliar a capacidade de sinalização intracelular do receptor de GnRH com as mutações p.V134G e p.Y283H. Células COS-7 transfectadas com o receptor selvagem ou mutante (p.V134G ou p.Y283H) foram estimuladas com concentrações crescentes (10^{-10} - 10^{-7} M) de GnRH e o acúmulo do segundo mensageiro (IP) foi mensurado. O receptor selvagem respondeu ao estímulo com GnRH de maneira dose dependente com um EC50 de 0,75 nM.

Os receptores contendo as mutações p.Y283H e p.V134G não foram capazes de induzir nenhum aumento na produção de IP, indicando que essas mutações levam à perda total de função do receptor (**Figura 5**).

Figura 5 - Produção de IP após estímulo com *GnRHR* em células transfectadas com o *GnRHR* selvagem ou com os mutantes p.V134G e p.Y283H. Os pontos da curva representam a média $\pm$ erro padrão das amostras em triplicata, representados como porcentagem da resposta máxima. *, $P < 0.05$, ***, $P < 0.001$ do *GnRHR* selvagem em comparação com *GnRHR* Y283H e V134G. Os resultados são uma representação de três experimentos independentes

4.1.2.2 Caracterização clínica e correlação genótipo-fenótipo

O espectro fenotípico de todos os pacientes incluídos no estudo, com ou sem mutações, variou de HHI completo até hipogonadismo parcial e/ou reversível. A idade média de diagnóstico foi de 21,5 anos. Puberdade espontânea parcial foi observada em 51% dos pacientes afetados. Entre as mulheres, 34% tiveram telarca espontânea, porém todas apresentavam útero hipoplásico (< 30 mL) e ovários reduzidos

(<3 mL) para a idade. Criptorquidismo uni ou bilateral estava presente em 23% dos casos dos pacientes portadores de HHI normósmico do sexo masculino e todos apresentavam micropênis (pênis: 5,7 +/- 1,9 cm (DP - 5,4 +/- 1,2)). Os pacientes com HHI normósmico portadores de mutações no *GNRHR* não apresentavam nenhuma característica clínica que os diferenciasse dos pacientes sem mutações ou com mutações em outros genes.

De um modo geral, os pacientes com mutações no *GNRHR* apresentaram uma boa correlação genótipo-fenótipo (**Tabela 5**). As mutações p.R139H, p.C200Y e p.Y284C causam perda total de função do receptor *in vitro*, como demonstrado em estudos anteriores ^(40, 45, 48). Todos os indivíduos homozigotos para essas variantes tinham um fenótipo de HHI normósmico completo. Estudos funcionais das novas variantes p.Y283H e p.V134G demonstraram que ambas causam inativação completa do receptor. Nos casos de mutações com inativação completa identificadas em heterozigose compostas com mutações parcialmente inativadoras (p.Q106R e p.R262Q e p.[N10K; Q11K]) a gravidade do fenótipo variou de HHI parcial com reversibilidade espontânea do hipogonadismo até HHI completo. Dentre esses, se destaca o paciente do sexo masculino portador das mutações p.R139H e p.Q106R em heterozigose composta que evoluiu com aumento do volume testicular durante a reposição de testosterona e apresentou reversão do hipogonadismo após interrupção do tratamento. Por outro lado, nenhum dos pacientes portadores apenas de mutações parcialmente inativadoras apresentou HHI completo. As mutações p.[N10K; Q11K] e p.Q106R,

parcialmente inativadoras, foram identificadas em heterozigose composta em duas irmãs e dois irmãos com HHI parcial e o paciente portador da mutação p.Q106R em homozigose apresentou HHI parcial com reversibilidade ^(35, 46).

4.2 Análise do efeito fundador da mutação p.R139H

4.2.1 Análise de microssatélites

Os três marcadores de microssatélites (D4S409, D4S2387, D4S3018) foram analisados nos seis casos de HHI normósmico carreadores da mutação p.R139H pertencentes a quatro famílias, e nos familiares com DNA disponível para estudo. Além disso, uma família consanguínea, proveniente da Polônia, com dois irmãos afetados portadores da mutação p.R139H em homozigose foi incluída no estudo (**Figura 6**).

Todos os casos brasileiros carreadores da mutação p.R139H apresentaram o mesmo haplótipo (294,259,216). No grupo controle esse mesmo haplótipo foi identificado em apenas 4% dos casos. Por outro lado o caso familiar proveniente da Polônia apresentou um haplótipo diferente (278,256,216) (**Tabela 6**).

Figura 6 - Heredograma dos pacientes portadores da mutação p.R139H e um esquema com os haplotipos obtidos pela análise de microssatélites. Heredogramas A, B, C e D: famílias brasileiras, heredograma E: família polonesa

Tabela 6 - Haplótipos apresentados pelas famílias portadoras da mutação p.R139H

País	Brasil	Brasil	Brasil	Brasil	Polônia
Família	Família A	Família B	Família C	Família D	Família E
Genótipo	R139H/R139H	R139H / +	R139H/R139H	R139H/R139H	R139H/R139H
D4S409	294 / 294	294 / 294	294 / 294	294 / 294	278 / 278
D4S2387	259 / 259	259 / 262	259 / 259	259 / 259	256 / 278
D4S3018	216 / 216	216 / 202	216 / 216	216 / 216	216 / 216

* Frequência do haplótipo formado pelo conjunto dos 3 marcadores estudados (294/259/216).

