PRISCILA SALES BARROSO

**Pesquisa de novos fatores genéticos no atraso
constitucional do crescimento e
desenvolvimento humano**

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 Latronico Xavier

Coorientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima
Jorge

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Barroso, Priscila Sales
Pesquisa de novos fatores genéticos no atraso
constitucional do crescimento e desenvolvimento
humano / Priscila Sales Barroso. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Ana Claudia Latronico Xavier.
Coorientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Puberdade tardia
2.Desenvolvimento do adolescente 3.Maturidade
sexual 4.Crescimento 5.Hipogonadismo 6.Genética
humana 7.Sequenciamento de nova geração

USP/FM/DBD-342/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Esta pesquisa foi desenvolvida na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto temático 2013/03236-5 e de bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), cota institucional (demanda social), e processo 88881.187051/2018-01 (Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE).

Dedicatória

*Aos meus pais, Giovanni e Ely,
aos meus irmãos, George e Victor,
e ao meu esposo, Vladimir.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Giovanni e Ely, que sempre apoiaram as minhas escolhas e me ensinaram desde cedo a amar os estudos e a lutar pelos meus objetivos.

Ao meu esposo, Vladimir, pelo apoio incondicional nesta jornada, compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos, George e Victor, pela amizade mais sincera que pode existir.

Ao meu avô Olimar (*in memoriam*), que nos deixou em junho deste ano, e à minha avó Miriam, por sempre terem me incentivado a estudar e aprender.

À minha querida orientadora Dra. Ana Claudia Latronico, por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho inovador e por ter me ajudado em todos os momentos, das dúvidas mais simples às maiores angústias. Com certeza, sem essa ótima orientação, eu não teria conseguido conquistar tantas vitórias ao longo desses quatro anos de estudos e aprendizado.

Ao meu coorientador Dr. Alexander A. L. Jorge pelos ensinamentos valiosíssimos no campo da genética médica e pela dedicação aos pacientes.

À Profa. Berenice Bilharinho Mendonça, que desde a residência em endocrinologia tem sido um exemplo de pesquisadora e médica dedicada aos pacientes e à Medicina.

Ao Dr. Vinícius Nahime Brito, pelos ensinamentos no ambulatório e na vida, pelas conversas leves e apoio desde o início do meu doutorado.

À Luciana Montenegro, pela amizade, paciência e ensinamentos no trabalho de bancada, parte fundamental no sucesso desta tese.

À Miriam Nishi e à Mariana Funari, por esclarecerem minhas dúvidas e pela ajuda nas questões de biologia molecular e de laboratório.

Ao grupo de pós-graduandos da puberdade, Delanie Macedo, Danielle Bessa, Carolina Ramos e Carlos Seraphim pela amizade, apoio e ajuda.

Ao grupo de pesquisa de hipogonadismo, Dra. Elaine Costa, Alessandra Renck e Caroline Schnoll por terem me recebido tão bem no ambulatório e me ensinado muito.

Às minhas amigas Lorena Lima Amato e Marina Cunha que desde a residência médica em endocrinologia têm sido parceiras nas horas boas e ruins.

Ao Dr. Ivo Arnhold, Dra. Tânia Bachega, Dra. Sorahia Domenice, Dra. Luciani Carvalho, Dra. Letícia Gontijo e Dra. Larissa Gomes pelos conhecimentos transmitidos sobre genética, pelas valiosas discussões científicas e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos pós-graduandos de outros grupos de pesquisas, Marilena Nakaguma, João Madeira, Rafael Loch, Nathália Lisboa, Isabela Biscotto, Raiane Crespo, Thaís Rocha, Edoarda Vasco, Thaís Kataoka, Thaís Lima, Fernanda Cavalieri, Mirela Miranda, Tatiana Pelaes, e muitos outros com os quais tive o prazer de conviver ao longo desses anos, pela amizade, troca de experiências e apoio.

Aos funcionários do departamento de Endocrinologia, Rubens, Roberta, Roseli, Rosana e Cida, pela disponibilidade e auxílio sempre que precisei.

Às funcionárias do LIM 42, Rosangele, Nilda, Suelen, Cris, Cidinha e Fran, pela dedicação e ajuda.

Ao nosso colaborador internacional, Dr Yee-Ming Chan, por ter me recebido em seu laboratório e me ensinado muito sobre genética e estudos de

bioinformática.

À Elfa e à Saakshi, minhas colegas no laboratório em Boston, por toda ajuda oferecida e pela amizade que se consolidou.

À família Harper, Analuce, Gabriela e Paula, por terem me dado todo o apoio necessário enquanto estive longe do meu país, família e amigos.

À toda minha família, tios, primos, cunhados, sogros, por apoiarem meus projetos pessoais e profissionais e estarem presente sempre que precisei de ajuda.

A todos os nossos pacientes e seus familiares, que nos permitiram desenvolver essa pesquisa, pois sem suas colaborações esse estudo não seria possível.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

Esta conquista não é só minha. Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Epígrafe

“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor lembre-se: se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele você conquistará o mundo.

(Albert Einstein)

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

Lista de siglas, abreviaturas e símbolos

Lista de genes

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Desenvolvimento puberal normal	2
1.2 Puberdade atrasada	4
1.3 Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento	5
1.4 ACCD e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado	6
1.5 Genética do atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento	8
1.5.1 Genes associados ao HHI no ACCD	8
1.5.2 Genes relacionados ao metabolismo e ao ACCD	9
1.5.3 Novas descobertas genéticas no ACCD	10
1.6 Hipóteses	12
2 OBJETIVOS	14
3 MÉTODOS	16
3.1 Considerações Éticas	17
3.2 Pacientes	17
3.2.1 Critérios clínicos de inclusão	17
3.2.2 Critérios clínicos de exclusão	18
3.3 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico	18
3.4 Elaboração do painel gênico para sequenciamento paralelo em larga escala	19
3.5 Etapas do sequenciamento paralelo em larga escala	22
3.5.1 Confeção de bibliotecas de fragmentos de DNA	22
3.5.2 Amplificação clonal	22
3.5.3 Sequenciamento	23

3.6	Análise de bioinformática	24
3.7	Análise das variantes potencialmente patogênicas	26
3.8	Confirmação das variantes encontradas	29
3.9	Análise estatística	30
4	RESULTADOS	31
4.1	Caracterização clínica dos pacientes com ACCD	32
4.2	Métricas do sequenciamento	33
4.3	Variantes alélicas identificadas pelo painel	34
4.4	Variantes genéticas raras em genes com padrão de herança autossômica dominante	35
4.5	Análise de segregação familiar	40
4.6	Oligogenicidade	40
4.7	Análise comparativa das características clínicas dos pacientes com e sem variantes raras identificadas	41
4.8	Variantes genéticas raras em genes com padrão de herança autossômica recessiva	43
4.9	Genes nos quais não foram encontradas variantes raras	43
5	DISCUSSÃO	44
5.1	Características clínicas do atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento	45
5.2	Genética do atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento	46
5.3	Variantes genéticas raras no gene <i>IGSF10</i>	47
5.4	Variantes genéticas raras no gene <i>GHSR</i>	48
5.5	Variantes genéticas raras no gene <i>CHD7</i>	49
5.6	Variantes genéticas raras no gene <i>SPRY4</i>	50
5.7	Variantes genéticas raras no gene <i>WDR11</i>	51
5.8	Variantes genéticas raras no gene <i>IL17RD</i>	51
5.9	Variantes genéticas raras no gene <i>SEMA3A</i>	52
5.10	Achados oligogênicos	53
5.11	Comparação das características clínicas entre pacientes com ACCD com e sem variantes genéticas raras	54
6	CONCLUSÕES	55
7	ANEXOS	57

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	58
Anexo B - Critérios de patogenicidade de variantes da American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)	63
Anexo C - Tabela 13 - Variantes raras potencialmente patogênicas encontradas nos 59 pacientes estudados	67
8 REFERÊNCIAS	69

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Aminoácido
ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACCD	Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento
ACMG	Colégio Americano de Genética Médica - <i>American College of Medical Genetics</i>
AMP	Associação de Patologia Molecular - <i>Association of Molecular Pathology</i>
ANNOVAR	Software de análise de variantes <i>Annotate Variation</i>
BA	Critério de benignidade ACMG/AMP autônomo
BAM	Formato de arquivo de bioinformática - <i>Binary Alignment Map</i>
BP	Critério de benignidade ACMG/AMP de apoio
BS	Critério de benignidade ACMG/AMP forte
BWA	Programa de bioinformática - <i>Burrows-Wheeler Aligner</i>
CADD	Ferramenta de análise <i>in silico</i> - <i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHARGE	Síndrome CHARGE (OMIM 214800): coloboma, anormalidades cardíacas, atresia de coana, anormalidades genitais e auditivas
cm	Centímetro
dbscSNV	Banco de dados de variantes de nucleotídeo único em regiões de consenso de <i>splicing</i> - <i>database single nucleotide variants within splicing consensus regions</i>
dbSNP	Banco de dados de polimorfismos de único nucleotídeo - <i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Desvio-padrão

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	E colaboradores
ExAC	Banco de dados de variantes genéticas - <i>Exome Aggregation Consortium</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GATK	Programa de análise de bioinformática - <i>Genome Analysis Toolkit</i>
GERP	Modelo <i>in silico</i> para análise de conservação de aminoácido - <i>Genomic Evolutionary Rate Profiling</i>
GH	Hormônio do crescimento
GHSR1a	Receptor secretagogo de hormônio do crescimento tipo 1a
gnomAD	Banco de dados de variantes genéticas - <i>Genome aggregation database</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GRCh37	Consórcio de referência do genoma humano construção 37 - <i>Genome Reference Consortium human build 37</i>
GWAS	Estudo de associação ampla do genoma - <i>Genome wide association study</i>
HH	Hipogonadismo hipogonadotrófico
HHG	Hipotálamo-hipófise-gonadal
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
ID	Identificação
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
Igsf10	Proteína membro 10 da superfamília das imunoglobulinas
IGV	<i>Software</i> de bioinformática - <i>Integrative Genomics Viewer</i>
IMC	Índice de massa corpórea
LIM42	Laboratório de Investigação Médica 42 - Laboratório de Hormônios e Genética Molecular
LH	Hormônio luteinizante
M	Molar
MAF	Frequência do menor alelo - <i>Minor allele frequency</i>
mg	Miligrama

mg/ml	Miligrama por mililitro
ml	Mililitro
mM	milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
nm	Nanômetro
ng	Nanograma
ng/μl	Nanograma por microlitro
NS	Diferença não significativa
OMIM	Website <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PolyPhen2	Ferramenta de predição <i>in silico</i> - <i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
pmol	Picomol
PREMiUM	Programa Rede de Equipamentos Multiusuários
PROVEAN	Ferramenta de predição <i>in silico</i> - <i>Protein Variation Effect Analyzer</i>
PM	Critério de patogenicidade ACMG/AMP moderado
PP	Critério de patogenicidade ACMG/AMP de apoio.
PS	Critério de patogenicidade ACMG/AMP forte
PVS	Critério de patogenicidade ACMG/AMP muito forte
RR	Risco relativo
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SELA	Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala
SEF	Expressão semelhante aos FGF's
SIFT	Ferramenta de predição <i>in silico</i> - <i>Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein</i>
SK	Síndrome de Kallmann
SNVs	Variantes de um único nucleotídeo
SPLE	Sequenciamento paralelo em larga escala

TAE	Tampão TRIS-Acetato-EDTA
TE	Tampão TRIS-HCl EDTA
Tris-HCl	Trisaminometado Hidroclorato
U	Unidade
UTR	Região não traduzida
VCF	Arquivo <i>Variant Call Format</i>
VUS	Variante de significado incerto
VUSp	Variante de significado incerto com impacto potencial à proteína
μg/mL	Micrograma por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
λ DNA	Marcador de peso molecular lambda DNA
λ <i>HindIII</i>	Marcador de peso molecular lambda DNA digerido com a enzima <i>HindIII</i> , de λ DNA- <i>HindIII</i> digest
>	Maior que
≥	Maior ou igual
<	Menor que
≤	Menor ou igual a
#	Número
%	Porcentagem
x	Vez(es)
®	Marca registrada
±	Mais ou menos
=	Igual a

LISTA DE GENES

<i>ANOS1</i>	Gene que codifica a anosmina-1, também conhecido como <i>KAL1</i>
<i>CHD7</i>	Gene que codifica a proteína <i>chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7</i>
<i>DMXL2</i>	Gene que codifica a rabconnectina-3.
<i>DUSP6</i>	Gene que codifica o DUSP6, um grande subgrupo heterogêneo da superfamília da proteína tirosina fosfatase baseado em cisteína tipo I
<i>EBF2</i>	Gene que codifica o BF2 pertencente à família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (<i>helix-loop-helix</i>)
<i>FGF17</i>	Gene que codifica um fator de crescimento de fibroblasto tipo 17 (<i>fibroblast growth factor</i>)
<i>FGF8</i>	Gene que codifica um fator de crescimento de fibroblasto tipo 8 (<i>fibroblast growth factor</i>)
<i>FGFR1</i>	Gene que codifica o receptor do fator de crescimento de fibroblasto 1
<i>FLRT3</i>	Gene que codifica a proteína transmembrana semelhante à fibronectina contendo domínio rico em leucina presente na matriz extracelular
<i>GHSR</i>	Gene que codifica o receptor acoplado à proteína G que media os efeitos biológicos da grelina
<i>GNRH1</i>	Gene que codifica o pré-pró-hormônio que é por fim processado ao decapeptídeo GnRH
<i>GNRHR</i>	Gene que codifica o receptor de GnRH
<i>HS6ST1</i>	Gene que codifica a enzima heparina-sulfato-6-O-sulfotransferase 1
<i>IGFALS</i>	Gene que codifica a subunidade ácido-lábil do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1)
<i>IGSF1</i>	Gene que codifica o membro da superfamília das imunoglobulinas (Ig) tipo 1
<i>IGSF10</i>	Gene que codifica o membro da superfamília das imunoglobulinas (Ig) tipo 10
<i>IL17RD</i>	Gene que codifica o receptor de interleucina 17 tipo D
<i>KISS1</i>	Gene que codifica a kisspeptina

