FERNANDA DE AZEVEDO CORREA

**Análise molecular dos genes
NEUROD4, *FGFR1* e *PROKR2* em
pacientes com hipopituitarismo congênito**

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. Berenice Bilharinho de
Mendonça

Coorientadora: Dra. Luciani Renata Silveira de
Carvalho

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Correa, Fernanda de Azevedo

Análise molecular dos genes *NEUROD4*, *FGFR1* e *PROKR2* / Fernanda de Azevedo Correa. -- São Paulo, 2015.

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

Orientadora: Berenice Bilharinho de Mendonça.

Coorientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.

Descritores: 1.Hipopituitarismo 2.Hormônio do crescimento/deficiência
3.Hormônio do crescimento/genética 4.Receptores de fatores de crescimento de
fibroblastos 5.PROKR2 6.NEUDOD4 7.Estudos de associação genética

USP/FM/DBD-097/15

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM 42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade da São Paulo, com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-PQ 305743/2011-2) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2013/03236-5).

Dedicatória

Esta tese é dedicada ao meu pai Antônio de Azevedo Corrêa (*in memoriam*), pesquisador do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Meu pai sempre foi meu grande incentivador, vivenciou e ensinou-me, entre outras virtudes, a lealdade e a gratidão.

Agradecimientos

Durante o período de execução desta tese de doutorado reencontrei grande parte da equipe que participou da minha formação na especialidade de Endocrinologia e Metabologia durante a residência médica no HC-FMUSP. Professores, médicos, técnicos, funcionários e colegas dedicados, solícitos e companheiros. Não é possível citar um a um, nem descrever como cada um atuou na minha formação científica, pois todos da disciplina de Endocrinologia e do Laboratório de Investigação Médica LIM/42 atuam em conjunto para apoiar os estudantes de pós-graduação, mas na pessoa de cada um abaixo citado todos estão representados.

Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, minha orientadora e professora titular da endocrinologia, aceitou-me incondicionalmente desde o primeiro contato, sempre esteve ao meu lado, é o meu exemplo de médica e pesquisadora, obrigado sempre!

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Luciani Carvalho, exemplo de persistência e entusiasmo científicos. Ao Dr. Ivo Arnhold, médico e pesquisador na área de hipopituitarismo, o meu agradecimento por todos esses anos de ensinamentos médicos, científicos e éticos. Ao Prof. Dr. Alexander Jorge, amigo que vi tornar-se professor ao longo do meu trabalho, dedicado e entusiasmado e sempre com tempo para dividir seus vastos conhecimentos científicos, obrigado pela generosidade. À Profa. Dra. Ana Cláudia Latrônico por suas preciosas sugestões e incentivo!

Agradeço às principais colaboradoras deste trabalho, Dra. Éricka Trarbach e Dra. Cintia Tusset, pesquisadoras na área de biologia molecular e parte fundamental no sucesso desta tese, pelas horas de trabalho, ensinamentos e discussão dos resultados obtidos. Atitude repetida por todos os outros biólogos e pesquisadores do LIM 42.

Agradeço aos funcionários administrativos e técnicos que me guiaram desde os primeiros passos, aqui representados pelas queridas Nilda, Maria Aparecida e Christina.

Agradeço aos meus colegas de doutorado, foram muitos neste período, com todos tive experiências e aprendizados maravilhosos e com alguns uma amizade que sei, perdurará...

Aos pacientes por sua generosidade em participar desta pesquisa esperando contribuir para melhorias no diagnóstico e tratamento não de si próprios, mas de outros pacientes no futuro.

Por fim, agradeço a minha família: meu pai, Antônio de Azevedo Corrêa (*in memoriam*), minha mãe, Cleusa Maria Alho de Azevedo Corrêa, meu marido, André Lasmar e meus dois filhos Bruno e Antônio. Aos meus pais e meu marido pelo amor e incrível apoio emocional, espiritual e até logístico, e aos meus filhos pela motivação para ir em frente.

“A essência dos Direitos Humanos é o direito a ter direitos.”

Hannah Arendt

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. 3^a ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	9
3 PACIENTES E MÉTODOS	11
3.1 Considerações éticas	12
3.2 Casuística	12
3.3 Análise molecular	15
3.4 Estudos funcionais do <i>FGFR1</i>	19
4 RESULTADOS	21
4.1 Análise do <i>NEUROD4</i> em pacientes com DIGH	22
4.2 Análise do <i>FGFR1</i> e <i>PROKR2</i> em pacientes com DHHM	22
4.3 Descrição fenotípica	26
4.4 Estudos funcionais das variantes identificadas no <i>FGFR1</i>	33
4.5 Estudos funcionais das variantes identificadas no <i>PROKR2</i>	36
5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	43
7 REFERÊNCIAS	45
APÊNDICE “ <i>FGFR1</i> and <i>PROKR2</i> rare variants found in patients with combined pituitary hormone deficiencies”	

Listas

Abreviaturas e Siglas

	Aminoácidos
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
Cys	Cisteína
Fen	Fenilalanina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
Ile	Isoleucina
Leu	Leucina
Lis	Lisina
Met	Metionina
Pro	Prolina
Ser	Serina
Tir	Tirosina
Tre	Treonina
Trp	Triptofano
ACTH	Hormônio corticotrófico
BMP	Bone morphogenetic protein
BTK	<i>Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase</i>
Ca	Cálcio
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
CHUV	Centre Hospitalier Universitaire Vaudois
DHHM	Deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla
DIGH	Deficiência isolada do hormônio de crescimento
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSO	Displasia septo óptica
ESP6500	Projeto de sequenciamento exômico
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR1	Receptor do fator de crescimento de fibroblastos tipo 1
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
GH1	Gene que codifica o hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador de hormônio do crescimento
GHRHR	Receptor do hormônio liberador de hormônio do crescimento
GHSR	<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>
GLI2	<i>GLI-Kruppel family member 2</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HESX1	<i>HESX homeobox 1</i>
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado

HPE	Holoprosencefalia
Ig	Imunoglobulina
IGF-1	Fator de crescimento insulino-símile tipo 1
IGFBP-3	Proteína ligadora de IGFs tipo 3
KDa	Kilodaltons
LH	Hormônio luteinizante
LHX3	<i>LIM homeobox 3</i>
LHX4	<i>LIM homeobox 4</i>
MAF	<i>Minor Allele frequency</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MATH3	<i>Protein MATH-3</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NEUROD4	Fator de diferenciação neuronal tipo 4
OTX2	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pit1	<i>POU domain, class1, transcription factor</i>
POU1F1	<i>POU class 1 homeobox 1</i>
PRL	Prolactina
PROK2	Procinetina 2
PROKR2	Receptor da procinetina tipo 2
PROP1	Profeta do POU1F1
RM	Ressonância magnética
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa, seguida de PCR
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SIHH	Síndrome da interrupção da haste hipofisária
SK	Síndrome de Kallmann
SNC	Sistema nervoso central
SOX2	<i>Sex determining region Y – box 2</i>
SOX3	<i>Sex determining region Y – box 3</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TRH	Hormônio Liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio tireotrófico
WNT	Sítio de integração MMTV do tipo <i>wingless</i>

