CINTIA TUSSET

**Pesquisa de mutações na neurocinina B e no seu receptor
em pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latrônico

Xavier

São Paulo

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tusset, Cintia

Pesquisa de mutações na neurocinina B e no seu receptor em pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos / Cintia Tusset. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Ana Cláudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Neurocinina B 2.Receptor da neurocinina B 3.Puberdade precoce 4.Retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento 5.Hipogonadismo 6.Mutação 7.Hormônio liberador de gonadotrofinas

USP/FM/DBD-178/12

Este trabalho foi realizado no 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, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): projeto temático 2005/04726 e bolsa de doutorado CAPES.

Dedicatória

Aos meus pais pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos. A todos que ainda acreditam no ser humano e no dia de amanhã, e à espiritualidade por tudo de maravilhoso que há na minha vida.

Agradecimentos

Era uma vez uma guria cheia de sonhos. Ela queria descobrir a vacina para o HIV e a cura do câncer, queria entender o que faz as pessoas realmente serem felizes e o que torna o mundo um lugar bom para se viver... Durante esses quatro anos, ela ainda não conseguiu a resposta para todas essas perguntas, mas ela aprendeu que pesquisa se faz com amor, e que não interessa se você está estudando a doença mais prevalente do mundo ou a mais rara, interessa o quanto você se compromete com aquilo que faz, o quanto você acredita que pode fazer a diferença e de que forma você realmente faz a diferença... E foi exatamente isso o que ela fez, deu o primeiro passo para se tornar uma verdadeira pesquisadora, comprometida com a ciência, com a ética e com o conhecimento humano acima de tudo...

Há quase quatro anos eu cheguei à São Paulo disposta a fazer um mestrado que logo se transformou em um doutorado direto. Fazer um doutorado na melhor universidade do país, aprender a lidar com a pressão por resultados, morar sozinha em uma cidade que não pára, saber administrar a saudades de casa e a vontade de voltar correndo, usar um pouco mais a razão ao invés da emoção, essas foram apenas algumas das dificuldades que eu enfrentei ao chegar aqui... Mas como diz o provérbio popular “no final tudo dá certo”, e realmente tudo deu certo!!

Com absoluta certeza eu não cheguei até aqui sozinha, muitas pessoas me ajudaram a seguir em frente quando eu achei que não ia conseguir... E são essas pessoas que eu quero agradecer!

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e a espiritualidade. Obrigada! Com toda certeza a presença de todos esses queridos seres de luz invisíveis aos meus olhos humanos são os grandes responsáveis por eu concluir mais essa etapa da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Gelson Tusset e Liete Rigotti, por terem acreditado em mim e apostado no meu sucesso. Obrigada pela paciência, pela compreensão, pelas palavras, pelo apoio, enfim, obrigada por serem meus queridos pais. Com toda certeza, vocês são os melhores pais do mundo.

A todos os meus familiares por acreditarem que eu sairia vitoriosa dessa empreitada. À Dra. Maria Beatriz Kohek por ter me trazido para São Paulo, e por ter confiado inteiramente na minha capacidade como pesquisadora.

Aos meus queridos amigos do Rio Grande do Sul, que apesar da distância física que nos separa, serão sempre meus eternos amigos.

À minha orientadora Dra. Ana Claudia Latronico pelo apoio, por acreditar no meu trabalho e na minha competência para realizar o mesmo. Agradeço à paciência, às palavras de incentivo e de consolo nos momentos difíceis, e acima de tudo, agradeço a grande oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisa de sucesso.

À Dra. Berenice Mendonça por ter me aceitado como integrante da grande família do LIM/42. Por ter acreditado que eu conseguiria fazer um doutorado direto, e pelo exemplo de profissional que é.

A todos os orientadores do LIM/42, pelo apoio e pelo clima sempre amigável de convivência.

À Dra. Éricka e à Dra. Letícia pelo apoio ao meu trabalho, por responderem todas as minhas dúvidas, por me passarem confiança, e serem exemplos de pesquisadoras.

À Nilda pelo carinho e atenção. E claro, por responder todas as minhas dúvidas e resolver meus problemas quando possível.

À Fran pelo carinho. À Cidinha pela paciência nos inúmeros pedidos de compra. À Cris por trazer mais humor aos meus dias e aguentar minhas insistentes solicitações de alíquotas. À Miriam pelas sábias sugestões. À Mariana pelas inúmeras placas de sequenciamento e pela amizade.

Aos amigos do LIM/42, Andréia, Luciana, Milena, Priscila, Andresa, Bia, Tamaya, Aline, Fernanda, Aline, Luiza, Helena, Ricardo, Acácio, Guilherme, enfim a todos os amigos desse laboratório tão querido! Às minhas queridas amigas, Tathiana, Fabiana, e Juliana Beneduzzi pelo carinho, por todas as brincadeiras, e principalmente pela amizade sincera.

À Renata pelas inúmeras conversas, pelas palavras sinceras de coragem e por ter sido uma verdadeira amiga nesses quatro anos. À Daiane pelas palavras, pelas “filosofias” em qualquer momento do dia (inclusive nas madrugadas), pelas risadas, pelas lágrimas, pelas festas, pelos puxões de orelha, pela paciência, mas principalmente, pela amizade incondicional que me premiaste nesses 4 anos e tenho certeza que será para sempre.

E depois de quatro longos anos de indas e vindas, encontros e desencontros, risos e lágrimas, eis que aquela “guria” cheia de medos e dúvidas conseguiu!. E com toda certeza ela não foi feliz para sempre, e sim ela será feliz para sempre... Porque é para isso que certas pessoas nascem, para encantarem e se deixarem encantar pelas surpresas que a vida nos reserva todos os dias... Basta ter olhos para ver! Obrigada!

Epígrafe

A única forma de chegar ao impossível, é
acreditar que é possível.

Alice no País das Maravilhas - Lewis Carroll

Normalização Adotada

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

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. 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

Listas de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Desenvolvimento Puberal Normal	2
1.2	Distúrbios do Desenvolvimento Puberal	5
1.2.1	Puberdade Precoce	5
1.2.2	Atraso Puberal	8
1.3	Taquicininas	17
1.4	Estrutura Gênica e Protéica da Neurocinina B e do Receptor NK3R	19
1.5	Neurocinina B e Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado Normósmico	26
1.6	Neurocinina B e Secreção de GnRH	33
2	OBJETIVOS	40
3	MÉTODOS	42
3.1	Considerações éticas	43
3.2	Pacientes	43
3.3	Avaliação Hormonal	56
3.4	Avaliação Molecular	58
3.4.1	Extração de DNA Genômico de Leucócitos de Sangue Periférico	58
3.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	59
3.4.3	Sequenciamento Automático Direto	61
3.4.4	Análises <i>In Silico</i>	62
3.5	Estudos Funcionais (<i>In Vitro</i>)	63
3.5.1	Mutagênese Sítio-Dirigida	63
3.5.2	Transfecção Celular	64
3.5.3	Estudo de Sinalização do NK3R	64
3.5.3.1	Avaliação do Acúmulo de Fosfatidil Inositol (IP)	64
4	RESULTADOS	66
4.1	Puberdade Precoce Dependente de Gonadotrofinas	67

4.1.1 Variante identificada no sequenciamento automático	67
4.1.2 Análises <i>In Silico</i> da variante identificada.....	69
4.2 Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento.....	70
4.2.1 Variante identificada no sequenciamento automático	70
4.2.2 Análises <i>In silico</i> da variante identificada	71
4.3 Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado Normósmico	72
4.3.1 Variantes identificadas no sequenciamento automático	72
4.3.2 Análises <i>In Silico</i> das variantes identificadas	75
4.3.3 Estudo Funcional da Variante p.G18D	75
4.4 Polimorfismos Identificados no NK3R	77
5 DISCUSSÃO.....	78
5.1 Puberdade Precoce Dependente de Gonadotrofinas.....	80
5.2 Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento.....	83
5.3 Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado Normósmico	86
6 CONCLUSÕES.....	93
7 REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE	

Lista de Abreviaturas

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
cDNA	DNA complementar
CHD7	Proteína ligadora do cromodomínio-helicase-DNA 7
<i>CYP11B1</i>	Gene que codifica a enzima 11-hidroxilase
<i>CYP19</i>	Gene que codifica a enzima aromatase
<i>CYP21A2</i>	Gene que codifica a enzima 21-hidroxilase
COS-7	Células de rim de macacos verdes africanos
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
DAG	Diacilglicerol
<i>DAX1</i>	Gene do fator codificado por uma região crítica do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagles</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
DYN	Dinorfina
<i>EAP-1</i>	<i>Enhanced at Puberty Gene</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
ER α	Receptor alfa de estrogênio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FGF8	Fator de crescimento dos fibroblastos tipo 8
FGFR1	Receptor tipo 1 do fator de crescimento dos fibroblastos
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GABA	Ácido gama-aminobutírico

GABRA-1	Receptor do ácido gama-aminobutírico
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GNRH1</i>	Gene que codifica o GnRH
<i>GNRHR</i>	Gene que codifica o Receptor de GnRH
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
HK1	Endocinina 1
HSD3B2	Gene que codifica a enzima tipo II da 3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase
IC	Idade cronológica
IFMA	Ensaio imunofluorométrico
IO	Idade óssea
IP	Fosfatidil inositol
IP3	Inositol trifosfato
<i>KAL1</i>	Gene que codifica a anosmina-1
<i>KISS1</i>	Gene que codifica a kisspeptina
<i>KISS1R</i>	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
KOR	Receptor da dinorfina
LH	Hormônio luteinizante
µg	Microgramas
MEK	Metil etil cetona
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
NELF	Fator nasal embrionário do hormônio liberador do hormônio luteinizante

NK1R	Receptor da substância P
NK2R	Receptor da neurocinina A
NK3R	Receptor da neurocinina B
NKA	Neurocinina A
NKB	Neurocinina B
NPY	Neuropeptídeo Y
<i>NPY-YR</i>	Gene que codifica o receptor tipo 1 do neuropeptídeo Y
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIP2	Fosfatidil inositol 4,5 bifosfato
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PPDG	Puberdade precoce dependente de gonadotrofinas
PPIG	Puberdade precoce independente de gonadotrofinas
PROK2	Procinetina 2
PROKR2	Receptor da Procinetina 2
RCCD	Retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento
RIE	Ensaio de radioimunoensaio
RM	Ressonância magnética
RNA _m	RNA mensageiro
SK	Síndrome de Kallmann
SP	Substância P
<i>TAC2</i>	Gene que codifica a Preprotaquicina 2
<i>TAC3</i>	Gene que codifica a Preprotaquicina 3

<i>TACR3</i>	Gene que codifica o Receptor da Preprotaquicinina 3
TGF- α	Fator de crescimento transformador alfa
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
<i>TTF1</i>	Gene que codifica o fator de transcrição tireoidiano tipo 1
VIP	Peptideo intestinal vasoativo

Lista de Figuras

Figura 1 -	Representação esquemática do gene <i>TAC3</i> e seus produtos protéicos.....	21
Figura 2 -	Representação esquemática do processamento da neurocinina B	23
Figura 3 -	A. Estrutura esquemática do gene <i>TACR3</i> que codifica o NK3R. B. Cascata de sinalização da NKB/NK3R	25
Figura 4 -	Representação esquemática do papel dos neurônios KISS1/Dyn/NKB na geração dos pulsos secretores de GnRH	36
Figura 5 -	a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TAC3</i> selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TAC3</i> mutante (c.187G>C).....	67
Figura 6 -	Grau de conservação da alanina na posição 63 da NKB entre as diversas espécies	68
Figura 7 -	Análise de segregação familiar da variante p.A63P	69
Figura 8 -	a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TACR3</i> selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TACR3</i> mutante (c.1345G>T)	70
Figura 9 -	Grau de conservação da alanina na posição 449 do NK3R entre as diversas espécies	71
Figura 10 -	a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TACR3</i> selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TACR3</i> mutante (c.53G>A)	73
Figura 11 -	a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TACR3</i> selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene <i>TACR3</i> mutante (c.172C>T).....	73

Figura 12 - a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TACR3* selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TACR3* mutante (c.824G>A) em heterozigose; c) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TACR3* mutante (c.824G>A) em homozigose73

Figura 13 - Gráfico da produção de fosfatidil inositol em células COS-7 transfectadas com NK3R selvagem (WT) e mutante p.G18D76

Figura 14 - Representação esquemática da localização das variantes do NK3R identificadas nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico91

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Causas genéticas de síndrome de Kallmann e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico	16
Tabela 2 -	Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com PPDG.....	46
Tabela 3 -	Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com PPDG.....	50
Tabela 4 -	Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com RCCD.....	51
Tabela 5 -	Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com RCCD.....	52
Tabela 6 -	Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com HHI normósmico.....	53
Tabela 7 -	Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com HHI normósmico.....	54
Tabela 8 -	Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos	57
Tabela 9 -	Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos	57
Tabela 10 -	Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes <i>TAC3</i> e <i>TACR3</i>	60
Tabela 11 -	Frequência dos polimorfismos identificados no NK3R nos pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos e nos indivíduos controles.....	77

Resumo

Tusset C. *Pesquisa de mutações na neurocinina B e no seu receptor em pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Mutações inativadoras nos genes *TAC3* e *TACR3*, os quais codificam a neurocinina B (NKB) e o seu receptor NK3R, respectivamente, foram descritas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) normósmico. A partir desse achado, hipotetizamos que mutações ativadoras na NKB e/ou NK3R resultariam na secreção prematura de GnRH e, conseqüentemente, no desenvolvimento de puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG). Nesse estudo, investigamos a presença de mutações ativadoras e/ou polimorfismos nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes com PPDG, bem como mutações inativadoras e/ou polimorfismos nesses genes em pacientes com retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento (RCCD), e HHI normósmico. Duzentos e trinta e sete pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos foram selecionados, sendo 114 com PPDG, 50 com RCCD, e 73 com HHI normósmico. Um grupo de 150 indivíduos que apresentaram desenvolvimento puberal normal foi utilizado como controle. As regiões codificadoras dos genes *TAC3* e *TACR3* foram amplificadas pela reação em cadeia da polimerase, seguido de purificação enzimática e seqüenciamento automático direto. Análises *in silico* e *in vitro* foram realizadas. Um nova variante foi identificada no gene *TAC3*, p.A63P, em uma paciente do sexo feminino com PPDG, a qual desenvolveu puberdade aos sete anos de idade. Essa variante (p.A63P) está localizada na proneurocinina B, e análises *in silico* sugeriram que ela não altera sítios constitutivos de *splicing* e é benigna para a estrutura da proteína. A análise de segregação familiar mostrou que a mãe da paciente, a qual apresentou um desenvolvimento puberal normal, também apresentava a alteração p.A63P em heterozigose, sugerindo que essa variante não desempenha um papel direto no fenótipo de PPDG. Uma nova variante em heterozigose no gene *TACR3*, p.A449S, foi identificada em uma paciente do sexo feminino com RCCD, que teve início puberal aos treze anos de idade. A análise do grau de conservação da alanina na posição 449 mostrou que esse aminoácido não é conservado entre as diferentes espécies, e análises *in silico* sugeriram que essa variante não altera os sítios constitutivos de *splicing*, e é benigna para a estrutura do NK3R. Três novas variantes

no NK3R foram identificadas, p.G18D, p.L58L (c.172C>T) e p.W275*, em três pacientes do sexo masculino não relacionados com HHI normósmico. As variantes p.G18D e p.L58L foram identificadas em heterozigose, enquanto que a variante p.W275* foi identificada em heterozigose associada a variante silenciosa p.L58L (c.172C>T), e em homozigose em outro paciente. Análises *in silico* sugeriram que a variante p.G18D poderia afetar a funcionalidade do NK3R. Estudos *in vitro* dessa nova variante foram realizados, e mostraram que a mesma não altera a função do NK3R, visto que o aumento na produção de fosfatidil inositol não diferiu significativamente entre o receptor mutado e selvagem. Todas as novas variantes descritas nos genes *TAC3* e *TACR3* não foram identificadas em 300 alelos controles. Em conclusão, nosso trabalho identificou novas variantes nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes brasileiros com distúrbios puberais centrais idiopáticos, e confirmou o envolvimento do complexo NKB/NK3R na etiologia do HHI normósmico.

Descritores: Neurocinina B; Receptor da neurocinina B; Puberdade precoce; Retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento; Hipogonadismo; Mutação; Hormônio liberador de gonadotrofinas.

Summary

Tusset C. *Analysis of mutations in the neurokinin B and its receptor in patients with idiopathic central pubertal disorders* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”, 2012.

Inactivating mutations of the *TAC3* and *TACR3* genes, which encode the neurokinin B (NKB) and its receptor, NK3R, respectively, were described in patients with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH). Based on these observations, we hypothesized that gain-of-function mutations in the NKB and/or NK3R might be associated with premature activation of GnRH release, leading to gonadotropin-dependent precocious puberty (GDPP). In this study, we investigated the presence of activating mutations and/or polymorphisms in the *TAC3* and *TACR3* genes in patients with GDPP, and inactivating mutations and/or polymorphisms in these genes in patients with constitutional delay of growth and puberty (CDGP) and normosmic IHH. It was selected 237 patients with idiopathic central pubertal disorders: 114 with GDPP, 50 with CDGP, and 73 with normosmic IHH. Indeed, a group 150 individuals who had puberty at adequate age was used as controls. The coding regions of *TAC3* and *TACR3* genes were amplified by polymerase chain reaction followed by enzymatic purification and direct automatic sequencing. *In silico* and *in vitro* analyses were performed. A new heterozygous variant in the *TAC3* gene, p.A63P, was identified in a Brazilian girl with GDPP who had puberty onset at seven years of age. The p.A63P variant was located in the proneurokinin B and *in silico* analysis suggested that this variant does not alter constitutive splice sites, and it was benign to the protein. The segregation analysis revealed that her mother was heterozygous for the p.A63P variant (who had a normal pubertal development), suggesting that this variant does not play a role in the GDPP phenotype. It was identified a new heterozygous variant, p.A449S, in the *TACR3* gene in a Brazilian girl with CDGP, who had puberty onset at thirteen years of age. Conservation degree analysis of alanine at position 449 showed that this amino acid is not a conserved residue among different species. *In silico* analyses suggested that this new variant does not alter splice sites or affects the structure of NK3R. Indeed, it was identified three new distinct variants in the *TACR3* gene, p.G18D, p.L58L (c.172C>T) and p.W275*, in three unrelated males with normosmic IHH. Both p.G18D and p.L58L (c.172C>T) were identified in heterozygous state, and the p.W275* variant was

identified in two of these males, since one in homozygous and in another in heterozygous state in association with the silent variant p.L58L (c.172C>T). *In silico* analyses suggested that p.G18D might be damaging to the NK3R. *In vitro* studies of this variant (p.G18D) showed that the amount of inositol phosphate (IP) was not significantly different in cells transfected with the p.G18D mutant receptor than in cells transfected with the wild type receptor, indicating that this variant did not alter the function of the neurokinin B receptor. All new variants identified in the *TAC3* and *TACR3* genes were absent in 300 control alleles. In conclusion, we identified new variants in the *TAC3* and *TACR3* genes in Brazilian patients with idiopathic central pubertal disorders. We confirm the key role of the NKB/NK3R complex in the etiology of normosmic IHH.

Descriptors: Neurokinin B; Neurokinin B receptor; precocious puberty; Constitutional delay of growth and puberty; Hypogonadism; Mutation; Gonadotropin- releasing hormone.

1 Introdução

1.1 Desenvolvimento Puberal Normal

A puberdade é um processo crítico do desenvolvimento humano que resulta na maturação sexual e aquisição da função reprodutiva¹. Em primatas, o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é ativo durante o período neonatal, seguido por um período de relativa quiescência durante toda a infância. A reemergência dos pulsos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ocorre no final da infância e coincide com o início do período puberal^{2,3}.

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 alcançarem a placa crivosa⁴. Na placa crivosa, as fibras olfatórias unem-se aos primórdios do bulbo olfatório, enquanto os neurônios secretores de GnRH atravessam essa estrutura até alcançarem o hipotálamo. Finalmente, os neurônios secretores de GnRH projetam seus axônios na eminência média hipotalâmica⁴. Nos seres humanos, a migração dos neurônios secretores de GnRH começa na 6ª semana do desenvolvimento embrionário, sendo observados no hipotálamo fetal na 9-10ª semana. Por volta da 14-16ª semanas de gestação, esses neurônios estão conectados ao sistema porta-hipofisário, completando assim seu desenvolvimento e maturação⁵.

O GnRH é secretado pelos neurônios hipotalâmicos e atinge a hipófise anterior via circulação porta-hipofisária, exercendo seus efeitos mediante a ligação a receptores de membrana específicos localizados nos gonadotrofos. Essa ligação

estimula a hipófise anterior a secretar as gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), as quais vão atuar no tecido gonadal, estimulando a secreção de esteróides sexuais, bem como a gametogênese em ambos os sexos⁶.

Os dois principais eventos biológicos que contribuem para as manifestações físicas da puberdade são a gonadarca e a adrenarca. A gonadarca se refere a ativação ovariana e testicular que ocorre ao final do período pré-puberal do desenvolvimento, levando a um aumento considerável na produção de esteróides sexuais e culminando na gametogênese. A ocorrência de telarca e menarca nas meninas, bem como o crescimento testicular e a virilização nos meninos são características dessa fase. Por outro lado, a adrenarca se refere a maturação do córtex da glândula suprarrenal, levando ao aumento da secreção dos andrógenos adrenais, tais como dehidroepiandrosterona, androstenediona, entre outros. A pubarca é a principal manifestação física da adrenarca⁷.

A idade de início puberal é bastante variável na população. Considera-se normal o início do período puberal por volta dos 8-13 anos nas meninas, e dos 9-14 anos nos meninos². Muitos fatores contribuem para o início do período puberal, tais como sexo, etnia, dieta, gasto energético, genética, entre outros^{8, 9}. Os fatores genéticos contribuem significativamente para o início da puberdade, como demonstrado pela idade similar de menarca entre membros de uma mesma etnia, pela similaridade da idade da menarca entre mães e filhas, e pelo maior grau de concordância de desenvolvimento puberal entre gêmeos monozigóticos quando comparados a gêmeos dizigóticos^{2, 10}. No entanto, apesar dos esforços visando a elucidação dos fatores que levam ao início do período puberal, o principal

mecanismo desencadeador desse processo ainda não foi estabelecido. Atualmente a hipótese mais aceita para explicar a reativação dos neurônios secretores de GnRH na puberdade envolve a regulação da secreção de GnRH por uma complexa rede de neuropeptídeos inibitórios e excitatórios, bem como por mecanismos de comunicação glia-neurais^{7, 11}.

A kisspeptina, bem como o glutamato, são os principais neurotransmissores excitatórios da secreção de GnRH. No entanto, outros neurotransmissores, tais como norepinefrina, dopamina e serotonina, também mostraram uma ação excitatória sobre a secreção hipotalâmica de GnRH^{12, 13}. Em contraste, o ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do eixo gonadotrófico¹⁴. Além do GABA, o neuropeptídeo Y (NPY), os opióides endógenos, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e a melatonina também são importantes neurotransmissores inibitórios da secreção de GnRH^{2, 3, 7, 11}.

Fatores de crescimento derivados das células da glia, tais como fatores de crescimento transformadores alfa (TGF- α) e fatores de crescimento epidermal (EGF) são também elementos excitatórios da secreção de GnRH¹⁵. Atualmente, há evidências de que o processo geral de comunicação glia-neuronal que leva ao início da puberdade é controlado por uma hierarquia de genes, muitos dos quais foram descritos anteriormente como genes supressores tumorais. Entre esses genes está o *Oct-2*^{15, 16}, *TTF1* (fator de transcrição tireoidiano tipo 1)^{11, 17} e o *EAP-1* (*enhanced at puberty gene*)¹¹, os quais parecem ser importantes componentes da regulação da transcrição gênica, controlando mudanças na comunicação bidirecional entre células da glia e neurônios, subjacentes ao início do período puberal¹¹.

1.2 Distúrbios do Desenvolvimento Puberal

1.2.1 Puberdade Precoce

Puberdade precoce é definida como o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários antes dos oito anos nas meninas e dos nove anos e meio nos meninos¹⁸. A puberdade precoce é classificada em dois grandes grupos de acordo com a etiologia: puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG), também denominada de puberdade precoce central ou verdadeira, a qual é resultado da reativação prematura de neurônios secretores de GnRH; e puberdade precoce independente de gonadotrofinas (PPIG), ou puberdade precoce periférica, a qual é causada pela secreção de esteróides sexuais independente do estímulo das gonadotrofinas hipofisárias¹⁹.

Clinicamente, ambas as situações levam ao desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, aceleração do crescimento linear e progressivo aumento da idade óssea¹⁹. A PPDG é predominante no sexo feminino e mais de 90% das meninas têm a forma idiopática mesmo após avaliação da região hipotalâmica por ressonância magnética^{2, 19, 20}. Em contraste, mais de 75% dos meninos com PPDG apresentam anormalidades no sistema nervoso central, como por exemplo hamartomas hipotalâmicos, especialmente presente em crianças menores de 4 anos de idade²⁰.

Alterações genéticas associadas ao desenvolvimento de PPIG foram descritas nas últimas décadas^{21, 22}. Mutações ativadoras constitutivas no gene do receptor de

LH humano promovem aumento da secreção de testosterona pelos testículos e levam ao quadro de puberdade precoce limitada ao sexo masculino familiar (testotoxicose)^{23, 24}. Além disso, mutações ativadoras também são responsáveis pelo fenótipo de PPIG presente na síndrome de McCune Albright, caracterizada pela presença de mutações somáticas pós-zigóticas na subunidade alfa da proteína G em diversos tecidos, incluindo as gônadas. As manifestações clínicas incluem um quadro de hiperfunção hormonal, manchas cutâneas café-com-leite e displasia fibrosa óssea²⁵. Outras mutações associadas ao fenótipo de PPIG incluem mutações inativadoras nos genes *CYP21A2*²⁶, *CYP11B1*²⁷, *HSD3B2*²⁷, *CYP19*^{28, 29}, *Receptor do glucocorticóide (GR)*^{25, 30}, *DAX1*³¹, entre outras.