<i>KISS1R</i>	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
<i>MKRN3</i>	Gene que codifica a proteína <i>makorin ring finger 3</i>
<i>MSX1</i>	Gene da família Msx dos genes HOX dos vertebrados originalmente isolado por homologia ao gene <i>Drosophila</i> msh (<i>muscle segment homeobox</i>)
<i>NELF</i>	Gene que codifica o fator embrionário nasal LHRH, também conhecido como <i>NSMF</i>
<i>OTX2</i>	É um gene da família homeobox relacionado a um gene de <i>Drosophila</i> expresso no desenvolvimento do sistema nervoso central
<i>PNPLA6</i>	Gene que codifica uma enzima que catalisa a desesterificação de fosfatidilcolina de membrana em ácidos graxos e glicerofosfolina
<i>POLR3A</i>	Gene que codifica a subunidade maior da RNA-polimerase III
<i>POLR3B</i>	Gene codifica a segunda maior subunidade da RNA-polimerase III
<i>PROK2</i>	Gene que codifica a procinetina-2
<i>PROKR2</i>	Gene que codifica o receptor ligado a proteína G da procinetina-2
<i>RNF216</i>	Gene que codifica uma E3 ubiquitina ligase, também conhecido como <i>ring finger protein 216</i>
<i>SEMA3A</i>	Gene que codifica a Semaforina 3A
<i>SEMA7A</i>	Gene que codifica a Semaforina 7A
<i>SOX10</i>	Gene que codifica o Sox10 que é um fator de transcrição que atua na crista neural e no desenvolvimento de oligodendrócitos
<i>SPRY4</i>	Gene que codifica o SPRY4, um inibidor da via de sinalização MAPK (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
<i>TAC3</i>	Gene que codifica a preprotaquicina 3
<i>TACR3</i>	Gene que codifica o receptor da preprotaquicina 3
<i>WDR11</i>	Gene que codifica a proteína Wdr11 (WD repeat domain 11)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema descrevendo a atividade de GnRH da vida fetal até a idade adulta	3
Figura 2 - Distribuição normal da idade de início da puberdade	4
Figura 3 - Base genética estabelecida das alterações puberais	12
Figura 4 - Fluxograma com a estratégia de filtragem das variantes identificadas	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Lista dos 36 genes selecionados para o painel gênico usado na análise de pacientes com ACCD	21
Tabela 2 -	Critérios de patogenicidade das ferramentas <i>in silico</i> utilizadas neste estudo	27
Tabela 3 -	Características clínicas dos 59 pacientes com ACCD estudados	33
Tabela 4 -	Métricas das corridas de SPLE	34
Tabela 5 -	Detalhamento da filtragem das variantes identificadas pelo SPLE	35
Tabela 6 -	Variantes genéticas raras identificadas em pacientes com ACCD por meio de SPLE	38
Tabela 7 -	Características clínicas dos 15 pacientes com ACCD nos quais foram identificadas variantes genéticas raras	39
Tabela 8 -	Características clínicas de todos os pacientes com ACCD e comparação entre os pacientes com e sem variantes genéticas raras	42
Tabela 9 -	Variantes em genes com padrão de herança recessiva	43
Tabela 10 -	Critérios para classificação de variantes patogênicas ACMG/AMP	63
Tabela 11 -	Critérios para classificação de variantes benignas ACMG/AMP	65
Tabela 12 -	Regras para combinar critérios para classificação das variantes	66
Tabela 13 -	Variantes raras potencialmente patogênicas encontradas nos 59 pacientes estudados	67

ANEXOS

Anexo A -	Termo De Consentimento Livre e Esclarecido	58
Anexo B -	Critérios de patogenicidade de variantes da <i>American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP)</i>	63
Anexo C -	Tabela 13 - Variantes raras potencialmente patogênicas encontradas nos 59 pacientes estudados	67

Resumo

Barroso PS. *Pesquisa de novos fatores genéticos no atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento humano* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

O atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD) é a causa mais prevalente de puberdade tardia em ambos os sexos. O principal diagnóstico diferencial do ACCD é o hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) congênito. Aproximadamente 50 a 75% dos pacientes com ACCD possuem história familiar de puberdade atrasada e a herança frequentemente é consistente com um padrão autossômico dominante, com ou sem penetrância completa. No entanto, a base molecular do ACCD ainda não é completamente compreendida. O objetivo deste estudo foi caracterizar as características clínicas e genéticas de uma coorte de pacientes com ACCD. Cinquenta e nove indivíduos com ACCD (48 meninos e 11 meninas) foram submetidos a cuidadosa avaliação clínica. Os critérios de inclusão foram ausência de aumento testicular (volume ≤ 3 mL) em meninos com 13,5 anos de idade ou mais, ausência de telarca em meninas com 13 anos de idade ou mais, baixos níveis séricos de esteroides sexuais para sexo e idade com baixos níveis séricos de gonadotrofinas, desenvolvimento puberal espontâneo ou após tratamento transitório com baixas doses de esteroides sexuais antes dos 18 anos de idade. Os critérios de exclusão foram doenças crônicas graves, deficiência de hormônios hipofisários, anosmia, criptorquidia ou micropênis na infância. O seguimento de longo prazo excluiu outras causas de puberdade tardia como HHI congênito. A análise genética foi realizada utilizando-se sequenciamento paralelo de larga escala por meio de painel gênico personalizado contendo 36 genes conhecidos e candidatos relacionados ao HHI congênito, ACCD ou outros distúrbios puberais. Os dados resultantes foram avaliados para seleção de variantes raras (MAF $<0,01$) em bancos de dados públicos internacionais e nacionais. Priorizamos variantes localizadas em regiões exônicas e de sítio de *splice* e selecionamos variantes com base em seu potencial de patogenicidade de acordo com análise *in silico*. Sequenciamento de Sanger e análise de segregação familiar foram realizados quando os DNAs dos pais estavam disponíveis. Predominância do sexo masculino (81%), baixa estatura (91%) e história familiar positiva (59%) foram as principais características clínicas dessa coorte de ACCD. As análises genéticas revelaram 15 variantes raras do tipo *missense* em heterozigose em 15 pacientes com ACCD (25%) em sete genes diferentes (*IGSF10*, *GHSR*, *CHD7*, *SEMA3A*, *IL17RD*, *SPRY4* e *WDR11*). *IGSF10* e *GHSR* foram os genes afetados mais prevalentes neste grupo. Em conclusão, identificamos variantes raras do tipo *missense* em heterozigose em genes implicados na migração do GnRH e no metabolismo em 25% dos pacientes com ACCD familiar ou esporádico, sugerindo heterogeneidade genética nessa condição pediátrica frequente.

Descritores: Puberdade tardia; Desenvolvimento do adolescente; Maturidade sexual; Crescimento; Hipogonadismo; Genética humana; Sequenciamento de nova geração.

Abstract

Barroso PS. *Research of new genetic factors in the constitutional delay of growth and development in human* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

Constitutional delay of growth and puberty (CDGP) is the most prevalent cause of delayed puberty in both sexes. The main differential diagnosis of CDGP is congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH). Approximately 50 to 75% of patients with CDGP have a family history of delayed puberty and the inheritance often is consistent with an autosomal dominant pattern, with or without complete penetrance. However, the molecular basis of CDGP is not completely understood. The objective of this study was to characterize the clinical and genetic features of a CDGP cohort. Fifty-nine individuals with CDGP (48 boys and 11 girls) underwent careful clinical evaluation. Inclusion criteria were absence of testicular enlargement (volume ≤ 3 mL) in boys after 13.5 years of age, absence of thelarche in girls after 13 years of age, low serum levels of sexual steroids for sex and age with low serum levels of gonadotropins, and spontaneous pubertal development or after transient treatment with low doses of sexual steroids prior the age 18 years. Exclusion criteria were chronic diseases, deficiency of pituitary hormones, anosmia, cryptorchidism and/or micropenis in childhood. Long-term follow-up excluded other causes of delayed puberty as congenital IHH. Genetic analysis was performed using next-generation sequencing through a custom targeted gene panel designed to capture 36 known and candidate genes related to congenital IHH, CDGP, or other puberty disorders. Data were screened for selection of rare variants (MAF < 0.01) in public international and national databases. We prioritized variants located in exonic and splice site regions and we selected variants based on their pathogenicity potential according to *in silico* analysis. Sanger sequencing and family segregation analysis were performed when parent's DNAs were available. Male predominance (81%), short stature (91%) and positive family history (59%) were the main clinical characteristics of this CDGP cohort. Genetic analysis revealed 15 rare heterozygous missense variants in 15 CDGP patients (25%) in seven different genes (*IGSF10*, *GHSR*, *CHD7*, *SEMA3A*, *IL17RD*, *SPRY4* and *WDR11*). *IGSF10* and *GHSR* were the most prevalent affected genes in this group. In conclusion, we identified rare missense heterozygous variants in genes implicated in GnRH migration and metabolism in 25% of patients with sporadic or familial ACCD, suggesting genetic heterogeneity in this frequent pediatric condition.

Descriptors: Puberty, delayed; Adolescent development; Sexual maturation; Growth; Hypogonadism; Human genetics; Next-generation sequencing.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento puberal normal

A puberdade é um período de transição do desenvolvimento humano durante o qual as crianças desenvolvem os caracteres sexuais secundários e atingem a maturidade sexual e capacidade reprodutiva ^(1, 2). Este processo inicia-se com a reativação da secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) após um período de quiescência durante a infância ^(3, 4). O início da puberdade é precedido por dois períodos de atividade no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG): o primeiro durante a vida fetal e o segundo durante os primeiros meses pós-natais, período conhecido como minipuberdade (Figura 1) ^(5, 6). A ativação pós-natal desse eixo nas meninas permanece durante os primeiros 24 meses de vida e é menos marcante que em meninos ⁽⁶⁾. Nos meninos, essa ativação ocorre de forma intensa nos seis primeiros meses de vida e é crucial para a descida final dos testículos e o crescimento peniano, assim como para a proliferação das células de Sertoli imaturas e espermatogônias ⁽⁶⁾. A minipuberdade é seguida por um período de supressão do eixo HHG durante toda a infância ⁽⁷⁾. No início da puberdade, o eixo HHG é reativado, porém os mecanismos que controlam esta reativação ainda não estão totalmente esclarecidos ^(4, 8). Estudos em roedores e primatas mostraram que um aumento de estímulos excitatórios e concomitante redução dos aferentes inibitórios contribuem para a reativação da secreção pulsátil de GnRH, desencadeando o início da puberdade ⁽⁹⁾.

Figura 1 - Esquema descrevendo a atividade de GnRH da vida fetal até a idade adulta. A linha vermelha representa a ativação gonadal normal. A linha verde representa o atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD). A linha azul representa a ausência de atividade de GnRH durante toda a vida, típico do diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) clássico. Fonte: Adaptado de Palmert MR *et al.*, *JCEM*, 2001. ⁽¹⁰⁾

Com o aumento da amplitude e frequência dos pulsos de GnRH, ocorre elevação da secreção das gonadotrofinas, hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), pela hipófise anterior e subsequente ativação da produção de esteroides sexuais pelas gônadas (ovários e testículos) ^(3, 4). Nos meninos, o primeiro sinal de puberdade é o aumento testicular (volume ≥ 3 ml ou diâmetro $\geq 2,5$ cm) caracterizando estágio G2 de Tanner & Marshall ⁽¹¹⁾. Em meninas, o início da puberdade consiste no aparecimento do broto mamário, a telarca, definindo estágio M2 de Tanner & Marshall ⁽¹²⁾.

A idade de início da puberdade varia muito na população geral e é influenciada por fatores genéticos e ambientais, como etnia e estado nutricional ⁽¹³⁾. Nas meninas, a idade média do início da puberdade é 10,5 anos, variando entre 8 e 13 anos ⁽¹⁴⁾. Nos meninos, a idade média de início puberal é 11,5 anos, variando entre 9 e 14 anos ⁽¹⁵⁾ (Figura 2).

Figura 2 - Na população geral, há uma distribuição normal da idade de início da puberdade, com as definições de puberdade precoce e atrasada definidas estatisticamente por ± 2 desvios-padrão (DP).

Fonte: Adaptado de Howard SR, Dunkel L, *Neuroendocrinology*, 2017. ⁽¹⁶⁾

1.2 Puberdade atrasada

Puberdade atrasada é definida como ausência do aumento testicular em meninos com 14 anos ou mais ou ausência do desenvolvimento mamário em meninas com idade de 13 anos ou mais ⁽¹⁷⁾. Outra definição de puberdade atrasada é a ausência de menarca em meninas com 15 anos ou mais ou ausência de estirão do crescimento em meninos com 16 anos ou mais ⁽⁶⁾. É uma condição clínica muito comum que pode afetar aproximadamente 2% dos adolescentes ⁽¹⁸⁾.

Os principais diagnósticos diferenciais de puberdade atrasada são o atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD), o hipogonadismo hipergonadotrófico, o hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) isolado ou associado a outras deficiências hipofisárias e o hipogonadismo

hipogonadotrófico funcional (atraso da maturação do eixo HHG devido a doenças sistêmicas como, por exemplo, doença celíaca, doenças inflamatórias intestinais, hipotireoidismo, anorexia nervosa, exercícios físicos em excesso, etc.)⁽¹⁷⁾.

1.3 Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento

Aproximadamente 65% dos meninos e 30% das meninas com atraso puberal apresentam puberdade atrasada autolimitada^(3, 17), um extremo do espectro normal de início da puberdade. Quando associada a velocidade de crescimento atenuada e, conseqüentemente, baixa estatura, chamamos esta condição de atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD)⁽¹⁹⁾.

Embora o ACCD represente a causa mais prevalente de puberdade atrasada em ambos os sexos, esse diagnóstico é estabelecido apenas após exclusão de outras causas de atraso puberal, como causas orgânicas, genéticas, nutricionais ou psicológicas^(6, 17, 20). É necessária uma história clínica completa com detalhes sobre o nascimento da criança e o período gestacional, padrão de crescimento na infância, tratamentos médicos e cirúrgicos realizados previamente, além da história familiar de início da puberdade⁽²¹⁾. Deve-se excluir doenças crônicas pela história clínica, exame físico e testes laboratoriais, como hemograma completo, função tireoidiana, renal e hepática e exames para excluir infecções crônicas e doença celíaca⁽²¹⁾. Além disso, essa condição requer desenvolvimento puberal espontâneo e normal antes dos 18 anos de idade⁽¹⁷⁾.

O ACCD está associado com baixo índice de massa corpórea (IMC), baixa velocidade de crescimento para a idade cronológica, idade óssea atrasada

e perfil bioquímico com baixas concentrações séricas de gonadotrofinas, esteroides sexuais e IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) para a idade cronológica ⁽⁶⁾. Atualmente, o ACCD não é considerado uma entidade totalmente benigna e pode estar associado a alguns resultados adversos à saúde, incluindo baixa estatura, baixa densidade mineral óssea, alterações psicológicas e aumento do risco de doenças cardiovasculares ⁽²²⁾.

1.4 ACCD e hipogonadismo hipogonadotrófico isolado

É desafiador diferenciar os adolescentes com ACCD daqueles com HH isolado (HHI) ⁽²³⁾. O HHI é uma condição genética rara e heterogênea que se manifesta como falha em iniciar ou completar a puberdade e infertilidade ⁽²⁴⁻²⁶⁾. Distinguir estas duas condições clínicas é especialmente difícil durante as avaliações iniciais, pois os adolescentes afetados por essas duas condições geralmente encontram-se pré-púberes ao exame físico e possuem baixas concentrações de gonadotrofinas (LH e FSH). Níveis de LH e FSH são baixos no ACCD porque o eixo HHG ainda não amadureceu o suficiente para secretar valores puberais de GnRH, enquanto no HHI os níveis são baixos devido à defeito na síntese, secreção ou capacidade do GnRH de induzir a síntese e liberação de gonadotrofinas ⁽²¹⁾.

ACCD e HHI parecem fazer parte do mesmo espectro clínico, um sendo classicamente descrito como transitório (ACCD) e o outro como permanente (HHI) ⁽²⁷⁾. É notável que por volta de 10% dos familiares de pacientes com HHI relatam história de puberdade atrasada, uma prevalência 4 a 5 vezes maior do que na população geral ⁽²⁸⁾.