Figuras

Figura 1 –	Organogênese da hipófise de camundongo mostrando a atuação têmporo-espaial de moléculas de sinalização e fatores de transcrição.....	3
Figura 2 –	Análise <i>in situ</i> nos 17.5 dias de vida embrionária de hipófises de camundongos <i>Neurod4</i> ^{-/-} em comparação ao selvagem.....	5
Figura 3 –	RT-PCR quantitativo do <i>Pit (Pou1f1)1</i> , <i>Prl</i> , <i>TSHβ</i> , <i>GHRHR</i> E <i>GH</i> no dia embrionário E17.5 de hipófises de camundongos.....	6
Figura 4 –	Fenótipo e modo de herança de acordo com a etiologia genética do hipopituitarismo congênito	8
Figura 5 –	Eletroferogramas das variantes encontradas no <i>FGFR1</i> nas sequencias com <i>primers</i> vistas no <i>foward</i>	22
Figura 6 –	Eletroferogramas das variantes encontradas na <i>PROKR2</i> (gráficos superiores) em comparação com eletroferograma de indivíduo controle (gráficos inferiores)	23
Figura 7 –	RM de hipófise e heredograma da paciente I com a variante p.Ser107Leu do <i>FGFR1</i>	26
Figura 8 –	RM de hipófise e heredograma da paciente II com a variante p.Arg448Trp do <i>FGFR1</i>	27
Figura 9 –	RM de hipófise e heredograma do paciente III com a variante p.Pro772Ser do <i>FGFR1</i>	28
Figura 10 –	RM de hipófise e heredograma do paciente IV com a variante p.Pro772Ser do <i>FGFR1</i>	29
Figura 11 –	RM de hipófise e heredograma da paciente V com a variante p.Arg85Cys da <i>PROKR2</i>	30
Figura 12 –	RM de hipófise e heredograma da paciente VI com a variante p.Arg248Glu da <i>PROKR2</i>	31
Figura 13 –	Análise funcional das variantes do <i>FGFR1</i> . A-C Atividade de sinalização dos receptores selvagem e alterados do <i>FGFR1</i> em mioblastos L6.....	34
Figura 14 –	A , Análise por Western blot de células CHO transitoriamente transfectadas com vetor vazio (EV), <i>FGFR1</i> selvagem (WT) ou construtos p.Arg448Trp	35

Tabelas

Tabela 1 –	Características clínicas e radiológicas dos pacientes com DIGH (n=51).....	13
Tabela 2 –	Características Clínicas e Radiológicas dos pacientes com DHHM (n=156)	14
Tabela 3 –	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do <i>NEUROD4</i>	16
Tabela 4 –	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do <i>FGFR1</i>	17
Tabela 5 –	Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da <i>PROKR2</i>	18
Tabela 6 –	Genótipo, frequência e predição funcional <i>in silico</i> das variantes identificadas em 6 pacientes com DHHM.....	24
Tabela 7 –	Frequência do alelo menor (MAF) das variantes encontradas no FGFR1 e PROKR2 nos bancos de dados populacionais 1000GENOMES e ESP6500	25
Tabela 8 –	Fenótipo dos pacientes com variantes no <i>FGFR1</i> e <i>PROKR2</i>	32
Tabela 9 –	Características das variantes <i>missense</i> do <i>FGFR1</i> encontradas em pacientes com DHHM.....	42

Resumo

Correa, FA. Análise molecular dos genes *NEUROD4*, *FGFR1* e *PROKR2* em pacientes com hipopituitarismo congênito [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O hipopituitarismo congênito está associado à importante morbimortalidade. Muitos genes tem sido implicados na etiologia da deficiência isolada do hormônio do crescimento (DIGH) e na deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM). No entanto a maioria dos casos permanece sem diagnóstico etiológico, sugerindo que outros fatores genéticos estejam envolvidos. **OBJETIVOS:** Pesquisar a presença de mutações inativadoras nos genes *NEUROD4*, *FGFR1* e *PROKR2* em uma grande coorte de pacientes com hipopituitarismo congênito. **MÉTODOS:** Foram selecionados 51 pacientes com DIGH para pesquisa de mutações no *NEUROD4* e 156 pacientes com deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM) para pesquisa de mutações no *FGFR1* e *PROKR2*. O estudo molecular foi realizado pelo método de Sanger e a função das novas variantes identificadas foi avaliada *in vitro*. **RESULTADOS:** Não foram identificadas mutações inativadoras no *NEUROD4* nos 51 pacientes estudados com DIGH. Nos pacientes com DHHM foram identificadas três variantes no *FGFR1* – p.Ser107Leu, p.Arg448Trp e p.Pro772Ser – em quatro pacientes não relacionados (dois masculinos) e duas variantes na *PROKR2* – p.Arg85Cys e p.Arg248Glu – em duas pacientes femininas não relacionadas. Na genealogia de 5 dos 6 pacientes com as variantes no *FGFR1* e *PROKR2* ao menos um familiar carreador não afetado foi identificado. O estudo funcional das variantes do *FGFR1* evidenciou redução da transcrição em relação ao receptor selvagem em apenas uma das variantes identificadas: a p.Arg448Trp. Estudos previamente realizados nas variantes da *PROKR2* demonstraram o comprometimento da mobilização do cálcio intracelular nas duas variantes e redução da transcrição com a p.Arg85Cys. **CONCLUSÕES:** As variantes alélicas com efeito deletério na proteína identificadas no *FGFR1* e na *PROKR2* em pacientes com DHHM podem ter um papel adjuvante na determinação do hipopituitarismo congênito. Outros fatores genéticos e/ou ambientais devem contribuir para a etiologia deste fenótipo.

Descritores: 1.Hipopituitarismo 2.Hormônio do crescimento/deficiência 3.Hormônio do crescimento/genética 4.Receptores de Fatores de Crescimento de Fibroblastos 5.PROKR2 6.NEUROD4 7.Estudos de Associação Genética

Abstract

Correa, FA. Molecular analysis of *NEUROD4*, *FGFR1* and *PROKR2* genes in patients with hypopituitarism [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

INTRODUCTION: Congenital hypopituitarism leads to considerable morbidity and premature mortality. Many genes have been involved in the aetiology of isolated growth hormone deficiency (IGHD) and combined pituitary hormones deficiencies (CPHD), but the majority of cases remain idiopathic, suggesting that other, yet unidentified, genetic factors are involved. **AIM:** To screen loss-of-function mutations in *NEUROD4*, *FGFR1* e *PROKR2* in a large cohort of patients with congenital hypopituitarism. **METHODS:** Loss-of-function mutations in *NEUROD4* were screened in 51 patients with IGHD and loss-of-function mutation in *FGFR1* and *PROKR2* were screened in 156 patients with CPHD. The screening was performed by Sanger sequencing. The new variants identified were tested with functional studies. **RESULTS:** Loss-of-function mutations were not identified in *NEUROD4*. We identified three *FGFR1* variants – p.Ser107Leu, p.Arg448Trp and p.Pro772Ser – in four unrelated patients (two males) and two *PROKR2* variants – p.Arg85Cys and p.Arg248Glu in two unrelated female patients from a cohort of 156 Brazilian patients with CPHD. Five out of six patients harbouring these rare variants had a first degree relative that was an unaffected carrier. *FGFR1* functional studies performed in p.Arg448Trp variant showed decreased transcription relative to the wild type. Previous functional studies in *PROKR2* variants showed that p.Arg85Cys moderately compromises intracellular Ca²⁺ increase and transcription and p.Arg248Glu has normal transcription activity but decreased calcium mobilization. **CONCLUSIONS:** It is possible that the loss-of-function variants identified in *FGFR1* and *PROKR2* act as adjuvant to the phenotypic features found in these patients. Other genetic and/or environmental modifiers may also play a role in the aetiology of congenital hypopituitarism.