Por outro lado, apesar de a PPDG ser mais comum que a PPIG, pouco se sabe sobre a sua etiologia molecular. Análises de mutações em receptores de neurotransmissores hipotalâmicos inibitórios da secreção pulsátil de GnRH (*GABRA-1*, *NPY-Y1*) foram realizadas em 33 meninas com PPDG^{19, 32}. Nenhuma mutação foi encontrada no *GABRA-1*. No *NPY-Y1* uma única variante (p.K374T) em heterozigose foi identificada em uma menina com PPDG familiar. Contudo essa variante não alterou a atividade do receptor *in vitro*, e aparentemente não contribuiu significativamente para o fenótipo de puberdade precoce central³².

Em 2008, Teles *et al.*³³ identificaram uma mutação ativadora em heterozigose no receptor da kisspeptina (p.R386P), em uma menina brasileira com puberdade precoce central. Estudos funcionais mostraram que a mutação p.R386P localizada na cauda carboxi-terminal do receptor da kisspeptina (KISS1R) levou à ativação prolongada da via de sinalização intracelular em resposta a kisspeptina devido a um

atraso na dessensibilização do receptor³³. Esses dados sugeriram a importância da kisspeptina e do seu receptor para a integridade do eixo reprodutivo.

Em 2010, Silveira *et al.*³⁴ descreveram duas variantes na kisspeptina (KISS1) (p.P74S e p.H90D) em três crianças brasileiras não relacionadas com puberdade precoce central. A mutação p.P74S foi identificada em heterozigose em um menino que desenvolveu puberdade precoce central a partir de um ano de idade. Análises funcionais mostraram que após uma pré-incubação com soro humano, a capacidade do vetor mutante em estimular a transdução de sinal foi significativamente maior quando comparado ao vetor não mutado, sugerindo que essa variante possa ser mais resistente a degradação, levando com isso a uma maior biodisponibilidade de kisspeptina³⁴. Por outro lado, a variante p.H90D foi descrita em homozigose em duas meninas não relacionadas com puberdade precoce central. Essa variante não foi identificada na população controle brasileira; porém foi identificada em heterozigose em alguns indivíduos controles e em pacientes hipogonádicos americanos e franceses, sugerindo que essa variante seja um raro polimorfismo³⁵. Além disso, estudos *in vitro* da variante p.H90D não mostraram alterações na atividade ou na resistência à degradação quando comparada à kisspeptina selvagem³⁴.

Recentemente, quatro estudos independentes de associação ampla do genoma (*genome-wide association studies*, GWAS) estabeleceram que marcadores genéticos próximos ou dentro do gene *LIN28B* estavam relacionados com a idade da menarca em mulheres normais³⁶⁻³⁹. Além disso, foi demonstrado que camundongos transgênicos que expressam LIN28a exibem aumento nas taxas de crescimento linear e tamanho corporal adulto⁴⁰. O *LIN28B* é o homólogo humano do *lin28* de *Caenorhabditis elegans*⁴¹. Mutações deletérias no *lin28* resultam em

desenvolvimento precoce (passagem de larva para adulto) e transformação parcial do fenótipo sexual em *Caenorhabditis elegans*⁴¹. As proteínas da família LIN28 são potentes repressores pós-transcricionais da biogênese dos microRNAs let7, os quais são microRNAs expressos de forma tempo-específicos e que controlam o desenvolvimento sexual⁴². Silveira-Neto *et al.*⁴³ rastrearam mutações no *LIN28B* em 80 crianças brasileiras com PPDG, e identificaram uma nova variante (p.H199R) em heterozigose em uma menina com PPDG. Estudos *in vitro* mostraram que a variante p.H199R não afeta a função do *LIN28B* na regulação da expressão de let-7, e provavelmente não contribui diretamente para o fenótipo da paciente⁴³. Outras mutações em genes envolvidos com o controle central do eixo reprodutivo ainda não foram descritas.

1.2.2 Atraso Puberal

O atraso puberal pode ser dividido em três subtipos: retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento, hipogonadismo hipogonadotrófico e hipogonadismo hipergonadotrófico, resultado de uma disfunção gonadal primária, com consequente aumento na secreção de gonadotrofinas.

O retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento (RCCD) é caracterizado pelo início tardio da puberdade normal ou pela atenuação de sua progressão, sendo esta a causa mais comum de atraso puberal. O RCCD é considerado uma variante do desenvolvimento normal, e ocorre quando indivíduos

saudáveis entram espontaneamente na puberdade após os 13 anos nas meninas e após os 14 anos nos meninos⁴⁴. Clinicamente, os pacientes apresentam baixa estatura, atraso do desenvolvimento sexual e estirão puberal tardio e atenuado, sendo mais frequente no sexo masculino⁴⁵.

As causas que levam ao desenvolvimento de RCCD não são completamente conhecidas, mas acredita-se que uma forte base genética possa explicar a ocorrência desses casos. Estudos mostram que 50-80% das variantes na idade de início da puberdade ocorrem devido a fatores genéticos⁴⁶, e que 50-75% dos pacientes com RCCD apresentam história familiar de atraso puberal^{47, 48}. O padrão de herança do RCCD é variável, mas frequentemente é consistente com uma herança autossômica dominante, com ou sem penetrância completa.

A investigação de pacientes com síndrome de Kallmann (hipogonadismo hipogonadotrófico associado a alterações olfatórias) e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico levou a identificação de inúmeros genes que apresentam um papel crítico no desenvolvimento e na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, porém mutações nesses genes não foram identificadas em pacientes com RCCD, exceto em casos raros^{49, 50}. Nesse contexto, vale lembrar que grande parte dos casos de síndrome de Kallmann e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico permanecem sem etiologia definida⁵¹.

O HHI congênito é definido pela ausência parcial ou completa de desenvolvimento puberal, secundário a um defeito na produção ou secreção hipotalâmica de GnRH ou pela resistência hipofisária à ação do GnRH⁵². O diagnóstico de hipogonadismo é suspeitado diante da ausência ou parada do desenvolvimento puberal após os 18 anos no sexo masculino e 16 anos no sexo

feminino. O HHI é caracterizado por baixas concentrações de esteróides 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^{13, 53}. A secreção dos demais hormônios hipofisários encontra-se normal, bem como a ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária, demonstrando a ausência de uma causa anatômica⁵². Em 50 a 60% dos casos, o HHI encontra-se associado a alterações olfatórias como anosmia ou hiposmia, caracterizando a síndrome de Kallmann^{52, 54, 55}. O HHI é considerado uma condição clínica rara e geneticamente heterogênea, podendo se manifestar de forma esporádica ou ser herdada como um traço autossômico dominante, recessivo ou, no caso da síndrome de Kallmann, também recessivo ligado ao X⁵⁵.

Nos últimos anos, diversos genes foram estudados com o intuito de elucidar os mecanismos envolvidos no HHI congênito associado ou não a anosmia. Os genes *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROK2*, *PROKR2*, *NELF*, *CHD7*, *WDR11*, *KISS1*, *KISS1R*, *GNRH1*, *GNRHR*, *TAC3*, *TACR3* estão sabidamente envolvidos com a etiologia do HHI (**Tabela 1**)^{56, 57}.

O gene *KAL1* codifica uma proteína de matriz extracelular denominada anosmina, a qual atua no processo de migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH^{58, 59}. Diversas mutações no gene *KAL1* foram descritas em indivíduos com síndrome de Kallmann. Como o *KAL1* está localizado na região pseudo-autossômica do cromossomo X, as mutações nesse gene são encontradas exclusivamente em

pacientes do sexo masculino, podendo ser transmitidas por mulheres portadoras assintomáticas. As mutações no gene *KALI* levam à perda de função da anosmina-1 e estão amplamente distribuídas ao longo dos seus diferentes domínios proteicos⁶⁰. Essas mutações são representadas por deleções completas do gene, deleções intragênicas e alterações de bases. As alterações no gene *KALI* têm sido identificadas em cerca de 8-11% dos casos esporádicos e 14-50% dos casos familiares de síndrome de Kallmann ligada ao X, e não foram associadas a casos de deficiência de GnRH sem alterações olfatórias⁶⁰.

O gene do receptor tipo 1 para fator de crescimento dos fibroblastos, *FGFR1*, foi o primeiro gene autossômico associado ao desenvolvimento de hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos⁶¹. Mutações no *FGFR1* têm sido encontradas numa prevalência de 10-17%, tanto na síndrome de Kallmann quanto no HHI normósmico. A maior parte dessas mutações foram identificadas em heterozigose, sendo representadas por pequenas deleções/inserções de base e mutações de ponto⁶². Até o momento, existe apenas o relato de uma paciente com hipogonadismo hipogonadotrófico e olfato normal causado por uma deleção em heterozigose completa do gene *FGFR1*⁶³. O *FGFR1* codifica um receptor tirosina quinase envolvido no desenvolvimento dos bulbos olfatórios e na interação com a proteína anosmina anteriormente citada⁶⁴. O fator tipo 8 de crescimento dos fibroblastos (FGF8), um dos ligantes do FGFR1, também foi implicado na etiologia do hipogonadismo hipogonadotrófico em humanos. Falardeau *et al.*⁶⁵ e Trarbach *et al.*⁶⁶ descreveram as primeiras mutações de perda de função no FGF8, as quais foram identificadas em pacientes com SK e HHI normósmico, sugerindo que o decréscimo na sinalização do FGF8 poderia levar a deficiência de GnRH em humanos^{65, 66}.

Os genes que codificam o receptor da procinetina 2, bem como o seu ligante, a procinetina 2, genes *PROKR2* e *PROK2* respectivamente, os quais estão envolvidos com o desenvolvimento dos bulbos olfatórios e na migração dos neurônios GnRH, foram implicados com a etiologia do HHI^{67, 68}. Grande parte das mutações nos genes *PROKR2* e *PROK2* foram identificadas em heterozigose em humanos, ocorrendo em pacientes com HHI com e sem anormalidades olfatórias. Abreu *et al.*⁶⁷ publicaram a primeira mutação em homozigose com perda de função no gene *PROKR2* em pacientes com SK, e sugeriram que a haploinsuficiência dos gene *PROKR2/PROK2* não seria suficiente para causar o fenótipo de hipogonadismo⁶⁷. Mutações nos genes *PROKR2/PROK2* estão presentes em cerca de 6% dos pacientes com SK, e em 3% dos pacientes com HHI normósmico^{69, 70}.

O gene *NELF* que codifica o fator nasal embrionário do hormônio liberador do hormônio luteinizante foi considerado um candidato para a SK, devido ao seu papel na orientação axonal dos neurônios olfatórios e dos neurônios secretores de GnRH em camundongos⁷¹. Em humanos, o gene *NELF* foi mapeado em 9q34, sendo composto de 16 éxons. No entanto, apesar de algumas variantes terem sido descritas, a importância desse gene no aparecimento da deficiência de GnRH em humanos ainda é controversa^{72, 73}.

O gene *CHD7* codifica uma proteína ligadora do cromodomínio-helicase-DNA tipo 7. Mutações no gene *CHD7* foram identificadas em pacientes com CHARGE, uma síndrome na qual hipogonadismo hipogonadotrófico e hiposmia estão associados com atresia de coanas, malformações cardíacas, retardo mental, coloboma da íris, anormalidades genitais e auditivas^{74, 75}. A hipótese de que o *CHD7* estivesse envolvido na patogênese do hipogonadismo hipogonadotrófico foi considerada pela

sobreposição de fenótipos entre as duas síndromes, na qual o hipogonadismo muitas vezes está associado a alterações olfatórias⁷⁶. Dessa forma, Kim *et al.*⁷⁶ estudaram 200 pacientes com HHI e identificaram mutações no *CHD7* em 3 pacientes com SK e em 4 pacientes com HHI normósmico⁷⁶. Em outro estudo semelhante, foram identificadas mutações em 3 pacientes não relacionados que apresentavam características clínicas da síndrome de CHARGE, sugerindo que pacientes que apresentam características clínicas de CHARGE, particularmente surdez, dismorfismos do pavilhão auditivo e aplasia/hipoplasia dos canais semicirculares, são mais propensos a mutações no *CHD7*⁷⁷. Mutações no *CHD7* são encontradas em 5-10% dos pacientes inicialmente classificados com SK e HHI normósmico^{56, 76}.

Recentemente, mutações em heterozigose no gene *WDR11*, o qual codifica uma proteína WD que interage com o fator de transcrição EMX1, foram identificadas em seis pacientes com síndrome de Kallmann e HHI normósmico⁷⁸. Todas as alterações descritas induziram a remodelagem da proteína WDR11, levando a redução ou eliminação de sua interação com o EMX1, interação essa, crucial para a migração dos neurônios olfatórios⁷⁸. De fato, análises de expressão do *WDR11* em células embrionárias olfatórias de humanos, camundongos e peixes *zebrafish* mostrou um padrão de expressão sobreposto com o fator de transcrição EMX1 em regiões críticas para a formação do hipotálamo, sugerindo que tanto o EMX1 quanto o *WDR11* são importantes para o desenvolvimento dos neurônios olfatórios⁷⁹.

Nos últimos anos, a kisspeptina, bem como o seu receptor KISS1R, foram considerados os principais reguladores do eixo reprodutivo. O gene *KISS1R* codifica um receptor de membrana acoplado à proteína G. A ligação da kisspeptina ao KISS1R resulta na estimulação da via Gαq/11 e ativação da fosfolipase C, levando a

um aumento na produção de trifosfato de inositol e na mobilização de cálcio intracelular. Estudos fisiológicos e farmacológicos conduzidos em animais e humanos demonstraram que a kisspeptina é o mais potente estimulador da secreção de LH dependente de GnRH identificado até o momento⁸⁰. Mutações no gene *KISS1R* foram relacionadas a etiologia do HHI normósmico por meio de estudos de ligação genética, que descreveram de forma independente duas mutações inativadoras em homozigose em pacientes com HHI normósmico em duas grandes famílias consanguíneas^{12, 13}. Mutações inativadoras identificadas no gene *KISS1R* seguem um padrão de herança autossômico recessivo, e representam 2- 5% dos casos de HHI normósmico. Recentemente, uma mutação inativadora no *KISS1* foi descrita em quatro irmãos de uma grande família consanguínea com HHI normósmico⁸¹.

Apesar de o *GNRHI* ser o candidato mais óbvio para explicar o hipogonadismo hipogonadotrófico, somente em 2009 foram descritas as primeiras mutações nesse gene^{82, 83}. Apesar do grande número de indivíduos rastreados até o momento, mutações no *GNRHI* parecem ser uma causa bastante rara de HHI normósmico. Vale ressaltar que mutações de perda de função em proteínas ligantes tendem a ser menos frequentes que mutações nos seus receptores⁸³. Uma possibilidade para explicar essa diferença, está relacionada ao tamanho do peptídeo ligante. O *GNRHI*, por exemplo, o qual contém apenas 10 aminoácidos na sua estrutura protéica final, representa um alvo “pequeno” para mutações. Além disso, a infertilidade devido à ocorrência de mutações genéticas resulta em um rápido desaparecimento desses defeitos herdados nas gerações futuras⁵⁷.

A ligação do GnRH ao seu receptor ativa diversas vias celulares de transdução de sinal, culminando na secreção das gonadotrofinas FSH e LH. Mutações no gene

GNRHR que codifica o receptor de GnRH (GNRHR) são frequentes e há muito conhecidas^{84, 85}. De forma geral, as mutações no *GNRHR* impedem ou reduzem a formação do complexo hormônio-receptor e estão associadas ao amplo espectro fenotípico apresentado por pacientes com HHI⁸⁶. Mutações nesse gene estão presentes em 3,5%-16% dos casos esporádicos de HHI normósmico e em até 40% dos casos familiares, sendo considerado a causa genética mais freqüente de HHI^{63, 87}.

Recentemente, a neurocinina B (NKB), bem como o seu receptor, NK3R, foram relacionados à etiologia do HHI⁸⁸. Até o momento, cerca de 50 indivíduos com mutações nos genes *TAC3* e *TACR3* foram descritos, com uma ampla distribuição mundial e uma grande diversidade étnica⁸⁸⁻⁹³. Mutações no complexo NKB/NK3R são consideradas uma causa comum de HHI normósmico, ocorrendo em mais de 5% dos indivíduos com HHI normósmico estudados⁹¹.

Tabela 1 - Causas genéticas de síndrome de Kallmann e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico.

Gene	Proteína	Função	Herança	Fenótipo	Estigmas
KAL1	Anosmina-1	Migração dos neurônios GnRH	Recessiva ligada ao X	SK	Anosmia, sincinesia bimanual, agenesia renal
FGFR1	Receptor tipo 1 do fator de crescimento dos fibroblastos	Migração dos neurônios GnRH	Autossômica dominante	SK/HHI	Anosmia, fenda palatina, lábio leporino, agenesia dental
FGF8	Fator de crescimento dos fibroblastos tipo 8	Migração dos neurônios GnRH	Autossômica dominante	SK/HHI	Anosmia, fenda palatina, lábio leporino, agenesia dental
PROKR2	Receptor da Procinetina 2	Migração dos neurônios GnRH	Autossômica recessiva	SK/HHI	Anosmia
PROK2	Procinetina 2	Migração dos neurônios GnRH	Autossômica recessiva	SK/HHI	Anosmia
NELF	Fator nasal embrionário do hormônio liberador de hormônio luteinizante	Migração dos neurônios GnRH	Autossômica dominante	SK/HHI	Anosmia
CHD7	Proteína ligadora do cromodomínio-helicase-DNA 7	Desenvolvimento dos neurônios GnRH	Autossômica dominante	SK/HHI	Síndrome de CHARGE
WDR11	Proteína WD	Migração dos neurônios GnRH	Autossômica dominante	SK/HHI	Anosmia
KISS1R	Receptor da Kisspeptina 1	Estimulação da secreção de GnRH	Autossômica recessiva	HHI	-
TACR3	Receptor da Neurocinina B	Estimulação da secreção de GnRH	Autossômica recessiva	HHI	-
TAC3	Neurocinina B	Estimulação da secreção de GnRH	Autossômica recessiva	HHI	-
GNRH1	GnRH	Síntese de GnRH e sinalização celular	Autossômica recessiva	HHI	-
GNRHR	Receptor de GnRH	Síntese de GnRH e sinalização celular	Autossômica recessiva	HHI	-

Adaptado de Tusset *et al.*⁵⁷

1.3 Taquicininas

As taquicininas representam uma família de peptídeos biologicamente ativos, nas quais os elementos mais conhecidos são substância P (SP), neurocinina A (NKA), neurocinina B (NKB), e mais recentemente, peptídeo hemocinina 1 (HK-1) e seus ortólogos humanos, endocinina A (EKA) e endocinina B (EKB)^{94, 95}. As taquicininas se caracterizam por apresentarem uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos na região C-terminal, Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, a qual é essencial para a ativação de seus receptores, NK1R, NK2R e NK3R⁹⁶.

Os receptores das taquicininas são reconhecidos pela sua moderada seletividade em relação às taquicininas endógenas. As três principais taquicininas, SP, NKA e NKB agem como agonistas dos três receptores de taquicininas existentes, porém exibem ligação preferencial ao receptor NK1R, NK2R e NK3R, respectivamente. Dessa forma, a SP se liga preferencialmente ao NK1R, seguida da NKA e da NKB; por outro lado a NKA se liga preferencialmente ao NK2R, seguida da SP e da NKB; por fim a NKB se liga preferencialmente ao NK3R, seguida da NKA e da SP^{97, 98}.

Inicialmente, as taquicininas foram consideradas peptídeos de origem exclusivamente neural, porém estudos mostraram que essa família de peptídeos está amplamente distribuída pelo organismo⁹⁵. Nervos sensoriais sensíveis à capsaicina foram considerados as principais fontes de taquicininas a nível periférico⁹⁹. No entanto, evidências posteriores mostraram a existência de outras fontes neurais e não neurais de taquicininas fora do sistema nervoso central. Estudos mostraram a

expressão de taquicininas em neurônios resistentes à capsaicina seguidos de plasticidade neuronal induzida por inflamação em áreas somáticas¹⁰⁰, bem como em neurônios resistentes à capsaicina do sistema respiratório¹⁰¹, e do sistema nervoso entérico¹⁰².

A expressão de substância P foi demonstrada em células humanas endoteliais¹⁰³, células de Leydig humanas e de camundongos¹⁰⁴, e em diferentes tipos de células inflamatórias e do sistema imune em humanos, ratos e camundongos¹⁰⁵. A SP e a NKA também são expressas em células enterocromafins¹⁰⁶, epiteliais¹⁰⁷, fibroblastos¹⁰⁸, em células da musculatura lisa do sistema respiratório e intestinal¹⁰⁹, e em vários órgãos reprodutivos¹¹⁰. Estudos mostraram a expressão da NKB na placenta humana, bem como na placenta de rato¹¹¹, no útero¹¹², e em outras células reprodutivas não neurais de camundongos¹¹⁰. Além disso, os novos membros dessa família de peptídeos, HK-1, EKA e EKB, são primariamente expressos em células de origem não neural⁹⁴.

Diversos estudos mostram que as taquicininas estão implicadas em uma série de processos fisiopatológicos, entre os quais podemos citar o seu envolvimento no crescimento tumoral¹¹³, na inflamação neurogênica¹¹⁴, na regulação da hematopoiese¹¹⁵, na patogênese da doença de Parkinson¹¹⁶, no grau de dependência a álcool e cocaína¹¹⁷, na patogênese da pré-eclâmpsia¹¹⁸, e mais recentemente na etiologia do hipogonadismo hipogonadotrófico congênito⁸⁸⁻⁹³.

1.4 Estrutura Gênica e Protéica da Neurocinina B e do Receptor NK3R

A neurocinina B é codificada por um gene denominado preprotaquicinina 3 (*TAC3*), localizado no braço longo do cromossomo 12 (12q13-q21). Este gene é composto por sete éxons, dos quais os éxons um e sete correspondem as regiões 5' e 3' não traduzidas do RNAm, respectivamente, e o éxon cinco codifica a NKB propriamente dita¹¹⁸.

Sabe-se que no RNAm de bovinos há dois transcritos do gene *TAC3*, os quais diferem apenas nas extremidades 5' das regiões não traduzidas¹¹⁹. Existem evidências que fortaleceram a hipótese da existência de uma forma estendida de NKB no cérebro de ratos¹²⁰, e da existência de duas isoformas precursoras do *TAC3* humano (alfa e beta *TAC3*) que variam em pelo menos 24 aminoácidos na sua porção C-terminal¹²¹. Recentemente, Page *et al.*¹²² estudaram a expressão do gene *TAC3* em placentas humanas. Essa análise revelou a existência de nove variantes adicionais de splicing alternativo no gene *TAC3* em humanos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$; $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$; $\gamma 1$, $\gamma 2$ e $\gamma 3$), as quais levam a formação de três isoformas da NKB, isoformas alfa e beta anteriormente descritas, e isoforma gama, a qual não codifica a neurocinina B (**Figura 1**)¹²².

A grande diversidade de transcritos encontrada na neurocinina B é a maior diversidade já vista entre os principais integrantes da família das taquicininas. Ainda não está claro o que representa essa variedade de transcritos do gene *TAC3*, mas especula-se que diferentes combinações das regiões não codificadoras possam gerar

alguma estabilidade adicional ao transcrito, sem alterar a sequência protéica final¹²². Acredita-se ainda que a produção de uma isoforma gama do *TAC3* poderia representar uma redundância no reconhecimento dos sítios aceptores e doadores de splicing para produzir um artefato precursor sem a neurocinina B, representando um mecanismo evolutivo de splicing alternativo anteriormente empregado por um gene ancestral que codificava duas taquicininas. Segundo essa hipótese, o gene *TAC3* codificava previamente duas taquicininas, a NKB no éxon 5, e uma taquicinina adicional no éxon 3. Com a evolução, essa taquicinina codificada pelo éxon 3 teria sido perdida, mantendo-se apenas a neurocinina B que conhecemos hoje¹²².

Cromossomo 12q13-q21

Figura 1 - Representação esquemática do gene *TAC3* e seus produtos proteicos: isoforma α composta de 135 aminoácidos, a qual contém a sequência precursora da NKB em diversas espécies; isoforma β composta de 121 aminoácidos, a qual contém a sequência precursora da NKB em humanos; e isoforma γ composta de 103 aminoácidos, a qual não contém a sequência precursora da NKB.

A tradução do RNAm do gene *TAC3* gera um grande polipeptídeo denominado prepropeptídeo (preproneurocinina B), o qual consiste de um peptídeo sinal, uma ou mais cópias do neuropeptídeo, e uma ou mais sequências intercalares. O peptídeo sinal contém aproximadamente 16-30 resíduos e está localizado na porção N-terminal, enquanto o neuropeptídeo e as sequências intercalares estão distribuídos de forma aleatória na estrutura prepropeptídica. O peptídeo sinal permite que o peptídeo em formação consiga aderir e passar para dentro do retículo endoplasmático durante a sua síntese. Após essa passagem, o peptídeo sinal é rapidamente clivado,

permitindo com isso a formação do propeptídeo (proneurocinina B)⁹⁵. Este por sua vez é transportado para o complexo de Golgi, no qual os elementos intercalares são retirados do peptídeo em formação, por meio da clivagem de sítios específicos de apenas um resíduo básico (Argina, Lisina) ou de dois resíduos básicos adjacentes⁹⁴. Os produtos sofrem ainda modificações pós-traducionais pela ação de carboxipeptidases que removem os resíduos dibásicos COOH-terminais, permitindo a ação da enzima peptidilglicina alfa-amidação que converte o resíduo exposto de glicina COOH terminal em uma amida¹²¹. Após esse processo de clivagem e amidação, é formada a NKB madura, a qual contém cerca de dez aminoácidos. Esse peptídeo final está pronto para ser secretado, ou no caso da síntese de NKB neuronal, está pronta para ser armazenada em grânulos secretores para posteriormente ser transportada pelo axônio para as terminações nervosas (**Figura 2**)⁹⁵.

Figura 2 - Representação esquemática da síntese e processamento da neurocinina B em células neuronais. O gene *TAC3* é composto de 7 éxons, sendo que os éxons 1 e 7 não são traduzidos, e o éxon 5 codifica a NKB propriamente dita. O *TAC3* é transcrito no retículo endoplasmático, e traduzido em um grande polipeptídeo denominado preproneurocinina B, a qual é composta de um peptídeo sinal, uma cópia da NKB e sequências intercalares de DNA. A clivagem do peptídeo sinal forma a proneurocinina B que é transportada para o complexo de Golgi, na qual as sequências intercalares são clivadas. O peptídeo final, NKB, é então armazenado em grânulos secretores e transportado para as terminações nervosas. Adaptado de Pennefather *et al.*⁹⁵.