5 Discussão

Os genes envolvidos na patogênese do HHI, incluindo o *GNRHR*, estão associados a um amplo espectro fenotípico, variando desde HHI completo até quadros mais leves, como hipogonadismo parcial e reversível, atraso puberal e amenorreia hipotalâmica ^(30, 49).

Na hipótese de que o ACCD poderia representar uma variante mais leve do HHI, pesquisamos defeitos no *GNRHR* nesse grupo de pacientes. Identificamos a variante p.Q106R em heterozigose em um menino com ACCD. Esta é uma das mutações mais comuns do *GNRHR*, parcialmente inativadora, descrita em homozigose ou heterozigose composta em casos de HHI normósmico e em heterozigose em familiares não afetados ⁽³⁵⁾. Vaaralahti *et al.* in 2011 ⁽³⁰⁾ estudaram 146 indivíduos com ACCD e também identificaram a mutação p.Q106R em heterozigose em uma paciente afetada. Somando as duas casuísticas, a variante p.Q106R foi identificada com a mesma frequência em afetados (1/146 dos pacientes com ACCD no estudo de Vaaralahti *et al.* e 1/50 pacientes com ACCD no presente estudo (1%)) e controles (2/200 no estudo de Vaaralahti *et al.* (1%)). Considerando esses resultados, é improvável que essa variante esteja envolvida com o fenótipo de ACCD.

No grupo de HHI normósmico, mutações no *GNRHR* foram identificadas em 10,4% de todos os indivíduos afetados. Considerando apenas os casos familiares essa frequência subiu para 33%. Outros genes associados ao fenótipo de HHI, incluindo *TAC3*, *TACR3*, *KISS1*, *KISS1R*, *GNRHR1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, foram estudados nesse grupo de

pacientes, entretanto mutações em outros genes estavam presentes em 17,4% de todos os casos. Sendo assim, individualmente o *GNRHR* é o gene mais afetado na população estudada, o que está em acordo com a literatura ^(36, 40). Em um levantamento realizado recentemente por de Roux *et al.* mutações no *GNRHR* foram responsáveis por 40% dos casos familiares com padrão de herança autossômico recessivo ⁽³⁶⁾.

Nesse estudo foram identificadas nove mutações no gene *GNRHR* em onze pacientes portadores de HHI normósmico, duas delas descritas pela primeira vez: p.Y283H e p.V134G. As mutações p.R139H e [p.N10K;p.Q11K] foram descritas anteriormente pelo nosso grupo e as mutações p.C200Y, p.Q106R, p.Y284C e p.R262Q foram previamente descritas na literatura e posteriormente também identificadas na nossa casuística ^(35, 40, 45).

As mutações p.Y284C e p.C200Y foram identificadas em estudos anteriores em heterozigose composta com outras mutações ⁽⁴⁰⁾. Estudos funcionais demonstraram que ambas levam a perda total de função do receptor de GnRH ^(40, 48, 50). No nosso estudo as mutações p.C200Y e p.Y284C foram identificadas em homozigose em casos familiares com HHI normósmico completo. Esses dados reforçam o papel deletério de ambas as mutações e demonstram uma boa correlação genótipo-fenótipo.

As novas mutações p.Y283H e p.V134G afetam aminoácidos bem conservados entre as espécies e a análise *in silico* sugeriu que ambas seriam deletérias. Para confirmar o papel deletério dessas variantes no

GNRHR, realizamos um estudo funcional *in vitro*, que demonstrou que tanto a p.Y283H quanto a p.V134G causam perda completa de função do receptor.

A mutação p.V134G foi identificada em heterozigose composta com as variantes p.Q106R e p.R262Q em dois pacientes do sexo masculino com HHI normósmico. Já a mutação p.Y283H foi identificada em heterozigose composta com as mutações p.[N10K;Q11K]. Essa é a terceira vez em que essas duas mutações p.[N10K; Q11K] são descritas em conjunto ^(45, 46). No caso descrito aqui, a segregação familiar mostrou que o pai do paciente, com desenvolvimento sexual normal, carregava apenas as mutações p.[N10K;Q11K] em heterozigose, confirmando que essas mutações segregam no mesmo alelo e não são suficientes para causar o fenótipo de HHI quando em heterozigose. Esse achado poderia ser atribuído a um efeito fundador ou à existência de uma região *hotspot* envolvendo esses dois códons. Como o material genético da mãe não estava disponível, não foi possível determinar se a variante p.Y283H foi herdada ou é uma mutação *de novo*.