Existem características clínicas que podem potencialmente distinguir ACCD do HHI, porém estas manifestações não são específicas para o diagnóstico definitivo ⁽¹⁷⁾. Adolescentes com ACCD podem ter adrenarca e pubarca atrasadas, juntamente com o atraso do desenvolvimento gonadal, enquanto indivíduos com HHI têm maior probabilidade de atraso isolado do desenvolvimento gonadal ⁽¹⁹⁾, mas esta distinção é muitas vezes obscura. Uma porcentagem dos pacientes com HHI (20 a 40%) apresentam evidências de desenvolvimento puberal inicial, mas posteriormente esta progressão é interrompida ⁽²⁹⁾, e aproximadamente 10% podem ter reversão sustentada do hipogonadismo na idade adulta ⁽³⁰⁾. Testículos pequenos ao exame (1-2 ml em volume), história de criptorquidismo e/ou micropênis podem indicar um diagnóstico de HHI ⁽³¹⁾. No entanto, a prevalência de criptorquidismo no HHI varia entre 5 e 40%, e naqueles pacientes com HHI e desenvolvimento puberal parcial, essa prevalência aproxima-se da população geral (3 a 5%) ^(29, 32). Anosmia ou hiposmia, uma característica da síndrome de Kallmann, ocorre em apenas 30 a 50% dos pacientes com HHI ⁽³³⁾. Portanto, em muitos casos, a avaliação clínica inicial de rotina não consegue diferenciar definitivamente o ACCD do HHI.

Embora atualmente existam diversos exames laboratoriais e de imagem disponíveis, nenhum deles pode diferenciar de forma definitiva os pacientes que entrarão espontaneamente e progredirão de maneira normal na puberdade e aqueles que necessitarão de tratamento médico a longo prazo ^(23, 34). Atualmente, a presença de desenvolvimento puberal progressivo espontâneo antes dos 18 anos é o “padrão-ouro” para diferenciar essas duas condições ⁽²³⁾.

1.5 Genética do atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento

A fisiopatologia neuroendócrina e a regulação genética do ACCD permanecem indefinidas na maioria dos pacientes ⁽³⁵⁾. Sabe-se que há uma forte base genética nesta condição visto que 50 a 75% dos indivíduos com ACCD possuem história familiar de puberdade atrasada ^(17, 36).

O ACCD apresenta padrões complexos de herança, incluindo autossômica dominante, autossômica recessiva, bilineal (ambos os pais afetados ou um dos pais é afetado e o outro possui um parente de primeiro grau afetado) e ligada ao X, embora também sejam observados casos esporádicos ^(16, 37, 38). A maioria das famílias exibe um padrão autossômico dominante de herança (com ou sem penetrância completa) ^(16, 36, 38).

A análise genética dos pacientes e famílias com ACCD é complicada pelo fato desse fenótipo representar o extremo de uma característica normalmente distribuída na população, portanto, espera-se que variantes que governam a herança dessa condição também possam estar presentes na população geral em uma menor frequência ⁽³⁹⁾.

1.5.1 Genes associados ao HHI no ACCD

Devido à hipótese de possível sobreposição fisiopatológica entre o ACCD e as condições congênitas de deficiência de GnRH, alguns grupos estudaram a contribuição de mutações nos genes associados ao HHI para o fenótipo de ACCD ⁽³⁹⁾.

Antes do advento das técnicas de sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE), os estudos genéticos em indivíduos com ACCD eram realizados utilizando o sequenciamento automático (método de Sanger) de genes candidatos. Dentre os genes associados ao HHI estudados previamente em coortes de ACCD podemos citar: *FGFR1*, *GNRHR*, *TAC3* e *TACR3* ^(40, 41). Uma mutação em homozigose com perda de função parcial no *GNRHR* foi encontrada em dois irmãos, um com ACCD e outro com HHI ⁽⁴¹⁾, e uma mutação em heterozigose adicional no *GNRHR* foi encontrada em um indivíduo do sexo masculino com ACCD ⁽⁴⁰⁾. No entanto, mutações nas regiões codificadoras de *FGFR1*, *GNRHR*, *TAC3* e *TACR3* provavelmente não foram encontradas em pacientes com ACCD neste estudo ⁽⁴⁰⁾.

Recentemente, utilizando sequenciamento exômico global, um estudo avaliou uma coorte de 56 pacientes com ACCD e identificou variantes potencialmente patogênicas em 14,3% dos indivíduos nos seguintes genes relacionados ao HHI: *GNRHR*, *IL17RD*, *SEMA3A*, *TAC3* e *TACR3* ⁽⁴²⁾.

Diferentemente, um outro estudo de um grupo europeu que avaliou pacientes com ACCD e HHI por meio de sequenciamento exômico global identificou variantes potencialmente patogênicas em apenas 7% dos pacientes com ACCD, enquanto essas variantes foram encontradas em 51% dos pacientes com HHI ⁽⁴³⁾.

1.5.2 Genes relacionados ao metabolismo e ao ACCD

A grelina, hormônio orexígeno secretado pelas células gástricas, é o ligante endógeno do receptor secretagogo de hormônio do crescimento (GHSR)

(44). Por meio da interação com o receptor GHSR1a, a grelina estimula a secreção de hormônio de crescimento (GH) e tem um potente efeito orexígeno (45). Mutações no gene *GHSR* foram previamente implicadas na etiologia da baixa estatura idiopática e na deficiência de GH em humanos (46, 47). Em 2011, Pugliese-Pires *et al.* (48) investigaram a presença de mutações no gene *GHSR* em um grupo de 31 pacientes com ACCD. Neste estudo, cinco variantes raras do tipo *missense* em heterozigose foram encontradas no gene *GHSR* em pacientes com ACCD, todas ausentes em uma população controle.

Recentemente, um estudo utilizando sequenciamento exômico global realizado em 67 famílias com 160 indivíduos (67 pacientes com ACCD, 58 familiares afetados e 35 familiares não afetados) identificou variantes raras em heterozigose no gene *FTO* (49). *FTO* foi o primeiro gene relacionado à susceptibilidade à obesidade identificado por meio de estudos GWAS (*genome-wide association studies*) e continua sendo o locus com o maior efeito no índice de massa corpórea e no risco de obesidade (50).

1.5.3 Novas descobertas genéticas no ACCD

Em 2012, um grupo realizou sequenciamento exômico do cromossomo X de pacientes do sexo masculino com quadro clínico de hipotireoidismo central e puberdade atrasada e encontraram oito variantes com perda de função e duas deleções no gene *IGSF1* (51). Concluiu-se que mutações inativadoras do gene *IGSF1* (membro 1 da superfamília das imunoglobulinas) causam uma síndrome ligada ao X (OMIM #300888) com hipotireoidismo central, macroorquidismo (ao final da adolescência), puberdade atrasada, deficiência de prolactina variável,

deficiência transitória de GH e aumento de índice de massa corpórea em meninos afetados ⁽⁵¹⁾. Em 2015, um estudo avaliou 30 pacientes do sexo masculino com ACCD nos quais o padrão de herança era aparentemente ligado ao X ⁽⁵²⁾. Três variantes do tipo *missense* de significado indeterminado foram encontradas, porém, essas variantes não segregaram perfeitamente nos indivíduos afetados ⁽⁵²⁾.

Em abril de 2016, um grupo europeu publicou um estudo no qual foi realizado sequenciamento exômico global em 111 indivíduos (76 indivíduos com ACCD e 35 controles) de 18 famílias não aparentadas de uma grande coorte finlandesa ⁽⁵³⁾. Este estudo identificou quatro variantes do tipo *missense* potencialmente patogênicas em heterozigose no gene *IGSF10* em 31 indivíduos de 10 famílias (27,9%) ^(53, 54). Em um estudo funcional com *zebrafish* transgênico, a falta da proteína *Igsf10* afetou a migração e o desenvolvimento axonal de neurônios GnRH que não conseguiram formar grupamentos compactos ou estender suas projeções para o hipotálamo ⁽⁵³⁾. Adicionalmente, mutações com perda de função neste gene foram encontradas em pacientes com amenorreia hipotalâmica ⁽⁵³⁾.

Mais recentemente, duas variantes raras potencialmente patogênicas (uma *missense* e uma deleção) foram identificadas no gene *EAP1* em pacientes com ACCD por meio de sequenciamento exômico global ⁽⁵⁵⁾. Este gene era previamente conhecido como um regulador da transcrição que, atuando no cérebro neuroendócrino, contribui para o controle da função reprodutiva ⁽⁵⁶⁾.

A Figura 3 apresenta um esquema de genes identificados na base genética das condições clínicas relacionadas à puberdade.

Figura 3 - Base genética estabelecida das alterações puberais como SK e HHI, puberdade precoce central, ACCD e variantes genéticas comuns identificadas em estudos GWAS. Mutações ativadoras e inativadoras nos genes *KISS1* e *KISS1R* causam fenótipos opostos, puberdade precoce central e HHI, respectivamente. SK: Síndrome de Kallmann; HHI: hipogonadismo hipogonadotrófico isolado; ACCD: atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento; GWAS: *genome wide association study*.

Fonte: Adaptado de Howard *et al.*, *Endocrine Reviews*, 2019. ⁽³⁹⁾

1.6 Hipóteses

Apesar dos vários estudos prévios que tentam esclarecer os fatores genéticos relacionados ao início da puberdade, a causa do atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento humano ainda não foi totalmente esclarecida.

É possível que haja uma relação fisiopatológica entre o hipogonadismo hipogonadotrófico congênito isolado e o ACCD, uma condição sendo permanente (HHI) e a outra transitória (ACCD). Portanto, variantes patogênicas em genes causadores do HHI podem estar presentes em pacientes com ACCD. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos na manifestação do ACCD, como variantes patogênicas em genes relacionados ao metabolismo, visto que pacientes com ACCD tendem a ter peso normal ou baixo.

O presente estudo visa ainda levar ao melhor entendimento das manifestações clínicas do ACCD, assim como ao maior esclarecimento do padrão de herança genética.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 - Análise das características clínicas de uma coorte de pacientes com atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento de um único centro médico acadêmico.

2.2 - Análise genética por sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE), utilizando painel gênico customizado, na coorte de pacientes com ACCD.

2.3 - Caracterização genótipo-fenótipo dos pacientes com ACCD com variantes gênicas potencialmente associadas à apresentação de atraso puberal.

2.4 - Comparação das características clínicas dos pacientes com variantes potencialmente patogênicas com os pacientes sem variantes.

3 MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – HCFMUSP (Parecer número 2.236.551). Todos os pacientes ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo A) para participação na pesquisa.

3.2 Pacientes

O presente estudo selecionou 59 pacientes com ACCD (48 meninos e 11 meninas) do ambulatório da Disciplina de Endocrinologia do HCFMUSP.

3.2.1 Critérios clínicos de inclusão

Utilizamos os seguintes critérios para a seleção dos pacientes:

- Volume testicular menor que 3 ml em meninos com idade de 14 anos ou mais;
- Ausência de telarca em meninas com idade de 13 anos ou mais;
- Baixas concentrações séricas de esteroides sexuais (testosterona ou estradiol) para idade cronológica e sexo;
- Baixas concentrações séricas de gonadotrofinas (LH e FSH) para

idade cronológica e sexo;

- Ausência de outras deficiências hormonais hipofisárias;
- Desenvolvimento puberal espontâneo ou após tratamento limitado com baixas doses de esteroides sexuais (cipionato de testosterona 50 mg a cada 30 dias por via intramuscular em meninos por 3 meses consecutivos ou estrógenos conjugados 0,3 mg ao dia por via oral em meninas por 3 meses consecutivos).

3.2.2 Critérios clínicos de exclusão

Utilizamos os seguintes critérios para exclusão de pacientes do estudo:

- Presença de doenças crônicas que podem levar a um hipogonadismo funcional, como, por exemplo, hipotireoidismo, diabetes mellitus descompensado, doença celíaca, dentre outras, avaliadas pela história clínica, exame físico, exames laboratoriais e de imagem;
- História prévia de micropênis, criptorquidia ou anosmia;
- Exames laboratoriais compatíveis com o diagnóstico de hipogonadismo hipergonadotrófico.

3.3 Extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico

As amostras de DNA genômico dos pacientes estudados foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico. Quando disponível, amostras de DNA genômico também foram coletadas de seus familiares. Sangue venoso (12 ml) foi colhido em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e submetidos ao

método de extração com NaCl saturado ⁽⁵⁷⁾. Esta técnica possui duas etapas: na primeira é realizada a lise de hemácias (NH₄Cl 114 mM; NH₄HCO₃ 1 mM) e na segunda etapa a lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) utilizando solução de dodecilsulfato de sódio (SDS 10%) e proteinase K (10 mg/ml). A precipitação do DNA foi induzida por etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em TE (10:0,1) (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro (*Biophotometer*, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade densidade ópt 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001M pH 8,0) contendo o corante SYBR Safe (*Invitrogen*, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 1x e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ *HindIII* (250 ng/µl) e 20 ng do λ DNA (10 ng/µl).

3.4 Elaboração do painel gênico para sequenciamento paralelo em larga escala

Um painel gênico customizado foi elaborado para capturar 36 genes conhecidos e candidatos envolvidos no HH, ACCD e outros distúrbios puberais (Tabela 1). Todos os éxons codificadores e 25 pares de bases (pb) das

sequências intrônicas flanqueadoras foram incluídos.

O painel customizado foi elaborado utilizando-se o *software Agilent SureDesign 2.0* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, EUA) com base na versão 19 do genoma humano (GRCh37, Fev2009). Esse *software* desenha sondas específicas para seleção e captura das regiões genômicas de interesse. Foi realizada a verificação manual da cobertura dos genes selecionados para o painel garantindo uma cobertura superior ou igual a 99%. A captura das regiões de interesse foi realizada utilizando-se o kit *SureSelectXT* (*Agilent Technologies*).

Tabela 1 - Lista dos 36 genes selecionados para o painel gênico usado na análise de pacientes com ACCD.

Gene	GeneCards ID	Referência
Genes classicamente associados a SK ou HHI normósmico		
<i>KAL 1</i>	GC0XM008528	Legouis et al.1991
<i>FGFR1</i>	GC08M038411	Dodé et al. 2003
<i>FGF8</i>	GC10M101770	Falardeau et al. 2008
<i>GNRH1</i>	GC08M025419	Bouligand et al. 2009
<i>GNRHR</i>	GC04M067737	DeRoux et al. 1997
<i>KISS1</i>	GC01M204190	Topaloglu et al. 2012
<i>KISS1R</i>	GC19P000917	Seminara et al. 2003
<i>TAC3</i>	GC12M057009	Topaloglu et al. 2009
<i>TACR3</i>	GC04M103586	Topaloglu et al. 2009
<i>PROK2</i>	GC03M071820	Dodé et al. 2006
<i>PROKR2</i>	GC20M005301	Dodé et al. 2006
<i>CHD7</i>	GC08P060678	Kim et al. 2008
Genes associados a síndromes que cursam com HHI		
<i>POLR3A</i>	GC10M077969	Timmons et al. 2006
<i>POLR3B</i>	GC12P106357	Saitsu et al. 2011
<i>PNPLA6</i>	GC19P007534	Topaloglu et al. 2014
<i>RNF216</i>	GC07M005661	Margolin et al. 2013
<i>DMXL2</i>	GC15M051447	Tata et al. 2014
Genes com alguns relatos na literatura como causadores de HHI		
<i>FGF17</i>	GC08P022042	Tornberg et al. 2011
<i>SEMA3A</i>	GC07M083955	Young et al. 2012
<i>SEMA7A</i>	GC15M074409	Känsäkoski et al. 2014
<i>IL17RD</i>	GC03M057124	Miraoui et al. 2013
<i>HS6ST1</i>	GC02M128236	Tornberg et al. 2011
<i>DUSP6</i>	GC12M089347	Miraoui et al. 2013
<i>WDR11</i>	GC10P120851	Kim et al. 2010
<i>FLRT3</i>	GC20M014322	Miraoui et al. 2013
<i>SPRY4</i>	GC05M142272	Miraoui et al. 2013
<i>SOX10</i>	GC22M039963	Pingault et al. 2013
<i>IGFALS</i>	GC16M001790	Domene et al. 2004
<i>NSMF</i>	GC09M137447	Miura et al. 2004
Genes previamente descritos em casuísticas de pacientes com ACCD		
<i>GHSR</i>	GC03M172443	Howard et al. 1996
<i>IGSF10</i>	GC03M151425	Howard et al. 2016
Genes associados a outros distúrbios puberais ou hipofisários		
<i>MKRN3</i>	GC15P024015	Abreu et al. 2013
<i>MSX1</i>	GC04P004861	Van Den Boogaard et al. 2000
<i>OTX2</i>	GC14M056799	Diaczok et al. 2008
<i>EBF2</i>	GC08M025841	Trarbach et al. 2005
<i>IGSF1</i>	GC0XM131273	Sun et al. 2012

Fonte: GeneCards ID; identificação no Human Gene Database (<http://www.genecards.org>)

3.5 Etapas do sequenciamento paralelo em larga escala

O sequenciamento envolveu três etapas fundamentais:

3.5.1 Confeção de bibliotecas de fragmentos de DNA

O DNA genômico foi fragmentado, de forma mecânica, por ultrassonificação centrada (tecnologia Covaris) a fim de gerar bibliotecas de DNA genômico com fragmentos entre 150 a 200 pb, de acordo com o protocolo do fabricante (*Agilent Technologies*). As bibliotecas foram enriquecidas com sequências provenientes dos genes selecionados. O enriquecimento foi obtido por meio da captura das regiões de interesse com a utilização de microesferas (*beads*) magnéticas acopladas à estreptavidina, após a hibridação do DNA fragmentado com sondas biotiniladas complementares a essas regiões. As sondas de captura foram produzidas a partir desse cRNA biotinilado, com 120 nucleotídeos cada, com o intuito de cobertura das regiões codificadoras dos genes candidatos e de um mínimo de 25 pb das junções íntron-éxon, assim como as regiões 5'UTR e 3'UTR. No fim desta etapa, foram adicionados adaptadores de identificação (*barcoding*) para cada amostra de DNA.