A NKB exerce seus efeitos mediante a ligação a um receptor de membrana específico acoplado à proteína G, denominado NK3R, o qual apresenta sete domínios hidrofóbicos na região transmembrana, três alças extracelulares, três alças intracelulares, um domínio amino-terminal extracelular, e um domínio carboxi-terminal intracelular¹²³. Este receptor é codificado pelo gene do receptor da

preprotaquicinina 3 (*TACR3*), o qual é composto de 5 éxons, todos codificadores, localizado no braço longo do cromossomo 4 (4q25). O éxon 1 do gene *TACR3* codifica a região 5' não traduzida do receptor, a porção N-terminal, a primeira alça intracelular e extracelular, além dos três primeiros domínios transmembrana. O éxon 2 codifica a segunda alça extracelular e intracelular, além do quarto domínio transmembrana do receptor. O éxon 3 codifica o quinto domínio transmembrana e a terceira alça intracelular. O éxon 4 codifica o sexto e o sétimo domínio transmembrana, além da terceira alça extracelular. O éxon 5 codifica a região C-terminal até a região 3' não traduzida do receptor. O NK3R apresenta 465 aminoácidos, sendo o receptor mais longo entre os membros da família das taquicininas (**Figura 3**)⁹⁵.

Figura 3 - a) Estrutura esquemática do gene *TACR3* que codifica o receptor da NKB (NK3R). b) Cascata de sinalização da NKB/NK3R. A ligação da NKB ao receptor acoplado à proteína Gq, NK3R, ativa a PLC que induz a hidrólise de PIP2 em IP3 e DAG, levando a mobilização de cálcio intracelular. PLC, fosfolipase C; PIP2, fosfatidil inositol 4,5 bifosfato; IP3, inositol trifosfato; Ca⁺⁺, cálcio; DAG, diacilglicerol; PKC, proteína quinase C; RAF1, MEK, quinases serina-treonina; ERK, quinase regulada por sinal extracelular.

Pinto *et al.*¹²⁴ analisaram a expressão do gene *TAC3* em diferentes tecidos humanos. Nesse trabalho foi demonstrada uma grande expressão de *TAC3* no

cérebro, placenta, testículos e rim; também sendo expressa de forma significativa, mas em níveis menores, na próstata, medula óssea, glândula salivar, músculo esquelético, timo e glândula suprarrenal. A expressão de *TAC3* foi indetectável no cerebelo, no fígado e no baço. Em relação à expressão do *TACR3*, a mesma foi detectada de forma intensa no cérebro, rim, pulmão, placenta e músculo esquelético, também sendo detectada em níveis um pouco menores na próstata e nos testículos. Uma baixa expressão foi observada no cerebelo, tireóide, glândula suprarrenal e salivares, timo, coração, fígado e traquéia¹²⁴.

1.5 Neurocinina B e Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado Normósmico

A primeira evidência do envolvimento da neurocinina B com o controle central do eixo reprodutivo ocorreu no início de 2009⁸⁸. Topaloglu *et al.*⁸⁸ realizaram uma extensa análise de polimorfismos do genoma humano em nove famílias Turcas consanguíneas, nas quais múltiplos membros apresentavam HHI normósmico. Em três famílias estudadas, uma região de homozigose localizada no braço longo do cromossomo 4 mostrou segregação com o fenótipo de HHI. O alinhamento gênico dos seis indivíduos afetados dessas três famílias refinou um intervalo cromossômico de 102,20-104,94 Mb, o qual compreendeu cerca de 20 genes. Dentre estes, o gene *TACR3* foi escolhido para análise. Essa escolha foi baseada em estudos anteriores que mostravam um alta expressão desse peptídeo em neurônios hipotalâmicos que

expressavam a kisspeptina, a qual é sabidamente envolvida com o controle da secreção de GnRH¹²⁵. Nesse primeiro trabalho, duas mutações em homozigose no NK3R, p.G93D e p.P353S, foram identificadas em todos os indivíduos afetados das famílias 1 e 2, respectivamente, não sendo encontradas nos indivíduos não afetados dessas famílias⁸⁸. Nenhuma dessas mutações foram identificadas em 100 indivíduos controles étnicos (Turcos para a família 1 e Curdos para as famílias 2 e 3), bem como nas outras seis famílias submetidas à análise de polimorfismos, e em 50 pacientes com HHI normósmico de outros grupos étnicos⁸⁸. Estudos *in vitro* mostraram que ambos os receptores mutados, p.G93D e p.P353S, apresentaram redução na resposta à estimulação pela NKB, indicando um possível prejuízo na sinalização celular⁸⁸.

Em outra família, na qual as mutações no gene *TACR3* haviam sido excluídas, foram identificadas duas regiões de autozigue nos indivíduos afetados dessa família. Essas regiões, de 125,7-130,4 Mb no cromossomo 4, e de 54,5-57,6 Mb no cromossomo 12, compreendiam 21 e 102 genes, respectivamente, na qual o candidato mais promissor para estudo foi o gene *TAC3* codificador da neurocinina B propriamente dita⁸⁸. O estudo da NKB evidenciou uma nova variante em homozigose, p.M90T, na região C-terminal do peptídeo maduro, nas duas irmãs afetadas dessa família. Os pais e a irmã não afetados foram heterozigotos para a mutação, e a mesma não foi detectada em 100 indivíduos controles de origem turca analisados. O peptídeo mutante amidado, o qual se acredita ser a forma que ocorre *in vivo*, mostrou uma severa redução na sua capacidade de estimular o NK3R quando comparado à NKB selvagem⁸⁸.

A análise fenotípica dos pacientes com mutações em homozigose nos genes *TAC3/TACR3* mostrou que todos os indivíduos afetados apresentavam uma evidente

falha na progressão puberal normal com valores baixos de esteróides sexuais e pré-puberais de gonadotrofinas circulantes⁸⁸. Além disso, todos os homens afetados apresentavam micropênis, sugerindo uma falha na ativação normal do eixo reprodutivo intrauterino e perinatal¹²⁶.

Em 2009, Guran *et al.*⁹² identificaram uma nova mutação no gene *TACR3*, p.H148L, em uma família turca consanguínea, na qual três membros apresentavam HHI normósmico. A mutação foi identificada em homozigose nos três indivíduos afetados dessa família, não sendo encontrada em 117 indivíduos controles⁹². Estudos funcionais demonstraram um claro prejuízo de sinalização celular em resposta a NKB. Além disso, pelo fato da mutação estar localizada na porção extracelular do receptor, os autores testaram a hipótese de que o defeito primário dessa mutação poderia ser na ligação da NKB ao receptor, e com isso um análogo da NKB, *senktide*, o qual apresenta uma estrutura química diferente da NKB selvagem, poderia ter habilidade em estimular o receptor da neurocinina B mesmo quando mutado. No entanto, a resposta obtida com o uso de *senktide* foi semelhante ao uso da NKB, evidenciando um significativo prejuízo da atividade do receptor mutado em comparação ao selvagem⁹².

A descrição clínica dos pacientes com a mutação p.H148L mostrou um típico fenótipo de HHI, com valores reduzidos de esteróides sexuais e pré-púberes de gonadotrofinas. Os dois homens afetados apresentavam micropênis, sendo que um deles relatou a ocorrência de criptorquidia, a qual se resolveu espontaneamente aos dois anos de idade. A mulher afetada apresentava amenorréia primária, mamas e pêlos pubianos estágio Tanner 1. Todos os pacientes apresentavam inteligência normal e nenhum defeito olfatório⁹².

Em 2010, Young *et al.*⁹³ agregaram mais informações ao estudo do sistema NKB/NK3R. Os autores identificaram uma substituição de G por C no sítio acceptor de *splicing* do íntron 3 do gene *TAC3* (c.209-1G>C) em homozigose em três indivíduos não relacionados. Descreveram ainda em homozigose, uma segunda substituição no sítio acceptor de *splicing* do íntron 2 do gene *TACR3* (c.738-1G>A) em três irmãos. Essas variantes levaram a deleção da NKB (c.209-1G>C) e geraram um receptor truncado sem função (c.738-1G>A), respectivamente. É importante ressaltar que essas novas variantes nos genes *TAC3* e *TACR3* foram encontradas em indivíduos de diferentes grupos étnicos, tais como em indivíduos do Haiti, República Democrática do Congo e Senegal, demonstrando com isso que essa nova causa de HHI pode afetar pessoas de diferentes origens étnicas, não sendo restrita a um grupo particular, como se acreditava anteriormente. Essas novas variantes foram rastreadas em 100 sujeitos controles eugonádicos, bem como em 150 controles não relacionados com HHI esporádico, não sendo identificadas em nenhum dos indivíduos estudados⁹³.

Os pacientes afetados pelas mutações nos genes *TAC3* e *TACR3*, c.209-1G>C e c.738-1G>A, respectivamente, apresentaram um claro fenótipo de HHI com tamanho testicular reduzido, esparsos pêlos pubianos e micropênis nos homens; presença de amenorréia primária e ausência de desenvolvimento mamário nas mulheres⁹³. Na maioria dos pacientes descritos nesse estudo foi observada uma dissociação entre os valores baixos de LH e os valores normais ou quase normais de FSH, com esta gonadotrofina respondendo excessivamente ao teste de estímulo de GnRH. Esse dado sugeriu a possibilidade de que uma alteração neuroendócrina específica envolvendo a

secreção de GnRH poderia ocorrer em pacientes com alteração na via de sinalização da NKB⁹³.

Ainda em 2010, Fukami *et al.*⁹⁰ identificaram 2 novas variantes em heterozigose composta no gene *TACR3* (p.Y145* e IVS1+delG) em uma paciente japonesa do sexo feminino com HHI normósmico. O estudo de segregação familiar mostrou que o pai da paciente era heterozigoto para a alteração p.Y145*, e a mãe heterozigota para a alteração IVS1+delG. Essas variantes não foram identificadas em outros 56 casos de HHI. Análise *in silico* da alteração IVS1+delG mostrou que a mesma causa uma adição de 1,153 pb na região intrônica do éxon 1, com consequente formação de um novo sítio de *splicing* entre a inserção e o sítio de *splicing* normal do éxon 2, levando a uma terminação prematura da transcrição gênica⁹⁰.

O fenótipo da paciente portadora das variantes em heterozigose composta era característico de HHI normósmico, com amenorréia primária, mamas estágio puberal Tanner 1, pêlos pubianos estágio Tanner 2, e valores baixos de gonadotrofinas e estradiol. A paciente foi avaliada após descontinuação da terapia de esteróides sexuais, e os dados hormonais foram consistentes com o quadro de HHI normósmico. Um teste de estímulo com GnRH após descontinuação da terapia hormonal foi realizado, e mostrou uma resposta gonadotrófica baixa; porém quando realizado após reposição de GnRH (100 µg intramuscular por 5 dias consecutivos) revelou uma resposta gonadotrófica satisfatória. A mãe da paciente, portadora da alteração IVS1+delG, teve menarca aos 14,6 anos, apresentando ciclos menstruais regulares, mas longos ao longo da vida. Para engravidar, ela foi submetida a dois ciclos de estimulação ovariana com citrato de clomifeno. A menopausa ocorreu aos

56 anos de idade. O pai portador da alteração p.Y145X era saudável e não apresentava nenhuma alteração do desenvolvimento puberal. Diante dos resultados, os autores sugeriram que uma disfunção hipotalâmica seria a causa primária de HHI em pacientes com alterações bialélicas no gene *TACR3* e manifestações clínicas características de HHI⁹⁰.

Recentemente, Francou *et al.*⁸⁹ estudaram 173 pacientes com HHI normósmico, e identificaram 8 variantes no gene *TACR3* (p.Q161HfsX23, p.R230H, p.Y247LfsX4, p.Y267N, p.W275*, p.K286R, p.M306I, p.Q335*) e uma variante no gene *TAC3* (p.P73IfsX9) em nove pacientes com HHI normósmico, as quais não foram identificadas em 200 indivíduos controles estudados. Das variantes identificadas, duas foram descritas anteriormente (p.Y247LfsX4 e p.P73IfsX9)⁹³, e duas são consideradas recorrentes (p.W275* e p.K286R), sendo as outras 5 variantes originais. Nesse trabalho, os autores focaram o estudo em 5 indivíduos de 3 famílias que apresentaram alterações bialélicas no gene *TACR3* (famílias 1, 2 e 3 descritas posteriormente). Os indivíduos portadores das variantes anteriormente descritas (p.Y247LfsX4 e p.P73IfsX9)⁹³, assim como os indivíduos portadores das variantes p.R230H, p.K286R, e p.M306I, as quais os estudos de modelagem molecular não sugeriram consequências funcionais para o NK3R não foram detalhadamente descritos no trabalho⁸⁹.

Na família 1, foi identificada uma nova variante em homozigose no gene *TACR3* (p.Q161HfsX23) em três irmãs afetadas, sendo encontrada em heterozigose no pai não afetado. Estudos *in silico* mostraram que essa variante leva a formação de um *frameshift* e um receptor truncado após o terceiro domínio transmembrana, com consequente efeito deletério para a função do NK3R. Nas famílias 2 e 3 foram

identificadas três variantes no gene *TACR3* em heterozigose composta (p.W275* e p.Q335*; p.W275* e p.Q335X; p.Y267N e p.W275*). Estudos de modelagem molecular, mostraram que a alteração p.Y267N afeta a conformação do quinto domínio transmembrana do receptor, a qual foi confirmada por estudos *in vitro* que mostraram que a sinalização do NK3R dependente da via da MAP quinase estava alterada⁸⁹.

As três irmãs afetadas da família 1 foram avaliadas pela primeira vez com idade variando de 19-24 anos. Todas apresentaram um claro fenótipo de HHI normósmico com desenvolvimento puberal incompleto, idade óssea atrasada, valores baixos de estradiol, muito baixos de LH, e normais de FSH. O caso índice da família 2 foi avaliado primariamente aos 8 anos de idade. Nessa ocasião, ele apresentou ao exame físico micropênis e criptorquidismo bilateral, o qual foi corrigido cirurgicamente aos 19 anos de idade. A avaliação hormonal ao diagnóstico (8 anos de idade) confirmou os achados de HHI normósmico com valores baixos de testosterona, baixos de LH, porém normais de FSH. O paciente foi reavaliado recentemente aos 46 anos de idade, após 4 meses de interrupção do tratamento androgênico, e mostrou novamente valores reduzidos de testosterona e LH, e valores normais de FSH. Na família 3, o caso índice foi avaliado inicialmente aos 20 meses de idade, apresentando na ocasião micropênis e criptorquidismo unilateral direito, o qual foi corrigido cirurgicamente aos 9 anos de idade. Na ocasião (20 meses) a análise hormonal revelou valores baixos de testosterona e LH, e valores normais de FSH. Aos 18 anos ele foi reavaliado e mostrou mais uma vez sinais típicos de HHI normósmico, com valores baixos de testosterona e LH, e valores normais de FSH⁸⁹.

Um dado que chama a atenção na análise hormonal dos pacientes anteriormente descritos é a secreção de LH fraca e não pulsátil, porém com valores preservados de FSH. Esse fato, o qual foi descrito anteriormente por Young *et al.*⁹³, sugere a existência de uma secreção endógena de GnRH de baixa frequência e possivelmente de baixa amplitude. No entanto, os mecanismos responsáveis pela baixa pulsatilidade da secreção de GnRH na circulação porta-hipofisária a favor da secreção de FSH pelas células gonadotróficas da hipófise anterior ainda não foram elucidados. Os autores sugeriram que o índice FSH/LH poderia ser útil para o rastreamento de indivíduos com HHI normósmico e mutações nos genes *TAC3* e *TACR3*⁸⁹.

1.6 Neurocinina B e Secreção de GnRH

A primeira indicação do papel da NKB no eixo reprodutivo surgiu de estudos que compararam a expressão gênica hipotalâmica de mulheres na pré menopausa e mulheres na pós menopausa¹²⁷. Estudos mostraram que mulheres na pós menopausa apresentam neurônios hipertrofiados e um aumento na expressão do gene *TAC3* no núcleo arqueado, na qual o receptor alfa de estrogênio (ER α), essencial para o mecanismo de *feedback* negativo do estrogênio, é coexpresso^{128, 129}. Outro estudo mostrou que a reposição de estrogênio suprime a expressão do gene *TAC2* (ortólogo humano do *TAC3*)¹³⁰. Além disso, foi demonstrado que neurônios contendo NKB são

sexualmente dimórficos¹³¹ e a expressão de NKB varia de acordo com o ciclo estral em ratos¹³².

Sabe-se que a kisspeptina é um regulador positivo da secreção de GnRH. Muitas similaridades entre a sinalização da kisspeptina e da neurocinina B foram observadas. A principal semelhança entre essas duas vias foi que assim como os neurônios que contém NKB, os neurônios que contém kisspeptina no núcleo arqueado também estão relacionados com o mecanismo de *feedback* negativo do estrogênio¹³³. Neurônios contendo *KISS1* também expressam *ERα*, e ambas as expressões de *KISS1* e *TAC3* são suprimidas no núcleo arqueado pela reposição de estrogênio¹³³. Assim como visto na NKB, mulheres na pós-menopausa, bem como macacas ovariectomizadas mostram um relativo aumento na expressão do gene *KISS1*¹³⁴.

Goodman *et al.*¹²⁵ demonstraram que neurônios contendo kisspeptina no núcleo arqueado de ovelhas expressam NKB e dinorfina (Dyn). Esse mesmo padrão de expressão foi observado em camundongos¹³⁵ e ratos¹³⁶. Notavelmente, esses três neurônios co-expressam o receptor da NKB (NK3R), sugerindo um papel na coordenação da atividade dos neurônios que contêm NKB/Dyn/KISS1 no núcleo arqueado¹³⁵. Krajewski *et al.*¹³⁶ identificaram 4 grandes vias de projeção dos neurônios que contêm NKB em ratos: projeções locais dentro do núcleo arqueado bilateralmente; projeções para a eminência média, incluindo a zona pálida lateral; projeções para a via periventricular; e projeções do trato hipotalâmico ventral para o hipotálamo lateral e medial. Esse estudo sugeriu um circuito anatômico que consiste de neurônios interconectados responsivos aos esteróides sexuais no núcleo arqueado. A presença de receptores NK3R no núcleo arqueado e também na eminência média,

sugere que comunicações entre essas vias ocorrem através do sistema NKB-NK3R¹³⁷.

Axônios contendo NKB e GnRH estão em aposição, e a expressão de NK3R foi identificada nos axônios contendo GnRH na eminência média, na qual estudos ultra-estruturais mostraram que varicosidades que apresentam NKB estão em contato direto com axônios que contêm GnRH sem a presença de sinapses clássicas¹³¹. Estes dados sugerem que a NKB pode modular a secreção de GnRH por meio de uma transmissão não sináptica, um mecanismo comum de sinalização peptídica¹³⁸. A convergência dos axônios contendo GnRH na eminência média é postulada como o sítio final de coordenação e sincronização da secreção pulsátil de GnRH, a qual é requerida para o início da puberdade. Juntos, esses estudos sugerem que uma rede de neurônios responsivos aos esteróides sexuais no núcleo arqueado co-expressam NKB, kisspeptina, Dyn e Era e provavelmente comunicações via NKB-NK3R desses neurônios projetam-se contralateralmente a eles mesmos, bem como para as terminações contendo GnRH na eminência média, a fim de levar a uma secreção sincronizada e intermitente de GnRH¹³⁷. Recentemente, Navarro *et al.*¹³⁵ propuseram um modelo de ação deste sistema, na qual a NKB e a Dyn agiriam autossinapticamente nos neurônios kisspeptina no núcleo arqueado para sincronizar a secreção pulsátil de kisspeptina e levar a secreção de GnRH nas fibras da eminência média (**Figura 4**).

Figura 4 - Representação esquemática do papel dos neurônios contendo KISS1/Dyn/NKB na geração dos pulsos de GnRH. De acordo com esse modelo, os neurônios que contêm KISS1/Dyn/NKB seriam estimulados pela NKB e pela Dyn, com o intuito de sincronizar a secreção pulsátil de kisspeptina e levar a secreção de GnRH nas fibras da eminência média, as quais são responsivas a kisspeptina e a NKB por meio dos receptores KISS1R e NK3R, respectivamente.

Apesar dessa aparente relação funcional entre a NKB e o GnRH, camundongos *knockout* para o gene *TACR3* foram inicialmente descritos como sendo saudáveis e férteis¹³⁹. Essa aparente discordância entre o fenótipo observado em humanos e roedores pode ser devido ao fato de que mais de 20% dos genes humanos essenciais tem ortólogos não essenciais em camundongos, e mutações em humanos e ortólogos murinos frequentemente resultam em diferentes fenótipos¹⁴⁰. No entanto, esses primeiros camundongos *knockout* foram gerados para estudar o desempenho cognitivo e de ansiedade de animais com deleção do gene *TACR3*. Dessa forma,

nesse relato inicial não havia um foco no sistema reprodutivo dos animais, o que poderia subestimar os efeitos reprodutivos existentes. Diante disso, Yang *et al.*¹⁴¹ exploraram o fenótipo reprodutivo dos camundongos *knockout* para o gene *TACR3*. Nesse recente estudo, os autores confirmaram que os marcadores de maturação sexual desses animais, tais como idade de separação prepucial e primeiro ciclo estral, estavam normais, porém os autores relataram consideráveis alterações no fenótipo reprodutivo desses animais após 60 dias de nascimento¹⁴¹. Os camundongos machos *knockout* exibiram testículos reduzidos e valores baixos de FSH quando comparados aos camundongos machos selvagens. Por outro lado, as fêmeas *knockout* mostraram um baixo peso uterino e ciclos estrais anormais. Aproximadamente metade das fêmeas não teve corpo lúteo detectável na histologia ovariana após 60 dias de vida. Apesar desse aparente defeito ovulatório, todas as fêmeas alcançaram a fertilidade quando colocadas em contato com os machos. No entanto, as fêmeas *knockout* foram consideradas subférteis, pois produziram um número reduzido de ninhadas, e um número reduzido de filhotes por ninhada. Os autores mostraram ainda, que a subfertilidade desses animais parece não ser devido a um defeito ovariano direto, visto que os mesmos responderam significativamente a administração de gonadotrofinas exógenas, sugerindo um defeito reprodutivo de origem central¹⁴¹. Até o presente momento não existem *knockouts* para o gene *TAC2* (ortólogo do *TAC3* humano)¹³⁹.

Vários trabalhos têm descrito a ação da NKB na secreção de LH. O primeiro desses estudos não encontrou efeito da administração intracerebroventricular de NKB em ratos¹⁴². No entanto, dois outros grupos observaram que a administração de NKB ou *senktide*, análogo da NKB, via intracerebroventricular levou a um

decréscimo da secreção de LH em ratos¹⁴³ e camundongos¹³⁵. Esses resultados não são consistentes com o papel positivo que a NKB parece exercer na secreção de GnRH por estudos realizados em humanos recentemente⁸⁸. A possível explicação para isso pode ser o fato de que a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal difere entre roedores e primatas⁶. Nesse sentido, McManus *et al.*¹⁴⁴ mostraram um efeito estimulatório da NKB sobre a secreção de GnRH em ovelhas.

Um recente estudo em roedores machos sugeriu uma complexa relação entre NKB e kisspeptina na secreção de GnRH/LH. A administração periférica ou intracerebroventricular de NKB em camundongos machos não teve efeito nos valores de LH, porém a administração de kisspeptina via intracerebroventricular aumentou significativamente a secreção de LH quando comparado ao controle. Interessantemente, a administração conjunta de kisspeptina e NKB causou um aumento significativo nas concentrações de LH, quando comparada somente a kisspeptina. Em extratos hipotalâmicos de ratos, a NKB falhou em estimular a secreção de GnRH, enquanto que a kisspeptina aumentou consideravelmente a secreção de GnRH. Além disso, a co-administração de NKB com kisspeptina anulou o efeito isolado da kisspeptina, com pouco estímulo à secreção de GnRH basal¹⁴⁵.

A atividade neural do GnRH é suprimida durante o período de lactação¹⁴⁶, a qual pode ser considerada como um estado de hipogonadismo hipogonadotrófico. Ambas as expressões de kisspeptina e NKB são reduzidas durante a lactação de roedores. Comparações de resposta da *KISS1/KISS1R* e *TAC2/TACR3* no comportamento alimentar de camundongos, jejum e jejum tratado com leptina, demonstraram que o estado nutricional não tem efeito na expressão de *KISS1* dentro do núcleo arqueado. No entanto, o jejum causou um aumento de cerca de 2,5 vezes

na expressão de *TAC2*, a qual foi quase completamente revertida com leptina, um hormônio derivado do tecido adiposo que regula o consumo alimentar, o gasto de energia e a função reprodutiva no hipotálamo¹⁴⁵. Esse dado sugere que os neurônios NKB possam ter uma função de integração do eixo reprodutivo com múltiplos processos homeostáticos e metabólicos¹³⁶.

Diante de tudo o que foi exposto, e considerando que variantes raras em genes comumente associados ao HHI foram identificadas em pacientes com condições distintas ao hipogonadismo, tal como amenorréia primária funcional¹⁴⁷, podemos inferir que mutações nesses mesmos genes poderiam ser identificadas em pacientes com outros fenótipos reprodutivos relacionados com a secreção de GnRH.

Como descrito anteriormente, a neurocinina B exerce seus efeitos mediante a ligação a um receptor de membrana específico acoplado a proteína G (NK3R). Recentemente, Teles *et al.*³³ descreveram uma mutação ativadora no *KISS1R*, um receptor acoplado a proteína G, em uma paciente com PPDG; posteriormente Silveira *et al.*³⁴ também descreveram uma mutação ativadora no *KISS1* em um paciente com PPDG. Dessa forma, será que mutações de ganho de função em pacientes com PPDG não poderiam ser identificadas na NKB e no NK3R? Além disso, considerando o retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento como um fenótipo intermediário de HHI, não seria razoável supor que pacientes com essa condição pudessem apresentar alterações em genes previamente relacionados à etiologia do HHI? Diante de todos esses questionamentos, percebemos a necessidade de mais estudos sobre o papel na NKB no controle central do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, a fim de elucidar o seu papel na fisiopatologia dos distúrbios puberais centrais idiopáticos.

2 OBJETIVOS

1. Identificar mutações ativadoras e/ou polimorfismos nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas.
2. Identificar mutações inativadoras e/ou polimorfismos nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes com retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento e/ou com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico.
3. Caracterizar os efeitos das novas mutações nos genes *TAC3* e *TACR3* em pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos, e estabelecer a correlação entre o genótipo mutante e o fenótipo observado nos pacientes.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (aprovação nº 0219/09) foi concedido aos pacientes ou responsáveis.