As mutações p.Q106R e p.R262Q são as mais frequentemente descritas nas populações nas quais o *GNRHR* foi estudado e sabidamente levam a perda parcial de função do receptor ^(35, 43). Identificamos a mutação p.Q106R em três casos de HHI parcial: em heterozigose composta em dois casos esporádicos (p.[Q106R];[V134G]) e (p.[R139H];[Q106R]) e em homozigose em um paciente com pais consanguíneos (p.[Q106R];[Q106R]). É interessante observar que dois desses pacientes apresentaram reversão do quadro de hipogonadismo,

com aumento de volume testicular após início de reposição androgênica, mantendo valores normais de testosterona e gonadotrofinas após interrupção do tratamento. Além disso, o paciente homozigoto para a p.Q106R apresentou fertilidade espontânea. Pitteloud *et al.* (2001) também descreveu um paciente homozigoto para a mutação p.Q106R, com quadro parcial de HHI, na presença de tamanho testicular normal, e algum grau de espermatogênese, que apresentou reversibilidade após tratamento e foi denominado síndrome do eunuco fértil ⁽⁵¹⁾. Reversibilidade tem sido descrita em até 10% dos casos de HHI, principalmente indivíduos com fenótipo parcial ^(52, 53). No seguimento clínico é importante avaliar a possibilidade de reversão do fenótipo reprodutivo, principalmente nos casos de hipogonadismo parcial, que deve ser suspeitado quando há aumento do volume testicular durante o tratamento.

A mutação p.R139H causa perda completa de função do receptor de GnRH *in vitro* ⁽⁴⁵⁾. Essa mutação foi primeiramente descrita em 2001 em um paciente brasileiro e estudos funcionais demonstraram que essa é uma mutação que causa completa perda de função do receptor ⁽⁴⁵⁾. Após essa descrição, identificamos a mutação p.R139H em mais seis casos provenientes de quatro famílias brasileiras não relacionadas (**Tabela 2**). Uma boa correlação genótipo/fenótipo foi observada nesses casos já que todos os pacientes homozigotos apresentavam HHI completo e o único caso portador da p.R139H em heterozigose composta com a mutação parcialmente inativadora p.Q106R apresentou HHI parcial reversível, como descrito acima.

A mutação p.R139H parece ser particularmente mais frequente na população brasileira, o que nos levou a analisar um possível efeito fundador. Embora nas leis da evolução as mutações prejudiciais sejam progressivamente eliminadas do pool genético humano, as mutações conhecidas como fundadoras persistem e são transmitidas aos descendentes ⁽⁵⁴⁾. Como a capacidade reprodutiva é o principal critério para seleção natural, a existência de mutações fundadoras que comprometem o controle das vias neuroendócrinas da reprodução é contraintuitivo. No entanto, algumas mutações fundadoras foram recentemente identificadas nos genes *TAC3* (c.209-1G>C), *GNRH1* (c.18-19insA) e *PROKR2* (p.L173R) em casos de HHI (55-57). Apesar dos pacientes brasileiros afetados não serem relacionados, todos são provenientes do interior de Sergipe (Itabaiana-SE) ou possuem ancestrais nessa região. Todos os casos brasileiros carreadores da mutação p.R139H apresentaram o mesmo haplótipo. No grupo controle esse mesmo haplótipo foi identificado em apenas 4% dos casos. Por outro lado o caso familiar proveniente da Polônia apresentou um haplótipo diferente. Esses resultados sugerem que a mutação p.R139H tem um ancestral comum na população brasileira, provavelmente originária da região nordeste do Brasil. Por outro lado, a família polonesa afetada apresentou o haplótipo (278, 256, 216). Apenas o marcador mais próximo do microssatélite para o gene *GNRHR* (D4S3018) apresentou o mesmo genótipo que os pacientes brasileiros, não podendo ser totalmente descartada a possibilidade de um ancestral comum mais remoto, apesar de não haver relatos de migração da Polônia para o

nordeste brasileiro. A mutação p.R139H foi identificada em outros cinco casos não relacionados de origem geográfica diferente, não avaliados nesse trabalho. A identificação de outra mutação afetando o mesmo códon (p.R139C) foi descrita em dois casos, levanta a hipótese de que essa possa ser uma região de *hotspot* ^(58, 59). Contudo mais estudos seriam necessários para determinar se a mutação p.R139H representa um *hotspot* ou um efeito fundador nas populações europeias e norte-americanas.

No presente estudo, atualizamos a frequência de mutações no *GNRHR* em pacientes com HHI normósmico. Os resultados apresentados confirmaram que mutações do *GNRHR* são a causa genética mais comum de HHI normósmico, com uma boa correlação genótipo-fenótipo, e demonstraram o efeito fundador da mutação p.R139H nos pacientes brasileiros. Apesar de não haver nenhuma característica que diferencia os pacientes portadores de mutações no *GNRHR* dos pacientes sem mutações ou com mutações em outros genes, o *GNRHR* deve ser o primeiro candidato para análise genética em casos de HHI normósmico, por ser o mais frequentemente afetado, particularmente os casos familiares ou com pais consanguíneos, com padrão de herança autossômica recessiva.

6 Conclusões

-
- O gene *GNRHR* é o mais frequentemente afetado entre os pacientes brasileiros com HHI normósmico.
 - Descrevemos duas novas mutações inativadoras, p.Y283H e p.V134G, no GnRHR na casuística de HHI normósmico.
 - Uma boa correlação genótipo-fenótipo foi observada nos pacientes com HHI normósmico portadores de mutações no *GNRHR*.
 - O estudo de efeito fundador sugere a presença de um ancestral comum para a mutação p.R139H na população brasileira.
 - Apenas a variante p.Q106R foi identificada em heterozigose em um paciente com ACCD e não parece estar relacionada com o fenótipo em questão.