3.5.2 Amplificação clonal

Nesta etapa, as bibliotecas, com seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores, foram depositadas em uma lâmina especial, denominada *flowcell*, em cuja superfície encontram-se fixados de maneira paralela duas espécies de

oligonucleotídeos. Estes são complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA da biblioteca. Após a ligação dos fragmentos aos seus oligonucleotídeos complementares presentes na superfície da *flowcell*, acontece a amplificação. Neste momento, cada molécula foi amplificada várias vezes pela reação em cadeia da polimerase em ponte (*bridge PCR*). Ao final desta etapa, foram gerados agregados de clones (*clusters*) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

3.5.3 Sequenciamento

Após a amplificação clonal, as moléculas *antisense* foram removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento foi iniciado com o acoplamento de um oligonucleotídeo iniciador. Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos específicos foram adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação, foram geradas imagens de toda a superfície da *flowcell* em cada um dos comprimentos de onda específicos para cada fluoróforo e captadas por meio de um *scanner* de fluorescência. Os clones presentes na superfície da *flowcell* foram então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propiciou a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada clone de moléculas, ou seja, a sequência do fragmento que deu origem ao clone.

As sequências das regiões codificadoras foram analisadas na plataforma de SPLE NextSeq 500 (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA) no laboratório de

Sequenciamento em Larga Escala (SELA) do Programa Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM), da Faculdade de Medicina da USP. Para maior acurácia, as sequências foram lidas na configuração *paired-end* (quando as duas extremidades da molécula do DNA são lidas), permitindo leituras de fragmentos de até 200 pb.

3.6 Análise de bioinformática

O grande volume de dados gerados pelos sequenciadores de larga escala requer o emprego de ferramentas de bioinformática para que as alterações genéticas de interesse sejam identificadas em meio a centenas ou milhares de polimorfismos não relacionados ao fenótipo. Este processo é realizado por diversos programas de computador que funcionam em cadeia.

Para esta análise, contamos com a colaboração do Dr. Antônio Marcondes Lerário, doutor em endocrinologia pela USP e atualmente pesquisador na Universidade de Michigan, Ann Arbor, EUA. Inicialmente, obtivemos os dados brutos gerados pelo sequenciador, arquivo FASTQ, que contém as sequências de leitura dos genes dispostas aleatoriamente. O FASTQ é um formato padrão para representação biológica das sequências de dados. Este formato é uma representação das sequências baseada em texto e foi desenvolvido para incorporar os escores de qualidade para facilitar a avaliação da sequência, sendo amplamente aceito como o formato padrão para dados brutos de SPLE⁽⁵⁸⁾. Em seguida, as principais etapas da análise dos dados foram:

- Alinhamento das leituras ao genoma de referência, versão 19 do genoma humano (*Genome Reference Consortium human genome 37* -

GRCh37, Fev2009), com alta eficiência e precisão. Foi utilizado o *software* BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>) ⁽⁵⁹⁾; Ao final, foi gerado um arquivo BAM (*Binary Alignment Map*). Este arquivo contém as leituras dos genes alinhadas ao genoma humano de referência;

- Recalibragem das sequências alinhadas que consistiu no realinhamento de forma contextualizada. Nesta etapa, foi utilizado o *software* GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>) ⁽⁶⁰⁾;
- Genotipagem, que consistiu em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de cada par do cromossomo para uma dada posição). Novamente foi utilizado o *software* GATK, que identifica SNVs (*single nucleotide variants*) e *indels* (inserções e deleções);
- Recalibragem da genotipagem: nesta fase, falsos positivos foram detectados e sinalizados para que fossem descartados do processo. Utilizou-se o *software* GATK.

Em seguida, todas as alterações divergentes da sequência genômica de referência foram listadas em um arquivo VCF (*variant call format*). Milhares de alterações, denominadas variantes alélicas, foram identificadas, por isso foi necessária a implementação de um processo de “filtragem” destas alterações utilizando o cruzamento de informações com bancos de dados públicos e com emprego de algoritmos de predição por análise computacional (predição *in silico*) para avaliação do impacto funcional dessas variantes alélicas identificadas. utilizando-se o programa ANNOVAR ⁽⁶¹⁾.

3.7 Análise das variantes potencialmente patogênicas

A partir das variantes alélicas encontradas, foram utilizados os seguintes critérios para seleção das variantes potencialmente patogênicas:

- Seleção de variantes com frequência alélica (*minor allele frequency* - MAF) inferior a 1% em bancos de dados populacionais públicos internacional (*Genome aggregation database* - gnomAD, <http://gnomad.broadinstitute.org/>)⁽⁶²⁾ e nacional (Arquivo Brasileiro Online de Mutações - ABraOM - <http://abraom.ib.usp.br>)⁽⁶³⁾;
- Seleção de variantes localizadas em éxons e sítios de *splicing*;
- Exclusão das variantes sinônimas;
- Seleção das variantes pelo potencial de patogenicidade, incluindo variantes que levam à perda de função da proteína (*stop-gain*, *frameshift*) e variantes preditas como patogênicas por múltiplos sites de predição *in silico* (Tabela 2).

Todas as variantes consideradas potencialmente patogênicas foram confirmadas visualmente no programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV)⁽⁶⁴⁾, a partir do arquivo BAM.

Após a identificação das variantes potencialmente patogênicas, foi realizada uma pesquisa de relatos prévios de ocorrência destas variantes no website *Online Mendelian Inheritance in Man* - OMIM® (www.omim.org) e no banco de dados PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

As variantes potencialmente patogênicas foram classificadas utilizando-se os critério de patogenicidade da *American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP)⁽⁶⁵⁾ – Anexo B.

Tabela 2 - Critérios de patogenicidade das ferramentas *in silico* utilizadas neste estudo.

Ferramenta	Classificação	Critério utilizado	Website
Predição <i>in silico</i> de alteração de sítio de <i>splicing</i>			
dbscSNV ADA score e dbscSNV RF score ⁽⁶⁶⁾	Entre 0 e 1	≥0,6	https://sites.google.com/site/jpopgen/dbNSFP
Predição <i>in silico</i> de patogenicidade			
SIFT ⁽⁶⁷⁾	T= Tolerada D= Deletéria	D	http://sift.jcvi.org/
PolyPhen-2 ⁽⁶⁸⁾	B= Benigna P= Provavelmente patogênica D= Deletéria	P e D	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
MutationAssessor ⁽⁶⁹⁾	L= Baixo M= Moderado H= Alto	M e H	http://mutationassessor.org/
PROVEAN ⁽⁷⁰⁾	N=Neutra D=Deletéria	D	http://provean.jcvi.org/genome_submit_2.php
CADD ⁽⁷¹⁾	Numérico	≥15	http://cadd.gs.washington.edu/
Modelo <i>in silico</i> para análise de conservação de aminoácido			
GERP ⁽⁷²⁾	Numérico	≥ 2,0	http://mendel.stanford.edu/SidowLab/downloads/gerp/

dbscSNV: *database single nucleotide variants within splicing consensus regions*; SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant human protein*; PolyPhen-2: *Polymorphism Phenotyping*; PROVEAN: *Protein Variation Effect Analyzer*; CADD: *Combined Annotation Dependent Depletion*; GERP: *Genomic Evolutionary Rate Profiling*.

Figura 4 - Fluxograma com a estratégia de filtragem das variantes identificadas.

VCF: *Variant Call Format*; MAF: Frequência do menor alelo; gnomAD: Genome aggregation database; ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; SIFT: *Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein*; PolyPhen-2: *Polymorphism Phenotyping v2*; PROVEAN: Protein Variation Effect Analyzer; CADD: *Combined Annotation Dependent Depletion*; GERP: *Genomic evolutionary rate profiling*; IGV: *Integrative Genomics Viewer*; OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man*; ACMG: *American College of Medical Genetics*;

3.8 Confirmação das variantes encontradas

As variantes identificadas foram confirmadas e submetidas à análise de segregação familiar nos casos em que o DNA dos pais estava disponível. Foi realizado o sequenciamento por técnica de Sanger ⁽⁷³⁾. Inicialmente, o DNA genômico foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene, seguido de sequenciamento automático. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 100 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,0 U de enzima *Go Taq DNA polymerase* (Promega, Madison, WI, EUA) e 5,0 µL do tampão 5x *Green Flexi Reaction Buffer* (Promega, Madison, WI, EUA). A reação de amplificação foi realizada no termociclador Veriti® 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e visualizados em transiluminador com luz ultravioleta. Posteriormente, os produtos de PCR foram submetidos à purificação com as enzimas *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) e *Exonuclease I* utilizando o kit EXO-SAP (USB Affymetrix Inc., Cleveland, Ohio, EUA). Após a purificação, estes produtos foram submetidos ao sequenciamento automático utilizando-se o kit *Big Dye terminator V3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, EUA) no equipamento ABI *Prism Genetic Analyzer 3100XL automatic DNA sequencer* (Applied Biosystems Inc, Foster City, CA, EUA).

3.9 Análise estatística

As comparações das características clínicas entre os grupos de pacientes com e sem variantes genéticas raras identificadas foram feitas utilizando o teste exato de Fisher para variáveis categóricas e ANOVA ou Kruskal Wallis para variáveis numéricas conforme apropriado, usando o software Sigmastat para Windows 3.5. O nível de significância foi estabelecido em um erro tipo α de 0,05.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica dos pacientes com ACCD

Foram selecionados para este estudo 59 pacientes com ACCD. A maioria dos pacientes com ACCD (81%) era do sexo masculino. Mais da metade dos pacientes (59%) tinham pelo menos um parente de primeiro grau com histórico de ACCD. Apenas dois pacientes tinham história familiar de consanguinidade (3,4%). A grande maioria (91,5%) apresentava baixa estatura, definida como desvio-padrão (DP) de altura $< -2,0$ ⁽⁷⁴⁾. De fato, a baixa estatura foi a principal queixa inicial em nossa série de pacientes com ACCD. Na avaliação inicial, aproximadamente um terço dos pacientes (37,3%) apresentava baixo peso, definido como DP do índice de massa corporal (IMC) $\leq -2,0$ ⁽⁷⁵⁾. A idade óssea estava atrasada mais de um ano em comparação com a idade cronológica em todos os pacientes. O atraso médio de idade óssea foi de 2,7 anos $\pm$ 1,2 anos. A mediana da idade cronológica no início da puberdade foi de 14,6 anos para meninos e 13,1 anos para meninas. No entanto, a mediana da idade óssea no início da puberdade foi de 12,1 anos para meninos e 11,3 anos para meninas.

Quarenta e quatro pacientes (74,6%) apresentaram desenvolvimento puberal espontâneo ao longo do seguimento clínico. Em 15 pacientes (14 meninos e uma menina), baixas doses de esteroides sexuais foram usadas para induzir o desenvolvimento puberal ⁽³⁾. Após a descontinuação do tratamento hormonal, os pacientes mantiveram a elevação dos níveis séricos de esteroides sexuais e o progresso do desenvolvimento puberal. O desenvolvimento

neuropsicomotor foi considerado anormal apenas em dois pacientes, um paciente com leve dificuldade de aprendizagem e outro com problemas comportamentais discretos.

As características clínicas da coorte estudada são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Características clínicas dos 59 pacientes com ACCD estudados.

Sexo (M:F)	48:11
História familiar de ACCD ¹ (%)	35 (59%)
Consanguinidade (%)	2 (3,4%)
Idade média na primeira avaliação (anos)	14,6 ± 1,0
Idade óssea média na primeira avaliação (anos)	11,3 ± 1,7
Baixa estatura ² na primeira avaliação (%)	54 (91,5%)
Baixo IMC ³ na avaliação inicial (%)	22 (37,3%)
Atraso médio da idade óssea (anos)	-2.7 ± 1.2
Mediana da idade cronológica no início da puberdade (anos)	
Meninos	14,6 (13,5 - 16,7)
Meninas	13,1 (12,9 - 15,2)
Mediana da óssea no início da puberdade (anos)	
Meninos	12,0 (10 - 13)
Meninas	11,0 (10 a 13)
Puberdade induzida por baixas doses de esteroides sexuais (%)	15 (25%)

M: masculino; F: feminino; ACCD: atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento; IMC: índice de massa corporal

¹ Parente de primeiro grau com história de ACCD

² DP altura < -2,0

³ DP IMC ≤ -2.0

4.2 Métricas do sequenciamento

As 59 bibliotecas foram incluídas em três diferentes *pools*. Esses *pools* foram sequenciados em três corridas distintas na plataforma NextSeq 500 com o kit NextSeq Kit V2 2x150 (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA).

As métricas das corridas realizadas estão resumidas na Tabela 4. A cobertura média foi de 298 vezes com um desvio-padrão de 129. A grande maioria (98,4%) das regiões-alvo do painel apresentaram uma cobertura de mais de 10 vezes, e 93,8% uma cobertura de mais de 20 vezes.

Tabela 4 - Métricas das corridas de SPLE

	Média	Mínimo	Máximo
Leituras geradas	2.497.667	309.289	6.067.595
Bases sequenciadas (pb)	144.852.884	9.007.787	214.395.289
Cobertura (x)	298	18,57	441,9
Desvio padrão da cobertura	129	9,64	176,4
Cobertura maior que 10x (%)	98,4%	82,0%	99,9%
Cobertura maior que 20x (%)	93,8%	42,8%	99,9%

pb: pares de base; x: vezes

4.3 Variantes alélicas identificadas pelo painel

As variantes identificadas após o sequenciamento foram submetidas à filtragem de frequência em bancos de dados genômicos, selecionadas de acordo com a localização, sendo priorizadas aquelas localizadas em regiões exônicas ou em sítios de *splicing*. Em seguida, foram excluídas as variantes sinônimas e priorizadas as variantes de acordo com o potencial patogênico em sites de predição *in silico* e banco de dados de variantes. A Tabela 5 apresenta o detalhamento da filtragem acima.