Descriptors: 1.Hypopituitarism 2.Growth hormone/deficiency 3.Growth hormone/genetics 4.Receptors, Fibroblast Growth Factor 5.PROKR2 6.NEUROD4 7.Genetic Association Studies

1 Introdução

INTRODUÇÃO

A deficiência congênita da secreção dos hormônios hipofisários pode se apresentar de forma isolada, como por exemplo, na deficiência isolada do hormônio de crescimento (DIGH) e no hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI), ou de forma combinada, quando há presença de duas ou mais deficiências hormonais (deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla - DHHM) ⁽¹⁾. O hipopituitarismo congênito está associado à elevada morbidade e aumento da mortalidade ⁽²⁾. O quadro clínico é determinado pelo tipo de deficiência hormonal com destaque para a baixa estatura observada na deficiência de GH, e pelos sintomas de hipogonadismo, hipotireoidismo e insuficiência suprarrenal determinados pela falta dos hormônios LH/FSH, TSH e ACTH respectivamente. Frequentemente este quadro está associado a alterações estruturais do SNC e da região hipotálamo-hipofisária que ocorrem durante a embriogênese do sistema nervoso central ⁽³⁾.

A hipófise tem origem ectodérmica e se origina de duas linhagens: uma da evaginação do teto ectodérmico do estomodeu – **o divertículo hipofisário**, e a outra da invaginação do neuroectoderma do diencéfalo – **o divertículo neuro-hipofisário** ⁽⁴⁾. Pesquisas em vertebrados revelam que o divertículo hipofisário origina-se de uma região denominada placa adeno-hipofisária que compartilha com a placa olfatória uma região precursora chamada *preplacodal region* ^(5, 6). Esta região especial do ectoderma é precursora de todas as placas cranianas e pode ser identificada por um conjunto único de genes tais como fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e *wingless-type* (Wnts). A formação da hipófise requer, para o seu correto desenvolvimento, uma atuação têmporo-espacial coordenada de fatores de transcrição e moléculas de sinalização tanto na bolsa de Rathke, quanto nos tecidos adjacentes ⁽⁷⁾ (Figura 1).

Figura 1 – Organogênese da hipófise de camundongo mostrando a atuação têmporo-espaçial de moléculas de sinalização e fatores de transcrição. Modificado de Zhu, Gleiberman e Rosenfeld 2007 ⁽⁷⁾

As causas genéticas do hipopituitarismo congênito foram identificadas em uma pequena parte dos pacientes afetados, em alguns casos envolvendo genes diretamente relacionados ao eixo GHRH-GH, e em outros, envolvendo genes de fatores de transcrição e moléculas de sinalização importantes durante o período da embriogênese hipotálamo-hipofisária. Na abordagem do tipo gene candidato é importante o conhecimento prévio dessas vias biológicas. Até o momento a maioria dos pacientes com DIGH ou DHHM não tem o diagnóstico molecular estabelecido ^(8, 9).

Deficiência Isolada do Hormônio do Crescimento – (DIGH): a deficiência isolada do hormônio do crescimento é a deficiência hipofisária mais comum, com uma incidência relatada de 1 a cada 4000-10000 nascidos vivos, e pode ter origem congênita ou adquirida ⁽¹⁰⁾.

Os fatores congênitos implicados na etiologia da DIGH incluem os defeitos genéticos que afetam os genes codificadores do hormônio do crescimento (GH1) ou

do receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRHR). Embora teoricamente possível, até o momento não foram relatadas mutações no GHRH^(10, 11). Raramente a DIGH pode resultar de mutações nos genes *HESX1*, *GHRH*, *OTX2*, *GLI2*, *SOX3* e *BTK* (os dois últimos de herança ligada ao X) alguns dos quais também implicados nos casos de DHHM^(10, 12, 13). Mutações nos genes que codificam proteínas responsáveis pela diferenciação hipofisária foram avaliadas em várias coortes e identificadas em aproximadamente 11% dos pacientes^(9, 10). A baixa frequência de defeitos genéticos identificados nos pacientes com hipopituitarismo congênito pode ser justificada por fenômenos epigenéticos ou por mutações ainda não identificados em outros genes.

Estudos em animais têm identificado novos fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento hipofisário que poderiam estar envolvidos na etiologia tanto da DIGH quanto na DHHM. O gene *Neuronal differentiation 4 (NEUROD4)*, anteriormente denominado *MATH3*, apresenta algumas características abaixo apresentadas que o indicam como possível candidato a causar deficiência isolada de GH.

A análise de hibridização *in situ* realizada em camundongos nocaute para o gene *Neurod4* (*Neurod4* -/-) revelou que sua expressão na hipófise anterior começa no dia embrionário 13.5 e persiste até a idade adulta com um padrão de expressão têmporo-espacial que é remanescente ao do *Pou1f1*. Além disso, a comparação *in silico* das regiões promotoras do *Neurod4* de camundongos e humanos pelo programa VISTA identificou um sítio de ligação para o *Pou1f1* dentro de uma região altamente conservada do *Neurod4*. Estes achados sugerem que o *Neurod4* é um alvo direto do *Pou1f1*. Camundongos transgênicos *Neurod4* -/- apresentam nanismo pós-natal, hipoplasia da hipófise anterior e no dia embrionário 17.5 diminuição acentuada da expressão de *GH* e *GHRHR*⁽¹⁴⁾ (Figura 2).

Figura 2 - Análise *in situ* nos 17.5 dias de vida embrionária de hipófises de camundongos *Neurod4*^{-/-} em comparação ao selvagem revela que os marcadores de somatotrofos: *GH* e *GHRHR* estão diminuídos no mutante. A expressão do *GHRHR* permanece indetectável no período pós-natal (P8) nos mutantes. Adaptado de Zhu X, 2006 ⁽¹⁴⁾

Em contraste, os animais mutantes não apresentam comprometimento das outras linhagem de células da hipófise em análises por RT-PCR quantitativo, mantendo quantidades adequadas de mRNA do *Pou1f1*, prolactina (*Prl*) e hormônio estimulador da tireoide subunidade beta (*TSH-β*) (Figura 3). Deste modo, o *Neurod4* parece apresentar papel fundamental e específico na maturação e função dos somatotrofos ⁽¹⁴⁾.