7 Referências

1. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2364-8.
2. Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(20):8132-6.
3. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 1989 Mar 9;338(6211):161-4.
4. Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest.* 2000 Oct;23(9):560-5.
5. Quinton R, Duke VM, de Zoysa PA, Platts AD, Valentine A, Kendall B, Pickman S, Kirk JM, Besser GM, Jacobs HS, Bouloux PM. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 Aug;81(8):3010-7.
6. Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, Seidman JG, Crowley WF, Jr., Vallejo M. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jan;82(1):213-7.

7. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr., Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003 Oct 23;349(17):1614-27.
8. Silveira LF, Stewart PM, Thomas M, Clark DA, Bouloux PM, MacColl GS. Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR "knockout". *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jun;87(6):2973-7.
9. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, Azcona C, MacColl GS, Jacobs HS, Conway GS, Besser M, Stanhope RG, Bouloux PM. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001 Aug;55(2):163-74.
10. Tusset C, Trarbach EB, Silveira LF, Beneduzzi D, Montenegro L, Latronico AC. [Clinical and molecular aspects of congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011 Nov;55(8):501-11.
11. Tsang S. When size matters: a clinical review of pathological micropenis. *J Pediatr Health Care*. 2010 Jul-Aug;24(4):231-40.
12. Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, Hughes VA, Dwyer AA, Martin KA, Quinton R, Mericq V, Merino PM, Gusella JF, Crowley WF Jr., Pitteloud N, Hall JE. Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar;96(3):E566-76.

13. Clayton PE, Shalet SM, Price DA. Endocrine manipulation of constitutional delay in growth and puberty. *J Endocrinol.* 1988 Mar;116(3):321-3.
14. Bierich JR, Nolte K, Drews K, Brugmann G. Constitutional delay of growth and adolescence. Results of short-term and long-term treatment with GH. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1992 Nov;127(5):392-6.
15. Drago F, Bohus B, Van Ree JM, Scapagnini U, De Wied D. Behavioral responses of long-term hyperprolactinaemic rats. *Eur J Pharmacol.* 1982 Apr 23;79(3-4):323-7.
16. Drago F, Pedersen CA, Caldwell JD, Prange AJ, Jr. Oxytocin potently enhances novelty-induced grooming behavior in the rat. *Brain Res.* 1986 Mar 19;368(2):287-95.
17. Brunner HG, Otten BJ. Precocious puberty in boys. *N Engl J Med.* 1999 Dec 2;341(23):1763-5.
18. Wehkalampi K, Widen E, Laine T, Palotie A, Dunkel L. Patterns of inheritance of constitutional delay of growth and puberty in families of adolescent girls and boys referred to specialist pediatric care. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Mar;93(3):723-8.
19. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jun;87(6):2447-54.
20. Silveira LF, Trarbach EB, Latronico AC. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Aug 5;324(1-2):30-8.

-
21. Trarbach EB, Silveira LG, Latronico AC. Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency. *Pituitary*. 2007;10(4):381-91.
 22. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2822-31.
 23. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonça BB, Latronico AC. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):4113-8.
 24. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*. 2009 Oct;5(10):569-76.
 25. Pugliese-Pires PN, Fortin JP, Arthur T, Latronico AC, Mendonca BB, Villares SM, Arnhold IJ, Kopin AS, Jorge AA. Novel inactivating mutations in the GH secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty. *Eur J Endocrinol*. 2011 Aug;165(2):233-41.
 26. Banerjee I, Trueman JA, Hall CM, Price DA, Patel L, Whatmore AJ, Hirschhorn JN, Read AP, Palmert MR, Clayton PE. Phenotypic variation in constitutional delay of growth and puberty: relationship to specific leptin and leptin receptor gene polymorphisms. *Eur J Endocrinol*. 2006 Jul;155(1):121-6.

-
27. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LF, Jorge AA, Brito VN, Cukier P, Seminara SB, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012 Dec;56(9):646-52.
 28. Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, Jorge A, Beneduzzi D, Bianco SD, Mukherjee A, Baptista MT, Costa EM, De Castro M, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol.* 2010 Jul;163(1):29-34.
 29. Tommiska J, Wehkalampi K, Vaaralahti K, Laitinen EM, Raivio T, Dunkel L. LIN28B in constitutional delay of growth and puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):3063-6.
 30. Vaaralahti K, Wehkalampi K, Tommiska J, Laitinen EM, Dunkel L, Raivio T. The role of gene defects underlying isolated hypogonadotropic hypogonadism in patients with constitutional delay of growth and puberty. *Fertil Steril.* 2011 Jun 30;95(8):2756-8.
 31. Kaiser UB, Dushkin H, Altherr MR, Beier DR, Chin WW. Chromosomal localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13.1-q21.1 and mouse chromosome 5. *Genomics.* 1994 Apr;20(3):506-8.
 32. Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 1992 Jan-Feb;11(1):1-20.