Tabela 5 - Detalhamento da filtragem das variantes identificadas pelo SPLE

Crítérios de filtragem	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Total
Variantes encontradas	1046	843	922	2811
Variantes raras nos bancos de dados (MAF < 0,01)*	385	336	282	1003
Variantes em éxons e em sítios de <i>splicing</i>	99	61	53	213
Variantes após a exclusão das sinônimas	65	37	28	130
Variantes potencialmente patogênicas após análise <i>in silico</i> e revisão da literatura	7	6	9	22
Variantes potencialmente patogênicas em genes com padrão de herança autossômica dominante	5	4	6	15

MAF: frequência do alelo menor (*minor allele frequency*), *MAF < 0,01 significa uma frequência inferior a 1% nos bancos de dados populacionais (gnomAD e ABraOM).

As variantes restantes foram confirmadas visualmente através do programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*). Em seguida, o verdadeiro potencial patogênico das mesmas foi avaliado de acordo com os critérios do ACMG/AMP - Anexo B ⁽⁶⁵⁾. A tabela 13 do anexo C apresenta todas as variantes potencialmente patogênicas identificadas.

4.4 Variantes genéticas raras em genes com padrão de herança autossômica dominante

Quinze variantes raras em sete genes (*IGSF10*, *GHSR*, *CHD7*, *SPRY4*, *WDR11*, *SEMA3A* e *IL17RD*) foram classificadas como variantes de significado incerto com impacto potencial à proteína (VUSp). Todas essas variantes eram do tipo *missense* em heterozigose. A frequência alélica dessas variantes variou

de ausente a 0,45% no banco de dados populacional internacional (gnomAD).

Na Tabela 6, estão listadas essas variantes.

As características clínicas dos pacientes com ACCD nos quais foram identificadas variantes raras estão descritas na Tabela 7.

Três variantes raras em heterozigose foram identificadas no gene *IGSF10* em quatro pacientes diferentes: NM_178822.4:c.4187C>T:p.Ser1396Phe, c.5983G>A: p.Val1995Ile e c.7180G>A: p.Gly2394Ser. A variante p.Val1995Ile foi identificada em dois meninos com ACCD não aparentados (Tabela 7, pacientes 2 e 3). No paciente 2, também foi identificada uma VUS em heterozigose no gene *SEMA3A* (NM_006080:c.2197C>T:p.Arg733Cys). A variante p.Gly2394Ser foi identificada em um menino (paciente 4) que também apresentou uma segunda variante rara no gene *SPRY4* (NM_030964.3:c.722C>A:p.Ser241Tyr).

Similarmente, três variantes raras foram identificadas no gene *GHSR* em quatro pacientes com ACCD: NM_198407.2:c.251G>T:p.Ser84Ile, c.545T>C: p.Val182Ala e c.1072G>A:p.Ala358Thr. Três desses probandos (Tabela 7, pacientes 5, 7 e 8) haviam sido avaliados previamente para mutações no gene *GHSR* em um estudo anterior do nosso grupo ⁽²⁶⁾. No entanto, mesmo com o aumento no número de genes estudados, esses pacientes permaneceram com apenas a variante do gene *GHSR* identificada. A variante p.Val182Ala foi identificada em dois pacientes não aparentados, uma menina e um menino. O menino (paciente 6) não havia sido estudado para variantes do *GHSR* previamente.

Foram identificadas as seguintes variantes no gene *CHD7*: NM_017780.3: c.2830C>T:p.Arg944Cys, c.3299G>A:p.Arg1100His e c.8362G>T:

p.Asp2788Tyr (tabela 7, pacientes 9, 10 e 11, respectivamente). Nenhum dos indivíduos afetados tinha características da síndrome de CHARGE, com exceção do atraso da puberdade.

Duas variantes raras foram identificadas no gene *SPRY4* em dois pacientes não aparentados com ACCD: NM_030964.3:c.722C>A:p.Ser241Tyr e c.910G>A: p.Val304Ile (Tabela 7, pacientes 4 e 15, respectivamente). Ambas as variantes foram previamente descritas em pacientes com HHI ⁽⁷⁶⁾.

Duas variantes raras foram identificadas em dois pacientes no gene *WDR11*: NM_018117.11:c.2267G>A:p.Arg756His e c.2962G>A:p.Glu988Lys (Tabela 7, pacientes 12 e 13, respectivamente).

Uma variante rara foi identificada no gene *IL17RD*: NM_017563.4: c.878C>T:p.Pro293Leu (Tabela 7, paciente 14).

Tabela 6 - Variantes genéticas raras identificadas em pacientes com ACCD por meio de SPLE

Gene	Variante	dbSNP ID	Frequência (MAF) ¹	Segregação
<i>IGSF10</i>	c.4187C>T p.Ser1396Phe	rs144379097	0,0002333	Herdada do pai não afetado
<i>IGSF10</i>	c.5983G>A p.Val1995Ile	rs141250073	0,0007723	Herdada da mãe afetada ³
<i>IGSF10</i>	c.7180G>A p.Gly2394Ser	rs141148204	0,0001380	Não realizada ²
<i>GHSR</i>	c.251G>T p.Ser84Ile	NA	0	Não realizada ²
<i>GHSR</i>	c.545T>C p.Val182Ala	NA	0	Herdada do pai afetado em ambas as famílias
<i>GHSR</i>	c.1072G>A p.Ala358Thr	rs150344113	0,0006015	Herdada do pai não afetado
<i>CHD7</i>	c.2830C>T p.Arg944Cys	rs587783435	0,00002824	Não realizada ²
<i>CHD7</i>	c.3299G>A p.Arg1100His	rs767259131	0,00005704	Herdada do pai não afetado
<i>CHD7</i>	c.8362G>T p.Asp2788Tyr	NA	0	Não realizada ²
<i>SPRY4</i>	c.722C>A p.Ser241Tyr	rs139512218	0,004530	Não realizada ²
<i>SPRY4</i>	c.910G>A p.Val304Ile	rs142439525	0,001626	Não realizada ²
<i>WDR11</i>	c.2267G>A p.Arg756His	rs12265848	0,00007073	Não realizada ²
<i>WDR11</i>	c.2962G>A p.Glu988Lys	rs74870997	0,001774	Não realizada ²
<i>SEMA3A</i>	c.2197>T p.Arg733Cys	rs138002949	0,00006015	Não realizada ²
<i>IL17RD</i>	c.878C>T p.Pro293Leu	rs150457965	0,0005626	Não realizada ²

dbSNP: banco de dados de polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism Database*);

¹ MAF: frequência do alelo menor no banco de dados gnomAD.

² Amostra de DNA de um ou ambos os pais não estava disponível.

³ Segregação realizada em apenas uma das famílias portadoras da variante. DNA dos pais da outra família não estava disponível.

Tabela 7 - Características clínicas dos 15 pacientes com ACCD nos quais foram identificadas variantes raras

ID	Gene e Variantes	Sexo	Primeira avaliação				Início da puberdade			História familiar			
			Idade (anos)	IO (anos)	DP Altura	DP IMC	Idade (anos)	IO (anos)	DP Altura	DP Altura paterna	DP Altura materna	Pai com ACCD	Mãe com ACCD
1	<i>IGSF10</i> p.Ser1396Phe	F	12,4	10,9	-2,5	-2,5	12,9	11,5	-2,8	-0,7	-0,9	Não	Sim
2	<i>IGSF10</i> p.Val1995Ile <i>SEMA3A</i> p.Arg733Cys	M	16,7	13,0	-2,3	-3,0	16,7	13,0	-2,3	-1,8	-0,9	Não	Sim
3	<i>IGSF10</i> p.Val1995Ile	M	14,0	12,2	-2,8	-0,7	14,0	12,0	-2,8	-1,0	0,3	Não	Não
4	<i>IGSF10</i> p.Gly2394Ser <i>SPRY4</i> p.Ser241Tyr	M	10,1	7,4	-2,2	-1,1	13,5	11,5	-2,3	-0,4	-1,5	Sim	Não
5	<i>GHSR</i> p.Ser84Ile	F	12,6	11,0	-2,4	-2,5	13,0	11,0	-2,4	-1,5	-0,3	Não	Não
6	<i>GHSR</i> p.Val182Ala	M	12,3	8,0	-2,6	-2,8	13,5	10,5	-2,5	-2,5	-0,4	Sim	Não
7	<i>GHSR</i> p.Val182Ala	F	12,8	11,0	-2,3	+1,0	13,2	11,0	-2,2	1,0	-1,3	Sim	Não
8	<i>GHSR</i> p.Ala358Thr	M	16,5	11,0	-4,7	-7,1	16,5	11,0	-4,7	-2,2	-2,6	Não	Não
9	<i>CHD7</i> p.Arg944Cys	M	15,6	12,0	-3,2	-2,0	15,6	12,0	-3,2	ND	-1,0	ND	Não
10	<i>CHD7</i> p.Arg1100His	M	13,0	9,5	-2,5	-1,6	14,3*	11,6	-2,7	-2,4	-0,8	Não	Sim
11	<i>CHD7</i> p.Asp2788Tyr	M	9,4	8,4	-1,3	-1,2	14,0	13,0	-1,8	-1,5	-1,7	Não	Não
12	<i>WDR11</i> p.Arg756His	M	14,1	11,8	-2,0	-3,1	14,1	11,8	-2,0	-0,4	+0,6	Sim	Não
13	<i>WDR11</i> p.Glu988Lys	M	16,1	13,0	-2,7	-0,2	16,5*	13,0	-2,4	-0,1	-1,3	Não	Não
14	<i>IL17RD</i> p.Pro293Leu	M	14,2	11,5	-2,4	-1,4	14,2	11,5	-2,4	-2,3	-0,2	Sim	Não
15	<i>SPRY4</i> p.Val304Ile	M	12,1	10,0	-3,2	-0,9	14,1	12,0	-2,7	-1,8	-2,0	Sim	Não

ID: identificação; IO: idade óssea; DP: desvio-padrão; IMC: índice de massa corpórea; ACCD: Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento; M: masculino; F: feminino; ND: não disponível,

* Puberdade induzida com baixas doses de esteroides sexuais por 3 meses

4.5 Análise de segregação familiar

A análise da segregação familiar foi possível em seis famílias.

A variante c.5983G>A: p.Val1995Ile do gene *IGSF10* foi identificada apenas nos membros afetados da Família 2 (probando, mãe e irmão). A variante c.545T>C: p.Val182Ala do gene *GHSR* foi igualmente identificada apenas nos membros afetados das Famílias 6 (probando e pai) e 7 (probando, pai e irmã) (Tabela 6).

No entanto, as variantes c.4187C>T: p.Ser1396Phe do gene *IGSF10*, c.1072G>A: p.Ala358Thr do gene *GHSR* e c.3299G>A: p.Arg1100His do gene *CHD7* não segregaram entre os indivíduos afetados.

4.6 Oligogenicidade

A oligogenicidade, definida como a presença de variantes patogênicas em mais de um gene em um mesmo indivíduo ⁽²⁸⁾, é frequentemente observada em pacientes com HH congênito isolado ⁽⁷⁷⁾.

Em dois pacientes de nossa casuística (3,4%), foi observada a presença de duas variantes de significado incerto com impacto potencial no nível da proteína. As combinações de genes identificadas foram: *IGSF10/SPRY4* e *IGSF10/SEMA3A*.

4.7 Análise comparativa das características clínicas dos pacientes com e sem variantes raras identificadas.

Uma análise comparativa das principais características clínicas foi realizada entre pacientes com e sem variantes genéticas raras identificadas. Todas as características clínicas foram semelhantes em ambos os grupos (Tabela 8).

Tabela 8 - Características clínicas de todos os pacientes com ACCD e comparação entre os pacientes com e sem variantes genéticas raras identificadas nos genes selecionados.

Características clínicas	Todos os pacientes (n = 59)	Pacientes com variantes (n = 15)	Pacientes sem variantes (n = 44)	Valor P
Sexo masculino (%)	48 (81,3%)	12 (80%)	36 (82%)	NS
História familiar de ACCD ¹ (%)	35 (59%)	11 (73%)	24 (54,5%)	0,2381
Consanguinidade (%)	2 (3,4%)	0	2 (4,5%)	NS
Baixa estatura ² na primeira avaliação (%)	54 (91,5%)	14 (93,3%)	40 (90,9%)	NS
Baixo IMC ³ na primeira avaliação (%)	22 (37,3%)	7 (46,7%)	15 (34%)	0,5374
Média de idade na primeira avaliação (anos)	14,6 ± 1,0	13,5 ± 2,2	14,2 ± 1,8	NS
Média de atraso na idade óssea (anos)	-2,7 ± 1,2	-2,7 ± 1,3	-2,8 ± 1,2	NS
Mediana da idade cronológica no início da puberdade (anos)				
Meninos	14,6 (13,5-16,7)	14,1 (13,5 - 16,7)	14,6 (13,6 - 16,4)	NS
Meninas	13,1 (12,9-15,2)	13,0 (12,9 - 13,1)	13,2 (12,9 - 14,6)	NS
Mediana da idade óssea no início da puberdade (anos)				
Meninos	12,0 (10-13)	12 (10 - 13)	12,2 (10 - 13)	NS
Meninas	11,0 (10-13)	11 (11 - 11.5)	11,2 (10 - 13)	NS
Puberdade induzida com baixas doses de esteroides sexuais (%)	15 (25%)	2 (13%)	13 (29,5%)	0,3103
Estatura final ⁴ dentro da faixa de estatura-alvo (%)	23 (85%)	8 (80%)	15 (88,2%)	NS
Baixa estatura ² na vida adulta ⁴ (%)	4 (14,8%) ⁴	3 (30%) ⁴	1 (5,8%) ⁴	0,1282

ACCD: atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento; IMC: índice de massa corpórea; NS: não significativo.

¹ Parente de primeiro grau com história de ACCD (mãe, pai ou irmãos)

² DP altura < -2,0

³ DP IMC ≤ -2,0

⁴ Dado de estatura final disponível em 10 pacientes no grupo 1 e em 17 pacientes no grupo 2

4.8 Variantes em genes com padrão de herança autossômica recessiva

Foram encontradas seis variantes raras potencialmente patogênicas em heterozigose em quatro genes com padrão de herança autossômica recessiva: *IGFALS*, *PROKR2*, *POLR3A* e *PNPLA6* (Tabela 9). É pouco provável que essas variantes sejam causadoras do fenótipo de ACCD pelo padrão de herança desses genes.

Tabela 9 - Variantes raras em genes com padrão de herança autossômica recessiva

Gene	Variante	dbSNP ID	Frequência (MAF) ¹
<i>IGFALS</i>	c.G944A p.Arg315His	rs747626071	0,00002364
<i>IGFALS</i>	c.C1702T p.Arg568Cys	rs367736547	0,000005718
<i>IGFALS</i>	c.G1822A p.Asp608Asn	rs143070371	0,0007611
<i>POLR3A</i>	c.G3280A p.Asp1094Asn	rs146861723	0,000798722
<i>PNPLA6</i>	c.G2633A p.Gly878Asp	NA	0
<i>PROKR2</i>	c.C253G p.Arg85Gly	rs141090506	0,00199681

dbSNP: banco de dados de polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polymorphism Database*);

¹ MAF: frequência do alelo menor no banco de dados gnomAD.