3.2 Pacientes

Duzentos e trinta e sete pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos foram estudados: 114 pacientes com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas (PPDG), 50 pacientes com retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento (RCCD), e 73 pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico (HHI). Os pacientes com PPDG foram selecionados do Serviço de Endocrinologia do HCFMUSP da cidade de São Paulo, Brasil; e da Unidade de Endocrinologia Reprodutiva e Ciências Reprodutivas do Hospital Geral de Massachussets, Boston, EUA. Por outro lado, os pacientes com RCCD foram provenientes do Serviço de Endocrinologia do HCFMUSP da cidade de São Paulo, Brasil. Os pacientes com HHI normósmico foram selecionados dos Serviços de Endocrinologia do HCFMUSP da cidade de São Paulo e de Ribeirão Preto, bem como do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil. Um grupo controle constituído de 150 indivíduos adultos de ambos os sexos,

que não apresentaram anormalidades no desenvolvimento puberal também foi estudado.

No grupo de 114 pacientes com PPDG, 107 eram do sexo feminino (93,9%) e 7 eram do sexo masculino (6,1%). Os critérios clínicos e laboratoriais para inclusão dos pacientes com PPDG no estudo foram: início dos caracteres sexuais secundários antes dos 8 anos nas meninas e dos 9 anos e meio nos meninos, concentrações de LH puberais em condição basal e/ou após estímulo com GnRH exógeno, e ressonância magnética (RM) do sistema nervoso central sem anormalidades.

Do total de pacientes com PPDG, estavam disponíveis os dados clínicos completos de 72 pacientes brasileiros. Destes, 14 pacientes pertencentes a 10 famílias apresentaram a forma familiar de puberdade precoce central (19%) e cinquenta e oito apresentaram a forma esporádica de PPDG (81%). Nesse grupo, a idade cronológica (IC) média de início do aparecimento dos caracteres sexuais secundários foi de $5,2 \pm 2,1$ anos (0-9 anos) e a mediana foi de 6 anos. O estágio de desenvolvimento mamário variou de 2 a 5 e o estágio de pêlos pubianos variou de 1 a 5, de acordo com os critérios de Tanner e Marshall^{148, 149}. Os pacientes do sexo masculino apresentaram diâmetro testicular superior a 2,5 cm ou volume testicular maior que 4 mL ao diagnóstico. As **Tabelas 2 e 3** resumem os achados clínicos dos 72 pacientes brasileiros com PPDG.

No grupo de 50 pacientes com RCCD, 11 eram do sexo feminino (22%) e 39 do sexo masculino (78%). Os critérios de inclusão dos pacientes foram o início espontâneo da puberdade após os 13 nas meninas e 14 anos nos meninos, idade óssea atrasada em relação a idade cronológica e desenvolvimento normal da puberdade após o seu início. Do total de pacientes, 11 apresentaram história familiar de atraso

puberal (7 meninos e 4 meninas). Os dados clínicos completos de 26 pacientes estavam disponíveis. Nesse grupo de pacientes, a média de idade cronológica de início da puberdade foi de $14,8 \pm 1,0$ (13-16,5 anos) e a mediana foi de 14,7 anos. As **Tabelas 4 e 5** resumem os achados clínicos completos de 26 pacientes com RCCD.

Setenta e três pacientes com HHI normósmico foram estudados, dos quais 26 eram do sexo feminino (36%) e 47 do sexo masculino (64%). Os critérios de inclusão dos pacientes no estudo foram a falta de aparecimento ou desenvolvimento incompleto de caracteres sexuais secundários após os 18 anos em ambos os sexos, concentrações baixas de esteróides sexuais (testosterona ou estradiol) para o sexo e idade, associados a concentrações séricas de LH e FSH baixas ou inapropriadamente normais, função olfatória normal, ausência de deficiências hipofisárias combinadas, e RM da região hipotálamo-hipofisária sem evidências de anormalidades. Do total de pacientes, 12 apresentaram história familiar da doença (16,4%), e 61 apresentaram a forma esporádica (83,6%).

Dos 73 pacientes estudados com HHI normósmico, foram disponíveis os dados clínicos completos de 59 pacientes. A idade cronológica média ao diagnóstico foi de $24,1 \pm 8,1$ anos (15-49 anos) e a mediana foi de 20,5 anos. Nos pacientes do sexo masculino, todos os pacientes apresentaram queixa de hipodesenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Criptorquidia unilateral ou bilateral e ginecomastia foram evidenciadas em 23,1% e 20,5% desses pacientes, respectivamente. Nas pacientes do sexo feminino, desenvolvimento mamário espontâneo, parcial ou completo esteve presente em 45,6% das pacientes. As **Tabelas 6 e 7** resumem os achados clínicos de 59 pacientes com HHI normósmico.

Tabela 2. Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com PPDG.

ID	Sexo	IC (Início da Puberdade)	IC (Início do Tratamento)	IO (Anos)	DP (Estatura)	Mamas*	PP*	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	LH pós GnRH (U/L)	LH pós acetato de leuprolide (U/L)	HFAM
1	F	5,8	6,8	11	2,46	4	2	1,9	6,2	53,3	31,5		F
2	F	4,5	10,3	11	-0,1	4	5	4,2		98,8			F
3	F	6,8	9,1	11	0,7	3	4	2,2	4,6	<13			F
4	F	5,5	8,1	11	1,21	3	4	1	1,9	17,4		8,8	F
5	F	5	8,3	11	1,9	4	1	1,7	3,9	34,6		34,1	F
6	F	4,5	6,11	7,1	1,97	3	1	<0,6	1,6	<13	11,4		F
7	F	6	7,3	9	1,5	3	3	<0,6		<13	8,1		
8	F	4	5,3	6,1	1,25	3	1	<0,6	2	<13	16,9	13,4	
9	F	6,2	8,7	12	2,1	4	4	1,2		19,8			
10	F	0	2,8	6,1	2,8	3	1	3	4,4	4,4	30		
11	F	0,75	1,8	2	0	4	3	1,1	4,3	60,4	21	13,1	
12	F	3,2	3,5	7,7	2,26	4	1	5	9,8	<13	89,7		
13	F	6,2	6,6	10	1,2	2	1	0,7		45	7,5		
14	F	4	7,3	11	3,13	3	2	0,9		<13			
15	F	2	4,9	8,1	3,3	4	1	0,7	1,5	19,1	18,8		
16	F	6,2	7,11	9	1,47	2	2	<0,6	5,5	7	9,5		
17	F	5	9,1	12	0,25	4	3	<0,6	1,7	<13		13,2	
18	F	3	6,6	8,1	3,96	4	3	<0,6	3,7	<13	4,2	10	F
19	F	6,5	8,08	12	2,5	3	3	1,5		21,1	76,9		
20	F	6	8	10	3,05	4	4	1	5,9	15	12		

continua

Tabela 2. Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com PPDG (continuação).

ID	Sexo	IC (Início da Puberdade)	IC (Início do Tratamento)	IO (Anos)	DP (Estatura)	Mamas*	PP*	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	LH pós GnRH (U/L)	LH pós acetato de leuprolide (U/L)	HFAM
21	F	3,2	5,17	12	3,5	4	3	4,9		14	23,7		
22	F	6,8	7,8	7,1	0,9	3	2	2	2	<6,8	20	23	
23	F	6,8	7,1	8,1	-0,15	3	3	10,3	4,5	<10	41		
24	F	4	6,1	12	3,22	4	3	6,1	4,7	62			
25	F	2	7,7	12	3,23	2	3	2,6	6	21	9,8		
26	F	2	4,1	8	2,4	3	1	3,8	16,3	23	28,8*		
27	F	4	8,7	11	0,63	4	2	0,5	1	22	6,4	8,5	F
28	F	4	7,1	11	1,78	3	2	<0,6	<1,0	<13	x	4,2	
29	F	6	8,9	12	1,86	5	4	1,5	5,9	62,2	13,5		
30	F	6	8	11	0,5	2	2	<0,6	1,3	20	8		
31	F	6	8,3	12	0,14	3	2	<0,6	2,7	13,4	5,3	12	
32	F	4,9	5	6	x	2	1	<0,5	2,1	<10	7,8		
33	F		6,8	7,8	1,2	3	1	3,5	x	<10	35		
34	F	7	8	12	1,9	4	3	1,2	4,1	20,5		50,4	
35	F	7	8,9	11	0,9	3	3	1,2	1,8	13,1	19		
36	F	5,5	7,7	7,1	1,7	3	1	<0,6	1,5	<13			F
37	F	7	8,11	11	0,78	3	4	0,01	2	4	8		
38	F	8,4	9,5	12	2,1	4	5	5,4	4,4	53,4			

continua

Tabela 2. Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com PPDG (continuação).

ID	Sexo	IC (Início da Puberdade)	IC (Início do Tratamento)	IO (Anos)	DP (Estatura)	Mamas*	PP*	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	LH pós GnRH (U/L)	LH pós acetato de leuprolide (U/L)	HFAM
39	F	2,8	4,3	6,1	1,16	4	1	0,6	4,2	18,2	13,5		
40	F	6	9,1	11	-1	4	3	0,8	3,5	22,2			
41	F	7,5	8,6	12	2,38	3	3	1,1	5,6	35		10,3	
42	F	7,3	8	11	4	3	3	1,5	2,7	<13		45,8	
43	F	6,8	8,3	11,6	2,26	4	3	1,5	5,6	46,3			
44	F	6,8	7,6	8,1	1,3	3	1	1,2	3,9	15	27,6		
45	F	5	7,8	11,5	2,1	4	1	1,6	2,8	26,8	29,4		
46	F	5	6,1	10	1,6	4	3	1,6	4,7	29		23,5	F
47	F	6	7,1	11	3,4	3	3	<0,6	1,2	<13	6,9	7,7	
48	F	7	8	11	1,7	3	1	0,4	3,4	3,8	9,9		F
49	F	6	6,9	7,1	0,5	3	2	1,6	4,6				
50	F	7	9,9	11	0	4	3	3,7	3,6	16			
51	F	5	9,1	12	1,92	3	3	0,9	4,1	22		27,8	
52	F	6	8,6	10	10,1	4	3	<0,6	3	<13	24		
53	F	6	7,7	11	1	3	2	<0,6	<1,0	14,4	36		F
54	F	7,7	8,3	11	1,08	3	3	<0,6	4,2	31		17,6	F
55	F	7,6	7,9	8,1	1,42	3	2	1	5,3	69,9			
56	F	6,9	7,4	8,1	2,18	4	2	0,1	3,7	20,9	16,91	16	F

continua

Tabela 2. Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com PPDG (conclusão).

ID	Sexo	IC (Início da Puberdade)	IC (Início do Tratamento)	IO (Anos)	DP (Estatura)	Mamas*	PP*	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	LH pós GnRH (U/L)	LH pós acetato de leuprolide (U/L)	HFAM
57	F	8	9,5	11	-0,7	3	1	<0,6	2,1	<13		16,3	
58	F	7	9,1	11	1,8	4	3	0,7	3,6	30	5,1		
59	F	7	8,3	11	0,9	3	2	0,6	3,5	46			
60	F	0	8,4	11	0,9	4	1	1,3	3	14,6	15,1		
61	F	7,9	8	11		3	2	<0,6	<1	13	20,4	8,3	
62	F	2,5	3,9	6		3	1	3,8	7,8	<13	15,3		
63	F	6,6	10,3	12	2,1	4	4						
64	F	6	8,4	11	2,29	2	3	<0,6	1,4	<13	11,3		
65	F	7	7,8	11	2,52	3	3	1,2	3,4	35,2		17,9	
66	F	0	5,1	4,1	1,14	4	1	<0,6	4,57	15,9	11,37		
67	F	7,5	7,1	11	2,17	4	4	0,4	2,3	23			
68	F	1,3	2,3	2,5	1,5	4	1	<0,6	1,7	<13	8,8		

ID: identificação; IC: idade cronológica de início da puberdade e idade cronológica de início de tratamento; IO: idade óssea; DP: desvio padrão da estatura (cm); Mamas: estádios segundo os critérios de Tanner; PP: pêlos pubianos (estádio segundo os critérios de Tanner); E2: estradiol; T: testosterona; HFAM: história familiar; F: herança familiar. * Exame realizado por radioimunoensaio (RIE). As demais dosagens hormonais foram realizadas por IFMA.

Tabela 3. Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com PPDG.

ID	Sexo	IC (Início da Puberdade)	IC (Início do Tratamento)	IO (Anos)	DP (Estatura)	Pênis (cm)	PP*	LH (U/L)	FSH (U/L)	T (ng/dL)	LH pós GnRH (U/L)	LH pós acetato de leuprolide (U/L)	HFAM
69	M	2	5,1	13	4,36	10,5	4	1,1	1,1	92		17,7	
70	M	1	1,5	2,8	0,5	2	2	11,5*	8,3*	600	47,2*		
71	M	6	8,1	10	0,83	8	1	1,18	1,53	116		14,1	
72	M	8	10,75	13,6	1,4	9	4	1,7	1,8	312			

ID: identificação; IC: idade cronológica de início da puberdade e idade cronológica de início de tratamento; IO: idade óssea; DP: desvio padrão da estatura em cm; PP: pêlos pubianos (estádios segundo os critérios de Tanner); E2: estradiol; T: testosterona; HFAM: história familiar; F: herança familiar. * Exame realizado por radioimunoensaio (RIE). As demais dosagens hormonais foram realizadas por IFMA.

Tabela 4. Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com RCCD.

ID	Sexo	IC (Início puberdade)	DP (Estatura)	IO (anos)	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)	HFAM
1	F	13,0	-2,1	10,2	<0,6	2,3	<13	F
2	F	13,4	-3,1	11	0,6	4,9	19,1	F
3	F	13,9	-2,28	11	1,3	3,7	<13	F
4	F	13,0	-3,5	11	<0,6	2,7	77	F

ID: identificação; IC: idade cronológica de início da puberdade; DP: desvio padrão da estatura em cm; T: testosterona; HFAM: história familiar; F: herança familiar. As dosagens hormonais foram realizadas por IFMA.

Tabela 5. Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com RCCD.

ID	Sexo	IC (Início puberdade)	DP (Estatura)	IO (anos)	LH (U/L)	FSH (U/L)	T (ng/dL)	HFAM
5	M	16,0	-2,8	14	1,4	<1,0	63,0	
6	M	16,5	-4,8	11	0,9	<1,0	80	
7	M	14,0	-2,8	12,6	0,8	1,4	68	F
8	M	15,7	-3,3	12,5	1,2	1,6	138	
9	M	16,1	-4,1	11	<0,6	1,8	<14	
10	M	16,5	-4,7	11	1,7	4,8	263	
11	M	14,0	-2,7	12	0,7	1,1	29,0	F
12	M	14,4	-2,6	11	1,2	1,8	15	
13	M	16,4	-3,49	ND	0,6	1,5	<14	
14	M	14,7	-2	10	<0,6	1,3	13	
15	M	15,3	-2,14	11,5		ND	ND	F
16	M	14,3	-2,1	11	<0,6	1,2	<14	
17	M	15,1	-5,59	12,5	<0,6	1,8/1,6	<1	F
18	M	14,1	-2,7	12,9	1,9	2,4	146	F
19	M	14,8	-2,4	11	1	2,2	<14	F
20	M	15,8	-2,7	12,5	<0,6	1	<14	
21	M	14,5	-3,6	12	0,3	1,1	23	
22	M	14,0	-1,3	12,5	1,8	3,8	37	
23	M	15,9	-2,7	12,5	3,23	3,53	43	
24	M	15,0	-2,2	13	<0,6	1,2/1,8	<14	
25	M	14,1	-3,2	13	1,5	2,4	24	F
26	M	14,7	-3,8	12	0,1	1,5	<11	

ID: identificação; IC: idade cronológica de início da puberdade; DP: desvio padrão da estatura em cm; T: testosterona; HFAM: história familiar; F: herança familiar. As dosagens hormonais foram realizadas por IFMA.

Tabela 6. Características clínicas e hormonais das pacientes do sexo feminino com HHI normósmico.

ID	Sexo	IC (anos)	Estatura (cm)	DP (Estatura)	IO (anos)	PP*	Mamas*	LH (U/L)	LH p (U/L)	FSH (U/L)	FSH p (U/L)	E2 (pg/mL)
1	F	21	146	-2,7		4	1	<0,6	1,5	<1,0	2,8	15
2	F	20	159,8	-0,4	14	3	1	<0,6	5,1	1,5	5,5	<13
3	F	16	157	-0,8	10	5	1	<0,6	4,7	<1,0	5,2	<13
4	F	30	170,5	1,4		5	5	1,7	12,2	3	6,4	<6,8
5	F	19	154,9	-1,2	11	2	2	<0,6	1,4	<1,0	1,7	<13
6	F	28	159	-0,5		4	4	<0,6	0,9	<1,0	1,9	<13
7	F	17	160,2	-0,3	15	3	3	<0,7	3,8	<1,1	3,6	<13
8	F	19	161		13	2	1	<0,6	6	3,8	10,6	<13
9	F	32	165,5			1	1	1	11,5	1,7	4,8	<13
10	F	54				-	5	<0,6		<0,1		<14
11	F	18				2	1	3,6*	5,1*	2,6*	2,9*	11
12	F	22	158,5		11	2	1	<0,1	2,34	0,31	6,16	<5
13	F							0,65*	8,25*	2,46*	10,5*	5,83
14	F	30	148			4	4	4,15		5,2		27
15	F	15	148	-2,31	11	1	2	1,7		5,4		
16	F	31	166				3	<0,6	1,4	2	5,9	17
17	F	33	154			5	4	0,7	1,3	1	1,5	13,6
18	F	19	162		14	4	3	9*	45,8*	8,5*	26,6*	<50
19	F	27	169			4	3	<0,1		<1		
20	F	15	168		18	5	4	3,82		2,12		40,3
21	F	20	164			1	1	<0,6	4,2	<1,0	2,1	<13

ID: identificação; IC: idade cronológica ao diagnóstico; DP: desvio padrão da estatura em cm; IO: idade óssea; PP: pêlos pubianos (estádios segundo os critérios de Tanner); Mamas: estádios segundo os critérios de Tanner; LHp: pico de LH; FSHp: pico de FSH; E2:estradiol. *As dosagens hormonais foram realizadas por RIE (radioimunoensaio); As demais análises foram realizadas por IFMA.

Tabela 7. Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com HHI normósmico.

ID	Sexo	IC (anos)	Estatura (cm)	DP (Estatura)	IO (anos)	PP*	Mamas*	Pênis (cm)*	LH (U/L)	LH p (U/L)	FSH (U/L)	FSH p (U/L)	T (ng/dL)
22	M	17	160,1	-2,16	13,5	3	3	4,7	1,7	6,5	3,5	6,3	28,3
23	M	19	170,2	-0,7	15	3	3	7	0,7	9,8	1,4	2,7	47
24	M	16	153,5	-2,6	13,5	3	1	7,5	9,7*	22,4*	5,9*	13,9*	31
25	M	18	180	0,9		2	1	12	<0,6		<1,0		23
26	M	29	166	-1,3	17	3	1	6,5	<0,6	6,6	<1,0	1,7	54
27	M	19	167,6	-1,1	18	3	1	7,3	<0,6	7	<1,0	2,6	24
28	M	22	178,6	0,5	14,6	4	2	2	<0,6	2,7	1	1,3	<14
29	M	26	178	0,42	16	4	3	7,8	<0,6	3,1	<1,0	3,6	<14
30	M	30	167,4	-1,1	17	3	1	7	<0,6	0,8	<1,0	3,5	35
31	M	25	152	-3,41	18	4	2	6,5	<0,6	<0,6	<1,0	<1	43
32	M	19	176,4	0,2	15	3	1	9,7	<0,6	2,3	<1,0	1,7	<14
33	M	14	144,3	-2,4	11	1	1		<0,6	1,7	<1,0	2,4	
34	M	20	167,2	-1,12	13	3	1	3	<0,6	1	1	2,8	34
35	M	30							<0,6		<1		61
36	M	34					GC	6	0,1	2	1	2,6	70
37	M	19	164	-1,6	16	2	1	5	1,1	11	2,1	4,9	38
38	M	28	180					10	1,5	44,5	2,9	11	44
39	M	31	171		16	3		3,5	0,29	7,51	1,39	4,53	<20
40	M	24	169			3		3	0,27	9,51	1,63	6,14	31
41	M	18	175					Micropênis	0,17		0,67		140
42	M	20	163			3	1	12,5	5*		9*		67
43	M	33	167			5	GC	10	2,3	4,5	1,8	3,8	106
44	M	34	164			2	3		9,28	2,02	1,08	2,34	20

continua

Tabela 7. Características clínicas e hormonais dos pacientes do sexo masculino com HHI normósmico (continuação e conclusão).

ID	Sexo	IC (anos)	Estatura (cm)	DP (Estatura)	IO (anos)	PP*	Mamas*	Pênis (cm)*	LH (U/L)	LH p (U/L)	FSH (U/L)	FSH p (U/L)	T (ng/dL)
45	M	33	189						<0,1		<1		126
46	M	49	182,5		3				0,5		0,8		94,6
47	M	24	188		1			Micropênis	0,8		1,4		6
48	M	23	166		16	1		7	1,3		1,4		43
49	M	17			15,6	2		7	1,4	15,2	1,4	2,9	70
50	M	38	182		4	4	1	7,5	0,3			1,5	30
51	M	19	194		4	4	1	3,5	0,4		1		10
52	M	21	174		14	2	1	4	0,6		1,6		23
53	M	17	164		14,6	1		1,5	0,9		2,6		30
54	M	16	174	-0,1	13	3		7	0,17		0,7		20
55	M	18	169		3	3	3	5,5	0,6	6,3	1,2	4,5	6,3
56	M	18	179		5	5	1	10					
57	M	19	150		14	3	1	4	<0,6	<0,6	<1	<1	33
58	M	18	169	-0,9	15,6	4	1	9	0,1		<1		20
59	M	22	169,6	-0,7	15	4	3	6	<0,6	1,2	<1,0	1,4	26

ID: identificação; IC: idade cronológica ao diagnóstico; DP: desvio padrão da estatura em cm; IO: idade óssea; PP: pêlos pubianos (estádios segundos os critérios de Tanner); Mamas: estádios segundo os critérios de Tanner; LHp: pico de LH; FSHp: pico de FSH; E2: estradiol. *As dosagens hormonais foram realizadas por RIE (radioimunoensaio); As demais análises foram realizadas por IFMA.

3.3 Avaliação Hormonal

Durante esse estudo foram utilizados dois métodos de dosagens hormonais: radioimunoensaio (RIE) com duplo anticorpo (*Wallac, Turku, Finlândia*) e ensaio imunofluorométrico (IFMA) (*Perkin Elmer, Wallac, Finlândia*). O coeficiente de variação foi inferior a 5% para todos os ensaios.

O teste de estímulo com GnRH de ação curta foi realizado pela administração de 100 µg de gonadorelina intravenosa no tempo zero e coleta de sangue nos tempos -15, 0, 15, 30, 45 e 60 minutos. Os valores de esteróides sexuais e de LH basal e após estímulo com GnRH considerados normais estão descritos nas **Tabelas 8 e 9**.

Para o diagnóstico de puberdade precoce central foram considerados concentrações puberais no sexo feminino LH basal $> 0,6$ U/L, após estímulo com GnRH $\geq 6,9$ U/L, ou após estímulo com acetato de leuprolide depot > 10 U/L, e estradiol ≥ 13 pg/mL para o IFMA; LH após estímulo com GnRH ≥ 15 U/L e estradiol ≥ 10 pg/mL para o RIE. No sexo masculino foram considerados concentrações puberais LH basal $> 0,6$ U/L, após estímulo com GnRH $\geq 9,6$ U/L, ou após estímulo com acetato de leuprolide depot > 10 U/L, e testosterona ≥ 14 ng/dL para o IFMA; LH após estímulo com GnRH ≥ 15 U/L e testosterona > 10 ng/dL para o RIE.

Tabela 8 - Valores normais de estradiol e LH no sexo feminino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos.

	Estradiol pg/mL	LH basal U/L	LH pico U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 13	≤ 0.6	< 6,9	IFMA
Adultos	30-94	1,0-8,4	7,6-31,7	
Pré-púberes	< 10		Delta < 15	RIE
Adultos	10-80		Delta ≥ 15	

* após 100 µg de gonadorelina i.v.

Tabela 9 - Valores normais de testosterona e LH no sexo masculino, obtidos nos ensaios IFMA e RIE em pré-púberes e adultos.

	Testosterona ng/dL	LH basal U/L	LH pico U/L	Ensaio
Pré-púberes	< 14	≤ 0.6	< 9,6	IFMA
Adultos	200-950	1,4-9,2	12-29,7	
Pré-púberes	< 10		Delta < 15	RIE
Adultos	350-1090		Delta ≥ 15	

* após 100 µg de gonadorelina i.v.

3.4 Avaliação Molecular

3.4.1 Extração de DNA Genômico de Leucócitos de Sangue Periférico

O DNA genômico foi extraído de 15 mL de sangue periférico colhido em tubo contendo EDTA, e submetido ao método de extração com NaCl saturado modificado¹⁵⁰. Esta técnica consiste em duas etapas de lise de hemácias (NH₄Cl 114 mM; NH₄HCO₃ 1 mM), seguida de uma etapa de lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0) utilizando SDS (0,2%) e proteinase K (160 µg/mL). Após o processo de extração propriamente dito, o DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado, seguido de 3 lavagens em etanol 70% por 5 minutos, e ressuspensão em TE (10 mM Tris-HCL pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0).

A concentração do DNA foi medida em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação acima de 1,8 entre as leituras 260 e 280 nm foi considerada ideal para caracterizar a pureza do material¹⁵¹. As amostras foram mantidas a 4°C até a sua utilização.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA genômico dos pacientes selecionados foi utilizado como substrato para a amplificação das regiões codificadoras dos genes *TAC3* e *TACR3*. Os 5 éxons codificadores dos genes *TAC3* (ENSG00000166863, ENST00000458521 e NM_013251) e *TACR3* (ENSG00000169836, ENST00000304883 e NM_001059) foram amplificados por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de oligonucleotídeos intrônicos descritos na **Tabela 10**.

Tabela 10 - Oligonucleotídeos usados para amplificação dos genes *TAC3* e *TACR3*.