-
33. Arora KK, Cheng Z, Catt KJ. Mutations of the conserved DRS motif in the second intracellular loop of the gonadotropin-releasing hormone receptor affect expression, activation, and internalization. *Mol Endocrinol*. 1997 Aug;11(9):1203-12.
 34. Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, Sellers JC, Neill JD. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992 Nov 30;189(1):289-95.
 35. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med*. 1997 Nov 27;337(22):1597-602.
 36. Chevrier L, Guimiot F, de Roux N. GnRH receptor mutations in isolated gonadotropic deficiency. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Oct 22;346(1-2):21-8.
 37. Noel SD, Kaiser UB. G protein-coupled receptors involved in GnRH regulation: molecular insights from human disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Oct 22;346(1-2):91-101.
 38. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF, Seminara SB, Crowley WF Jr, Pitteloud N. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 24;107(34):15140-4.
 39. Wu S, Wilson MD, Busby ER, Isaac ER, Sherwood NM. Disruption of the single copy gonadotropin-releasing hormone receptor in mice by gene trap: severe reduction of reproductive organs and functions in developing and adult mice. *Endocrinology*. 2010 Mar;151(3):1142-52.

-
40. Beranova M, Oliveira LM, Bedecarrats GY, Schipani E, Vallejo M, Ammini AC, Quintos JB, Hall JE, Martin KA, Hayes FJ, Pitteloud N, Kaiser UB, Crowley WF Jr, Seminara SB. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Apr;86(4):1580-8.
 41. Kottler ML, Counis R, Bouchard P. Mutations of the GnRH receptor gene: a new cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism. *Arch Med Res*. 1999 Nov-Dec;30(6):481-5.
 42. Pralong FP, Gomez F, Castillo E, Cotecchia S, Abuin L, Aubert ML, Portmann L, Gaillard RC. Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3811-6.
 43. Karges B, Karges W, de Roux N. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Hum Reprod Update*. 2003 Nov-Dec;9(6):523-30.
 44. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb 11;16(3):1215.
 45. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJ, Kaiser UB, Latronico AC. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun;86(6):2680-6.

-
46. Meysing AU, Kanasaki H, Bedecarrats GY, Acierno JS, Jr., Conn PM, Martin KA, Seminara SB, Hall JE, Crowley WF Jr, Kaiser UB. *GNRHR* mutations in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism highlight the differential sensitivity of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 Jul;89(7):3189-98.
 47. Layman LC, McDonough PG, Cohen DP, Maddox M, Tho SP, Reindollar RH. Familial gonadotropin-releasing hormone resistance and hypogonadotropic hypogonadism in a family with multiple affected individuals. *Fertil Steril.* 2001 Jun;75(6):1148-55.
 48. Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, Bolbolan S, Bick DP, Sherins RR, Duck LW, Musgrove LC, Sellers JC, Neill JD. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1):14-5.
 49. Lin L, Conway GS, Hill NR, Dattani MT, Hindmarsh PC, Achermann JC. A homozygous R262Q mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor presenting as constitutional delay of growth and puberty with subsequent borderline oligospermia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Dec;91(12):5117-21.
 50. Bedecarrats GY, Linher KD, Janovick JA, Beranova M, Kada F, Seminara SB, Michael Conn P, Kaiser UB. Four naturally occurring mutations in the human GnRH receptor affect ligand binding and receptor function. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Jul 31;205(1-2):51-64.
 51. Pitteloud N, Boepple PA, DeCruz S, Valkenburgh SB, Crowley WF, Jr., Hayes FJ. The fertile eunuch variant of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: spontaneous reversal associated with a homozygous mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2470-5.

-
52. Laitinen EM, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, Toppari J, Raivio T. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or *GNRHR* mutations. *PLoS One*. 2012;7(6):e39450.
 53. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, Cole LW, Pearce SH, Lee H, Boepple P, Crowley WF Jr, Pitteloud N. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30;357(9):863-73.
 54. Crow JF, Kimura M. Efficiency of truncation selection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979 Jan;76(1):396-9.
 55. Avbelj Stefanija M, Jeanpierre M, Sykiotis GP, Young J, Quinton R, Abreu AP, Plummer L, Au MG, Balasubramanian R, Dwyer AA, Florez JC, Cheetham T, Pearce SH, Purushothaman R, Schinzel A, Pugeat M, Jacobson-Dickman EE, Ten S, Latronico AC, Gusella JF, Dode C, Crowley WF Jr, Pitteloud N. An ancient founder mutation in *PROKR2* impairs human reproduction. *Hum Mol Genet*. 2012 Oct 1;21(19):4314-24.
 56. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, Grymberg M, Lamenicky P, Chanson P, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A. *TAC3* and *TACR3* defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 May;95(5):2287-95.
 57. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a *GNRH1* mutation. *N Engl J Med*. 2009 Jun 25;360(26):2742-8.

-
58. Gurbuz F, Kotan LD, Mengen E, Siklar Z, Berberoglu M, Dokmetas S, Kılıçlı MF, Güven A, Kirel B, Saka N, Poyrazoğlu Ş, Cesur Y, Doğan M, Özen S, Özbek MN, Demirbilek H, Kekil MB, Temiz F, Önenli Mungan N, Yüksel B, Topaloğlu AK. Distribution of gene mutations associated with familial normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2012 Sep;4(3):121-6.
 59. Topaloglu AK, Lu ZL, Farooqi IS, Mungan NO, Yuksel B, O'Rahilly S, Millar RP. Molecular genetic analysis of normosmic hypogonadotropic hypogonadism in a Turkish population: identification and detailed functional characterization of a novel mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Neuroendocrinology*. 2006;84(5):301-8.