4.9 Genes nos quais não foram encontradas variantes raras

No presente estudo, não foram identificadas variantes raras em pacientes com ACCD nos seguintes genes: *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TAC3R*, *PROK2*, *POLR3B*, *RNF216*, *DMXL2*, *FGF17*, *SEMA7A*, *DUSP6*, *FLRT3*, *SOX10*, *NSMF*, *MKRN3*, *MSX1*, *OTX2*, *EBF2* e *IGSF1*.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

5.1 Características clínicas do atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento

A puberdade ocorre em um período crítico em termos de desenvolvimento social e educacional. Quaisquer alterações na idade de início da puberdade, patológicas ou não, podem ter impactos significativos na saúde física e psicológica. Em estudos epidemiológicos, puberdade precoce ou atrasada, em ambos os sexos, têm sido relacionadas a uma ampla gama de resultados adversos à saúde, incluindo neoplasias malignas, doenças cardiometabólicas, gastrointestinais, musculoesqueléticas e neurológicas ^(22, 78).

Neste estudo, investigamos as características clínicas e genéticas de 59 indivíduos brasileiros não aparentados de ambos os sexos com diagnóstico de atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento (ACCD) avaliados em um único centro médico terciário. Durante a observação clínica longitudinal, todos apresentaram desenvolvimento puberal antes dos 18 anos de idade, excluindo o fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico. Foram observadas características clínicas e epidemiológicas típicas nesta coorte brasileira de ACCD, incluindo predominância masculina (81%), baixa estatura (91%) e atraso na idade óssea (média de 2,5 anos nos meninos e 2,0 anos nas meninas) na avaliação inicial.

A predominância masculina observada em nossos pacientes com ACCD está de acordo com dados da literatura ^(17, 19, 79). O predomínio do sexo masculino

também é observado no hipogonadismo hipogonadotrófico congênito ⁽⁸⁰⁾, o que pode indicar que ambas as condições tenham uma fisiopatologia comum.

Um grande número de pacientes em nossa coorte apresentava baixa estatura na avaliação inicial. Isso pode ser um viés de um centro médico terciário, pois provavelmente as crianças com baixa estatura severa procuraram avaliação médica e, então, o ACCD foi detectado.

Apesar do aumento progressivo da prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças e adolescentes nos dias de hoje, 37,3% dos pacientes com ACCD apresentavam baixo peso (DP IMC < -2), enquanto os outros pacientes apresentavam IMC normal, o que sugere que pacientes com ACCD costumam ter peso normal ou baixo.

5.2 Genética do atraso constitucional de crescimento e desenvolvimento

O ACCD apresenta uma forte base genética visto que 50 a 75% dos indivíduos possuem história familiar de puberdade atrasada ^(17, 36). A maioria das famílias exibe um padrão autossômico dominante de herança (com ou sem penetrância completa) ^(16, 36, 38).

No presente estudo, 59% dos pacientes apresentavam história familiar de ACCD em pelo menos um parente de primeiro grau. A baixa taxa de consanguinidade (3,4%) e o padrão de herança vertical nesta coorte de ACCD, reforçam a relevância da herança autossômica dominante nesta condição ⁽³⁶⁾.

Na última década, foram feitos avanços significativos na elucidação da base genética do ACCD usando-se o sequenciamento paralelo em larga escala (painel gênico e sequenciamento exômico global) ^(42, 43, 53). Variantes raras

potencialmente patogênicas foram identificadas em vários genes, incluindo *IGSF10* ⁽⁵³⁾, *HS6ST1* ⁽⁸¹⁾, *FTO* ⁽⁴⁹⁾ e, mais recentemente *EAP1* ⁽⁵⁵⁾.

No presente estudo, um painel gênico customizado incluindo 36 genes implicados com HH e outros distúrbios puberais foi usado para análise genética abrangente em todos os casos de ACCD. Entre os genes selecionados estavam aqueles previamente relacionados ao ACCD, HH sindrômico e não-sindrômico clássico isolado e combinado, bem como genes relacionados a outros distúrbios puberais, como a puberdade precoce central (Tabela 1). Foram identificadas 15 variantes raras em heterozigose em 15 dos 59 pacientes com ACCD (25%) em genes com padrão de herança autossômica dominante (Tabela 6). *IGSF10* e *GHSR* foram os genes afetados mais prevalentes.

5.3 Variantes genéticas raras no gene *IGSF10*

O membro 10 da superfamília das imunoglobulina (*IGSF10*) foi o primeiro gene associado ao atraso constitucional da puberdade por meio de um estudo de sequenciamento exômico completo ^(53, 54). Este estudo seminal, contendo 111 indivíduos (76 afetados e 35 controles) de 18 famílias de uma grande coorte finlandesa com atraso puberal familiar, revelou quatro variantes do tipo *missense* potencialmente patogênicas em heterozigose em 31 indivíduos de 10 famílias (27,9%) ^(39, 53, 54). No presente estudo, três variantes raras do tipo *missense* potencialmente patogênicas em heterozigose foram também identificadas no *IGSF10* (p.Ser1396Phe, p.Val1995Ile e p.Gly2394Ser) em quatro pacientes não aparentados. Curiosamente, a variante p.Val1995Ile foi recorrente (Famílias 2 e 3) e segregou com o fenótipo de ACCD em membros afetados da Família 2. De

acordo com Howard *et al.* ^(16, 34), variantes no gene *IGSF10* causam uma desregulação da migração neuronal de GnRH durante o desenvolvimento embrionário, resultando em números reduzidos ou na chegada errônea dos neurônios de GnRH ao hipotálamo, produzindo um defeito funcional na rede neuroendócrina de GnRH.

5.4 Variantes genéticas raras no gene *GHSR*

Mutações no gene do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (*GHSR*) foram previamente associadas ao fenótipo de baixa estatura ⁽⁴⁷⁾. De fato, uma grande variabilidade fenotípica tem sido associada a essas mutações, incluindo deficiência de GH ⁽⁴⁶⁾, baixa estatura idiopática ⁽⁴⁷⁾ e ACCD ⁽⁴⁸⁾. Além disso, estudos funcionais sugeriram que mutações no *GHSR* podem diminuir a secreção de GH ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Em 2011, nosso grupo avaliou a presença de variantes raras no gene *GHSR* em 31 pacientes com ACCD ⁽⁴⁸⁾. Cinco variantes raras do tipo *missense* em heterozigose foram identificadas neste estudo anterior, sugerindo que, na presença de mutações no gene *GHSR*, há uma redução do apetite dependente da grelina e, conseqüentemente, um IMC relativamente menor, o que pode contribuir para um atraso no início da puberdade. No presente estudo, identificamos três variantes raras do tipo *missense* potencialmente patogênicas em heterozigose no *GHSR* (p.Ser84Ile; p.Val182Ala e p.Ala358Thr) em quatro pacientes com ACCD não aparentados. Três desses pacientes (Tabela 7, pacientes 5, 7 e 8) foram incluídos tanto no estudo prévio quanto no estudo atual. No entanto, apesar do aumento do número de genes estudados, apenas as variantes *GHSR* permaneceram potencialmente associadas ao

fenótipo de ACCD nesses casos. Todos os quatro pacientes tinham baixa estatura e três pacientes tinham IMC gravemente reduzido na avaliação inicial (IMC DP -7,1 a -2,6).

5.5 Variantes genéticas raras no gene *CHD7*

O gene da proteína de ligação *chromodomain-helicase-DNA 7 (CHD7)* codifica uma proteína expressa no epitélio olfatório, hipotálamo e hipófise e que desempenha importante papel no desenvolvimento neuronal do bulbo olfatório e neurônios de GnRH ⁽⁸²⁾. Mutações no gene *CHD7* estão relacionadas à síndrome CHARGE (OMIM #214800) caracterizada por coloboma, malformações cardíacas, atresia das coanas, retardo do crescimento e desenvolvimento, anomalias genitais e anomalias do ouvido (auditivas e vestibulares) ⁽⁸³⁾. A síndrome de CHARGE tem uma incidência estimada de nascimentos de 1 em 8.500 - 12.000 ⁽⁸⁴⁾. Mutações de perda de função no *CHD7* também podem ser encontradas em pacientes com HH isolado sem características sindrômicas associadas ⁽³⁹⁾. O estudo pioneiro do *CHD7* em pacientes com HH isolado foi realizado por Kim *et al.* ⁽⁸⁵⁾ no qual avaliaram a presença de mutações nesse gene em 197 pacientes com HH isolado normósmico e síndrome de Kallmann, sem o fenótipo de síndrome CHARGE, encontrando sete mutações em heterozigose no *CHD7*, a maioria do tipo *missense*. No presente estudo, identificamos três variantes raras do tipo *missense* potencialmente patogênicas em heterozigose no gene *CHD7* em três pacientes com ACCD (Tabela 7, pacientes 9, 10 e 11). A análise de segregação familiar foi possível em uma

família (Família 10, Tabela 7), mas a variante p.Arg1100His não segregou entre os membros afetados da família.

5.6 Variantes genéticas raras no gene *SPRY4*

O gene *Sprouty, Drosophila, Homolog Of 4 (SPRY4)* codifica a proteína SPRY4 que antagoniza a sinalização de FGF (fator de crescimento de fibroblasto) inibindo a ativação induzida pelo receptor da via MAPK (proteína quinase ativada por mitogênio) ⁽⁸⁶⁾. Os SPRYs estão posicionados a montante da ativação do RAS (protooncogene RAt Sarcoma) e prejudicam a formação do complexo ativo GTP-RAS (GTP: guanosina trifosfato) ⁽⁸⁶⁾.

Em 2013, Miraoui *et al.* ⁽⁷⁶⁾ identificaram variantes do tipo *missense* em heterozigose no gene *SPRY4* em 14 indivíduos não aparentados com hipogonadismo hipogonadotrófico congênito. Três desses indivíduos, apresentavam outra variante do tipo *missense* em heterozigose em outro gene associado ao HH, incluindo *FGFR1* e *DUSP6*. Os pesquisadores concluíram que mutações nos genes que codificam componentes da via do FGF estão associadas a modos complexos de herança HH congênito e atuam principalmente como contribuintes para uma arquitetura genética oligogênica ⁽⁷⁶⁾.

Duas variantes raras do tipo *missense* em heterozigose foram identificadas no gene *SPRY4* em dois pacientes não aparentados com ACCD: c.722C>A: p.Ser241Tyr e c.910G>A: p.Val304Ile (Tabela 7, pacientes 4 e 15, respectivamente). Ambas as variantes foram previamente descritas em pacientes com HHI ⁽⁷⁶⁾. No entanto, a variante p.Val304Ile é muito frequente na população de afrodescendentes (MAF gnomAD = 0,01714) e ambas estão

presentes em homozigose no banco de dados gnomAD. A variante p.Ser241Tyr estava presente em digenicidade com a variante do IGSF10 p.Gly2394Ser no paciente 4 (Tabela 7).

5.7 Variantes genéticas raras no gene *WDR11*

O gene *WDR11* (proteína 1 que contém repetição de WD) codifica uma proteína altamente conservada ao longo da evolução dos vertebrados que é expressa no desenvolvimento do olfato e do caminho migratório do GnRH ⁽⁸⁷⁾.

Em 2010, Kim et al. ⁽⁸⁸⁾ avaliaram 201 pacientes com HH congênito normósmico e anósmico para mutações no gene candidato *WDR11* e identificaram cinco variantes do tipo *missense* em heterozigose em seis probandos não aparentados (cinco normósmicos e um anósmico). Essas variantes foram ausentes em um grupo controle de mais de 400 indivíduos.

No presente estudo, identificamos duas variantes raras em heterozigose do tipo *missense* no gene *WDR11* em dois pacientes: c.2267G>A:p.Arg756His e c.2962G>A:p.Glu988Lys (Tabela 7, pacientes 12 e 13, respectivamente). A segregação familiar não foi possível pela indisponibilidade de amostras de DNA dos pais.

5.8 Variante genética rara no gene *IL17RD*

O gene *IL17RD* codifica uma proteína de membrana pertencente à família de proteínas do receptor de interleucina-17 e faz parte de um grupo de

moduladores da sinalização de FGF, conhecido como "expressão semelhante aos FGFs" (SEF) ^(26, 89).

Em 2013, Miraoui *et al.* ⁽⁷⁶⁾ identificaram 7 variantes do tipo *missense* no gene *IL17RD* em 8 indivíduos não aparentados com HH congênito. Dois dos pacientes eram homozigotos para mutações no gene *IL17RD* e em outros 2 pacientes a mutação heterozigótica no *IL17RD* foi acompanhada por uma mutação heterozigótica em outro gene associado ao HH, *FGFR1* e *KISS1R*, respectivamente ⁽⁷⁶⁾.

Em um estudo com 56 pacientes com ACCD, foram identificadas três variantes raras do tipo potencialmente patogênicas em heterozigose no gene *IL17RD* ⁽⁴²⁾. Portanto, sugeriu-se que variantes em heterozigose neste gene poderiam resultar em fenótipos endócrinos reprodutivos de gravidade variável ⁽⁴²⁾.

No presente estudo, a variante c.878C>T:p.Pro293Leu foi identificada em um paciente (Tabela 7, paciente 14). Esta variante ainda não foi descrita na literatura.

5.9 Variante genética rara no gene *SEMA3A*

O gene *SEMA3A* codifica a proteína semaforina-3A, a qual é essencial para o desenvolvimento do sistema neuronal do GnRH ⁽⁹⁰⁾. A perda da sinalização da semaforina-3A altera o direcionamento dos nervos vomeronasais e a migração de neurônios de GnRH ⁽⁹⁰⁾.

Mutações de perda de função em heterozigose foram identificadas previamente no gene *SEMA3A* em pacientes com síndrome de Kallmann, alguns deles em combinação com mutações em outros genes relacionados ao HHI ⁽⁹¹⁾.

No presente estudo, identificamos uma variante do tipo *missense* em heterozigose no gene *SEMA3A* (c.2197>T: p.Arg733Cys) no paciente 2 (Tabela 7). Este paciente também apresentou uma variante do tipo *missense* em heterozigose no gene *IGSF10*. A presença dessas duas variantes no mesmo paciente pode contribuir de maneira sinérgica para a puberdade atrasada, como ocorre nos casos de pacientes com HH congênito que possuem variantes do gene *SEMA3A* ⁽⁹²⁾.

5.10 Achados oligogênicos

Identificamos a presença de variantes potencialmente patogênicas em dois genes diferentes (oligogenicidade) em 3,4% da nossa coorte de ACCD. As combinações de genes foram *IGSF10 / SPRY4* e *IGSF10 / SEMA3A*. A presença dessas variantes pode atuar como mecanismo sinérgico no atraso constitucional, assim como ocorre nos casos de HH, mas a frequência de oligogenicidade nesta coorte de ACCD foi menor do que nas coortes de HH ^(43, 76, 77).