Éxon	Oligonucleotídeos Específicos
Gene <i>TAC3</i>	
2	2F 5'CAAGCTGCTGGTAATGAATG3' 2R 5'AAATGCCCTCTGACGGAC3'
3-4	34F 5'GATTCAGGATGGGCTCAGG3' 34R 5'GGGAGCTGGCATATTGTTTG3'
5-6	56F 5'GAACAGAGACCAGAAACCCAGTC3' 56R 5'TTTAATACCTGTAGCATGGGAGGAA3'
Gene <i>TACR3</i>	
1	1F 5'CAGGGATTGCAGTATCTTTC 3' 1R 5'CCTCCTTTTCAGCAAAAATTC3'
2	2F 5'GCCATGATTACCATTCTACG3' 2R 5'ACTTATTGACCACACACAAATC3'
3	3F 5'CAACTGGCAGCATTTGAAAC3' 3R 5'GATTACAGTATGTGGACAGCAGC3'
4	4F 5'CTGTCCGTATATTGCTTCACC3' 4R 5'AAGCCTGTGCCTCTCTCAG3'
5	5F 5'TGACATAAATTCTAAGAGTCTGG3' 5R 5'CTTTCTCAATTTGACCATAGC3'

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 (*Promega Madison, WI, EUA*) e tampão fornecido pelo fabricante contendo 1,5 mM de $MgCl_2$. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (*Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA*) e foi constituída das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento variando de 55-56 °C por 30 segundos, 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 à 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta.

3.4.3 Sequenciamento Automático Direto

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 pré-purificação enzimática, utilizando-se o produto comercial *EXOSAP* contendo a exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (*Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA*). A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o reagente 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 Analyser 3100 automatic DNA sequencer (Perkin Elmer, Foster City, CA).

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências depositadas na base de dados do *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI).

Todas as mutações identificadas foram confirmadas em dois produtos de PCR independentes e foram sequenciadas nas duas direções do DNA.

3.4.4 Análises *In Silico*

Todas as variantes identificadas foram submetidas a análises *in silico*. Para análise dos sítios constitutivos e auxiliares de *splicing* foram utilizados os programas NNSPLICE 0.9 e *Human Splicing Finder*. Esses programas avaliam a possibilidade das novas variantes identificadas criarem ou destruírem sítios constitutivos de *splicing* ou sequências *cis* auxiliares de *splicing*, tais como *enhancers* e *silencers*.

Para avaliação dos efeitos das substituições nucleotídicas para a estrutura/função da proteína foram utilizados os programas PolyPhen e SIFT. Ambos os algoritmos desses programas estão baseados na homologia das sequências dos aminoácidos, a qual é comparada entre proteínas contendo o mesmo domínio funcional e também de acordo com sua conservação durante a evolução, e nas propriedades físicas de cada aminoácido. Assim, o impacto da alteração do aminoácido sobre a estrutura da proteína e consequentemente sobre a sua função é avaliado, e esta é classificada como potencialmente deletéria ou não.

3.5 Estudos Funcionais (*In Vitro*)

Os estudos funcionais foram realizados em colaboração com a Divisão de Endocrinologia, Diabetes e Hipertensão do Hospital Brigham and Women's, Divisão de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Harvard, Boston, Estados Unidos.

3.5.1 Mutagênese Sítio-Dirigida

A geração de mutantes foi realizada em vetor de expressão de mamíferos pcDNA3.1+ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) contendo a sequência do NK3R selvagem (*Missouri S&T cDNA Resource Center, www.cdna.org*). A mutação p.G18D foi introduzida neste vetor a partir da técnica de mutagênese sítio-dirigida com o produto comercial *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit* (*Stratagene, La Jolla, CA*), e confirmada por sequenciamento automático direto.

3.5.2 Transfecção Celular

Para a realização do ensaio de acúmulo de fosfatidil inositol, células de rins de macacos verdes africanos (COS-7) foram transitoriamente transfectadas com 500 ng de vetores contendo as sequências selvagem (pcDNA 3.1 NK3RWT) ou mutante (pcDNA 3.1 NK3RG18D), e 500 ng vetor vazio (pcDNA 3.1empty) em placas de 6 poços utilizando o produto comercial *GenePORTER Transfection Reagent* (*Gene Therapy Systems, San Diego, CA*). Foram utilizados 5 µg de GenePORTER para cada 1 µg de vetor transfectado.

3.5.3 Estudo de Sinalização do NK3R

3.5.3.1 Avaliação do Acúmulo de Fosfatidil-Inositol (IP)

Quarenta e oito horas após a transfecção celular, o meio de cultura das células COS-7 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-[2-³H]-inositol *Perkin Elmer, Waltham, MA*) foi adicionado às células, seguido da adição de 10mM de cloreto de lítio após 15 minutos. Após incubação por 12 horas, a produção de IP foi estimulada pela adição de 10⁻⁷M de NKB (*Genescript, Piscataway, NJ*) por uma hora. As células foram então lavadas com PBS, a fim de

remover o excesso de meio de cultura, e posteriormente lisadas com ácido fórmico. Os extratos celulares foram neutralizados, centrifugados e tiveram seu conteúdo protéico determinado pelo método de Bradford. O sobrenadante de cada poço foi carregado em colunas de resina para troca de ânions AG-X8 (*Fisher Scientific, Pittsburgh, PA*) previamente equilibradas. As colunas foram lavadas e o inositol total foi eluído. O acúmulo de fosfatidil inositol total radioativo foi medido em contador beta e corrigido pelo conteúdo de proteínas totais das células. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4 Resultados

4.1 Puberdade Precoce Dependente de Gonadotrofinas

4.1.1 Variante identificada no sequenciamento automático

Uma nova variante no éxon 3 do gene *TAC3* foi identificada em uma menina brasileira com PPDG. Essa variante caracteriza-se pela substituição em heterozigose de uma base nucleotídica guanina por uma citosina na posição 187 (c.187G>C) (**Figura 5**), resultando na troca de uma alanina por uma prolina na posição 63 (p.A63P) da proneurocinina B. A análise do grau de conservação mostrou que a alanina na posição 63 é um resíduo conservado apenas entre primatas (**Figura 6**). Essa variante não foi identificada em 150 indivíduos controles, bem como nos outros 113 pacientes com PPDG da análise de DNA original, e nos outros 123 pacientes com RCCD e HHI normósmico estudados. Nesse grupo de pacientes, não foram identificadas outras novas variantes no gene *TAC3* e nenhuma nova variante no gene *TACR3*.

Figura 5 - a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TAC3* selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TAC3* mutante (c.187G>C). A substituição nucleotídica está identificada por uma seta preta.

Homo sapiens	LQRLFKS-HSSLEGLLK A LSQASTDPKESTSPEKRDMDHFFVGLMGKRSV
Macaca mulata	LQRLFKS-HSSLEGFLK A MSQARTDPKESTSPEKRDMDHFFVGLMGKRSV
Gorilla gorilla	LQRLFKS-HSSLEGLLK A LSQASTDPKESTSPEKRDMDHFFVGLMGKRSV
Rattus norvegicus	LRRLYDSRPISLEGLLK V LSKASVGPKETSLPQKRDMDHFFVGLMGKRNS
Canis familiaris	KLYDSGSVSLEGLLK M LKASVDPKESPLPQKRDMDHFFVGLMGKRNIQP
Bos Taurus	LRRLYDSRVVSLDGLLK M LSKASVGPKESPLPQKRDMDHFFVGLMGKRNL
Mus musculus	LRRLYDSRPVSLEGLLK V LSKASVGPKETSLPQKRDMDHFFVGLMGKRNS

Figura 6 - Grau de conservação da alanina na posição 63 da NKB entre as diversas espécies. A conservação da alanina na posição 63 entre primatas está destacada em rosa.

A menina portadora da alteração p.A63P iniciou o desenvolvimento puberal por volta dos sete anos de idade. No exame físico ela apresentou idade óssea avançada de 11 anos e estágio puberal Tanner 3. A avaliação hormonal dessa paciente mostrou valores puberais de LH basal 1,2 U/L (IFMA), valores puberais de LH após estímulo com GnRH 17,9 U/L (IFMA) e valores puberais de estrogênio basal 35,2 pg/mL (IFMA) (**Tabela 2, paciente 65**). Essa menina é filha única de uma família não consanguínea, e os pais são assintomáticos do ponto de vista reprodutivo. A análise de segregação familiar foi realizada, e mostrou que a mãe da paciente é portadora da mesma alteração em heterozigose (p.A63P), enquanto que o pai é homozigoto para o alelo selvagem (**Figura 7**). A mãe da paciente apresentou um desenvolvimento puberal normal com menarca aos 12 anos de idade.

Figura 7 - Análise de segregação familiar da alteração p.A63P. O caso índice está identificado por uma seta vermelha. Símbolo cheio significa PPDG. A substituição nucleotídica está identificada por uma seta preta.

4.1.2 Análises *In Silico* da variante identificada

Análises *in silico* para avaliação de possíveis alterações nos sítios constitutivos e auxiliares de *splicing* foram realizadas, e sugeriram que essa substituição nucleotídica (c.187G>C) não altera os mesmos (NNSPLICE 0.9 e *Human Splicing Finder*).

O possível efeito da substituição de uma alanina por uma prolina na posição 63 para a estrutura e função da NKB também foi avaliado, e sugeriu que essa variante poderia afetar a estrutura e consequentemente a função da proteína madura (SIFT). No entanto, esse resultado não foi confirmado por outro programa de análise *in silico* (PolyPhen), o qual sugeriu que essa variante é benigna para a proteína.

4.2 Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento

4.2.1 Variante identificada no sequenciamento automático

Identificamos uma nova variante no éxon 5 do gene *TACR3* em uma paciente com RCCD. Essa variante se caracteriza pela substituição em heterozigose de uma base nucleotídica guanina por uma timina na posição 1345 (c.1345G>T) (**Figura 8**), resultando na troca de uma alanina por uma serina na posição 449 do NK3R. A análise de conservação de aminoácidos entre as diversas espécies mostrou que a alanina na posição 449 não é um aminoácido conservado (**Figura 9**). Essa variante não foi identificada em 150 indivíduos controles, bem como nos outros 49 pacientes da análise de DNA original, e nos outros 187 pacientes com PPDG e HHI normósmico estudados. Nesse grupo de pacientes, não foram identificadas outras novas variantes no gene *TACR3* e nenhuma nova variante no gene *TAC3*.

Figura 8 - a) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TACR3* selvagem; b) Eletroferograma da sequência de nucleotídeos do gene *TACR3* mutante (c.1345G>T). A substituição nucleotídica está identificada por uma seta preta.

<i>Homo sapiens</i>	TRSSRKKRATPRDPSFNGCSRNSKSASATSSFISSPYTSVDEYS
<i>Macaca mulata</i>	ARSSRKKRATPRDPSFNGCSRNSKSASTTSSFISSPYTSVDE--
<i>Gorilla gorilla</i>	TRSSRKKRATPRDPSFNGCSRNSKSASATSSFISSPYTSVDEYS
<i>Rattus norvegicus</i>	TKSSRKKRAVPRDPSANGCSHRGSKSASTTSSFISSPYTSVDEYS
<i>Canis familiaris</i>	TKSSRKKRVTPRDPSFSGCSRNSKSASTTSSFISSPYTSVDEYS
<i>Bos taurus</i>	TRSSRKKRVPPRDPSFNGCSRQNSKSGSTTSSF-----
<i>Mus musculus</i>	AKSSRKKRAVPRDPSANGCSHREFKSASTTSSFISSPYTSVDEYS

Figura 9 - Grau de conservação da alanina na posição 449 do NK3R entre as diversas espécies. A ausência de conservação desses aminoácidos nas diversas espécies está destacada em rosa.

A paciente portadora da alteração p.A449S apresentou início do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários aos 13,4 anos de idade e uma idade óssea atrasada de 11 anos. A referida paciente apresentava valores pré-puberes de LH 0,6 U/L (IFMA) e baixos, mas normais de estradiol 19 pg/mL (IFMA) (**Tabela 4, paciente 2**). A paciente relata história familiar de atraso puberal, porém não tivemos disponibilidade do DNA de nenhum de seus familiares para análise molecular.

4.2.2 Análise *In silico* da variante identificada

As análises *in silico* realizadas sugerem que essa substituição nucleotídica (p.A449S) não altera os sítios constitutivos e auxiliares de *splicing* (NNSPLICE 0.9 e *Human Splicing Finder*), bem como sugerem que essa variante é benigna para a estrutura e função do NK3R (SIFT e *PolyPhen*).

4.3 Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado Normósmico

4.3.1 Variantes identificadas no sequenciamento automático

Identificamos três novas variantes no gene *TACR3* em três pacientes não relacionados com HHI normósmico. A primeira variante encontrada se caracteriza pela substituição em heterozigose de uma base nucleotídica guanina por uma adenina na posição 53 (c.53G>A) (**Figura 10**), resultando na troca de uma glicina por um aspartato na posição 18 do NK3R (p.G18D). A segunda variante se refere à troca em heterozigose de uma base nucleotídica citosina por uma timina na posição 172 (c.172C>T) (**Figura 11**), não alterando o aminoácido na posição 58 (p.L58L). Por fim, a terceira variante se caracteriza por uma substituição de uma base nucleotídica guanina por uma adenina na posição 824 (c.824G>A) (**Figura 12**), resultando na troca de um triptofano por um códon de parada prematura no NK3R (p.W275*), sendo encontrada em homozigose em um paciente e heterozigose em outro associada a variante p.L58L. A análise do grau de conservação dos aminoácidos entre as diversas espécies mostrou que a glicina na posição 18, bem como o triptofano na posição 275 são aminoácidos conservados. Essas variantes não foram identificadas em 150 indivíduos controles, bem como nos outros 70 pacientes com HHI normósmico da análise de DNA original, e nos 164 pacientes com PPDG e RCCD estudados. Nesse grupo de pacientes, não foram identificadas outras novas variantes no gene *TACR3* e nenhuma nova variante no gene *TAC3*.

O portador da alteração p.G18D era um paciente do sexo masculino que procurou o serviço de endocrinologia do HCFMUSP aos 24 anos de idade devido a presença de micropênis. Esse paciente apresentava ao exame físico pêlos pubianos estágio de Tanner 1, micropênis e testículos direito e esquerdo < 2,5 cm. A avaliação

hormonal revelou valores baixos de gonadotrofinas (FSH: 1,4 U/L e LH:0,8 U/L) (IFMA) e valores pré-púberes de testosterona 6 ng/dL (IFMA) (**Tabela 7, paciente 47**). O paciente negou história familiar de hipogonadismo ou alterações olfatórias.

O portador das variantes p.L58L e p.W275X era um paciente do sexo masculino que foi encaminhado ao serviço de endocrinologia do HCFMUSP aos 20 anos de idade para acompanhamento do quadro de HHI. Na ocasião da primeira consulta, o paciente apresentava ao exame físico pêlos pubianos estágio de Tanner 3, testículo direito de 3x0,5 cm e testículo esquerdo de 2x1 cm. A avaliação hormonal revelou valores normais de gonadotrofinas (LH: 5 U/L e FSH: 9 U/L) (RIE) e valores baixos de testosterona 67 ng/dL (RIE) (**Tabela 7, paciente 42**). O paciente afirmou ter 2 irmãos com quadro clínico semelhante, porém eles não estavam disponíveis para análise molecular.

O portador da alteração p.W275* era um paciente do sexo masculino que procurou o serviço de endocrinologia do HCFMUSP aos 30 anos de idade devido a presença de micropênis. Esse paciente apresentava ao exame físico pêlos pubianos estágio de Tanner 3, micropênis e testículos direito e esquerdo de 2x1,5 cm. A avaliação hormonal revelou valores baixos de gonadotrofinas (LH: <0,6 U/L e FSH: < 1,0 U/L) e baixos de testosterona 35 ng/dL (IFMA) (**Tabela 7, paciente 30**). O paciente afirmou ter pais consanguíneos, e um irmão e primo com condição clínica semelhante, porém os mesmos não estavam disponíveis para análise clínica e molecular.

4.3.2 Análises *In Silico* das variantes identificadas

As análises *in silico* realizadas sugerem que as variantes, p.G18D e p.L58L, identificadas nessa coorte de pacientes não alteram sítios constitutivos e auxiliares de *splicing* (NNSPLICE 0.9 e *Human Splicing Finder*). Por outro lado, sugeririam que variante p.W275* poderia afetar tantos sítios constitutivos quando auxiliares de *splicing* alternativo.

Análises *in silico* realizadas com o intuito de avaliar os potenciais efeitos dessas substituições de aminoácidos (p.G18D, p.L58L e p.W275*) para a estrutura e função do NK3R, sugeriram que a troca de uma glicina por um ácido aspártico na posição 18 do NK3R poderia ser deletéria para a proteína (SIFT e *PolyPhen*). A variante p.L58L foi sugerida como benigna para o NK3R (SIFT e *PolyPhen*). Em relação a variante p.W275*, as análises realizadas com os programas SIFT e *PolyPhen* não puderam ser realizadas, pois ambos os programas não analisam a substituição de aminoácidos por códons de parada prematura.

4.3.3 Estudo Funcional da Variante p.G18D

Com o intuito de avaliar o efeito da variante p.G18D sobre a estrutura e função do NK3R foi realizado um estudo de sinalização intracelular, por meio de um ensaio de acúmulo de fosfatidil inositol (IP). Os estudos realizados não mostraram alteração significativa na afinidade do receptor mutado (p.G18D) com o ligante

neurocinina B em comparação ao receptor selvagem. As células transfectadas com o receptor p.G18D mostraram um aumento na produção de IP de $13,5 \pm 3,5$ vezes, a qual não diferiu estatisticamente das células transfectadas com o receptor selvagem, as quais mostraram um incremento na produção de IP de $16,7 \pm 3,9$ vezes, indicando que a variante p.G18D não afeta a produção de IP do NK3R (**Figura 13**).

Figura 13 - Avaliação do aumento na produção de fosfatidil inositol em células COS-7 tratadas com 10^{-7} M de NKB. O gráfico mostra que o vetor vazio falhou em estimular a produção de IP, enquanto que as células transfectadas com o receptor selvagem e mutante mostraram um aumento semelhante na produção de IP. IP: fosfatidil inositol. *a*, *b* indicam diferenças significativas no estímulo ao aumento da produção de IP.

4.4 Polimorfismos Identificados no NK3R

Três polimorfismos previamente descritos na literatura p.K286R (rs2276973), p.L291L (rs35085919) e p.A449T (rs17033889), foram identificados em heterozigose no gene *TACR3*¹¹⁷. As frequências desses polimorfismos nos diferentes distúrbios puberais centrais idiopáticos estudados, bem como em indivíduos controles, estão descritas na **Tabela 11**.

Tabela 11 - Frequência dos polimorfismos identificados no NK3R nos pacientes com distúrbios puberais centrais idiopáticos e nos indivíduos controles.

	PPDG	RCCD	HHI normósmico	Controles
p.K286R (c.857A>G)	0,9%	2%	1,4%	-
p.L291L (c.873A>G)	2,6%	4%	1,4%	4%
p.A449T (c.1345G>A)	-	4%	1,4%	1%

PPDG: puberdade precoce dependente de gonadotrofinas; RCCD: retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento; HHI: hipogonadismo hipogonadotrófico isolado.

5 Discussão

Sabe-se que a puberdade é desencadeada pela reativação dos pulsos secretores de GnRH com progressiva ativação da função gonadal. De forma geral, durante o período fetal os neurônios hipotalâmicos que agem de forma sincronizada e interconectada para estimular a secreção de GnRH estão ativos. Durante a infância, porém, este circuito neuronal é inibido; a perda desse tônus inibitório na segunda década de vida coincide com a reemergência dos pulsos secretores de GnRH, e com isso no desenvolvimento puberal⁶. Diversas mutações foram identificadas em genes que influenciam o início da puberdade. Mutações inativadoras nos genes *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *KISS1R* levam ao quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico, interferindo com a síntese, secreção e ação normal do GnRH, respectivamente^{12, 13, 81-84}. Recentemente, mutações de perda de função nos genes *TAC3* e *TACR3* que codificam a NKB e o seu receptor NK3R, respectivamente, também foram implicadas com o fenótipo de HHI normósmico^{88, 92, 93, 152, 153}.

Os mecanismos pelos quais a NKB exerce seus efeitos no controle central neuroendócrino ainda não foram estabelecidos. A expressão de NKB foi demonstrada na eminência média hipotalâmica de ratos, assim como a expressão do seu receptor, NK3R, nos neurônios contendo GnRH¹⁵⁴. Além disso, a NKB é altamente expressa em neurônios hipotalâmicos que também expressam kisspeptina, a qual apresenta um comprovado papel no controle da secreção de GnRH¹²⁵. Estudos conduzidos em humanos e primatas mostraram uma hipersecreção gonadotrófica em mulheres na pós-menopausa secundária ao aumento da secreção de GnRH em associação com a hipertrofia de neurônios que expressam kisspeptina, neurocinina B, dinorfina e receptor alfa de estrogênio, sugerindo que a NKB é parte dessa rede neural responsável pela secreção gonadotrófica¹⁵⁵.

Até o momento, a frequência de mutações nos genes *TAC3* e *TACR3* descrita em pacientes com HHI normósmico é de cerca de 5%⁹¹. Nesse trabalho, nós estudamos não somente os pacientes com HHI normósmico, nos quais foram descritas as primeiras alterações na NKB e no seu receptor, mas também estendemos a análise para os pacientes com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas e retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento, visando ampliar os conhecimentos sobre a base molecular dos distúrbios puberais centrais idiopáticos.

5.1 Puberdade Precoce Dependente de Gonadotrofinas

Diversos fatores estão envolvidos com o controle central do início do período puberal, porém até o momento poucos defeitos moleculares, incluindo mutações e polimorfismos foram associados com o fenótipo de puberdade precoce central^{33, 34}. Mutações ativadoras no *KISS1R* (p.R386P) e *KISS1* (p.P74S) foram identificadas em pacientes brasileiros com puberdade precoce central, o fenótipo inverso de HHI^{33, 34}. Nesse trabalho, avaliamos a hipótese de que mutações de ganho de função no *NK3R* e na NKB também poderiam ser identificadas em crianças com puberdade precoce dependente de gonadotrofinas¹⁵⁶.

No presente estudo, identificamos uma nova variante em heterozigose na NKB (p.A63P) em uma menina brasileira com PPDG. A variante p.A63P não foi identificada em 300 alelos controles de indivíduos com desenvolvimento puberal normal, bem como não foi identificada nos outros pacientes da análise de DNA

original, indicando que essa nova variante não se trata de um polimorfismo na população brasileira. Uma variante alélica é considerada um polimorfismo gênico se está presente em mais de 1% de uma determinada população. Esse conceito é baseado na frequência populacional e não leva em conta os efeitos patogênicos da variante¹⁵⁷. O estudo de segregação familiar mostrou que a mãe da paciente era portadora da mesma variante em heterozigose (p.A63P), apesar de ter apresentando um desenvolvimento puberal normal (menarca aos 12 anos de idade).

A análise do grau de conservação da alanina na posição 63 mostrou que essa variante é conservada apenas entre primatas. Ainda, a troca de uma alanina, aminoácido polar, por uma prolina que também é um aminoácido polar, parece não acarretar em uma alteração significativa da estrutura protéica final. Estudos *in silico* sugeriram que essa variante não afeta sítios constitutivos e/ou auxiliares de *splicing*. Em relação à avaliação dos potenciais efeitos dessa substituição nucleotídica para a proteína, as análises *in silico* realizadas apresentaram resultados discordantes. Enquanto uma análise sugeriu um efeito benigno para a estrutura e função da NKB, outra análise sugeriu um potencial efeito deletério para a proteína. Considerando que ambos os programas são baseados na conservação/análise por homologia das sequências, a discordância nos resultados poderia ser explicada pelas constantes atualizações das bases de dados desses programas, pelo fato do número de informações contidas nos diferentes programas serem distintos, e principalmente por utilizarem algoritmos de análises diferentes.

A variante p.A63P está localizada na proneurocinina B, ou seja, em uma região que sofre clivagem para formar a neurocinina B madura¹²¹. Mutações inativadoras em propeptídeos são descritas na literatura associadas a diversos

fenótipos¹⁵⁸⁻¹⁶⁰. No entanto, mutações de ganho de função em propetideos são bastante raras e até o momento não existem estudos funcionais descritos.

Uma hipótese que poderia explicar o envolvimento da NKB com o fenótipo de PPDG está relacionada ao processamento desse peptídeo. Uma alta expressão de *TAC3* em gestações associadas à síndrome de pré-eclâmpsia foi demonstrada¹⁶¹. De fato, a placenta pré-eclâptica parece ser bastante eficiente em processar a proneurocinina B no decapeptídeo protéico final, ou seja, na NKB propriamente dita. Em contraste à placenta normal, a placenta pré-eclâptica apresenta evidências de aumento da clivagem proteolítica da proneurocinina B. Esse fato pode ser resultado do aumento da atividade de certas pro-hormônio convertases durante a pré-eclampsia, e pode ser parte dos mecanismos que levam ao aumento da circulação de NKB durante a ocorrência dessa síndrome¹⁶¹. Até o momento, não há avaliações séricas dos valores de NKB em pacientes com PPDG. Considerando que a NKB apresenta um papel central na regulação da secreção de GnRH, poderíamos sugerir que a NKB esteja regulada para cima em pacientes com o fenótipo de PPDG. Essa regulação poderia ser resultado tanto do aumento da atividade de enzimas pro-hormônio convertases, como poderia ser resultado de alterações gênicas em regiões codificadoras, bem como em regiões reguladoras da tradução e das modificações pós- traducionais desse peptídeo.

Diante dos resultados apresentados, parece claro que a variante p.A63P não apresenta um efeito causal direto sobre o fenótipo da paciente, porém, não podemos descartar a hipótese de que essa alteração, por mecanismos genéticos desconhecidos, tais como alterações em regiões promotoras e intrônicas não estudadas, ou em

associação com outros genes ainda não identificados, possa contribuir para o fenótipo de PPDG.

5.2 Retardo Constitucional do Crescimento e Desenvolvimento

O retardo constitucional do crescimento e desenvolvimento é considerado uma variante normal de atraso puberal quando comparado ao quadro de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado. As causas que levam ao RCCD ainda não foram completamente elucidadas, mas é sugerida a existência de uma base genética para explicar esses casos. No entanto, apesar de muitos genes terem sido relacionados como possíveis causas de RCCD, acredita-se que outros genes ainda não identificados possam contribuir mais diretamente para a etiologia dessa doença⁴⁸.