Figura 3 – RT-PCR quantitativo do *Pit (Pou1f1)*, *Prl*, *TSHβ*, *GHRHR* e *GH* no dia embrionário E17.5 de hipófises de camundongos mostra significativa e específica redução do mRNA do GH e GHRHR

Deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM): em pacientes com DHHM de origem congênita foram descritas mutações inativadoras em genes codificadores de vários fatores de transcrição tais como *PROP1*, *POU1F1*, *GLI2*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX2*, *SOX3* e *OTX2* (Figura 4). No entanto, mesmo com vários genes afetados descritos, a maioria dos pacientes permanece sem diagnóstico genético determinado ^(15, 16). A presença de uma origem embriológica comum e de fenótipos semelhantes em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) e DHHM, tais como a presença de fenda palatina, palato ogival e agenesia dentária, levantou a suspeita do envolvimento de genes classicamente implicados no hipogonadismo na etiologia genética da DHHM ^(5, 17).

Os genes *Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)* e *Prokineticin receptor 2 (PROKR2)* estão sabidamente envolvidos na morfogênese dos bulbos olfatórios e na migração dos neurônios de GnRH. Mutações inativadoras nestes genes são causa de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado com e sem alteração olfatória ⁽¹⁸⁻²²⁾.

Gene *FGFR1*: em camundongos, membros da família de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) atuam em múltiplas etapas da embriogênese através de seus receptores do tipo tirosina-quinase. O uso de técnicas de imunohistoquímica e hibridização *in situ* identificou o padrão de expressão temporal dos membros desta família na região hipofisária e tecidos adjacentes. Verificou-se o seu surgimento na *preplacodal region* e posteriormente sua localização no diencéfalo ventral de onde estimulam a proliferação celular na bolsa de Rathke⁽²³⁾. Parte de sua ação se dá pela indução da expressão dos genes *Lhx3* e *Lhx4* na bolsa de Rathke⁽¹⁵⁾.

O *FGFR1* está localizado no cromossomo 8p12, possui 18 exons, e codifica uma glicoproteína de aproximadamente 130 kDa denominada FGFR1 que constitui um dos 4 receptores para os vários FGFs. O receptor, do tipo tirosina-quinase, consiste de 3 alças extracelulares Ig-like, um domínio transmembrana, um domínio *acidic box* e 2 domínios intracelulares tirosina-quinase⁽²⁴⁻²⁶⁾.

Gene *PROKR2*: este gene, localizado no cromossomo 20p13, contém 2 exons e codifica um dos receptores acoplados a proteína G das procinetinas, a PROKR2 de 384 aminoácidos⁽²⁷⁾. As procinetinas são proteínas bioativas envolvidas em diversos processos biológicos tais como a morfogênese dos bulbos olfatórios e do sistema reprodutivo, bem como angiogênese e migração neuronal^(28, 29). Este receptor está presente preferencialmente no sistema nervoso central. Camundongos transgênicos nocaute (*Prokr2* -/-) apresentam fenótipo semelhante ao de pacientes com HHI com hipoplasia dos bulbos olfatórios e atrofia do sistema reprodutivo⁽²⁸⁾.

Considerando o grande número de pacientes com hipopituitarismo sem diagnóstico genético definido e com base no conhecimento da embriologia hipofisária e dos modelos animais transgênicos, escolhermos o *NEUROD4* como gene candidato para o estudo dos pacientes com DIGH e os genes *FGFR1* e *PROKR2* como genes candidatos para o estudo dos pacientes com DHHM.

Figura 4 – Fenótipo e modo de herança de acordo com a etiologia genética do hipopituitarismo congênito

NH-neuro-hipófise, AH-aden-hipófise, DH-deficiências hormonais, MH-modo de herança, MF-malformações, NL-normal, DIGH-deficiência isolada de GH, DHHM-deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla, AD-autossômico dominante, AR-autossômico recessivo, HPE-holoprosencefalia, DLM-defeito de linha média, DSO-displasia septo-ótica.

2 Objetivos

OBJETIVOS

Pesquisar a presença de mutações inativadoras no *NEUROD4* em pacientes com deficiência isolada do hormônio de crescimento de origem congênita.

Pesquisar a presença de mutações inativadoras nos genes *FGFR1* e *PROK2R* em pacientes com deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla de origem congênita.

3 Pacientes e Métodos

PACIENTES e MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi conduzido de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012 ⁽³⁰⁾. O protocolo de estudo (0082/11) foi aprovado junto a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes da pesquisa.

3.2 CASUÍSTICA

Foram selecionados pacientes com hipopituitarismo de origem congênita, sem diagnóstico molecular definido, matriculados no serviço de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). O diagnóstico das deficiências hormonais foi baseado na falência em apresentar resposta normal aos testes provocativos: Teste da Clonidina (clonidina 0,1 mg/m² de superfície corporal VO), Teste de Tolerância à Insulina (insulina 0,05-0,1 U/Kg EV) e Teste Combinado (insulina 0,05-0,1 U/kg, TRH 200 µg e GnRH 100 µg, EV) e/ou valores basais baixos de IGF-1, IGFBP3, T4 livre, e cortisol. A altura dos pacientes foi medida com um estadiômetro, e o desvio padrão de altura foi calculado usando referências britânicas ⁽³¹⁾. Os exames de ressonância magnética (RM) foram realizados no aparelho Sigma; GE, Milwaukee, WI, 1,5 Tesla, utilizando varreduras ponderadas em T1 e T2, em cortes sagitais e coronais. O grupo controle para análise das variantes alélicas identificadas nos pacientes foi constituído de 400 brasileiros saudáveis.

Os pacientes estudados foram divididos em dois grupos:

DIGH – constituído por 51 pacientes portadores de deficiência isolada do hormônio do crescimento nos quais foi realizada a pesquisa de mutações no *NEUROD4* (Tabela 1).

DHHM – constituído por 156 pacientes portadores de deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla nos quais foi realizada a pesquisa de mutações no *FGFR1* e *PROKR2* (Tabela 2).

Nestes pacientes foram descartadas mutações nos genes sabidamente implicados na etiologia genética do hipopituitarismo congênito (*GHI*, *GHRHR*, *GLI2*, *LHX4*, *HESX1*, *OTX2* e *SOX3*).