5.11 Comparação das características clínicas entre pacientes com ACCD com e sem variantes genéticas raras

Uma análise comparativa das características clínicas foi realizada entre os pacientes com e sem variantes genéticas raras identificadas. Apesar de algumas frequências serem aparentemente diferentes, ao realizarmos a análise estatística com o teste exato de Fisher, não observamos diferenças estatisticamente significantes.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- As principais características clínicas observadas na coorte brasileira de ACCD foram predominância do sexo masculino (81%), baixa estatura (91%), atraso da idade óssea e IMC normal ou baixo na avaliação inicial.
- 59% dos pacientes apresentavam história familiar de ACCD em pelo menos um parente de primeiro grau. A baixa taxa de consanguinidade (3,4%) e o padrão de herança vertical nesta coorte de ACCD, reforçam a relevância da herança autossômica dominante nesta condição.
- Quinze variantes raras do tipo *missense* em heterozigose foram identificadas em sete genes (*IGSF10*, *GHSR*, *CHD7*, *SPRY4*, *WDR11*, *SEMA3A* e *IL17RD*) em quinze pacientes (25%).
- Os genes *IGSF10* e *GHSR* foram os genes com o maior número de variantes encontradas.
- Não houve diferença nas características clínicas entre os pacientes com ACCD com e sem variantes genéticas raras identificadas.

7 ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Pesquisa De Novos Fatores Genéticos No Atraso Constitucional Do Crescimento E Desenvolvimento Humano

Pesquisador principal: Priscila Sales Barroso

Departamento/Instituto: Departamento de Clínica Médica/ Disciplina de Endocrinologia e Metabologia / Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM 42 / ICHC FMUSP

Você está sendo convidado a participar deste estudo o qual tem como objetivo tentar esclarecer a causa de você ter apresentado ausência do aumento dos testículos (em meninos com 14 anos ou mais) ou ausência do desenvolvimento de mamas (em meninas com idade de 13 anos ou mais).

Quando este quadro ocorre é chamado de atraso puberal. Essas alterações podem interferir com a altura adulta, massa óssea e bem-estar psicossocial. Algumas poucas alterações em genes (que são estruturas

presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) foram identificadas como causa desta condição. Entretanto, suspeita-se que outros genes, ainda desconhecidos, possam também participar como causa. Por favor, leia este termo e pergunte ao seu médico qualquer dúvida que você tiver. A decisão de participar neste estudo é sua.

Você será acompanhado em consultas e vai realizar os exames de rotina necessários ao seu tratamento, nenhum deles é experimental. Este estudo implica na coleta adicional de 3 tubos pequenos de sangue ($\pm$ 12 ml) através de uma picada na veia do antebraço com agulha estéril e descartável para a obtenção do material genético (DNA). Essa coleta será realizada por um profissional treinado e devidamente habilitado para sua realização. Não é preciso estar em jejum e não é necessária a ingestão de nenhum medicamento para a coleta de sangue. Os riscos e desconfortos desses procedimentos serão mínimos. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em menos de 7 (sete) dias. Este estudo também inclui a coleta de informações contidas no seu prontuário hospitalar (ou registro médico).

Este estudo pode não trazer benefícios diretos para você, mas o seu resultado pode ajudar outros pacientes e seus familiares a terem um diagnóstico mais precoce. Uma melhor compreensão das causas da puberdade atrasada pode também conduzir ao desenvolvimento de novos tratamentos no futuro.

Você, ou seu representante legal, podem retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado pelo pesquisador a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, valendo a desistência a

partir da data de formalização desta. A retirada do consentimento será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes. Informamos também que este termo de consentimento será elaborado em duas vias igualmente válidas, assinadas e rubricadas em todas as suas páginas, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa ou responsável legal.

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. No entanto, este estudo assegura ao participante de pesquisa e ao seu acompanhante (quando necessário) o ressarcimento de despesas, tais como transporte e alimentação nos dias em que for necessária sua presença para consultas ou exames.

O seu material genético (DNA) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 para futuras pesquisas, pois com o surgimento de novas tecnologias poderemos continuar estudando o seu caso e descobrir a causa genética da sua doença. No entanto, para realização de uma nova pesquisa com o seu material genético, você será obrigatoriamente informado e, se você desejar participar, um novo termo de consentimento livre e esclarecido será necessário, bem como será realizada uma nova análise por meio do sistema de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O tempo de armazenamento do material será de acordo com o cronograma da pesquisa (3 anos), sendo que o prazo máximo é de 10 anos.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. A principal

investigadora é o Dra. Ana Claudia Latronico que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho 255, 2º. Andar, Bloco 6, Telefone (11) 2661-7512., e-mail anacl@usp.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – Telefones: (11) 2661-7595, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo **Pesquisa De Novos Fatores Genéticos No Atraso Constitucional Do Crescimento E Desenvolvimento Humano**. Eu discuti as informações acima com o Pesquisador Responsável Dra. Priscila Sales Barroso sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal:

Data / /

Assinatura do responsável pelo estudo:

Data / /

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU
RESPONSÁVEL LEGAL**

1.NOME:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE: SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO..... Nº.....APTO:.....

BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: (.....)

Anexo B - Critérios de patogenicidade de variantes da *American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP)

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

Genetics
in Medicine

Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

Sue Richards, PhD¹, Nazneen Aziz, PhD^{2,16}, Sherri Bale, PhD³, David Bick, MD⁴, Soma Das, PhD⁵, Julie Gastier-Foster, PhD^{6,7,8}, Wayne W. Grody, MD, PhD^{9,10,11}, Madhuri Hegde, PhD¹², Elaine Lyon, PhD¹³, Elaine Spector, PhD¹⁴, Karl Voelkerding, MD¹³ and Heidi L. Rehm, PhD¹⁵; on behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee

Tabela 10 - Critérios para classificação de variantes patogênicas ACMG/AMP

Evidência de patogenicidade	Categoria
Muito forte (<i>Very strong</i>)	<p>PVS1 Variante nula (<i>nonsense</i>, <i>frameshift</i>, <i>splice sites</i>, códon de iniciação, deleção de um ou múltiplos éxons) em um gene em que mutação com perda de função é um mecanismo conhecido da doença.</p> <p>Ressalvas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Genes em que a perda de função não é um mecanismo de doença conhecido (por exemplo: <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>) • Variantes com perda de função no extremo 3' de um gene • Variantes em sítios de <i>splice</i> que levam a exclusão de um éxon, mas mantém o restante da proteína intacta • Genes com múltiplos transcritos
Forte (<i>Strong</i>)	<p>PS1 Mesma alteração de aminoácido que uma variante patogênica previamente estabelecida, independentemente da alteração nucleotídica.</p> <p>Exemplo: Val → Leu causado por G>C ou G>T no mesmo códon</p> <p>Advertência: Cuidado com as trocas que afetam sítio de <i>splicing</i> em vez de aminoácidos/proteínas.</p> <p>PS2 Variante <i>de novo</i> (maternidade e paternidade confirmadas) em um paciente com a doença e sem histórico familiar.</p> <p>Nota: A confirmação apenas da paternidade é insuficiente. Doação de óvulos, maternidade de aluguel, erros na transferência de embrião e assim por diante, podem contribuir para a não-maternidade.</p> <p>PS3 Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos que apoiam um efeito prejudicial no gene ou produtos do gene.</p> <p>Nota: Estudos funcionais que foram validados e demonstraram ser reprodutíveis e robustos são considerados os mais bem estabelecidos.</p> <p>PS4 A prevalência da variante nos indivíduos afetados está significativamente aumentada em comparação com a prevalência nos controles.</p> <p>Nota 1: O risco relativo (RR), obtido em estudos de caso-controle, é > 5,0 e o intervalo de confiança em torno da estimativa do RR não inclui 1,0.</p>

PVS: patogênico muito forte; PS: patogênico forte

Tabela 10 - Critérios para classificação de variantes patogênicas ACMG/AMP
(Continuação)

	<p>Nota 2: Nos casos de variantes muito raras, nas quais os estudos de caso-controle podem não atingir significância estatística, a observação prévia da variante em vários pacientes não aparentados com o mesmo fenótipo e sua ausência em controles pode ser usado como nível moderado de evidência.</p>
Moderado	<p>PM1 Variante localizada em um <i>hot spot</i> mutacional e/ou em um domínio funcional crítico e bem estabelecido (por exemplo, sítio ativo de uma enzima) sem variação benigna.</p> <p>PM2 Ausente nos controles (ou a uma frequência extremamente baixa se for recessivo) no <i>Exome Sequencing Project</i>, 1000 Genomes Project ou Exome Aggregation Consortium (EXAC).</p> <p>Advertência: Os dados da população para inserções/deleções podem ser mal lidas pelo sequenciamento paralelo em larga escala.</p> <p>PM3 Para doenças recessivas, variante identificada em <i>trans</i> com uma variante patogênica conhecida.</p> <p>Nota: Isso requer teste dos pais (ou filhos) para determinar a fase.</p> <p>PM4 O comprimento da proteína muda como resultado de deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região não repetida ou variantes de <i>stop loss</i>.</p> <p>PM5 Nova troca do tipo <i>missense</i> em um aminoácido no qual uma troca <i>missense</i> diferente já foi descrita como patogênica.</p> <p>Exemplo: Arg156His é patogênico; agora você observa Arg156Cys.</p> <p>Advertência: Cuidado com as alterações que afetam <i>splicing</i>.</p> <p>PM6 Variante presumida <i>de novo</i>, mas sem confirmação de paternidade e maternidade.</p>
Apoio (Supporting)	<p>PP1 Segregação em vários membros da família afetados em um gene definitivamente conhecido por causar a doença.</p> <p>Nota: Pode ser usado como evidência muito forte com o aumento dos dados de segregação.</p> <p>PP2 Variante <i>missense</i> em um gene que tem uma baixa taxa de variantes benignas do tipo <i>missense</i> e em que variantes <i>missense</i> são um mecanismo comum de doença.</p> <p>PP3 Múltiplas linhas de evidência computacional suportam um efeito deletério no gene ou no produto do gene (conservação, evolução, impacto no <i>splicing</i>, etc.)</p> <p>Advertência: Como muitos algoritmos <i>in silico</i> usam dados muito semelhantes ou os mesmos para suas previsões, cada algoritmo não deve ser contado como um critério independente. O critério PP3 pode ser usado apenas uma vez em qualquer avaliação de uma variante.</p> <p>PP4 O fenótipo ou histórico familiar do paciente é altamente específico para uma doença com uma única etiologia genética.</p> <p>PP5 Fonte respeitável recentemente relatou variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para o laboratório para realizar uma avaliação independente.</p>

PM: patogênica moderada; PP: patogênica de apoio.

Tabela 11 - Critérios para classificação de variantes benignas ACMG/AMP

Evidência de impacto benigno	Categoria
Autônomo (<i>Stand-alone</i>)	BA1 Frequência alélica > 5% no <i>Exome Sequencing Project</i> , <i>1000 Genomes Project</i> ou <i>Exome Aggregation Consortium</i>
Forte (<i>Strong</i>)	<p>BS1 A frequência alélica é maior que a esperada para a doença.</p> <p>BS2 Variante encontrada em um indivíduo adulto saudável para uma doença recessiva (homozigoto), dominante (heterozigoto) ou ligado ao X (hemizigoto), com penetração total esperada em idade precoce.</p> <p>BS3 Estudos funcionais bem estabelecidos <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> não mostraram efeito deletério da variante sobre a função da proteína ou <i>splicing</i>.</p> <p>BS4 Ausência de segregação nos membros afetados de uma família.</p> <p>Advertência: A presença de fenocópias para fenótipos comuns (isto é, câncer, epilepsia) pode imitar a ausência de segregação entre os indivíduos afetados. Além disso, as famílias podem ter mais de uma variante patogênica contribuindo para uma doença autossômica dominante, confundindo ainda mais uma aparente falta de segregação.</p>
Apoio (<i>Supporting</i>)	<p>BP1 Variante <i>missense</i> em um gene no qual se sabe que mutações truncadoras causam doença.</p> <p>BP2 Variante identificada em <i>trans</i> com uma variante patogênica para um gene/doença dominante totalmente penetrante ou observada em <i>cis</i> com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança.</p> <p>BP3 Deleções/inserções <i>in-frame</i> em uma região repetitiva sem uma função conhecida.</p> <p>BP4 Múltiplas linhas de evidência computacional sugerem que não há impacto no gene ou no produto do gene (conservação, evolução, impacto na união, etc.).</p> <p>Advertência: Como muitos algoritmos <i>in silico</i> usam dados muito semelhantes ou os mesmos para suas previsões, cada algoritmo não pode ser contado como um critério independente. O BP4 pode ser usado apenas uma vez em qualquer avaliação de uma variante.</p> <p>BP5 Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença.</p> <p>BP6 Fonte respeitável relatou recentemente variante como benigna, mas a evidência não está disponível para o laboratório para realizar uma avaliação independente</p> <p>BP7 Variante sinônima (silenciosa) para a qual os algoritmos de previsão de <i>splicing</i> não preveem impacto na sequência consenso de <i>splicing</i> nem na criação de um novo local de <i>splicing</i> E o nucleotídeo não é altamente conservado.</p>

BA: benigna autônoma; BS: benigna forte; BP: benigna de apoio.

Tabela 12 - Regras para combinar critérios para classificação das variantes

Patogênica	(i) 1 Muito forte (PVS1) E (a) ≥ 1 Forte (PS1 – PS4) OU (b) ≥ 2 Moderado (PM1 – PM6) OU (c) 1 Moderado (PM1 – PM6) e 1 Apoio (PP1 – PP5) OU (d) ≥ 2 Suporte (PP1 – PP5) (ii) ≥ 2 Forte (PS1 – PS4) OU (iii) 1 forte (PS1 – PS4) E (a) ≥ 3 Moderado (PM1 – PM6) OU (b) 2 Moderado (PM1 – PM6) E ≥ 2 Apoio (PP1 – PP5) OU (c) 1 Moderado (PM1 – PM6) E ≥ 4 Apoio (PP1 – PP5)
Provável patogênica	(i) 1 Muito forte (PVS1) E 1 moderado (PM1–PM6) OU (ii) 1 Forte (PS1 – PS4) E 1-2 Moderado (PM1 – PM6) OU (iii) 1 Forte (PS1 – PS4) E ≥ 2 Apoio (PP1 – PP5) OU (iv) ≥ 3 Moderado (PM1 – PM6) OU (v) 2 Moderado (PM1 – PM6) E ≥ 2 Apoio (PP1 – PP5) OU (vi) 1 Moderado (PM1 – PM6) E ≥ 4 Apoio (PP1 – PP5)
Benigna	(i) 1 Autônomo (BA1) OU (ii) ≥ 2 Forte (BS1 – BS4)
Provável benigna	(i) 1 Forte (BS1 – BS4) e 1 Apoio (BP1 – BP7) OU (ii) ≥ 2 Suporte (BP1 – BP7)
Significado incerto	(i) Outros critérios mostrados acima não são atendidos OU (ii) os critérios para benigno e patogênico são contraditórios

PVS: patogênico muito forte; PS: patogênico forte; PM: patogênica moderada; PP: patogênica de apoio; BA: benigna autônoma; BS: benigna forte; BP: benigna de apoio.

Anexo C -

Tabela 13 - Variantes raras potencialmente patogênicas encontradas nos 59 pacientes estudados.