8 Apêndice

case report

Novel mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor (*GNRHR*) gene in a patient with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism

Nova mutação no receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRHR) em um paciente com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normosmico

Daiane Beneduzzi¹, Ericka B. Trarbach¹, Ana Claudia Latronico¹, Berenice Bilharinho de Mendonça¹, Letícia F. G. Silveira¹

SUMMARY

We report a novel *GNRHR* mutation in a male with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism (nIHH). The coding region of the *GNRHR* gene was amplified and sequenced. Three variants p.[Asn10Lys;Gln11Lys]; [Tyr283His] were identified in the *GNRHR* coding region in a male with sporadic complete nIHH. The three variants were absent in the controls (130 normal adults). Familial segregation showed that the previously described p.Asn10Lys and p.Gln11Lys are in the same allele, in compound heterozygosity with the novel variant p.Tyr283His. The p.[Asn10Lys;Gln11Lys] are known inactivating mutations. The p.Tyr283His affects a well-conserved residue, and *in silico* analysis suggested it is a deleterious variant. We describe a novel *GNRHR* mutation in a male with nIHH. Absence of the mutation in the control group, conservation among species, *in silico* analysis, and familial segregation suggest that p.Tyr283His, which was identified in compound heterozygosity with the p.[Asn10Lys;Gln11Lys] variants, is an inactivating mutation. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):540-4

SUMÁRIO

Relatamos uma nova mutação no gene *GNRHR* em um homem com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normosmico (HHIn). A região codificadora do gene *GNRHR* foi amplificada e sequenciada. Três variantes p.[Asn10Lys;Gln11Lys]; [Tyr283His] foram identificadas no *GNRHR* em um homem com HHIn esporádico. As três variantes estavam ausentes no grupo controle (130 adultos normais). A segregação familiar mostrou que as variantes previamente descritas p.[Asn10Lys;Gln11Lys] se localizavam no mesmo alelo, em heterozigose composta com a nova variante p.Tyr283His. As mutações p.[Asn10Lys;Gln11Lys] são sabidamente inativadoras. A variante p.Tyr283His afeta um resíduo bem conservado, e a análise *in silico* sugeriu que essa é uma mutação deletéria. Descrevemos uma mutação inédita no gene *GNRHR* em um paciente com HHIn nIHH. A ausência da variante no grupo controle, a conservação entre as espécies, a análise *in silico* e a segregação familiar sugerem que a p.Tyr283His é uma mutação inativadora, identificada em heterozigose composta com as mutações p.[Asn10Lys;Gln11Lys]. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2012;56(8):540-4

¹Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), São Paulo, SP, Brazil

Correspondence to:
Letícia F. G. Silveira
Daiane Beneduzzi
Av. Dr. Eneas de Carvalho
Aguiar, 155, 2º andar, Bloco 6
05403-900 – São Paulo, SP, Brazil
leticia_gontijo@yahoo.com.br
daiane.beneduzzi@yahoo.com.br

Received on July/31/2012
Accepted on Sept/26/2012

INTRODUCTION

Congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is characterized by partial or com-

plete lack of pubertal development, secondary to deficient GnRH-induced gonadotropin secretion (1). Diagnosis is based on the presence of low levels of sex

steroids associated with low or inappropriately normal LH and FSH serum levels, with no anatomical lesion in the hypothalamic-pituitary tract, and no other pituitary hormone deficiencies (2).

Normosmic IHH (nIHH) is a rare and genetically heterogeneous condition, which occurs most commonly in the sporadic form or, less frequently, inherited as an autosomic recessive trait (3). GnRH receptor inactivating mutations were the first recognized monogenic causes of this condition (4). Up to 22 inactivating mutations of human *GNRHR* have now been described, distributed along the whole receptor, in the transmembrane domains, and extracellular or intracellular loops, with no hotspot. These mutations impair GnRH signaling by means of the loss of receptor expression, ligand binding, G-protein coupling, and/or abnormal intracellular trafficking of the receptor (5). After *GNRHR* mutations, defects in a number of genes have been associated with the pathogenesis of nIHH, although *GNRHR* is still the most commonly affected gene in this condition (6).

In the present study, we describe a sporadic case of complete nIHH associated with a novel mutation of the *GNRHR* gene.

CASE REPORT

A 16-year-old male came to medical attention complaining of lack of pubertal development. He was born at term from a non-consanguineous couple, following an uncomplicated pregnancy, with a normal male external genitalia and topic testes. He denied similar cases in the family. At physical examination, he had absent facial and body hair, eunuchoid habitus (height, 174.2 cm, arm span, 175 cm), weight, 73.2 kg, pubic hair tanner stage III, pre-pubertal testes (1.5 x 1.0 cm and 1.4 x 1.0 cm), and micropenis (penis length 7.0 x 2.0 cm, Z- 4.2). He had a normal sense of smell, as confirmed by a normal Smell Identification Test™ (UPSTI, Philadelphia, PA), and no other associated features. Basal hormonal evaluation revealed low serum testosterone (20 ng/dL), LH (0.17 IU/L), and FSH (0.7 IU/L) levels. Other tests of anterior pituitary function were normal, as was a subsequent magnetic resonance imaging scan of the hypothalamus-pituitary region. His bone age was 13 years. He was started on low IM doses of testosterone cypionate (200 mg/month) for 6 months. After withdrawal of testosterone therapy his hormonal levels returned to

pre-pubertal levels, and by the age of 18 he still did not have spontaneous pubertal development, confirming the diagnosis of normosmic IHH. The patient was then started on full replacement dose of IM testosterone cypionate (200 mg every 3 weeks).