Mutações em genes relacionados ao HHI podem apresentar quadros de penetrância incompleta e/ou expressividade variável. Esse fato é bastante pertinente, quando observamos os fenótipos de indivíduos que apresentam mutações no FGFR1, um dos mais frequentes defeitos gênicos relacionados ao HHI^{61, 162, 163}. Os pacientes com alterações nesse gene apresentam desde síndrome de Kallmann^{61, 162}, a HHI normósomica^{163, 164}, atraso puberal¹⁶²⁻¹⁶⁴, e até mesmo podem ser portadores assintomáticos¹⁶⁴. Além disso, muitos portadores de mutações no FGFR1 desenvolvem puberdade tardiamente, sendo considerados quadros reversíveis de atraso puberal¹⁶³⁻¹⁶⁶. Semelhante ao que ocorre com o FGFR1, há um largo espectro fenotípico, incluindo RCCD, associado a mutações no GNRHR^{84, 86, 167, 168}.

Nesse trabalho, estudamos 50 pacientes com RCCD, e descrevemos uma nova variante em heterozigose no gene *TACR3* em uma menina brasileira que apresentou início do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários aos 13,4 anos de idade. A variante p.A449S não foi identificada em 300 alelos controles de indivíduos com desenvolvimento puberal normal, bem como não foi identificada em outros pacientes da análise de DNA original, indicando que essa nova variante não se trata de um polimorfismo na população brasileira. A análise do grau de conservação da alanina na posição 449 do NK3R mostrou que esse não é um aminoácido conservado entre as diferentes espécies; ainda, análises *in silico* realizadas mostraram que apesar da alanina ser um aminoácido apolar e ser substituída por um aminoácido neutro (serina), essa alteração não parece afetar consideravelmente a estrutura protéica, nem alterar os mecanismos de *splicing* alternativo do *TACR3*. A referida paciente relata história familiar de atraso puberal, porém não tivemos acesso ao material genéticos dos familiares.

Em 2011, Vaaralahti *et al.*⁵⁰ estudaram os principais genes envolvidos com a etiologia do HHI, *FGFR1*, *GNRHR*, *TAC3* e *TACR3*, em 146 indivíduos finlandeses com RCCD. Nesse trabalho, foi descrita uma nova variante no *FGFR1* (p.S436C), porém a mesma não segregou entre os familiares, sendo também descrita no grupo controle, o que sugere ser uma variante rara e não uma mutação causal; foram descritas ainda três variantes em heterozigose no *GNRHR*⁵⁰. As variantes, p.Q106R e p.R262Q, foram descritas anteriormente em pacientes com HHI normósmico, e identificadas na mesma frequência em indivíduos controles. A outra variante identificada no *GNRHR* foi uma deleção de um aminoácido, Phe309del, o qual mostrou segregar com o atraso puberal verificado nessa família. Em relação aos

genes *TAC3* e *TACR3* não foram descritas variantes gênicas nessa coorte de pacientes⁵⁰.

Gianetti *et al.*⁹¹ mostraram uma alta frequência de micropênis em indivíduos que são portadores de alterações no gene *TACR3*, sugerindo que a NKB é indispensável para a função normal do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em meninos durante a fase final da gestação e na “mini-puberdade” que ocorre durante a infância. Considerando que micropênis não é um fenótipo comumente visto em pacientes com RCCD, a ausência de mutações no gene *TACR3* em homens com atraso puberal parece justificada⁵⁰. Além disso, vale ressaltar que no nosso grupo de pacientes com HHI, independente da presença ou não de defeitos gênicos no complexo NKB/NK3R ou em outros genes associados ao HHI (*GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3* e *TACR3*), a frequência de micropênis é de quase 100%, e o rastreamento de mutações nesses genes não identificou até o momento nenhuma variante significativa na nossa coorte de pacientes com RCCD.

Mutações em ambos os genes, *TAC3* e *TACR3*, foram descritas em pacientes com HHI reversível, e, dessa forma, sugere-se que mutações nesses genes poderiam estar associadas ao fenótipo de RCCD. No entanto, apesar de a NKB e o seu receptor serem candidatos óbvios para o desenvolvimento de atraso puberal, até o momento não foram descritas variantes nesse sistema em pacientes do sexo feminino, bem como em pacientes do sexo masculino com RCCD, sugerindo que a via de sinalização da NKB não parece se relacionar diretamente com a etiologia do RCCD⁵⁰.

Diante desses resultados, parece claro que mutações em regiões codificadoras de genes frequentemente relacionados ao HHI não parece ser uma causa comum de

RCCD. No entanto, alterações em regiões regulatórias, bem como em regiões intrônicas comumente não estudadas, não podem ser descartadas como potenciais contribuintes para o fenótipo de RCCD. No caso da referida paciente, a variante identificada parece não ser isoladamente a causa de RCCD, porém como mencionado, não podemos ignorar o fato de que outros genes podem, por diferentes mecanismos, interagir com a via da NKB e contribuir para o fenótipo observado.

5.3 Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado Normósmico

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico é uma condição rara, geneticamente heterogênea, a qual ocorre mais frequentemente na forma esporádica, e menos frequentemente na forma familiar com herança autossômica recessiva¹⁶⁹. Mutações inativadoras no GNRHR foram as primeiras alterações genéticas reconhecidas como causa monogênica de HHI normósmico, porém a base molecular de grande parte dos casos de HHI permanece não definida⁸⁴. Nos últimos anos, no entanto, um grande número de neuropeptídeos e seus receptores envolvidos com o controle dos diferentes estágios da função do GnRH foram relacionados a etiologia do HHI, especialmente em casos familiares⁵⁶.

No presente trabalho identificamos três novas variantes no gene *TACR3*, p.G18D, p.L58L e p.W275*, em três homens não relacionados. A variante p.G18D foi identificada em heterozigose em um homem de 24 anos de idade que apresentava micropênis ao exame físico; valores baixos de gonadotrofinas e pré-púberes de

testosterona. Os estudos *in vitro* dessa variante demonstraram que a mesma não altera significativamente a funcionalidade do receptor da NKB, não sendo demonstradas diferenças significativas no ensaio de acúmulo de IP entre o receptor mutado e o receptor selvagem. A mutação p.W275* foi identificada em homozigose em um homem de 30 anos de idade que apresentou, assim como o paciente anteriormente descrito, micropênis ao exame físico, valores baixos de gonadotrofinas e pré-púberes de testosterona. Essa mutação também foi identificada no estado heterozigótico em conjunto com a alteração p.L58L em heterozigose em outro paciente do sexo masculino de 20 anos de idade, que apresentou valores normais de gonadotrofinas e pré-púberes de testosterona. Análises *in silico* sugeriram que a mutação silenciosa p.L58L não afeta sítios críticos de *splicing*, sugerindo não alterar a funcionalidade do NK3R. Por outro lado, a mutação p.W275* resultou em um códon de parada prematura na terceira alça intracelular do receptor, com provável destruição do transcrito de RNAm nascente pelo mecanismo de decaimento do RNAm mediado por mutações nonsense (*nonsense mediated mRNA decay*). Esse mecanismo tem por objetivo realizar uma varredura do transcrito de RNAm nascente, e eliminar aqueles que apresentam códons de parada prematura antes de eles serem traduzidos em proteínas truncadas e potencialmente prejudiciais para a função celular¹⁷⁰⁻¹⁷². Diversas descrições na literatura sugerem um papel essencial desse processo em condições humanas hereditárias, por meio da inativação de alelos contendo códons de parada prematura e pela modificação de fenótipos clínicos ou padrões de herança de doenças^{173, 174}.

A administração pulsátil de GnRH a adultos com alteração no *TAC3/TACR3* restaura os valores séricos de LH e a secreção de testosterona em homens; e resulta

em ovulação e gestação normal nas mulheres⁹³. Esses dados sugerem que a deficiência gonadotrófica verificada nesses pacientes é devido a uma alteração nos mecanismos de sinalização da NKB no hipotálamo, excluindo anormalidade hipofisárias ou gonadais. Um achado interessante dos pacientes com mutações na NKB e no NK3R é a relativa preservação da secreção de FSH, comparada aos baixos valores séricos de LH^{88, 89, 93}. Esse padrão de gonadotrofinas séricas pode ser reproduzido experimentalmente pela redução na frequência de pulsos de GnRH em macacos *rhesus*¹⁷⁵, ou pela administração contínua e não pulsátil de GnRH em ratos¹⁷⁶. Juntas, essas evidências sugerem uma mudança no padrão de pulsos de GnRH em pacientes com defeitos na sinalização da NKB/NK3R¹⁷⁷. No nosso trabalho, porém, essa correlação não foi encontrada. Os pacientes com mutações no *TACR3* não apresentaram essa dissociação nos valores basais de LH e FSH. Na nossa coorte de estudo, os valores baixos de LH costumam ser acompanhados de valores também baixos de FSH. Essa discordância de resultados com a literatura pode ser explicada pelo pequeno número de pacientes com HHI normósmico com causas genéticas identificadas na nossa cauística. Além disso, diferenças nos protocolos de dosagens hormonais entre os estudos na podem ser descartadas.

Em 2010, o nosso grupo em colaboração com o grupo da Dra. Stephanie Seminara da *Harvard Medical School*, publicaram um importante trabalho sobre a NKB e o seu receptor na etiologia do HHI normósmico, relatando uma frequência de mutações nesses genes de 5% em pacientes com essa doença⁹¹. Nesse trabalho, foram estudados 345 pacientes com HHI normósmico de várias etnias, dos quais 60 pacientes eram brasileiros. Treze novas variantes no gene *TACR3* em 19 pacientes, incluindo as três alterações descritas anteriormente, p.G18D, p.L58L e p.W275*

foram descritas. No gene *TAC3* foi descrita uma única deleção de um par de bases, resultando na completa perda da NKB. Nesse estudo, destacaram-se o número de alterações descritas em heterozigose (60%), a frequência de micropênis entre os pacientes com mutações no *TACR3* (93%), e a alta prevalência de reversibilidade do quadro de HHI normósmico após a descontinuação da terapia de esteróides sexuais, verificada sobretudo em alguns pacientes da casuística americana (5/7 homens e 4/5 mulheres)⁹¹. Essa reversibilidade foi aparente, inclusive em pacientes com micropênis, sugerindo que o complexo NKB/NK3R teria uma importância maior durante o desenvolvimento neonatal, seguido de uma ação atenuada ao longo da vida do indivíduo, na qual outros sistemas, tais como kisspeptina, receptor alfa de estrógeno e dinorfina, passariam a ter uma importância maior⁹¹.

No nosso grupo de pacientes hipogonádicos com mutações no *TACR3*, as mutações em heterozigose foram identificadas em 3 pacientes (75%), o que está de acordo com a frequência relatada no estudo de Gianetti *et al.*⁹¹. Além disso, a alta frequência de micropênis relatada pelo estudo anterior, também está de acordo com a frequência de micropênis verificada nos pacientes brasileiros com HHI normósmico. No entanto, torna-se importante ressaltar que na casuística brasileira de HHI normósmico, independentemente do fato de ser um hipogonadismo idiopático ou com causa genética determinada, a frequência de micropênis é de quase 100%, frequência essa que não difere em pacientes com variantes identificadas no gene *TACR3*. A presença de reversibilidade do quadro de HHI normósmico não pôde ser avaliada na nossa coorte de pacientes.

Até o momento, aproximadamente 50 pacientes hipogonádicos com alterações nos genes *TAC3* e/ou *TACR3* foram descritos (**Figura 14**)^{88-93, 177}. Muitas

dessas alterações foram descritas em heterozigose, inclusive no presente trabalho, na qual encontramos três alterações em heterozigose e apenas uma em homozigose. Um grande desafio é entender a importância das mutações no *TAC3/TACR3* em heterozigose nos pacientes com HHI normósmico. Uma hipótese bastante discutida é a presença de mutações em mais de um gene como causa da doença. Sykiotis *et al.*¹⁷⁸ estudaram 397 pacientes com HHI, e mostraram que cerca de 2% desses pacientes apresentaram mutações em dois ou mais genes. Essa incidência por sua vez foi semelhante à de homozigose e heterozigose composta encontrada. Dentre os pacientes com mutações identificadas, a chance de oligogenicidade foi estimada em 11,3%¹⁷⁸. No entanto, a presença de mutações em mais de um gene não explica totalmente a heterozigose dos pacientes com HHI. Até o momento, nos pacientes com alterações no *TAC3/TACR3* descritos, nenhum apresenta outra alteração gênica conhecida. De fato, foi demonstrado que pacientes com mutações no *PROKR2* em heterozigose, outro gene na qual a frequência de alterações em heterozigose é bastante alta, apenas 10% apresentaram mutações em outros genes relacionados ao HHI⁶⁹. Dessa forma, a possibilidade de mutações em genes não conhecidos como causadores de HHI normósmico não pode ser descartada; além disso, a presença de uma segunda variante genética na região promotora ou na região intrônica, comumente não avaliadas, também deve ser considerada. Ainda, alterações epigenéticas ou até mesmo a influência de fatores ambientais que poderiam interferir na expressão do alelo normal também podem contribuir para o fenótipo de HHI.

Figura 14 - Representação esquemática da localização das variantes do NK3R identificadas nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico. O quadro rosa representa as mutações intrônicas descritas na literatura no gene *TACR3*⁸⁸⁻⁹³.

Em resumo, identificamos pela primeira vez uma variante no gene *TAC3* em uma menina com PPDG, além de uma nova variante no gene *TACR3* em uma paciente com RCCD, e três novas variantes no gene *TACR3* em três pacientes não relacionados com HHI normósmico, uma delas comprovadamente inativadora (p.W275*). O verdadeiro significado das mutações em heterozigose descritas em pacientes com HHI normósmico permanece indeterminado. Dessa forma, nosso trabalho confirma o envolvimento do complexo NKB/NK3R na fisiopatologia do

HHI normósmico, porém não confirma seu envolvimento na etiologia da PPDG e RCCD.

6 Conclusões

- Descrevemos uma nova variante em heterozigose na neurocinina B, p.A63P, em uma menina brasileira com PPDG.
- O mecanismo potencial de ativação da variante p.A63P permanece indeterminado, porém a localização da mutação, as análises *in silico* realizadas, e a não segregação familiar sugerem que a nova variante descrita na NKB não é um fator causal direto do fenótipo de PPDG.
- Descrevemos uma nova variante em heterozigose no NK3R, p.A449S, em uma menina brasileira com RCCD.
- O grau de conservação da alanina na posição 449, bem como as análises *in silico* realizadas, sugerem que essa alteração não seja uma causa direta de RCCD nessa paciente.
- Descrevemos três novas variantes no NK3R, p.G18D, p.L58L e p.W275X, em três pacientes do sexo masculino não relacionados com HHI normósmico.
- Os estudos funcionais da variante p.G18D mostraram que ela não altera a funcionalidade do receptor da neurocinina B.
- A variante p.W275* leva a uma parada prematura do processo traducional no éxon 3, com provável destruição do transcrito de RNAm nascente pelo mecanismo de decaimento do RNAm mediado por mutações nonsense.
- No nosso estudo, não houve uma correlação genótipo-fenótipo convincente que diferencie pacientes com mutações no *TAC3/TACR3* de pacientes com mutações em outros genes relacionados ao HHI normósmico, bem como em pacientes com HHI normósmico idiopático.
- Em conclusão, nosso estudo confirma o envolvimento do complexo NKB/NK3R na etiologia do HHI normósmico.

7 Referências

1. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 2002;57 Suppl 2:2-14.
2. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2364-8.
3. Terasawa E, Fernandez DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev.* 2001;22(1):111-51.
4. 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;86(20):8132-6.
5. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 1989;338(6211):161-4.
6. Plant TM. Hypothalamic control of the pituitary-gonadal axis in higher primates: key advances over the last two decades. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(6):719-26.
7. Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update.* 2004;10(1):67-77.
8. Ebling FJ. The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction.* 2005;129(6):675-83.
9. Warren MP, Vu C. Central causes of hypogonadism--functional and organic. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003;32(3):593-612.

-
10. Banerjee I, Clayton P. The genetic basis for the timing of human puberty. *J Neuroendocrinol.* 2007;19(11):831-8.
 11. Ojeda SR, Roth C, Mungenast A, Heger S, Mastronardi C, Parent AS, et al. Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts. *Int J Androl.* 2006;29(1):256-63.
 12. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10972-6.
 13. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1614-27.
 14. Han SK, Todman MG, Herbison AE. Endogenous GABA release inhibits the firing of adult gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology.* 2004;145(2):495-9.
 15. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS, et al. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology.* 2006;147(3):1166-74.
 16. Treacy MN, Rosenfeld MG. Expression of a family of POU-domain protein regulatory genes during development of the central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1992;15:139-65.

17. Lee BJ, Cho GJ, Norgren RB, Jr., Junier MP, Hill DF, Tapia V, et al. TTF-1, a homeodomain gene required for diencephalic morphogenesis, is postnatally expressed in the neuroendocrine brain in a developmentally regulated and cell-specific fashion. *Mol Cell Neurosci.* 2001;17(1):107-26.
18. Papathanasiou A, Hadjiathanasiou C. Precocious puberty. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2006;3 Suppl 1:182-7.
19. Brito VN, Latronico AC, Arnhold JJ, Mendonca BB. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(1):18-31.
20. Kakarla N, Bradshaw KD. Disorders of pubertal development: precocious puberty. *Semin Reprod Med.* 2003;21(4):339-51.
21. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ, Jr., Minegishi T, Cutler GB, Jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature.* 1993;365(6447):652-4.
22. Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. *N Engl J Med.* 1991;325(24):1688-95.
23. Latronico AC. Naturally occurring mutations of the luteinizing hormone receptor gene affecting reproduction. *Semin Reprod Med.* 2000;18(1):17-20.

-
24. Latronico AC, Lins TS, Brito VN, Arnhold IJ, Mendonca BB. The effect of distinct activating mutations of the luteinizing hormone receptor gene on the pituitary-gonadal axis in both sexes. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53(5):609-13.
25. Kalantaridou SN, Chrousos GP. Clinical review 148: Monogenic disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2481-94.
26. Bachega TA, Billerbeck AE, Madureira G, Marcondes JA, Longui CA, Leite MV, et al. Molecular genotyping in Brazilian patients with the classical and nonclassical forms of 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(12):4416-9.
27. Marui S, Torrealba IM, Russell AJ, Latronico AC, Sutcliffe RG, Mendonca BB. A novel homozygous nonsense mutations E135* in the type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in a girl with salt-losing congenital adrenal hyperplasia. *Mutations in brief no. 168. Online. Hum Mutat*. 1998;12(2):139.
28. Martin RM, Lin CJ, Nishi MY, Billerbeck AE, Latronico AC, Russell DW, et al. Familial hyperestrogenism in both sexes: clinical, hormonal, and molecular studies of two siblings. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(7):3027-34.
29. Morishima A, Grumbach MM, Simpson ER, Fisher C, Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(12):3689-98.

-
30. Mendonca BB, Leite MV, de Castro M, Kino T, Elias LL, Bachega TA, et al. Female pseudohermaphroditism caused by a novel homozygous missense mutation of the GR gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(4):1805-9.
31. Domenice S, Latronico AC, Brito VN, Arnhold JJ, Kok F, Mendonca BB. Adrenocorticotropin-dependent precocious puberty of testicular origin in a boy with X-linked adrenal hypoplasia congenita due to a novel mutation in the DAX1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4068-71.
32. Freitas KC, Ryan G, Brito VN, Tao YX, Costa EM, Mendonca BB, et al. Molecular analysis of the neuropeptide Y1 receptor gene in human idiopathic gonadotropin-dependent precocious puberty and isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2007;87(3):627-34.
33. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, et al. A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008;358(7):709-15.
34. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2276-80.
35. Houang M, Roze C. KISS1 Polymorphisms analysis in a cohort of patients with disorders in the timing of pubertal onset shows association between 3'UTR polymorphisms and central precocious puberty. *LWPES/ESPE 8th Joint Meeting: Hormone Research*; 2009.

-
36. He Q, Karlberg J. Bmi in childhood and its association with height gain, timing of puberty, and final height. *Pediatr Res*. 2001;49(2):244-51.
37. Ong KK, Elks CE, Li S, Zhao JH, Luan J, Andersen LB, et al. Genetic variation in LIN28B is associated with the timing of puberty. *Nature genetics*. 2009;41(6):729-33.
38. Perry JR, Stolk L, Franceschini N, Lunetta KL, Zhai G, McArdle PF, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche. *Nature genetics*. 2009;41(6):648-50.
39. Sulem P, Gudbjartsson DF, Rafnar T, Holm H, Olafsdottir EJ, Olafsdottir GH, et al. Genome-wide association study identifies sequence variants on 6q21 associated with age at menarche. *Nature genetics*. 2009;41(6):734-8.
40. Zhu H, Shah S, Shyh-Chang N, Shinoda G, Einhorn WS, Viswanathan SR, et al. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies. *Nature genetics*. 2010;42(7):626-30.
41. Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1984;226(4673):409-16.
42. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*. 2009;11(3):228-34.
43. Siveira-Neto AP, Brito VN, Cukier P, Arnhold IJ, Medonca BB, Latronico AC. Mutational analysis of lin28b gene in children with idiopathic central precocious

puberty. 49th Annual Meeting of the European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE); Prague: Program & Abstracts; 2010.

44. Clayton PE, Shalet SM, Price DA. Endocrine manipulation of constitutional delay in growth and puberty. *J Endocrinol.* 1988;116(3):321-3.

45. Du Caju MV, Op De Beeck L, Sys SU, Hagendorens MM, Rooman RP. Progressive deceleration in growth as an early sign of delayed puberty in boys. *Horm Res.* 2000;54(3):126-30.

46. Gajdos ZK, Henderson KD, Hirschhorn JN, Palmert MR. Genetic determinants of pubertal timing in the general population. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;324(1-2):21-9.

47. Sedlmeyer IL, Hirschhorn JN, Palmert MR. Pedigree analysis of constitutional delay of growth and maturation: determination of familial aggregation and inheritance patterns. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(12):5581-6.

48. 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;93(3):723-8.

49. Gajdos ZK, Butler JL, Henderson KD, He C, Supelak PJ, Egyud M, et al. Association studies of common variants in 10 hypogonadotropic hypogonadism genes with age at menarche. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4290-8.

-
50. 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;95(8):2756-8.
51. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol*. 2009;5(10):569-76.
52. Seminara SB, Oliveira LM, Beranova M, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*. 2000;23(9):560-5.
53. 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;87(6):2973-7.
54. Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(4):1532-8.
55. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(2):163-74.
56. Silveira LF, Trarbach EB, Latronico AC. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;324(1-2):30-8.

57. 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;55(8):501-11. Aspectos clínicos e moleculares do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito.
58. Soussi-Yanicostas N, de Castro F, Julliard AK, Perfettini I, Chedotal A, Petit C. Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell*. 2002;109(2):217-28.
59. Soussi-Yanicostas N, Faivre-Sarrailh C, Hardelin JP, Levilliers J, Rougon G, Petit C. Anosmin-1 underlying the X chromosome-linked Kallmann syndrome is an adhesion molecule that can modulate neurite growth in a cell-type specific manner. *J Cell Sci*. 1998;111 (Pt 19):2953-65.
60. Tsai PS, Gill JC. Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2006;2(3):160-71.
61. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature genetics*. 2003;33(4):463-5.
62. Trarbach EB, Silveira LG, Latronico AC. Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency. *Pituitary*. 2007;10(4):381-91.

63. Trarbach EB, Teles MG, Costa EM, Abreu AP, Garmes HM, Guerra G, Jr., et al. Screening of autosomal gene deletions in patients with hypogonadotropic hypogonadism using multiplex ligation-dependent probe amplification: detection of a hemizygosis for the fibroblast growth factor receptor 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(3):371-6.
64. Groth C, Lardelli M. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *Int J Dev Biol*. 2002;46(4):393-400.
65. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *The Journal of clinical investigation*. 2008;118(8):2822-31.
66. Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LF, Garmes HM, Baptista MT, Teles MG, et al. Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(7):3491-6.
67. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, et al. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):4113-8.
68. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet*. 2006;2(10):e175.

69. de Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E, Schaison G. The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):567-72.
70. Semple RK, Kemal Topaloglu A. The recent genetics of hypogonadotropic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2009;72(4):427-35.
71. Kramer PR, Wray S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes Dev.* 2000;14(14):1824-34.
72. Miura K, Acierno JS, Jr., Seminara SB. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet.* 2004;49(5):265-8.
73. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of clinical investigation.* 2007;117(2):457-63.
74. Pinto G, Abadie V, Mesnage R, Blustajn J, Cabrol S, Amiel J, et al. CHARGE syndrome includes hypogonadotropic hypogonadism and abnormal olfactory bulb development. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(10):5621-6.

-
75. Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, et al. Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet.* 2004;36(9):955-7.
76. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *American journal of human genetics.* 2008;83(4):511-9.
77. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, et al. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet.* 2009;75(1):65-71.
78. Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *American journal of human genetics.* 2011;87(4):465-79.
79. Schwarting GA, Wierman ME, Tobet SA. Gonadotropin-releasing hormone neuronal migration. *Semin Reprod Med.* 2007;25(5):305-12.
80. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of KiSS-1 mRNA in the male rat. *Neuroendocrinology.* 2004;80(4):264-72.

81. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*. 2012;366(7):629-35.
82. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2742-8.
83. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsirias S, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(28):11703-8.
84. 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.
85. Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, et al. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nature genetics*. 1998;18(1):14-5.
86. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold JJ, 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.

-
87. Bedecarrats GY, Kaiser UB. Mutations in the human gonadotropin-releasing hormone receptor: insights into receptor biology and function. *Semin Reprod Med.* 2007;25(5):368-78.
88. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature genetics.* 2009;41(3):354-8.
89. Francou B, Bouligand J, Voican A, Amazit L, Trabado S, Fagart J, et al. Normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism due to TAC3/TACR3 mutations: characterization of neuroendocrine phenotypes and novel mutations. *PLoS One.* 2011;6(10):e25614.
90. Fukami M, Maruyama T, Dateki S, Sato N, Yoshimura Y, Ogata T. Hypothalamic dysfunction in a female with isolated hypogonadotropic hypogonadism and compound heterozygous TACR3 mutations and clinical manifestation in her heterozygous mother. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(6):477-81.
91. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2857-67.
92. Guran T, Tolhurst G, Bereket A, Rocha N, Porter K, Turan S, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to a novel missense mutation in the first

extracellular loop of the neurokinin B receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(10):3633-9.

93. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson ML, Gaillez S, Jeanpierre M, et al. TAC3 and TACR3 Defects Cause Hypothalamic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism in Humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2287-95.