ID	Gene	Troca de nucleotídeo e AA	gnomAD	ABraOM	SIFT	Poly Phen2	Mutation Assessor	PROVEAN	CADD	GERP	Classificação ACMG
1	<i>IGSF10</i>	c.C4187T p.Ser1396Phe	0,0002333	0,002463	D	B	L	D	23,6	4,47	VUSp
2, 3	<i>IGSF10</i>	c.G5983A p.Val1995Ile	0,0007723	0,003284	T	D	L	N	33	5,45	VUSp
4	<i>IGSF10</i>	c.G7180A p.Gly2394Ser	0,000138	0,000821	D	D	M	D	29,1	5,59	VUSp
5	<i>GHSR</i>	c.G251T p.Ser84Ile	0	0	D	D	H	D	32	5,45	VUSp
6, 7	<i>GHSR</i>	c.T545C p.Val182Ala	0	0,000821	D	D	M	D	27,4	5,59	VUSp
8	<i>GHSR</i>	c.G1072A p.Ala358Thr	0,0006015	0,001642	T	B	L	N	21,4	5,78	VUSp
9	<i>CHD7</i>	c.C2830T p.Arg944Cys	0,00002824	0	D	D	M	D	34	5,53	VUSp
10	<i>CHD7</i>	c.G3299A p.Arg1100His	0,00005704	0,000821	D	D	N	D	34	5,73	VUSp
11	<i>CHD7</i>	c.G8362T p.Asp2788Tyr	0	0	D	P	L	D	31	5,33	VUSp
4	<i>SPRY4</i>	c.C722A p.Ser241Tyr	0,00453	0,006568	D	D	M	D	27,3	5,45	VUSp
12	<i>SPRY4</i>	c.G910A p.Val304Ile	0,00419329	0,0017	D	B	L	N	25,9	5,05	VUSp

ID: identificação do paciente; AA: aminoácido; gnomAD: Genome aggregation database; ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; SIFT: *Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein*; PolyPhen-2: *Polymorphism Phenotyping v2*; PROVEAN: Protein Variation Effect Analyzer; CADD: *Combined Annotation Dependent Depletion*; GERP: *Genomic evolutionary rate profiling*; ACMG: *American College of Medical Genetics*; D: Deletéria; T: tolerada; P: Provavelmente patogênica; B: benigna; H: alto impacto funcional; M: moderado impacto funcional; L: baixo impacto funcional; N: impacto funcional neutro; VUSp: variante de significado incerto com impacto potencial à proteína.

Tabela 13 - Variantes raras potencialmente patogênicas encontradas nos 59 pacientes estudados (Continuação)

ID	Gene	Troca de nucleotídeo e AA	gnomAD	ABraOM	SIFT	Poly Phen2	Mutation Assessor	PROVEAN	CADD	GERP	Classificação ACMG
13	WDR11	c.G2267A p.Arg756His	0,00007073	0	D	D	L	D	34	5,61	VUSp
14	WDR11	c.G2962A p.Glu988Lys	0,001774	0	D	D	M	N	34	5,86	VUSp
15	IL17RD	c.C878T p.Pro293Leu	0,0005626	0,000821	T	D	L	D	26,9	5,48	VUSp
2	SEMA3A	c.C2197T p.Arg733Cys	0,00006015	0,001642	T	P	L	D	33	6,08	VUSp
5	POLR3A	c.G3280A p.Asp1094Asn	0,000798722	0	T	P	L	D	23	4,8	VUSp
9	IGFALS	c.G944A p.Arg315His	0,00002364	0,000821	D	D	L	D	25,5	4,28	VUSp
16	IGFALS	c.C1702T p.Arg568Cys	0,000005718	0	D	B	M	D	25,3	3,37	VUSp
17	IGFALS	c.G1822A p.Asp608Asn	0,0007611	0,001647	D	D	M	N	26,9	4,15	VUSp
18	PNPLA6	c.G2633A p.Gly878Asp	0	0	D	D	M	D	28,8	4,89	VUSp
19	PROKR2	c.C253G p.Arg85Gly	0,00199681	0,000822	D	D	M	D	27,6	4,76	VUSp

ID: identificação do paciente; AA: aminoácido; gnomAD: Genome aggregation database; ABraOM: Arquivo Brasileiro Online de Mutações; SIFT: *Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein*; PolyPhen-2: *Polymorphism Phenotyping v2*; PROVEAN: Protein Variation Effect Analyzer; CADD: *Combined Annotation Dependent Depletion*; GERP: *Genomic evolutionary rate profiling*; ACMG: *American College of Medical Genetics*; D: Deletéria; T: tolerada; P: Provavelmente patogênica; B: benigna; H: alto impacto funcional; M: moderado impacto funcional; L: baixo impacto funcional; N: impacto funcional neutro; VUSp: variante de significado incerto com impacto potencial à proteína.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Abreu AP, Kaiser UB. Pubertal development and regulation. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(3):254-64.
2. Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(3):265-74.
3. Dunkel L, Quinton R. Transition in endocrinology: induction of puberty. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(6):R229-39.
4. Leka-Emiri S, Chrousos GP, Kanaka-Gantenbein C. The mystery of puberty initiation: genetics and epigenetics of idiopathic central precocious puberty (ICPP). *J Endocrinol Invest.* 2017;40(8):789-802.
5. Kuiri-Hänninen T, Sankilampi U, Dunkel L. Activation of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in infancy: minipuberty. *Horm Res Paediatr.* 2014;82(2):73-80.
6. Dwyer AA, Phan-Hug F, Hauschild M, Elowe-Gruau E, Pitteloud N. TRANSITION IN ENDOCRINOLOGY: Hypogonadism in adolescence. *Eur J Endocrinol.* 2015;173(1):R15-24.
7. Macedo DB, Cukier P, Mendonca BB, Latronico AC, Brito VN. [Advances in the etiology, diagnosis and treatment of central precocious puberty]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014;58(2):108-17.
8. Ojeda SR, Lomniczi A. Puberty in 2013: Unravelling the mystery of puberty. *Nat Rev Endocrinol.* 2014;10(2):67-9.

9. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med*. 2013;368(26):2467-75.
10. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2364-8.
11. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13-23.
12. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291-303.
13. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev*. 2003;24(5):668-93.
14. Biro FM, Greenspan LC, Galvez MP, Pinney SM, Teitelbaum S, Windham GC, et al. Onset of breast development in a longitudinal cohort. *Pediatrics*. 2013;132(6):1019-27.
15. Herman-Giddens ME, Steffes J, Harris D, Slora E, Hussey M, Dowshen SA, et al. Secondary sexual characteristics in boys: data from the Pediatric Research in Office Settings Network. *Pediatrics*. 2012;130(5):e1058-68.
16. Howard SR, Dunkel L. The Genetic Basis of Delayed Puberty. *Neuroendocrinology*. 2017.
17. Palmert MR, Dunkel L. Clinical practice. Delayed puberty. *N Engl J Med*. 2012;366(5):443-53.

18. Abitbol L, Zborovski S, Palmert MR. Evaluation of delayed puberty: what diagnostic tests should be performed in the seemingly otherwise well adolescent? *Arch Dis Child*. 2016;101(8):767-71.
19. Sedlmeyer IL, Palmert MR. Delayed puberty: analysis of a large case series from an academic center. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(4):1613-20.
20. Bozzola M, Bozzola E, Montalbano C, Stamati FA, Ferrara P, Villani A. Delayed puberty versus hypogonadism: a challenge for the pediatrician. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2018;23(2):57-61.
21. Villanueva C, Argente J. Pathology or normal variant: what constitutes a delay in puberty? *Horm Res Paediatr*. 2014;82(4):213-21.
22. Zhu J, Chan YM. Adult Consequences of Self-Limited Delayed Puberty. *Pediatrics*. 2017;139(6).
23. Harrington J, Palmert MR. Clinical review: Distinguishing constitutional delay of growth and puberty from isolated hypogonadotropic hypogonadism: critical appraisal of available diagnostic tests. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):3056-67.
24. Dwyer AA, Pitteloud N. Transition of Care from Childhood to Adulthood: Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Dev*. 2018;33:82-98.
25. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(9):547-64.
26. Lima Amato LG, Latronico AC, Gontijo Silveira LF. Molecular and Genetic Aspects of Congenital Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017;46(2):283-303.

27. Sykiotis GP, Pitteloud N, Seminara SB, Kaiser UB, Crowley WF. Deciphering genetic disease in the genomic era: the model of GnRH deficiency. *Sci Transl Med*. 2010;2(32):32rv2.
28. Waldstreicher J, Seminara SB, Jameson JL, Geyer A, Nachtigall LB, Boepple PA, et al. The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996;81(12):4388-95.
29. Pitteloud N, Hayes FJ, Boepple PA, DeCruz S, Seminara SB, MacLaughlin DT, et al. 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*. 2002;87(1):152-60.
30. 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.
31. Grinspon RP, Freire AV, Rey RA. Hypogonadism in Pediatric Health: Adult Medicine Concepts Fail. *Trends Endocrinol Metab*. 2019.
32. Bhagavath B, Podolsky RH, Ozata M, Bolu E, Bick DP, Kulharya A, et al. Clinical and molecular characterization of a large sample of patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2006;85(3):706-13.
33. 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.
34. Howard SR. Genes underlying delayed puberty. *Mol Cell Endocrinol*. 2018.

35. Wehkalampi K, Widén E, Laine T, Palotie A, Dunkel L. Association of the timing of puberty with a chromosome 2 locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(12):4833-9.
36. 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.
37. Winter S, Ousidhoum A, McElreavey K, Brauner R. Constitutional delay of puberty: presentation and inheritance pattern in 48 familial cases. *BMC Pediatr.* 2016;16:37.
38. Wehkalampi K, Widén 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.
39. Howard SR, Dunkel L. Delayed Puberty - Phenotypic Diversity, Molecular Genetic Mechanisms and Recent Discoveries. *Endocr Rev.* 2019.
40. 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.
41. 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.

42. Zhu J, Choa RE, Guo MH, Plummer L, Buck C, Palmert MR, et al. A shared genetic basis for self-limited delayed puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(4):E646-54.
43. Cassatella D, Howard SR, Acierno JS, Xu C, Papadakis GE, Santoni FA, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty have distinct genetic architectures. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(4):377-88.
44. Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* 1999;402(6762):656-60.
45. Sun Y, Wang P, Zheng H, Smith RG. Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(13):4679-84.
46. Pantel J, Legendre M, Nivot S, Morisset S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, et al. Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4334-41.
47. Inoue H, Kangawa N, Kinouchi A, Sakamoto Y, Kimura C, Horikawa R, et al. Identification and functional analysis of novel human growth hormone secretagogue receptor (GHSR) gene mutations in Japanese subjects with short stature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(2):E373-8.
48. Pugliese-Pires PN, Fortin JP, Arthur T, Latronico AC, Mendonca BB, Villares SM, et al. Novel inactivating mutations in the GH secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty. *Eur J Endocrinol.* 2011;165(2):233-41.

49. Howard SR, Guasti L, Poliandri A, David A, Cabrera CP, Barnes MR, et al. Contributions of Function-Altering Variants in Genes Implicated in Pubertal Timing and Body Mass for Self-Limited Delayed Puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018;103(2):649-59.
50. Yeo GS. The role of the FTO (Fat Mass and Obesity Related) locus in regulating body size and composition. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;397(1-2):34-41.
51. Sun Y, Bak B, Schoenmakers N, van Trotsenburg AS, Oostdijk W, Voshol P, et al. Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an X-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. *Nat Genet.* 2012;44(12):1375-81.
52. Joustra SD, Wehkalampi K, Oostdijk W, Biermasz NR, Howard S, Silander TL, et al. IGSF1 variants in boys with familial delayed puberty. *Eur J Pediatr.* 2015;174(5):687-92.
53. Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, Mancini A, David A, Storr HL, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):626-42.
54. Zhu J, Kusa TO, Chan YM. Genetics of pubertal timing. *Curr Opin Pediatr.* 2018;30(4):532-40.
55. Mancini A, Howard SR, Cabrera CP, Barnes MR, David A, Wehkalampi K, et al. EAP1 regulation of GnRH promoter activity is important for human pubertal timing. *Hum Mol Genet.* 2019;28(8):1357-68.
56. Heger S, Mastronardi C, Dissen GA, Lomniczi A, Cabrera R, Roth CL, et al. Enhanced at puberty 1 (EAP1) is a new transcriptional regulator of the female neuroendocrine reproductive axis. *J Clin Invest.* 2007;117(8):2145-54.

57. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
58. Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, et al. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform.* 2014;13(Suppl 2):67-82.
59. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-60.
60. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-303.
61. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(16):e164.
62. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. Variation across 141,456 human exomes and genomes reveals the spectrum of loss-of-function intolerance across human protein-coding genes. *bioRxiv.* 2019.
63. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017;38(7):751-63.
64. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178-92.
65. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and

Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015;17(5):405-24.

66. Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(22):13534-44.

67. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.

68. Chun S, Fay JC. Identification of deleterious mutations within three human genomes. *Genome Res*. 2009;19(9):1553-61.

69. Reva B, Antipin Y, Sander C. Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(17):e118.

70. Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*. 2015;31(16):2745-7.

71. Kircher M, Witten DM, Jain P, O'Roak BJ, Cooper GM, Shendure J. A general framework for estimating the relative pathogenicity of human genetic variants. *Nat Genet*. 2014;46(3):310-5.

72. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, Green ED, Batzoglou S, Sidow A, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res*. 2005;15(7):901-13.

73. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.

74. Argente J. Challenges in the Management of Short Stature. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(1):2-10.

75. Cole TJ, Lobstein T. Extended international (IOTF) body mass index cut-offs for thinness, overweight and obesity. *Pediatr Obes.* 2012;7(4):284-94.
76. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):725-43.
77. 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.
78. Day FR, Elks CE, Murray A, Ong KK, Perry JR. Puberty timing associated with diabetes, cardiovascular disease and also diverse health outcomes in men and women: the UK Biobank study. *Sci Rep.* 2015;5:11208.
79. Soliman AT, De Sanctis V. An approach to constitutional delay of growth and puberty. *Indian J Endocrinol Metab.* 2012;16(5):698-705.
80. Silveira LF, Latronico AC. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):1781-8.
81. Howard SR, Oleari R, Poliandri A, Chantzara V, Fantin A, Ruiz-Babot G, et al. HS6ST1 insufficiency causes self-limited delayed puberty in contrast with other GnRH deficiency genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018.
82. Balasubramanian R, Choi JH, Francescatto L, Willer J, Horton ER, Asimacopoulos EP, et al. Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated GnRH deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(50):17953-8.
83. Hsu P, Ma A, Wilson M, Williams G, Curotta J, Munns CF, et al. CHARGE syndrome: a review. *J Paediatr Child Health.* 2014;50(7):504-11.

84. Bergman JE, de Ronde W, Jongmans MC, Wolffenbuttel BH, Drop SL, Hermus A, et al. The results of CHD7 analysis in clinically well-characterized patients with Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(5):E858-62.
85. 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. *Am J Hum Genet.* 2008;83(4):511-9.
86. Leeksa OC, Van Achterberg TA, Tsumura Y, Toshima J, Eldering E, Kroes WG, et al. Human sprouty 4, a new ras antagonist on 5q31, interacts with the dual specificity kinase TESK1. *Eur J Biochem.* 2002;269(10):2546-56.
87. Valdes-Socin H, Rubio Almanza M, Tomé Fernández-Ladreda M, Debray FG, Bours V, Beckers A. Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014;5:109.
88. 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. *Am J Hum Genet.* 2010;87(4):465-79.
89. Yang RB, Ng CK, Wasserman SM, Kömüves LG, Gerritsen ME, Topper JN. A novel interleukin-17 receptor-like protein identified in human umbilical vein endothelial cells antagonizes basic fibroblast growth factor-induced signaling. *J Biol Chem.* 2003;278(35):33232-8.
90. Cariboni A, Davidson K, Rakic S, Maggi R, Parnavelas JG, Ruhrberg C. Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking

SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Mol Genet.* 2011;20(2):336-44.

91. Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, Parkash J, Espy C, Fouveaut C, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002896.

92. Käsäkoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, Vaaralahti K, Hackman P, Pitteloud N, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res.* 2014;75(5):641-4.