Tabela 1 – Características clínicas e radiológicas dos pacientes com DIGH (n=51)

Características fenotípicas	n	%
Sexo		
Masculino	32	63
Feminino	19	37
Consanguinidade	7	14
Casos familiares	12	24
Alterações hipofisárias na RM		
Hipoplasia da adeno-hipófise	34	67
Haste ausente ou afilada	24	47
Neuro-hipófise ectópica	33	65
Neuro-hipófise não visualizada	2	4
Outras alterações cerebrais na RM		
Displasia Septo-óptica	2	4
Hemiatrofia cerebelar D e agenesia do vermis	1	2
Alterações extra hipofisárias		
Hipospádia	1	2
Hiperplasia Suprarrenal Congênita	1	2
Retinite Pigmentosa	1	2
Retardo Mental	2	4
Micropênis	1	2
Ceratocone	1	2

Tabela 2 – Características Clínicas e Radiológicas dos pacientes com DHHM (n=156)

Características fenotípicas	n	%
Sexo		
Masculino	98	63
Feminino	58	37
Consanguinidade	11	7
Casos familiares	37	24
Alterações hipofisárias na RNM		
Hipoplasia da adeno-hipófise	130	83
Haste ausente ou afilada	112	72
Neuro-hipófise ectópica	111	71
Neuro-hipófise ausente	19	12
Outras alterações cerebrais na RNM		
Displasia septo-óptica	8	5
Sela vazia	8	5
Malformação de Chiari	2	1
Hemiatrofia cerebral	1	0,6
Hemiatrofia cerebelar	1	0,6
Cisto arachnoide	1	0,6
Assimetria dos corpos mamilares	1	0,6
Alterações extra hipofisárias		
Epilepsia	10	6
Defeitos crânio-faciais de linha média	7	4
Criptorquidismo	5	3
Retardo Mental	3	2
Micropênis	3	2
Clinodactilia	3	2
Limitação da rotação do pescoço	2	1
Estrabismo	2	1

3.3 ANÁLISE MOLECULAR

Extração de DNA genômico humano: as amostras de DNA foram extraídas de leucócitos periféricos pela técnica de proteinase-K-extração com sal (*salting out*). Quinze mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubos com 25 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se para isso 2 volumes de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NH_4HCO_3 1 mM) e incubando-se a 4 °C por 30 minutos. Centrifugou-se o material a 4 °C por 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall RT7, GMI, Inc., Minnesota, EUA), desprezando-se o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais uma vez. O botão leucocitário foi suspenso em 9 ml de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM; Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 10 mM) com 180 µl de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, Saint Louis, MO, EUA) e 150 µl de proteinase K (10 ng/ml) (Invitrogen Life Technology, Gaithersburg, MD, Estados Unidos), sendo o material incubado a 37 °C por 18 horas. Após esse período, 3,6 ml de solução saturada de cloreto de sódio (6M) foram adicionadas agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o DNA foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se com cuidado por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida lavado em etanol 70%, repetindo-se a operação por mais três vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo secado em centrífuga a vácuo (Eppendorf, Concentrador 5301, Westbury, NY, EUA). Após tal procedimento, o DNA foi ressuspendido em tampão TE (10: 0,1) (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 0,1 mM, pH 8,0). A concentração do DNA foi obtida através de leitura em espectrofotômetro Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg, Alemanha) no comprimento de onda 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/ml). Foi estabelecida a relação de 1,8 entre as leituras de 260 e 280 nm como ideais para caracterização da pureza do DNA. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (Tris 0,004 M; ácido acético glacial; EDTA 0,001 M, pH 8,0) para verificar sua integridade.

Amplificação de DNA genômico por PCR – Reação de polimerização em cadeia: os protocolos utilizados na reação de polimerização em cadeia dos genes *NEUROD4*, *FGFR1* e *PROK2R* foram padronizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM 42.

Análise do *NEUROD4*: os oligonucleotídeos para a amplificação do gene foram criados com o auxílio do programa PRIMER3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3www.cgi/>) de acordo com a sequência ENSG00000123307. Uma vez que o exon 2 possui 996 pares de bases este foi dividido em 2 fragmentos (exons 2A e 2B) para amplificação e sequenciamento.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do *NEUROD4*

Região	Oligonucleotídeos específicos 5' – 3'
Exon 2A	F TCTTTCAGTTTTGGACTGGTCA
	R TCCAGGAGGACAGACTGAGG
Exon 2B	F CTGGCCAGGAAGTATATTTGG
	R GCTCAACCACTTGAATTATGGA

F-*foward*, R-*reverse*

Para cada reação de PCR em um volume final de 25 uL, foram usados 100 ng de DNA genômico, 15 pmol de cada oligonucleotídeos *foward* e *reverse*, 200 uM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 2,5 U de enzima Taq polimerase (Promega), 1X de tampão 5X (Promega). A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, hibridação em temperaturas variando de 52 a 54 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Análise do *FGFR1*: a PCR foi realizada em um volume final de 20 a 25uL utilizando-se 50 a 200 ng de DNA genômico, 0,6 pmol de cada oligonucleotídeo *foward* e *reverse*, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U de enzima *Taq polimerase*, tampão de

PCR 1X e 1,5 mM de MgCl₂. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA) e consistiu das seguintes etapas seguindo 30 ciclos: desnaturação a 94 °C por 1 minuto; hibridação em temperaturas variando de 55 a 65 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. Os oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene estão publicados em TRARBACH *et al.* (2006) ⁽¹⁹⁾, e as condições das reações foram similares às descritas nesse trabalho.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação do *FGFR1*

Região	Oligonucleotídeos específicos 5' – 3'
Exon 2	F CTT TAA GCA GCC ACC ACA TGG R GCT CCA CTT GGG AAG GAG CC
Exon 3	F GCT CAG TAG CCT CCA GTA AGT G R GGT TCA CCT TCC TCT GAA ACT G
Exon 4-5	F CGT GTT CAT CTG GAA CTG CAC R GCA TGT AAT CAG GAC TTC C
Exon 6	F CCA CCA GGC TCT GAT ATG GAG R GAA GTG CCA ATC GCT ATC CTG
Exon 7	F CAT GAG CGA CTT ACT GTG ACT G R CGT GAG GAA TGA TCC CAT TCG
Exon 8	F CAG CAT TTC TTC CTC TAG TC R AGC CTG GAA ATG CAT GCT CC
Exon 9	F AGT CCT AGC TAG AAC TTG CC R AGA CTC TAG AGC ACT TAG TTC
Exon 10-11	F TAC ACA GAC ATG TGC CTC TG R CAG AGA AGC TGT TCT GCT GG
Exon 12	F TAT TGC AAC GGC TCC C R TTG GGA CTG ATA CCC CAG C
Exon 13	F GGG TTT CTT TGA GGT GAA GCC R GTG CTC AGT GCA TCC ACA ACG
Exon 14-15	F AAG TCG GCT AGT TGC ATG GG R CTA CAG TGC TAG AAG CTC TC
Exon 16-17-18	F AGA TGT TGA AAG GCT GAT CT R GGT GAA GGC AGG CCA CAC A

Análise da *PROKR2*: as reações foram realizadas em um volume final de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 10 pmol de cada oligonucleotídeo *forward* e *reverse*, 200 µM de cada dNTP, 1,25 U de enzima *Taq polimerase* (*Promega, Madison, WI, EUA*) e tampão da reação fornecido pelo fabricante contendo 1,5 mM de MgCl₂. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador *GeneAmp PCR System 2400* (*Perkin-Elmer, Foster City, CA, EUA*) e consistiu das seguintes etapas: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, hibridação em temperaturas variando de 52 a 54 °C por 45 segundos, extensão a 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 10 minutos ⁽²²⁾. Os dois exons da *PROKR2* foram amplificados utilizando-se os seguintes pares de oligonucleotídeos:

Tabela 5 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação da *PROKR2*

Região	Oligonucleotídeos específicos 5' – 3'
Exon 1	F TGAAAGAGCAGAAGGTCTGGA
	R TCCTCATTTAGGCTCTGACAGG
Exon 2	F GATTCAGTGTGCCACTGCTT
	R CCAGTACTCAGAGCATCACCC

Os produtos de PCR dos três genes em estudo foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados por transiluminação em luz ultravioleta para assegurar visualização da banda específica e/ou a existência de produtos inespecíficos.