94. Page NM, Bell NJ, Gardiner SM, Manyonda IT, Brayley KJ, Strange PG, et al. Characterization of the endokinins: human tachykinins with cardiovascular activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(10):6245-50.

95. Pennefather JN, Lecci A, Candenas ML, Patak E, Pinto FM, Maggi CA. Tachykinins and tachykinin receptors: a growing family. *Life Sci.* 2004;74(12):1445-63.

96. Severini C, Improta G, Falconieri-Erspamer G, Salvadori S, Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Pharmacol Rev.* 2002;54(2):285-322.

97. Lecci A, Maggi CA. Peripheral tachykinin receptors as potential therapeutic targets in visceral diseases. *Expert Opin Ther Targets.* 2003;7(3):343-62.

98. Maggi CA. Principles of tachykininergic co-transmission in the peripheral and enteric nervous system. *Regul Pept.* 2000;93(1-3):53-64.

99. Patacchini R, De Giorgio R, Bartho L, Barbara G, Corinaldesi R, Maggi CA. Evidence that tachykinins are the main NANC excitatory neurotransmitters in the guinea-pig common bile duct. *Br J Pharmacol.* 1998;124(8):1703-11.

100. Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature*. 1996;384(6607):360-4.
101. Carr MJ, Hunter DD, Jacoby DB, Udem BJ. Expression of tachykinins in nonnociceptive vagal afferent neurons during respiratory viral infection in guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(8):1071-5.
102. Lomax AE, Furness JB. Neurochemical classification of enteric neurons in the guinea-pig distal colon. *Cell Tissue Res*. 2000;302(1):59-72.
103. Maggi CA. The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells. *Regul Pept*. 1997;70(2-3):75-90.
104. Chiwakata C, Brackmann B, Hunt N, Davidoff M, Schulze W, Ivell R. Tachykinin (substance-P) gene expression in Leydig cells of the human and mouse testis. *Endocrinology*. 1991;128(5):2441-8.
105. Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol*. 1998;86(1):80-6.
106. Simon C, Portalier P, Chamoin MC, Ternaux JP. Substance P like-immunoreactivity release from enterochromaffin cells of rat caecum mucosa. Inhibition by serotonin and calcium-free medium. *Neurochem Int*. 1992;20(4):529-36.

107. Chu HW, Kraft M, Krause JE, Rex MD, Martin RJ. Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. *J Allergy Clin Immunol.* 2000;106(4):713-22.
108. Bae SJ, Matsunaga Y, Takenaka M, Tanaka Y, Hamazaki Y, Shimizu K, et al. Substance P induced preprotachykinin-a mRNA, neutral endopeptidase mRNA and substance P in cultured normal fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002;127(4):316-21.
109. Maghni K, Michoud MC, Alles M, Rubin A, Govindaraju V, Meloche C, et al. Airway smooth muscle cells express functional neurokinin-1 receptors and the nerve-derived preprotachykinin-a gene: regulation by passive sensitization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(1):103-10.
110. Pintado CO, Pinto FM, Pennefather JN, Hidalgo A, Baamonde A, Sanchez T, et al. A role for tachykinins in female mouse and rat reproductive function. *Biol Reprod.* 2003;69(3):940-6.
111. Page NM, Woods RJ, Gardiner SM, Lomthaisong K, Gladwell RT, Butlin DJ, et al. Excessive placental secretion of neurokinin B during the third trimester causes pre-eclampsia. *Nature.* 2000;405(6788):797-800.
112. Patak E, Candenas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martin JD, et al. Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol.* 2003;139(3):523-32.

-
113. Friess H, Zhu Z, Liard V, Shi X, Shrikhande SV, Wang L, et al. Neurokinin-1 receptor expression and its potential effects on tumor growth in human pancreatic cancer. *Lab Invest.* 2003;83(5):731-42.
114. De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, et al. Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature.* 1998;392(6674):394-7.
115. Bandari PS, Qian J, Oh HS, Potian JA, Yehia G, Harrison JS, et al. Crosstalk between neurokinin receptors is relevant to hematopoietic regulation: cloning and characterization of neurokinin-2 promoter. *J Neuroimmunol.* 2003;138(1-2):65-75.
116. Zhang X, Andren PE, Chergui K, Svenningsson P. Neurokinin B/NK3 receptors exert feedback inhibition on L-DOPA actions in the 6-OHDA lesion rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology.* 2008;54(7):1143-52.
117. Foroud T, Wetherill LF, Kramer J, Tischfield JA, Nurnberger JI, Jr., Schuckit MA, et al. The tachykinin receptor 3 is associated with alcohol and cocaine dependence. *Alcohol Clin Exp Res.* 2008;32(6):1023-30.
118. Page NM. New challenges in the study of the mammalian tachykinins. *Peptides.* 2005;26(8):1356-68.
119. Kotani H, Hoshimaru M, Nawa H, Nakanishi S. Structure and gene organization of bovine neuromedin K precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(18):7074-8.

120. Lang S, Sperk G. Neurochemical characterization of preprotachykinin B(50-79) immunoreactivity in the rat. *Regul Pept.* 1995;57(2):183-92.
121. Page NM. Hemokinins and endokinins. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(13):1652-63.
122. Page NM, Morrish DW, Weston-Bell NJ. Differential mRNA splicing and precursor processing of neurokinin B in neuroendocrine tissues. *Peptides.* 2009;30(8):1508-13.
123. Maggi CA. The mammalian tachykinin receptors. *Gen Pharmacol.* 1995;26(5):911-44.
124. Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *Eur J Pharmacol.* 2004;494(2-3):233-9.
125. Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, de Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, et al. Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology.* 2007;148(12):5752-60.
126. Grumbach MM. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(5):3122-7.
127. Rance NE, Young WS, 3rd. Hypertrophy and increased gene expression of neurons containing neurokinin-B and substance-P messenger ribonucleic acids in the hypothalami of postmenopausal women. *Endocrinology.* 1991;128(5):2239-47.

128. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE. Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: Morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol*. 2006;498(5):712-26.
129. Dorling AA, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology*. 2003;78(4):204-9.
130. Dellovade TL, Merchenthaler I. Estrogen regulation of neurokinin B gene expression in the mouse arcuate nucleus is mediated by estrogen receptor alpha. *Endocrinology*. 2004;145(2):736-42.
131. Ciofi P, Leroy D, Tramu G. Sexual dimorphism in the organization of the rat hypothalamic infundibular area. *Neuroscience*. 2006;141(4):1731-45.
132. Rance NE, Bruce TR. Neurokinin B gene expression is increased in the arcuate nucleus of ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. 1994;60(4):337-45.
133. Smith JT, Cunningham MJ, Rissman EF, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*. 2005;146(9):3686-92.
134. Rometo AM, Krajewski SJ, Voytko ML, Rance NE. Hypertrophy and increased kisspeptin gene expression in the hypothalamic infundibular nucleus of

postmenopausal women and ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(7):2744-50.

135. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci.* 2009;29(38):11859-66.

136. Krajewski SJ, Burke MC, Anderson MJ, McMullen NT, Rance NE. Forebrain projections of arcuate neurokinin B neurons demonstrated by anterograde tract-tracing and monosodium glutamate lesions in the rat. *Neuroscience.* 2010;166(2):680-97.

137. Topaloglu AK. Neurokinin B signaling in puberty: Human and animal studies. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;324(1-2):64-9.

138. Merighi A. Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol.* 2002;66(3):161-90.

139. Kung TT, Crawley Y, Jones H, Luo B, Gilchrest H, Greenfeder S, et al. Tachykinin NK3-receptor deficiency does not inhibit pulmonary eosinophilia in allergic mice. *Pharmacol Res.* 2004;50(6):611-5.

140. Liao BY, Zhang J. Null mutations in human and mouse orthologs frequently result in different phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(19):6987-92.

141. Yang JJ, Caligioni CS, Chan YM, Seminara SB. Uncovering novel reproductive defects in neurokinin B receptor null mice: closing the gap between mice and men. *Endocrinology*. 2012;153(3):1498-508.
142. Sahu A, Kalra SP. Effects of tachykinins on luteinizing hormone release in female rats: potent inhibitory action of neuropeptide K. *Endocrinology*. 1992;130(3):1571-7.
143. Sandoval-Guzman T, Rance NE. Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res*. 2004;1026(2):307-12.
144. McManus CJ, Valent M, Lehman MN, Goodman R. A neurokinin B agonist stimulates LH secretion in follicular, but not luteal phase ewes. Society for Neuroscience Annual Meeting Washington 2005.
145. Corander MP, Challis BG, Thompson EL, Jovanovic Z, Loraine Tung YC, Rimmington D, et al. A study of the effects of neurokinin B (NKB) upon gonadotrophin release in male rodents. *J Neuroendocrinol*. 2009;22(3):181-7.
146. Smith MS, Grove KL. Integration of the regulation of reproductive function and energy balance: lactation as a model. *Front Neuroendocrinol*. 2002;23(3):225-56.
147. Caronia LM, Martin C, Welt CK, Sykiotis GP, Quinton R, Thambundit A, et al. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med*. 2011;364(3):215-25.

148. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291-303.
149. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13-23.
150. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
151. Sambrook J FE, Maniatis T. *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3rd, editor. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
152. Karges B, de Roux N. Molecular genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Endocr Dev*. 2005;8:67-80.
153. Karges B, Karges W, de Roux N. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Hum Reprod Update*. 2003;9(6):523-30.
154. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol*. 2005;489(3):372-86.
155. Rance NE. Menopause and the human hypothalamus: evidence for the role of kisspeptin/neurokinin B neurons in the regulation of estrogen negative feedback. *Peptides*. 2009;30(1):111-22.

156. Latronico AC. The neurokinin B pathway in human reproduction. *Nature genetics*. 2009;41(3):269-70.
157. Morton NE, Simpson SP, Lew R, Yee S. Estimation of haplotype frequencies. *Tissue Antigens*. 1983;22(4):257-62.
158. Chevrier L, Guimiot F, de Roux N. GnRH receptor mutations in isolated gonadotropic deficiency. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;346(1-2):21-8.
159. Kannu P, O'Rielly DD, Hyland JC, Kokko LA. Avascular necrosis of the femoral head due to a novel C propeptide mutation in COL2A1. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(7):1759-62.
160. Symoens S, Malfait F, Vlummens P, Hermanns-Le T, Syx D, De Paepe A. A novel splice variant in the N-propeptide of COL5A1 causes an EDS phenotype with severe kyphoscoliosis and eye involvement. *PLoS One*. 2011;6(5):e20121.
161. Page NM, Dakour J, Morrish DW. Gene regulation of neurokinin B and its receptor NK3 in late pregnancy and pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod*. 2006;12(7):427-33.
162. Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahimi OA, et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6281-6.

-
163. Probst WC, Snyder LA, Schuster DI, Brosius J, Sealfon SC. Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell Biol.* 1992;11(1):1-20.
164. Beranova M, Oliveira LM, Bedecarrats GY, Schipani E, Vallejo M, Ammini AC, et al. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1580-8.
165. Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1317-22.
166. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2007;357(9):863-73.
167. Bhangoo A, Jacobson-Dickman E. The genetics of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: unraveling the biology of human sexual development. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2009;6(3):395-404.
168. 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;91(12):5117-21.

169. Pralong FP, Gomez F, Castillo E, Cotechia S, Abuin L, Aubert ML, et al. Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3811-6.
170. Chang YF, Imam JS, Wilkinson MF. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry.* 2007;76:51-74.
171. Hentze MW, Kulozik AE. A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell.* 1999;96(3):307-10.
172. Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS, Rivolta C. Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *The Journal of clinical investigation.* 2008;118(4):1519-31.
173. Holbrook JA, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE. Nonsense-mediated decay approaches the clinic. *Nature genetics.* 2004;36(8):801-8.
174. Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *European journal of human genetics : EJHG.* 2006;14(10):1074-81.
175. Wildt L, Hausler A, Marshall G, Hutchison JS, Plant TM, Belchetz PE, et al. Frequency and amplitude of gonadotropin-releasing hormone stimulation and gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 1981;109(2):376-85.

176. Wise PM, Rance N, Barr GD, Barraclough CA. Further evidence that luteinizing hormone-releasing hormone also is follicle-stimulating hormone-releasing hormone. *Endocrinology*. 1979;104(4):940-7.
177. Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain Res*. 2010;1364:116-28.
178. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, et al. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15140-4.

Apêndice

TAC3/TACR3 Mutations Reveal Preferential Activation of Gonadotropin-Releasing Hormone Release by Neurokinin B in Neonatal Life Followed by Reversal in Adulthood

Elena Gianetti, Cintia Tusset, Sekoni D. Noel, Margaret G. Au, Andrew A. Dwyer, Virginia A. Hughes, Ana Paula Abreu, Jessica Carroll, Ericka Trarbach, Leticia F. G. Silveira, Elaine M. F. Costa, Berenice Bilharinho de Mendonça, Margaret de Castro, Adriana Lofrano, Janet E. Hall, Erol Bolu, Metin Ozata, Richard Quinton, John K. Amory, Susan E. Stewart, Wiebke Arlt, Trevor R. Cole, William F. Crowley, Ursula B. Kaiser, Ana Claudia Latronico, and Stephanie B. Seminara*

Context: Mutations in *TAC3* and *TACR3* (encoding neurokinin B and its receptor) have been identified in Turkish patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH), but broader populations have not yet been tested and genotype-phenotype correlations have not been established.

Objective: A broad cohort of normosmic IHH probands was screened for mutations in *TAC3/TACR3* to evaluate the prevalence of such mutations and define the genotype/phenotype relationships.

Design and Setting: The study consisted of sequencing of *TAC3/TACR3*, *in vitro* functional assays, and neuroendocrine phenotyping conducted in tertiary care centers worldwide.

Patients or Other Participants: 345 probands, 18 family members, and 292 controls were studied.

Intervention: Reproductive phenotypes throughout reproductive life and before and after therapy were examined.

Main Outcome Measure: Rare sequence variants in *TAC3/TACR3* were detected.

Results: In *TACR3*, 19 probands harbored 13 distinct coding sequence rare nucleotide variants [three nonsense mutations, six nonsynonymous, four synonymous (one predicted to affect splicing)]. In *TAC3*, one homozygous single base pair deletion was identified, resulting in complete loss of the neurokinin B decapeptide. Phenotypic information was available on 16 males and seven females with coding sequence variants in *TACR3/TAC3*. Of the 16 males, 15 had micropallus; none of the females had spontaneous thelarche. Seven of the 16 males and five of the seven females were assessed after discontinuation of therapy; six of the seven males and four of the five females demonstrated evidence for reversibility of their hypogonadotropism.

Conclusions: Mutations in the neurokinin B pathway are relatively common as causes of hypogonadism. Although the neurokinin B pathway appears essential during early sexual development, its importance in sustaining the integrity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis appears attenuated over time. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: 2857–2867, 2010)

Humans with defects in GnRH secretion and/or action with resulting idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH) have been instrumental in defining the genetic control of this hormone. Human, animal, cellular, and bioinformatic models have been integrated to identify and understand the roles of genes affecting GnRH neuronal migration [*KAL1* (1), *FGFR1* (2), *FGF8* (3), *NELF* (4), *PROK2* (5–8), *PROKR2* (6, 8)], GnRH secretory activity [*KISS1-R* (9, 10), *GNRH1* (11–13)], pituitary GnRH responsiveness [*GNRHR* (14)], and, in some cases, functions yet to be clearly understood [*CHD7* (15)]. The newest proteins on this list are neurokinin B (NKB, encoded by *TAC3*) and its cognate G protein-coupled receptor, NK3-R (encoded by *TACR3*) (16). NKB is a member of the tachykinin superfamily of neuropeptides that includes substance P and neurokinin A (17). Mutations in the genes encoding this ligand-receptor pair were recently identified in a Turkish population of normosmic IHH (nIHH) patients (16).

The mechanism(s) by which mutations in the NKB pathway cause GnRH deficiency and IHH are not yet clear. However, NKB is expressed in the same neurons that express kisspeptin, a member of the RF amide family of proteins (sharing the common C-terminal sequence Arg-Phe-NH₂) (18, 19). Although mutations in the gene encoding kisspeptin (*KISS1*) have yet to be reported in humans with GnRH deficiency, mutations in the gene encoding the kisspeptin receptor (*KISS1-R* or *GPR54*) have been identified in nIHH probands as well as in individuals with central precocious puberty (9, 10, 20–23). Kisspeptin is a powerful stimulus for GnRH-induced LH secretion, whereas paradoxically, NKB agonists appear to have an excitatory or inhibitory effect on GnRH-induced gonadotropin secretion in rodent models depending on gender and sex steroid milieu (24–27). This variability in response to NKB seems at odds with the discovery of loss of function mutations in the NKB signaling pathway in hypogonadotropic patients (16).

Because the original mutations in *TAC3* and *TACR3* were described only in Turkish patients, the goal of this study was to examine the prevalence of *TAC3* and *TACR3* mutations in a much larger, international cohort of patients. Once putative mutations were identified, their functional consequences were studied *in vitro*. The phenotypic

consequences of mutation-carrying patients were investigated at several developmental windows including neonatal life, adolescence/early adulthood, and late adulthood (after sex steroid therapy) as evaluated by physical examination, gonadotropin pulse pattern, and fertility outcome.

The data from these studies demonstrate that functionally validated rare sequence variants within the tachykinin pathway profoundly impact the functioning of the hypothalamic-pituitary-gonadal (hpg) axis in late gestation. However, the effect of these same mutations appears to attenuate over time because a significant proportion of patients carrying mutations exhibited partial or complete reversal of their hypogonadotropism in adult life. These data thus suggest that patients with genetic mutations in this system may not require lifelong sex steroid replacement and may be capable of spontaneous fertility. Finally, these findings have importance for assembling the hierarchy of the various neuroendocrine and genetic determinants of GnRH secretion in the human during both adolescent puberty and the “mini-puberty” of neonatal life.

Patients and Methods

All study activities fell under research protocols approved by the Massachusetts General Hospital Institutional Review Board.

Patient cohorts

The *TAC3* and *TACR3* genes were screened in two groups: patients affected by nIHH, and prospectively recruited volunteers determined to have normal reproductive function by history and physical examination (192 Caucasians screened for all coding exons, and 100 Brazilians screened only for five nucleotide variants: G18D, I249V, Y256H, W275X, and R295S). Patients were referred directly to the Reproductive Endocrine Associates of Massachusetts General Hospital or the Developmental Endocrinology Unit of the Clinical Hospital in Sao Paulo, Brazil, for clinical evaluation, or they were referred by their physicians to participate in genetic studies. Whenever possible, patients were interviewed by both a physician and a genetics counselor using an Institutional Review Board-approved questionnaire to obtain a thorough medical and family history.

The diagnosis of nIHH was based on the failure to undergo normal sexual maturation by age 18 yr, low serum sex steroid levels in the setting of inappropriately low or normal gonadotropin levels, and no other abnormality detected on cranial imaging (28).

Harvard Center for Reproductive Sciences and Reproductive Endocrine Unit (E.G., M.G.A., A.A.D., V.A.H., J.E.H., W.F.C., S.B.S.), Department of Medicine, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts 02114; Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (C.T., E.T., L.F.G.S., E.M.F.C., B.B.d.M., A.C.L.), Serviço de Endocrinologia - Divisão de Clínica Médica I, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 05403-900 São Paulo, Brazil; Harvard Center for Reproductive Sciences and Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension (S.D.N., A.P.A., J.C., U.B.K.), Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts 02115; Departamento de Clínica Médica (M.d.C.), Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Monte Alegre 14049900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; Section of Endocrinology (A.L.), University Hospital of Brasília and Molecular Pharmacology Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Brasília, DF 70910-900 Brasília, Brazil; Department of Endocrinology (E.B., M.O.), Gulhane School of Medicine, Ankara 06018, Turkey; Endocrinology Research Group (R.Q.), Institute for Human Genetics, University of Newcastle-upon-Tyne, Newcastle-upon-Tyne NE1 3BZ, United Kingdom; Division of General Internal Medicine (J.K.A.), University of Washington Medical Center, Seattle, Washington 98195; Clinical Genetics Unit (S.E.S., T.R.C.), Birmingham Women's Hospital National Health Service Foundation Trust, Edgbaston, Birmingham B15 2TG, United Kingdom; and Centre for Endocrinology, Diabetes, and Metabolism (W.A.), School of Clinical and Experimental Medicine, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, United Kingdom

Olfactory testing employed the University of Pennsylvania identification test whenever possible (29). A score of at least the fifth centile based on sex and age was deemed normal. Of the 345 IHH patients who were screened, 107 were normosmic by olfactory testing, four were hyposmic, and the remaining 234 were normosmic by self-report.

The 345 IHH probands represented a diverse racial mix: 213 were Caucasian (including 37 from Turkey), 25 were Asian, one was American Indian/Alaskan native, 12 were African American, one was mixed native American/Caucasian, and 93 were unknown [of these, 60 of 93 were Brazilian (30)] (Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>).

Of the nIHH probands, 248 were male, 95 were female, and two were unknown. These ratios are consistent with previously published reports demonstrating a male predominance in nIHH (31).

Of the nIHH pedigrees, 89 were familial and 80 were sporadic, with the remaining unknown as to their mode of inheritance. Of the familial cases, 43 could be classified as autosomal dominant, 27 as autosomal recessive, and two as X-linked.

Clinical studies

Of the 345 IHH patients screened, 97 were admitted to the General Clinical Research Center of Massachusetts General Hospital for blood sampling every 10 min for 12–24 h to assess endogenous GnRH-induced LH secretion as previously described (32).

Clinical assays

Blood-sampling studies were performed over a 29-yr period; therefore, two different immunoassay systems were used for the measurement of LH. Originally, LH measurements were made via RIA with a limit of detection of 0.8 IU/liter (33). Later, this assay was switched to an automated microparticle enzyme immunoassay (AxSYM System; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) with a limit of detection of 1.6 IU/liter. The microparticle enzyme immunoassay was calibrated using the same reference preparations as the RIA to make results comparable across data sets. The data regarding the presence or absence of LH pulses are based on the respective limits of detection of each system and integrated by virtue of a common standard in both assays that permitted interconversion.

Mutation analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. Probands were screened by PCR amplification of exon segments and direct sequencing. The coding region of the *TAC3* and *TACR3* genes were amplified using PCR. The *TAC3* gene (chromosome 12; GenBank accession no. NM 013251) consists of 10 exons. The *TACR3* gene (chromosome 4; GenBank accession no. NM 001059) consists of five exons. Primers are outlined in Supplemental Data 1. All amplified products were sequenced using the AmpliTaq Dye Terminator Cycle Sequencing Kit and an ABI PRISM 377 DNA sequencer (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA). All sequence variations were found on both strands and confirmed in a separate PCR. All nucleotide changes were assessed for their presence in the National Center for Biotechnology Information database of single nucleotide polymorphisms, the expressed sequence tags database, and among control alleles.

Of the 345 probands in the cohort, 284 were also screened for mutations in genes known to be involved in IHH, including *FGFR1* (n = 332), *KISS1-R* (n = 336), *NELF* (n = 274), *GNRHR* (n = 343), *FGF8* (n = 332), *GNRH1* (n = 200), *KAL1* (n = 334), *PROK2* (n = 330), and *PROKR2* (n = 330).

Functional studies

African green monkey kidney fibroblast cells (COS-7 cells) were transiently transfected with 0.5 μ g of either WT, G18D, I249V, Y256H, R295S, or Y315C NK3-R or empty vector (EV) (pcDNA3.1+) using GenePORTER Transfection Reagent (Gene Therapy Systems, San Diego, CA). Generation of NK3-R mutations and inositol phosphate (IP) assays are described in Supplemental Data 2.

Results

IHH and *TACR3*

Ethnic and gender distribution

Rare nucleotide variants in *TACR3* were identified in 19 of 345 nIHH probands for a total prevalence of 5.5%. When the frequency of variants was examined in different racial subgroups, nucleotide changes were identified in 10 of 213 Caucasian probands (4.7%; four of the 10 probands were Turkish, for a 10.8% frequency in that ethnic subgroup), two of 25 were Asian probands (8%), and one of 12 was an African-American proband (8.3%) (Table S1). In probands where the racial designation was uncertain, one of 11 Hispanic probands (9%), four of 60 Brazilian probands (6.7%) (30), and one additional individual also harbored variants (Supplemental Table 1). Rare nucleotide variants were identified in 15 of 247 males (6.1%) and four of 95 females (4.2%) and thus occurred at approximately equal frequency in both genders.

Variants

Of the 345 nIHH probands, 19 were found to harbor 13 distinct coding sequence nucleotide variants in *TACR3* that were not observed in 292 controls (Table 1; also see Fig. 2). With the exception of P353S, which had previously been reported in the Turkish population (16), all other variants were novel. Three of the 13 variants were nonsense mutations (S27X, W280X, W275X); six of 13 variants were nonsynonymous (*i.e.* changing the amino acid: G18D, I249V, Y256H, R295S, Y315C, P353S); and the remaining four variants were synonymous (*i.e.* not changing the amino acid: L58L, V98V, T246T, S448S). However, the homozygous G>A transition underlying T246T occurred in the last base pair of exon 2 and was predicted to affect splicing (NNSPLICE 0.9). Of the nonsense, nonsynonymous, and putative splice site changes (n = 10), six were homozygous [S27X, W275X (present in three probands), Y256H, Y315C, P353S, T246T], and five variants

TABLE 1. Probands bearing rare variants in *TACR3* and *TAC3*

Proband	Change (nucleotide)	Change (amino acid)	Functional consequences	Inheritance	Race	Coding mutation in other genes
<i>TACR3</i>						
Nonsense mutations						
1	[c. 80 C>A]+[c. 80 C>A]	S27X/S27X	PTC		C	None ¹
2	[c. 623 G>A]+[=]	W208X/N	PTC	F	C	None ¹
3	[c. 824 G>A]+[c. 824 G>A]	W275X/W275X	PTC	S	C	None ²
4	[c. 824 G>A]+[c. 824 G>A]	W275X/W275X	PTC	F	C	None ¹
5	[c. 824 G>A]+[c. 824 G>A]	W275X/W275X	PTC	F	C	None ⁴
6	[c. 824 G>A]+[=]	W275X/N	PTC	S	C	None ¹
7	[c. 824 G>A]+[=]	W275X/N	PTC	F	C	None ¹
8	[c. 824 G>A]+[=]	W275X/N	PTC	S	C	None ²
9	[c. 172 C>T]+[=] and [c. 824 G>A]+[=]	L58 I/N and W275X/N	N/A and PTC	F	C	None ⁴
Nonsynonymous changes						
10	[c. 53 G>A]+[=]	G18D/N	=	S		None ⁴
11	[c. 745 A>G]+[=]	I249V/N	=	F	H	None ³
12	[c. 766 T>C]+[c. 766 T>C]	Y256H/Y256H	↓↓↓ IP	S	C	None ¹
13	[c. 885 A>C]+[=]	R295S/N	↓↓↓ IP	F		None ⁴
14	[c. 944 A>G]+[c. 944 A>G]	Y315C/Y315C	↓↓↓ IP	F		None ²
15	[c. 1057 C>T]+[c. 1057 C>T]	P353S/P353S	↓↓↓ Calcium ^a	F	C	None ¹
Synonymous changes						
16	[c. 294 G>C]+[=]	V98V/N	N/A	S	AA	Not screened
17	[c. 738 G>A]+[c. 738 G>A]	T246T/T246T	Loss of splice site	S	A	GnRH1: het T58S 2
18	[c. 1344 C>T]+[=]	S448S/N	N/A	(Adopted)	A	None ²
19	[c. 1344 C>T]+[=]	S448S/N	N/A		C	None ¹
<i>TAC3</i>						
20	[c. 60 Gdel]+[c. 60 Gdel]	G20fsX39/G20fsX39	PTC	F	A	None ²

¹ Screened for GnRHR, KISS1-R, FGFR1, FGFR2, PROKR2, NELLF, GnRH1; ² screened for GnRHR, KISS1-R, FGFR1, FGFR2, PROKR2, NELLF; ³ screened for GnRHR, KISS1-R, FGFR2, PROKR2, NELLF; ⁴ screened for GnRHR, KISS1-R, FGFR1, FGFR2, PROKR2, GnRH1. N/A, Not applicable; N, normal allele; PTC, premature termination codon; F, familial; S, sporadic; C, Caucasian; A, Asian; AA, African-American; H, Hispanic; =, IP accumulation not different from WT; ↓↓↓, IP accumulation reduced compared to WT.