MATERIAL AND METHOD

The protocol was approved by the Ethical Committee of Hospital das Clínicas da FMUSP (0713/2011). Written informed consent was obtained from the patient and his parents. The control population consisted of 130 Brazilian adults with normal pubertal development.

Hormone assays

Serum LH and FSH concentrations were determined by immunofluorometric assays (IFMA, AutoDELFIA hLH Spec and AutoDELFIA hFSH, Wallac Oy, Turku, Finland). Sensitivity was set at 0.1 IU/L for LH, and 1.0 IU/L for FSH. Serum testosterone concentrations were measured by commercial solid-phase fluoroimmunoassay (FIA) (AutoDELFIA Testosterone, PerkinElmer, Turku, Finland), with sensitivity of 14 ng/dL (0.6 nmol/liter) for testosterone. The interassay coefficient of variation was 5% or less for all assays.

Genetic analysis

Genomic DNA from the proband and his father was extracted from peripheral leukocytes. The three exons of the *GNRHR* gene (Accession no. NM_000406.2) were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using specific, previously described intronic primers pairs (7). Amplification reactions were performed in a final volume of 25 µL containing 10 pmol of each primer, 150 ng template DNA, 200 µmol/L dNTPs, 2.5 U Taq polymerase, 2.5 µL 10x buffer containing 1.5 mM MgCl₂, and carried out for 35 cycles: denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 55-57°C for 30 sec, extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension for 10 min at 72°C. All PCR products were separated on 1% agarose gel electrophoresis, and automatically sequenced using the ABI Prism™ Big Dye terminator Kit (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) in an ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA).

In silico analysis

Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), and SIFT – Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html) software were used to predict the putative impact of an amino acid substitution on structure and protein function. These tools are essentially based on sequence information, structural information, or both, and on the premise that protein conservation is correlated with protein function (8-10).

RESULTS

Sequencing of the *GNRHR* coding region revealed three variants: p.[Asn10Lys;Gln11Lys]; [Tyr283His]. In one allele, a thymine was substituted by adenine at nucleotide position 30, and a cytosine was substituted by adenine at position 31 in exon 1, resulting in a two amino acid substitutions, lysine for asparagine and lysine for glutamine, p.Asn10Lys and p.Gln11Lys, respectively, in the N-terminal extracellular domain. These variants were previously described (rs104893843 and rs142842994) (7,11). On the other allele, a novel variant was identified, in which thymine was substituted by cytosine at nucleotide position 847 in exon 3, resulting in tyrosine for histidine substitution (p.Tyr283His) in the seventh transmembrane domain of the GnRH receptor (Figure 1A). Familial segregation showed that the unaffected father of the proband was only heterozygous for p.[Asn10Lys;Gln11Lys] mutations, confirming that these variants segregate together in the same allele.

The novel p.Tyr283His variant was absent in the control population of 130 healthy Brazilian adults. In addition, thymine at position 283 of GnRHR is a highly conserved residue among the species, as demonstrated on figure 1B.

To investigate how this variant could interfere in GnRHR function, *in silico* analysis of the p.Tyr283His substitution in the *GNRHR* protein sequence was submitted to three different bioinformatics tools that examine functional effects of single nucleotide variants in humans (SIFT, Polyphen, and Mutation Taster). The p.Tyr283His was considered to be damaging by SIFT software, probably damaging (score 2.310) by Polyphen, and disease-causing by Mutation Taster.

A

c. 30T>A ; 31C>A p.(Asn10Lys;Gln11Lys)

Wild type

c. 847 T>C (p.Tyr283His)

Wild type

B

Species	AA	Alignment
Human	283	FATSFTVCWTPYYVLGIWYWF
Chimp	283	FATSFTVCWTPYYVLGIWYWF
Rhesus	283	FATSFTVCWTPYYVLGIWYWF
Mouse	283	FATSFVCWTPYYVLGIWYWF
Elegans	283	IVLAFICWTPYSILMFLHFL
Drosophila	283	IVVFICWTPYYTISMWYWLD

Figure 1. A. Automatic DNA sequencing of the *GNRHR* gene, showing the heterozygous mutations (p.[Asn10Lys;Gln11Lys] and p.Tyr283His) identified in the male proband with nIHH; **B.** Amino acid sequence alignment of the *GNRHR* among species; p.Tyr283His is indicated in red.

DISCUSSION

In this study, we report a patient who presented lack of pubertal development and pre-pubertal levels of serum testosterone, LH, and FSH at age 16. The hypothesis

of constitutional delay of growth and puberty could not be initially discharged, but was unlikely, considering that the patient did not have short stature, and there was no history of pubertal delay in the family. Nevertheless, diagnosis of complete normosmic IHH could only be confirmed after lack of spontaneous pubertal development, even after short term testosterone therapeutic trial, at 18 years of age.