Purificação do produto de PCR e sequenciamento automático: os fragmentos amplificados foram submetidos ao sequenciamento direto automático pelo método de terminação de cadeia com dNTP modificado com dideoxi utilizando o kit *ABI Fsm BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (*Applied Biosystems, Perkin-Elmer Corporation, Inc., Foster City, EUA*), com os primers pertinentes. Os produtos de PCR foram analisados no sequenciador automático de DNA - *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (*PE Applied Biosystems the Perkin Elmer Corporation CN, Foster City, EUA*).

Análise das variantes alélicas: os esferogramas foram analisados pelo software Sequencher 4.8 (Ann Arbor, MI, USA). A análise da região codificadora e das regiões de transição entre o exon e o intron foi feita em comparação com a sequência referência do genbank.

Todas as variantes encontradas foram confirmadas em duas reações de PCR distintas e nomeadas de acordo com as recomendações da *Human Genome Variation society* (www.hgvs.org).

Foi realizada análise *in silico* para predição da natureza patológica ou não da substituição na sequência da proteína. As ferramentas de bioinformática utilizadas foram: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) e Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>).

3.4 ESTUDOS FUNCIONAIS DO FGFR1

Os estudos funcionais das variantes do FGFR1 foram realizados no laboratório da Profa. Dra. Nelly Pitteloud no *Centre Hospitalier Universitaire Vaudois* (CHUV), *Faculté de Biologie et Médecine de l'Université de Lausanne, Suisse*.

Ensaio utilizando a luciferase como gene reporter: a atividade de sinalização das variantes do FGFR1 foi avaliada em células de mioblastos L6 conforme descrição prévia ⁽³²⁾. As células foram transitoriamente transfectadas com o vetor de expressão FGFR1c selvagem ou alterado em combinação com o *osteocalcin-FGF-response-element luciferase reporter*. As células foram então tratadas com doses crescentes do ligante FGF2 e analisadas quanto à atividade da luciferase. Os dados foram plotados em curvas sigmóides de dose-resposta utilizando o Prism software (version 5; GraphPad). Os experimentos de transfecção foram realizados em triplicata e repetidos 3 vezes. Individualmente os experimentos foram expressos como uma porcentagem do resultado da atividade da luciferase da proteína selvagem. A atividade máxima média (topo da curva sigmoide) calculada oriunda de 3 experimentos independentes foi comparada utilizando o *Prisms' F-test function*.

Estudos de expressão e maturação do receptor: análises de *western* e endoglicosidase foram realizados conforme previamente publicado ⁽³²⁾. Células COS-

7 foram transfectadas transitoriamente com *Myc-tagged* cDNA do FGFR1 selvagem ou mutante. Quatro μL de lisado celular purificado ($\sim 5 \mu\text{g}$ de proteína total) foram submetidos a digestão com PNGase e EndoH (New England Biolab), resolvido em géis NuPAGE 3–8% Tris–Acetate Gels (Invitrogen) e depois submetidos à análise do western utilizando um anticorpo primário (anti-Myc, clone 4A6, 1:2000; Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY) e um anticorpo secundário (goat anti-mouse horseradish peroxidase-conjugated, 1:20,000, Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY). A imunoreatividade do FGFR1 e da β -actina foi quantificada por densitometria em imagens adquiridas em filme (BioMAX, Kodak) usando o software ImagJ. Os valores de expressão total dos receptores selvagens e mutantes foram determinados a partir das amostras tratadas com PNGase e foram comparados aos seus respectivos valores de β -actina. Os resultados foram expressos como a razão entre o mutante e o selvagem. Para os estudos de maturação, as densidades das bandas superiores (maduras) e inferiores (imaturas) foram determinadas individualmente nas amostras tratadas com EndoH, e a percentagem da fração madura foi calculada e expressa como a razão da expressão do mutante versus selvagem. Os experimentos foram repetidos três vezes e os valores de expressão e maturação das proteínas foram comparados entre mutantes e selvagens usando o teste t de Student. Os dados são apresentados com média $\pm$ SEM.

Expressão do receptor na superfície celular: A expressão do FGFR1 selvagem ou mutante na superfície celular foi quantificada em células COS-7 utilizando um ensaio de ligação de anticorpos⁽³²⁾. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e repetidos quatro vezes. A expressão específica de proteínas alteradas do FGFR1 na superfície celular foi comparada àquela do selvagem com o teste t de Student. Os dados foram apresentados em média $\pm$ SEM.

4 Resultados

RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DO *NEUROD4* EM PACIENTES COM DIGH

Não foram identificadas mutações inativadoras no *NEUROD4* nos 51 pacientes estudados com DIGH de origem congênita. Foi identificado o polimorfismo rs2656804 em 23 pacientes em heterozigose e em 3 pacientes em homozigose e foi identificado a combinação dos polimorfismos rs2656804/rs138982886 em 2 pacientes ambos em heterozigose.

4.2 ANÁLISE DO *FGFR1* E *PROKR2* EM PACIENTES COM DHHM

FGFR1: foram identificadas três variantes do tipo *missense* em heterozigose, p.Ser107Leu, p.Arg448Trp e p.Pro772Ser em quatro pacientes não relacionados (dois masculinos) (Figura 5). A análise *in silico* da variante p.Arg448Trp foi predita como deletéria pelas ferramentas *Mutation Taster*, *SIFT* e *Polyphen-2*, enquanto que as variantes p.Ser107Leu e p.Pro772Ser foram preditas como causadoras de doença apenas no *Mutation Taster* (Tabela 6).

Figura 5 – Eletróferogramas das variantes encontradas no *FGFR1* nas sequências com *primers* vistas no *forward*

A pesquisa das variantes no grupo controle de 400 brasileiros saudáveis revelou que a p.Pro772Ser do *FGFR1* foi identificada em 5 indivíduos (1,2%). As variantes p.Ser107Leu, p.Arg448Trp não foram identificados no grupo controle.