^a Previously published (16).

FIG. 1. Pedigrees of familial cases of *TACR3* and *TAC3* mutations. With only one exception, all the affected family members had the same change as their respective probands. A, Proband 4; B, proband 7; C, proband 2; D, proband 11; E, proband 20.

were heterozygous [G18D, W208X, I249V, W275X (present in four probands), R295S].

Of the eight probands bearing homozygous *TACR3* variants, three were familial (only one of the three appeared to have an autosomal recessive mode of inheritance), three were sporadic, and two were unknown. Of the 11 probands bearing heterozygous ($n = 10$) or possible compound heterozygous ($n = 1$) variants, five were familial (one dominant, two recessive, and two unknown), four were sporadic, and two were unknown.

In familial cases, the identified nucleotide variants did not arise *de novo* but rather were present in at least one parent and all family members who were affected by IHH and whose DNA was available (Fig. 1). This observation suggests that *TACR3* does not undergo frequent spontaneous mutagenesis.

Functional studies

In WT NK3-R transfected cells, NKB caused a 16.7 ± 3.9 -fold induction of IP production; in contrast, cells

transfected with EV failed to show any IP induction. Y256H, R295S, and Y315C NK-3R variants showed complete loss of function, with IP induction of 1.2 ± 0.2 -fold, 3.2 ± 0.6 -fold, and 1.7 ± 0.5 -fold, respectively, over unstimulated levels. In contrast, cells transfected with the G18D or I249V NK3-R variant had a 13.5 ± 3.5 -fold and 16.1 ± 4.4 -fold IP induction, respectively, in response to 10^{-7} M NKB, not significantly different from cells transfected with WT NK3-R (Fig. 2).

Clinical phenotypes

Probands carrying rare variants in *TACR3* exhibited a broad range of phenotypes. Of males carrying coding sequence variants in *TACR3* and in whom information was available ($n = 15$ probands and one family member), 15 of 16 or 94% had microphallus [stretched penile length of less than 10.5 cm (34)] as assessed by questionnaire or physical examination at first presentation (in most cases) (Table 2). Surprisingly, despite this high prevalence of microphallus, only two probands (no. 7 and no. 13) had cryptorchidism. Testes size was generally small but did range from 1–12 ml, suggesting that some probands had undergone partial sexual maturation (35) (Table 2). Of females carrying sequence variants in *TACR3* and in whom information was available ($n = 3$), none had spontaneous thelarche or menarche (Table 3).

Probands were also evaluated after treatment was discontinued (most commonly sex steroids). In striking contrast to the signs of severe hypogonadotropism that accompanied their initial presentation (pre treatment), several probands with *TACR3* mutations showed evidence for spontaneous activity of their hpg axis post treatment in adulthood. Three males [no. 6 with W275X/N, no. 8 with W275X/N, no. 12 with Y256H/Y256H (functionally validated)] exhibited significant increases in testicular volume while on androgens, suggestive of endogenous gonadotropin stimulation of Sertoli cell complement (Table 2). Notably, no. 6 and no. 8 also achieved fertility in the absence of gonadotropin/GnRH therapy.

Four male probands underwent blood sampling every 10 min to assess endogenous GnRH-induced LH pulsatility (Table 2 and Fig. 3). Within this group, no. 12 [Y256H/Y256H (functionally validated)] had 5-ml testes and a testosterone (T) level of 65 ng/dl pre treatment. After androgen treatment, he had 12-ml testes, T level of 222

FIG. 2. A, Schematic of mutations in NK3-R. B, Effects of mutations in *TACR3* on NKB-mediated activation of signal transduction. COS-7 cells transfected with wild-type (WT), G18D, I249V, Y256H, R295S, and Y315C NK3-R or EV were treated with NKB (10^{-7} M) for 1 h. A significant increase in IP accumulation occurred in cells transfected with WT, G18D, or I249V NK3-R. In contrast, there was a marked reduction in NKB-stimulated IP production in cells transfected with Y256H, R295S, or Y315C NK3-R, or with EV. a, b, and c denote significantly different fold increases in IP accumulation.

ng/dl, and four LH pulses during 12 h of blood sampling every 10 min. Similarly, patient 16 (V98V/N) had a T level of 16 ng/dl before treatment but 246 ng/dl after treatment, accompanied by five LH pulses in 12 h. Proband 6 (W275X/N) had a complete absence of GnRH-induced LH pulses before starting sex steroid therapy; after treatment, two LH pulses were detectable. Despite this modest change in his neuroendocrine profile, years later, this patient conceived a child in the absence of GnRH or gonadotropin therapy (genetic paternity not confirmed). Proband 7 (W275X/N) also had no LH pulses before androgen therapy but after treatment demonstrated robust LH pulses (although his T levels remained subnormal) (Table 2 and Fig. 3). Notably, one of the brothers of proband 7 (7b) who carried the same W275X mutation demonstrated an active LH pattern on his post treatment sampling study but with normal T levels (Figs. 1B and 3 and Table 2). Another brother with IHH also showed a

“normalized” hpg axis after treatment based on hormone levels, but no DNA is available to confirm his *TACR3* genotype (Fig. 1B).

IHH and *TAC3*

For *TAC3*, one female proband from a consanguineous family (no. 20) was found to harbor a homozygous frameshift mutation (c.G60del) leading to a premature termination codon in the precursor upstream of the NKB decapeptide (Supplemental Fig. 1). After treatment with sex steroids, this individual conceived a child without fertility medications, but she subsequently suffered an early pregnancy loss. One of her sisters carrying the same homozygous mutation (no. 20b) also conceived spontaneously, and she carried the pregnancy to term (Table 3 and Fig. 1). Sister 20c has not conceived but has regular menstrual cycles (Table 3 and Fig. 1). Sister 20d has had a positive withdrawal bleed to a progesterone challenge but does not cycle spontaneously (Table 3 and Fig. 1).

Discussion

This report focuses on reproductive phenotypes before and after sex steroid therapy in hypogonadotropic patients with rare nucleotide variants in the NKB pathway. Although information regarding the probands and family members comes from several different sources with variable depth of phenotyping, therapies, and intensity of follow-up, two striking biological features emerge. Most males carrying *TACR3* variants for whom physical examination evidence was available (94%) had microphallus identified either neonatally or later in life. This frequency stands in sharp contrast to an 8% prevalence of microphallus in an nIHH cohort ($n = 42$) selected without consideration of genetic etiology (35). Because phallic growth is strongly influenced by the integrity of the *in utero* activity of the hpg axis in late gestation (36), this consistent presence of microphallus suggests that NKB-stimulated signaling plays an important role as a driver of GnRH secretory activity during this critical window of development. Second, the majority of patients who were assessed longitudinally after discontinuation of sex steroid

TABLE 2. Phenotypic characterization of male probands and family members harboring rare variants in *TACR3* before and after treatment

Proband	Before treatment				After treatment			
	Testis size; phallus size	T levels (ng/dl)	No. of pulses/mean LH (q 10 min sampling × 12 h for LH)	Treatment	Testis size; phallus size	T levels (ng/dl)	No. of pulses/mean LH (q 10 min sampling × 12 h for LH)	Evidence for neuroendocrine recovery
1	—	—	—	T	0.5 ml; 6 cm	—	—	—
3	"Small phallus" ^a	14	—	T	4–5 ml; 9.5 cm	—	—	—
4	1 ml; 7 cm	—	—	T	—	—	—	—
5	2 ml; 7 cm	35	—	T	3 ml; 10 cm	—	—	—
6	2 ml; 5 cm	16	0/1.2	T	8 ml; "increased phallus"	38	2/3.2	Spontaneous fertility
7	2 ml; "small phallus"	57	0/0.8	T, GnRH pump, hCG	10 ml; "NL phallus"	68	8/7.9	↑ LH pulses
8	6 ml; 4 cm	<28	—	T, hCG+FSH	25 ml	285	—	Spontaneous fertility
9	6 ml; 12.5 cm	34	—	T	8 ml; 12.5 cm	—	—	—
10	2 ml	<14	—	—	—	—	—	—
12	5 ml; "small phallus"	65	—	T	12 ml; "NL phallus"	222	4/7.5	↑ T
13	2 ml; 6 cm	30	—	T	9 cm	—	—	—
15	—	—	—	T, hCG	6 ml; 8 cm	"Low"	—	No
16	12 ml; "small phallus" ^a	16	—	T	13 ml; 10 cm	246	5/7.4	↑ T
17	"Small phallus" ^a	—	—	T	3 ml	—	—	—
19	1–2 ml; "small phallus"	—	—	T	1–2 ml; 7 cm	—	—	—
Family members								
4b	—	—	—	—	—	—	—	—
7b	4 ml; "small phallus"	35	0/1.7	T, GnRH	11 ml; "NL phallus"	505	6/9.1	↑ LH pulses

NL, Normal; —, unknown; hCG, human chorionic gonadotropin; ↑, increased.

^a These assessments were made at birth; all others were made at the first presentation for abnormal pubertal development.

TABLE 3. Phenotypic characterization of female probands and family members harboring rare variants in *TACR3* and *TAC3* before and after treatment

Proband	Before treatment			After treatment				Evidence for neuroendocrine recovery
	Breast	Menarche	No. of pulses/mean LH (q 10 min sampling × 12 h for LH)	Treatment	Breast	Menarche	No. of pulses/mean LH (q 10 min sampling × 12 h for LH)	
<i>TACR3</i>								
2	No	No	0/0.8	E/P	III	Yes	0/0.9	No
11	No	No	0/1.6	E/P	IV	Yes	—	—
14	—	—	—	E/P	—	Yes	—	—
18	No	No	—	E/P ^a	—	Yes	—	—
<i>TAC3</i>								
20	No	No	—	E/P	Yes	Yes	—	S
								Spontaneous fertility, spontaneous vaginal bleeding
Family members								
20b	No	No	—	E/P	Yes	Yes	—	S
20c	No	No	—	E/P	Yes	Yes	—	No
								Spontaneous fertility Spontaneous regular vaginal bleeding
20d	No	No	—	E/P	Yes	Yes	—	No
								Vaginal bleeding after progesterone monotherapy

E/P, Estrogens/progesterone; S, spontaneous; —, unknown.

^a Also clomiphene, pulsatile GnRH, and gonadotropins.

FIG. 3. Blood sampling every 10 min regarding reversal probands. *Left*, Studies before treatment. *Right*, Studies after discontinuation of treatment. *, T value represents a single blood sample taken within 5 months of the sampling study.

therapy exhibited evidence of spontaneous partial or complete recovery of their reproductive axis (10 of 12 or 83%), as determined by increases in LH pulsatility, T, testicular volume, the presence of withdrawal bleeding, spontaneous menstrual cycles, and/or spontaneous pregnancy (10 individuals with rare sequence variants: 9 of 10 with termination, frameshift, or functionally validated mutations; and one of 10 with heterozygous synonymous change). Although determining the true incidence of amelioration of IHH is limited by the difficulty of assessing patients off therapy, the high prevalence of reversal reported here stands in sharp distinction to the much lower reported incidence of recovery from GnRH deficiency in a patient cohort bearing a variety of genetic mutations (~10%) (28). Thus, *TAC3/TACR3* genetic defects may portend future prognosis in IHH and foreshadow the possibility of discontinuing sex steroid or gonadotropin therapy later in life. More importantly, perhaps, this striking phenotype strongly suggests that the role of the NKB system in GnRH secretion may be less critical in adult life than during late gestation and the early neonatal period. This finding is in contrast to patients with *DAX1* mutations causing adrenal hypoplasia congenita (IHH and adrenal insufficiency), who can have active hpg axes in neonatal life followed by adolescent hypogonadotropism (37). Moreover, the *TAC3/TACR3* phenotype appears to be distinct from the phenotypes associated with another secretory product of the same neurons, kisspeptin, and its cognate receptor, *KISS1-R*, where reversal of IHH has not yet been described. Of course, this latter point must be interpreted with caution because the number of well-studied muta-

tions in the *KISS1/KISS1-R* system is much smaller at this time (9, 10, 20, 21).

Nonsense mutations in the ligand (*TAC3*) and receptor (*TACR3*) provide an important opportunity to examine the most severe dosing of gene impairment, thereby allowing a contrast of phenotypic severity as well as a contrast between the two sexes. For example, two females with a homozygous frameshift mutation in *TAC3* conceived spontaneously. Another continued having spontaneous regular menstrual cycles after discontinuation of sex steroid treatment. Because the homozygous *TAC3* mutation led to a complete absence of peptide, these patients demonstrate that the ligand, NKB, is dispensable for GnRH synthesis and secretion during the adult period. Because the tachykinin pathway is already well known to be promiscuous, other tachykinins, or even completely different ligands might compensate for their absence of NKB (17).

In parallel to this ligand mutation, four men had homozygous nonsense mutations in *TACR3*. Although patient 3 (homozygous W275X) was born with a microphallus, no follow-up is available to determine whether his hypogonadal state persisted or showed evidence for recovery later in life. Similarly, little follow-up information is available on the other male homozygous patients: no. 1 (S27X/S27X), no. 4 and no. 5 (W275X/W275X), as well as no. 17 (with the presumed homozygous splice site mutation T246T/T246T). However, proband 12 (Y256H/Y256H; validated loss-of-function *in vitro*) presented at age 21 with a history of microphallus and a hypogonadal T level (65 ng/dl) but subsequently demonstrated robust LH pulses off therapy with T levels of 222 ng/dl later in adulthood. This observation suggests that patients with markedly abnormal signaling through the NKB receptor can still achieve robust GnRH synthesis and secretion during adulthood.

Using traditional Mendelian principles, patients bearing heterozygous mutations in autosomal recessively inherited genes, such as those encoding NKB and its receptor, would not be predicted to manifest a disease phenotype. However, heterozygous mutations in the gene encoding another G protein-coupled receptor [prokineticin 2 receptor (*PROKR2*)] have now been reported as contributors to the IHH disease phenotype, either alone or in the presence of heterozygous mutations in other as-yet-to-be-identified genes/pathways (8). Thus, patients with homozygous nonsense mutations in *TACR3* might be hypothesized to have more severe phenotypes than those

bearing heterozygous mutations. Three probands with homozygous W275X presented with microphallus; however, three of four men bearing heterozygous nonsense mutations also had microphallus, suggesting that despite a smaller number of intact *TACR3* alleles, the severity of early androgen deficiency was comparable. Importantly, whereas the vast majority of the patients with mutations in this series were screened for mutations in the other genes currently known to cause IHH, strikingly only one rare heterozygous variant (13) was identified in another gene (proband 17, bearing heterozygous T58S in *GnRH1*) (Table 1).

Despite the number of mutations identified in the NKB pathway, our knowledge of how this ligand/receptor pair influences GnRH secretion remains incomplete. In rodents and sheep, NKB and its receptor are coexpressed in neurons that express kisspeptin and dynorphin (18, 19), raising the possibility of neurokinins acting indirectly to modulate GnRH secretion. Like many other genes involved in the pathogenesis of GnRH deficiency, NKB and its receptor are also expressed in various other organs (uterus and ovary) (38, 39), opening the possibility that mutations in this pathway can act at multiple levels of the hpg axis to cause dysfunction. In contrast to patients with nIHH, mice with targeted deletions of *Tacr3*, at least in the strains tested to date, do not have gross reproductive defects (40), and mice in which the *TAC3*-equivalent gene *Tac2* has been selectively deleted have yet to be reported.

Mutations in the NKB system are relatively common as causes of hypogonadism, occurring in more than 5% of a nIHH population that spans several ethnic groups. Although additional studies will help to illuminate the biology and interactions of the neurokinin pathway, the severe hypogonadotropism observed during early neonatal life in patients with mutations in the ligand/receptor pair juxtaposed against later markers of recovery suggests that NKB and its receptor play disparate roles in different windows of reproductive development.

Acknowledgments

We are grateful to the Brazilian contributors, Heraldo Mendes Garmes, Maria Tereza M. Baptista, Gil Guerra, Jr., and Maria Adelaide Albergaria Pereira, who referred patients for molecular analysis.

Address all correspondence and requests for reprints to: Stephanie B. Seminara, 55 Fruit Street, BHX 511, Boston, Massachusetts 02114. E-mail: sseminara@partners.org.

S.B.S. and J.E.H. received grant support from the National Center for Research Resources (M01-RR-01066, Harvard Clinical and Translational Science Center). The Brazilian work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(FAPESP Grant 05/04726-0) (to A.C.L.) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Grant 300209/2008-8) (to A.C.L.). W.A. is supported by the Medical Research Council UK (MRC Program Grant G0900567) and the European Commission (FP7 Collaborative Project EuroDSD). S.B.S., U.B.K., and W.F.C. received grant support from the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development/National Institutes of Health through a cooperative agreement (U54 SU54HD028138) as part of the Specialized Cooperative Centers Program in Reproduction and Infertility Research. J.E.H. received grant support from National Institutes of Health R01-HD-42708.

Disclosure Summary: E.G., C.T., S.D.N., M.G.A., A.A.D., V.A.H., A.P.A., J.C., E.T., L.F.G.S., E.M.F.C., B.B.d.M., M.d.C., A.L., E.B., M.O., R.Q., J.K.A., S.E.S., and T.R.C. have nothing to declare. Grant support received by other authors is acknowledged above.

References

1. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carrozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Persico MG, Camerino G, Ballabio A 1991 A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529–536
2. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Bavelle F, Pêcheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Deleamarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP 2003 Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 33:463–465
3. 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 2008 Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 118:2822–2831
4. Miura K, Acierio Jr JS, Seminara SB 2004 Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, *NELF*, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet* 49:265–268
5. Matsumoto S, Yamazaki C, Matsumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushima H, Furuichi K, Shigeyoshi Y 2006 Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor *PKR2*. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4140–4145
6. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveau C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toubanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP 2006 Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2:e175
7. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley Jr WF 2007 Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:17447–17452
8. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alois N, Speiser P, Takeshita A, Van Vliet G, Pearce S, Crowley Jr WF, Zhou QY, Pitteloud N 2008 Mutations in prokineticin 2 and

- prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3551–3559
9. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E 2003 Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:10972–10976
 10. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinf KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley Jr WF, Aparicio SA, Colledge WH 2003 The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614–1627
 11. Cattanach BM, Iddon CA, Charlton HM, Chiappa SA, Fink G 1977 Gonadotrophin-releasing hormone deficiency in a mutant mouse with hypogonadism. *Nature* 269:338–340
 12. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J 2009 Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 360:2742–2748
 13. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley Jr WF, Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB 2009 GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11703–11708
 14. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E 1997 A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 337:1597–1602
 15. Kim HG, Kurth I, Lan F, Melicani I, Wenzel W, Eom SH, Kang GB, Rosenberger G, Tekin M, Ozata M, Bick DP, Sherins RJ, Walker SL, Shi Y, Gusella JF, Layman LC 2008 Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 83:511–519
 16. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, Serin A, Mungan NO, Cook JR, Ozbek MN, Imamoglu S, Akalin NS, Yuksel B, O'Rahilly S, Semple RK 2009 TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 41:354–358
 17. Almeida TA, Rojo J, Nieto PM, Pinto FM, Hernandez M, Martín JD, Candelas ML 2004 Tachykinins and tachykinin receptors: structure and activity relationships. *Curr Med Chem* 11:2045–2081
 18. Burke MC, Letts PA, Krajewski SJ, Rance NE 2006 Coexpression of dynorphin and neurokinin B immunoreactivity in the rat hypothalamus: morphologic evidence of interrelated function within the arcuate nucleus. *J Comp Neurol* 498:712–726
 19. Amstalden M, Coolen LM, Hemmerle AM, Billings HJ, Connors JM, Goodman RL, Lehman MN 2010 Neurokinin 3 Receptor Immunoreactivity in the Septal Region, Preoptic Area and Hypothalamus of the Female Sheep: Colocalization in Neurokinin B Cells of the Arcuate Nucleus but not in Gonadotrophin-Releasing Hormone Neurons. *J Neuroendocrinol* 22:1–12
 20. Semple RK, Achermann JC, Ellery J, Farooqi IS, Karet FE, Stanhope RG, O'Rahilly S, Aparicio SA 2005 Two novel missense mutations in G protein-coupled receptor 54 in a patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 90:1849–1855
 21. Lanfranco E, Gromoll J, von Eckardstein S, Herding EM, Nieschlag E, Simoni M 2005 Role of sequence variations of the GnRH receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 153:845–852
 22. Tenenbaum-Rakover Y, Commenges-Ducos M, Iovane A, Aumas C, Admoni O, de Roux N 2007 Neuroendocrine phenotype analysis in five patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism due to a L102P inactivating mutation of GPR54. *J Clin Endocrinol Metab* 92:1137–1144
 23. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S, Seminara SB, Mendonça BB, Kaiser UB, Latronico AC 2008 A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med* 358:709–715
 24. Sandoval-Guzmán T, Rance NE 2004 Central injection of senktide, an NK3 receptor agonist, or neuropeptide Y inhibits LH secretion and induces different patterns of Fos expression in the rat hypothalamus. *Brain Res* 1026:307–312
 25. Corander MP, Challis BG, Thompson EL, Jovanovic Z, Loraine Tung YC, Rimmington D, Huhtaniemi IT, Murphy KG, Kemal Topaloglu A, Yeo GS, O'Rahilly S, Dhillon WS, Semple RK, Coll AP 2010 The effects of neurokinin B (NK3) upon gonadotrophin release in male rodents. *J Neuroendocrinol* 22:181–187
 26. Navarro VM, Gottsch ML, Chavkin C, Okamura H, Clifton DK, Steiner RA 2009 Regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by kisspeptin/dynorphin/neurokinin B neurons in the arcuate nucleus of the mouse. *J Neurosci* 29:11859–11866
 27. Kauffman AS, Navarro VM, Kim J, Clifton D, Steiner RA 2009 Sex differences in the regulation of Kiss1/NKB neurons in juvenile mice: implications for the timing of puberty. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297:E1212–E1221
 28. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, Cole LW, Pearce SH, Lee H, Boepple P, Crowley Jr WF, Pitteloud N 2007 Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 357:863–873
 29. Doty RL, Shaman P, Kimmelman CP, Dann MS 1984 University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope* 94:176–178
 30. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, Rocha J, Bydlowski SP, Pena SD 2006 Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 62:190–195
 31. Waldstreicher J, Seminara SB, Jameson JL, Geyer A, Nachtigall LB, Boepple PA, Holmes LB, Crowley Jr WF 1996 The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4388–4395
 32. Hayes FJ, McNicholl DJ, Schoenfeld D, Marsh EE, Hall JE 1999 Free α -subunit is superior to luteinizing hormone as a marker of gonadotropin-releasing hormone despite desensitization at fast pulse frequencies. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1028–1036
 33. Filicori M, Butler JP, Crowley Jr WF 1984 Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest* 73:1638–1647
 34. Gabrich PN, Vasconcelos JS, Damião R, Silva EA 2007 Penile anthropometry in Brazilian children and adolescents. *J Pediatr (Rio J)* 83:441–446
 35. Pitteloud N, Hayes FJ, Boepple PA, DeCruz S, Seminara SB, MacLaughlin DT, Crowley Jr WF 2002 The role of prior pubertal development, biochemical markers of testicular maturation, and genetics in elucidating the phenotypic heterogeneity of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 87:152–160
 36. Herman RA, Jones B, Mann DR, Wallen K 2000 Timing of prenatal androgen exposure: anatomical and endocrine effects on juvenile male and female rhesus monkeys. *Horm Behav* 38:52–66
 37. Takahashi T, Shoji Y, Shoji Y, Haraguchi N, Takahashi I, Takada G 1997 Active hypothalamic-pituitary-gonadal axis in an infant with X-linked adrenal hypoplasia congenita. *J Pediatr* 130:485–488
 38. Patak E, Candelas ML, Pennefather JN, Ziccone S, Lilley A, Martín JD, Flores C, Mantecón AG, Story ME, Pinto FM 2003 Tachykinins and tachykinin receptors in human uterus. *Br J Pharmacol* 139:523–532
 39. Löffler S, Schulz A, Brylla E, Nieber K, Spanel-Borowski K 2004 Transcripts of neurokinin B and neurokinin 3 receptor in superovulated rat ovaries and increased number of corpora lutea as a non-specific effect of intraperitoneal agonist application. *Regul Pept* 122:131–137
 40. Siuciak JA, McCarthy SA, Martin AN, Chapin DS, Stock J, Nadeau DM, Kantesaria S, Bryce-Pritt D, McLean S 2007 Disruption of the neurokinin-3 receptor (NK3) in mice leads to cognitive deficits. *Psychopharmacology (Berl)* 194:185–195