Sequencing of the *GNRHR* coding sequence revealed three variants: p.[Asn10Lys;Gln11Lys]; [Tyr283His]. The p.Asn10Lys and p.Gln11Lys mutations were previously described (7,11). Meysing and cols. (11) reported a case of a normosmic female subject with congenital idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, who harbored the p.Asn10Lys, p.Gln11Lys in the same allele, while a distinct mutation (p.P320L) was identified in the other allele. *In vitro* functional studies of the p.[Asn10Lys; Gln11Lys] mutations resulted in reduced ligand binding and impaired intracellular signal transduction capacity (11).

In the present study, familial segregation was performed to investigate the hypothesis that p.Asn10Lys and p.Gln11Lys might be inherited together. The father's DNA was analyzed and revealed that he also carried the p.Asn10Lys and p.Gln11Lys mutations in the heterozygous state, and it was concluded that these variants were inherited together in the same allele. The father had completely normal pubertal development confirming that p.[Asn10Lys; Gln11Lys] in the heterozygous state are not sufficient for the phenotype of pubertal delay. Unfortunately, the mother's DNA was not available for study, but we can infer that the p.Tyr283His was either a *de novo* mutation or it was inherited from the mother.

This is the third time these two mutations p.[Asn10Lys; Gln11Lys] are described together (7,11). This finding may, in principle, be ascribed to a founder effect. However a second explanation is the existence of a hotspot region involving these two codons.

The p.Tyr283His is a novel variant. Although functional studies are still needed, it is very likely that this is a loss-of-function mutation. The p.Tyr283His was absent in the control group, and the affected tyrosine is a well-conserved residue across the species. In addition, *in silico* analysis performed on three different current bioinformatics tools is highly suggestive of a deleterious variant. SIFT software predicts the functional importance of the amino acid substitutions based on the alignment of orthologous and/or paralogous protein sequences; in this software, p.Tyr283His was

considered damaging. PolyPhen software predicts the functional effect of amino acid changes by considering evolutionary conservation, physicochemical properties, and proximity of the substitution to predicted functional domains and/or structural features. In Polyphen, the scores are designated as probably damaging (> 2.00), possibly damaging ($1.50 - 1.99$), potentially damaging ($1.25 - 1.49$), borderline ($1.00 - 1.24$), or benign ($0.00 - 0.99$) (12). On Polyphen, the p.Tyr283His was predicted to be probably damaging with a score of 2.310. Finally, MutationTaster employs a Bayes classifier to predict disease potential of an alteration. The Bayes classifier is fed with the outcome of all tests and features of the alterations, and calculates probabilities for the alteration to be either a *disease mutation* or a harmless *polymorphism*. For this prediction, frequencies of all single features for known disease mutations/polymorphisms were studied in a large training set composed of $> 40,000$ known disease mutations and $> 500,000$ polymorphisms. Mutation Taster software predicted that this variant was disease-causing, with possible changes in protein features.

In summary, we describe a male with nIHH harboring a novel p.Tyr283His *GNRHR* mutation identified in compound heterozygosity with the p.[Asn10Lys;Gln11Lys] variants. Familial segregation analysis was essential to elucidate that the p.Asn10Lys and p.Gln11Lys were on the same allele, confirming that biallelic defects are necessary for loss-of-function of the receptor. Although functional studies are still needed, many factors such as absence of the p.Tyr283His variant in the control group, familial segregation, conservation across species, and *in silico* analysis that was highly suggestive of p.Tyr283His as an inactivating *GNRHR* mutation.

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) 2011/15530-0.

Disclosure: no potential conflict of interest relevant to this article was reported.

REFERENCES

1. Silveira LF, Trarbach EB, Latronico AC. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;324(1-2):30-8.
2. Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF Jr. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 2000;23(9):560-5.
3. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions

Copyright © 2012, All rights reserved.

Novel *GNRHR* mutation in normosmic IHH

- addressed through phenotypic characterization. Clin Endocrinol (Oxf). 2001;55(2):163-74.
4. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, et al. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. N Engl J Med. 1997;337(22):1597-602.
 5. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. Nat Rev Endocrinol. 2009;5(10):569-76.
 6. Beate K, Joseph N, Nicolas de R, Wolfram K. Genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism: role of GnRH receptor and other genes. Int J Endocrinol. 2012;2012:147893.
 7. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJ, Kaiser UB, Latronico AC. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. J Clin Endocrinol Metab. 2001;86(6):2680-6.
 8. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. Nat Methods. 2010;7(4):248-9.
 9. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. Mutation-Taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. Nat Methods. 2010;7(8):575-6.
 10. Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. Genome Res. 2001;11(5):863-74.
 11. Meysing AU, Kanasaki H, Bedecarrats GY, Acierno JS Jr, Conn PM, Martin KA, et al. GNRHR mutations in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism highlight the differential sensitivity of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone. J Clin Endocrinol Metab. 2004;89(7):3189-98.
 12. Xi T, Jones IM, Mohnweiser HW. Many amino acid substitution variants identified in DNA repair genes during human population screenings are predicted to impact protein function. Genomics. 2004;83(6):970-9.