Pesquisamos a frequência do alelo menor (minor allele frequency- MAF) nos bancos de dados populacionais 1000GENOMES e Exome Sequencing Project

(ESP6500). O 1000GENOMES é composto de várias subpopulações enquanto que o ESP6500 apresenta apenas 2 subpopulações: afro-americanos e euro-americanos. A variante p.Ser107Leu apresentou uma frequência do alelo menor (MAF) de 0,6% no 1000GENOMES. A variante não foi encontrada no banco de dados ESP6500. Uma vez que esta paciente é filha de pais japoneses pesquisamos a frequência do MAF na subpopulação japonesa do 1000GENOMES, na qual foi encontrado numa frequência de 2,8% (Tabela 7). A variante p.Pro772Ser do FGFR1 tem uma MAF=0,5% na população global do 1000GENOMES e uma MAF=4,2% na população afro-americana do ESP6500 (Tabela 7). Até o momento a variante p.Arg448Trp do FGFR1 não foi descrita nos bancos de dados populacionais consultados (Tabela 7).

PROKR2: Foram identificadas duas variantes *missense*, p.Arg85Cys e p.Arg248Glu em duas pacientes não relacionadas do sexo feminino (Figura 6). Na análise *in silico* a variante p.Arg85Cys foi predita como deletéria pelas ferramentas *Mutation Taster*, *SIFT* e *Polyphen-2*, enquanto que a variante p.Arg85Cys foi predita como benigna nas três ferramentas de predição (Tabela 6).

Figura 6 – Eletroferogramas das variantes encontradas na *PROKR2* (gráficos superiores) em comparação com eletroferograma de indivíduo controle (gráficos inferiores)

A pesquisa das variantes no grupo controle de 400 brasileiros saudáveis revelou que a variante p.Arg85Cys da *PROKR2* foi encontrada em 1 indivíduo (0,25%) e a variante p.Arg248Glu não foi encontradas no grupo controle.

A variante p.Arg85Cys apresenta uma MAF=0,2% na população global do 1000GENOMES e MAF=0,6% na população afro-americana do ESP6500. A variante p.Arg248Glu não apresenta descrição da MAF nos bancos de dados pesquisados (Tabela 7).

Tabela 6 – Genótipo, frequência e predição funcional *in silico* das variantes identificadas em 6 pacientes com DHM

Paciente	Gene	Troca no nucleotídeo	Troca na proteína	Domínio funcional	Ferramentas de predição <i>in silico</i>		
					Mutation Taster	SIFT	Polyphen-2
I	<i>FGFR1</i>	c.320C>T	p.Ser107Leu	<i>Ig-like C2-Type 1 domain</i>	Causadora de doença	Tolerada	Benigna
II	<i>FGFR1</i>	c.1342C>T	p.Arg448Trp	<i>Juxta membrane domain</i>	Causadora de doença	Afeta a função da proteína	Provavelmente Deletéria
III	<i>FGFR1</i>	c.2314C>T	p.Pro772Ser	<i>C-terminal tail</i>	Causadora de doença	Tolerada	Benigna
IV	<i>FGFR1</i>	c.2314C>T	p.Pro772Ser	<i>C-terminal tail</i>	Causadora de doença	Tolerada	Benigna
V	<i>PROKR2</i>	c.253C>T	p.Arg85Cys	<i>1st intracellular loop</i>	Causadora de doença	Afeta a função da proteína	Provavelmente Deletéria
VI	<i>PROKR2</i>	c.743G>A	p.Arg248Glu	3rd intracellular loop	Polimorfismo	Tolerada	Benigna

Tabela 7 – Frequência do alelo menor (MAF) das variantes encontradas no FGFR1 e PROKR2 nos bancos de dados populacionais 1000GENOMES e ESP6500

Variante	Registro no dbSNP	MAF 1000GENOMES		MAF ESP6500	
		Todas as populações %	Sub-populações (%)	Afro americanos %	Euro americanos
p.Ser107Leu	rs140382957	0,6	Japonesa (2,8)	0	0
p.Arg448Trp	ND	ND	ND	ND	ND
p.Pro772Ser	rs56234888	0,5	1,8 africana	4,2	0
p.Arg85Cys	rs141090506	0,2	0,8 africana	0,6	0
p.Arg248Glu	rs376142095	ND	ND	ND	ND

dbSNP – banco de dados de polimorfismos de um único nucleotídeo (The Single Nucleotide Polymorphism Database)

MAF – frequência do alelo menor (minor allele frequency)

1000GENOMES Project – banco de dados público da variação genética humana

ESP6500 Project – Projeto de sequenciamento exômico (Exome Sequencing Project) – banco de dados público de exomas completos da população norte americana

4.3 DESCRIÇÃO FENOTÍPICA

Pacientes com as variantes alélicas no FGFR1

Paciente I: a variante p.Ser107Leu do FGFR1 foi identificada em heterozigose em uma paciente feminina nascida de pais japoneses não consanguíneos. Na primeira avaliação a paciente encontrava-se com 15,5 anos de idade e apresentava baixa estatura grave (-7,6 DP), amenorreia primária e idade óssea atrasada (10 anos). A avaliação laboratorial mostrou deficiências de GH e LH/FSH. Foi iniciado o tratamento para ambas as deficiências, a paciente cresceu 15,7 cm atingindo uma altura final de 131,7 cm. A RM de hipófise mostrou adeno-hipófise hipoplásica, haste normal e neuro-hipófise ectópica. No estudo de segregação familiar constatou-se que uma irmã não afetada é carreadora da mesma variante, a mãe não é carreadora e o pai era falecido à época do exame (Figura 7).

Figura 7 – RM de hipófise e heredograma da paciente I com a variante p.Ser107Leu do FGFR1. A RM mostra adeno-hipófise reduzida de volume, haste normal e neuro-hipófise ectópica.

Paciente II: a variante p.Arg448Trp do FGFR1 foi identificada em heterozigose em uma paciente do sexo feminino que procurou atendimento médico inicial aos 4 anos de idade. Ela nasceu de casamento não consanguíneo e não havia história de baixa estatura na família. A queixa inicial era de baixa estatura (-3,0 DP). A avaliação laboratorial endócrina inicial revelou a presença de deficiência de GH e TSH. A paciente iniciou o tratamento com boa resposta apresentando recuperação da altura e velocidade de crescimento atingindo o percentil de altura da família. Durante o acompanhamento a paciente não apresentou sinais de puberdade até os 13 anos de idade, de modo que iniciou-se a indução puberal com estrogênios conjugados. A RM de hipófise mostrou adeno-hipófise hipoplásica, haste afilada e neuro-hipófise ectópica. No estudo da família demonstrou-se que o pai e a irmã não afetados são carreadores da variante (figura 8).

Figura 8 – RM de hipófise e heredograma da paciente II com a variante p.Arg448Trp do FGFR1. A RM evidencia adeno-hipófise hipoplásica, haste afilada e neuro-hipófise ectópica

Pacientes III e IV: a variante p.Pro772Ser foi identificada em heterozigose em 2 pacientes do sexo masculino não relacionados. O paciente III tinha uma história de apresentação pélvica com o uso de fórceps no parto. Ele tinha 16,7 anos de idade na apresentação inicial e suas queixas eram baixa estatura (-6,7 DP) e ausência de desenvolvimento puberal. No exame físico inicial o paciente apresentava tamanho peniano de 4,5 x 1,9 cm (< -2,5 DP), testículo direito 1,8 x 1,0 cm e testículo esquerdo 1,4 x 0,9 cm. Na avaliação laboratorial inicial foram constatadas deficiências de GH, TSH, ACTH e LH/FSH. O paciente iniciou tratamento para todas as deficiências e, após 6 anos de uso de GH, atingiu uma altura final de 172,5 cm. A RM mostrou adeno-hipófise hipoplásica, haste ausente e neuro-hipófise ectópica. A mãe não afetada era carreadora da mesma variante (figura 9).

Figura 9 – RM de hipófise e heredograma do paciente III com a variante p.Pro772Ser do FGFR1. A RM evidenciou adeno-hipófise hipoplásica, ausência de haste e neuro-hipófise ectópica

O segundo paciente portador da variante p.Pro772Ser nasceu em parto domiciliar sem assistência médica, filho de casamento não consanguíneo. Aos 15 anos de vida procurou atendimento médico por baixa estatura (-3,5 DP) e ausência de desenvolvimento puberal. Ao exame físico o pênis media 4,5x1,5 cm (<-2,5 DP), o testículo esquerdo era retrátil e o direito media 2,8x1,5 cm. Os testes endócrinos confirmaram as deficiências de GH, TSH e LH/FSH. Ele foi tratado para todas as deficiências e o tratamento com GH teve a duração de 3,5 anos com uma altura final atingida de 172 cm. O paciente evoluiu na fase adulta com obesidade grau III e DM2. Na RM foi evidenciada adeno-hipófise acentuadamente hipoplásica, haste ausente e neuro-hipófise ectópica. O paciente é filho único, sua mãe não é carreadora da variante e o pai havia falecido á época do estudo (figura 10).

Figura 10 – RM de hipófise e heredograma do paciente IV com a variante p.Pro772Ser do FGFR1. A RM evidenciou hipoplasia acentuada da adeno-hipófise, ausência de haste e neuro-hipófise ectópica

Pacientes com variantes na PROKR2

Paciente V: A pacientes com a variante p.Arg85Cys procurou atendimento médico aos 19 anos de idade com queixa de amenorreia e ausência de caracteres sexuais secundários. Ela era nascida de casamento não consanguíneo e desconhecia casos semelhantes na família. Na avaliação laboratorial inicial foram constatadas deficiências de GH, ACTH, LH and FSH. A paciente iniciou o tratamento para todas as deficiências com exceção do GH e intrigantemente atingiu uma altura final de 168,3 cm. Evoluiu com diabetes insipidus (DI) 8 anos após a avaliação inicial. A RM mostrava adeno-hipófise normal, ausência de haste e neuro-hipófise não visualizada. O pai não afetado é carreador da mesma variante (figura 11).

Figura 11 – RM de hipófise e heredograma da paciente V com a variante p.Arg85Cys da PROKR2. A RM evidencia adeno-hipófise de volume normal, ausência de haste e neuro-hipófise não visualizada

Paciente VI: A variante p.Arg248Glu foi identificada em uma paciente feminina, nascida de parto cesáreo, com 32 semanas de idade gestacional em virtude de rotura prematura de membranas. Não existem outros casos semelhantes na família e os pais não eram aparentados. Na primeira avaliação, aos 10 anos de idade, a queixa principal era baixa estatura grave (-5,0 DP) e a avaliação inicial revelou deficiências de GH, TSH, LH/FSH e parcial de ACTH. No exame físico a paciente apresentava assimetria facial e clinodactilia. A paciente foi tratada por 8 com GH, além da reposição das demais deficiências e atingiu uma altura final de 166,5 cm. Aos 24 anos apresentou diabetes mellitus (DM) com testes negativos para diabetes autoimune e elevação discreta das enzimas hepáticas com testes negativos para hepatite viral. Na história familiar o pai faleceu por cirrose caracterizada como alcoólica e era portador de DM e a paciente relata ter um irmão e vários tios diabéticos. A RNM revelou adeno-hipófise hipoplásica, ausência de haste e neuro-hipófise ectópica. A mãe não afetada é carreadora da variante.

Figura 12 – RM de hipófise e heredograma da paciente VI com a variante p.Arg248Glu da PROKR2. A RM mostrou adeno-hipófise hipoplásica, ausência de haste e neuro-hipófise ectópica

Todos os 6 pacientes tiveram sua função olfatória testada com o Pocket Smell Test® ou o Brief Smell Identification Test® Sensonics, Inc. New Jersey e apresentaram resultado normal. As características fenotípicas dos 6 pacientes estão resumidas na tabela 8.

Tabela 8 – Fenótipo dos pacientes com variantes no *FGFR1* e *PROKR2*

Paciente	Gene	Sexo	Idade ao diagnóstico (anos)	Deficiências Hormonais	RNM	Teste Olfatório	Outras Características
I	<i>FGFR1</i>	F	15	GH, LH, FSH	AHH, NHE, haste normal	NL	Pais japoneses
II	<i>FGFR1</i>	F	4	GH, TSH, LH, FSH	AHH, NHE, haste ausente	NL	
III	<i>FGFR1</i>	M	16	GH, TSH, ACTH, LH, FSH	AHH, NHE, haste afilada	NL	Micropênis
IV	<i>FGFR1</i>	M	15	GH, TSH, LH, FSH,	AHH, NHE, haste ausente	NL	Micropênis
V	<i>PROKR2</i>	F	19	GH, ACTH, LH, FSH	AHN, NHNV haste ausente	NL	Diabetes <i>insipidus</i>
VI	<i>PROKR2</i>	F	10	GH, TSH, partial ACTH, LH, FSH	AHH, NHE, haste ausente	NL	Diabetes mellitus, assimetria facial, clinodactilia

Abreviações: F – feminino, M – Masculino, AHH – Adeno-hipófise hipoplásica, NHE – neuro-hipófise ectópica, AHN – adeno-hipófise normal, NHNV – neuro-hipófise não visualizada, ND – não disponível, NL – normal.

4.4 ESTUDOS FUNCIONAIS DAS VARIANTES IDENTIFICADAS NO FGFR1

As três variantes do *FGFR1* – p.Ser107Leu, p.Arg448Trp e p.Pro772Ser – foram consideradas deletérias em ao menos 1 das 3 ferramentas de predição *in silico* testadas (tabela 6). A atividade de sinalização das variantes foi testada *in vitro* usando o bem estabelecido sistema repórter FGF-responsive osteocalcin, que atua *downstream* na via MAPK. As células expressando as variantes p.Ser107Leu e p.Pro772Ser suscitararam uma curva dose-resposta similar ao FGFR1c selvagem (Figura 13 A e B). Por outro lado a variante p.Arg448Trp demonstrou uma pequena (~15%) porém significativa redução da atividade de sinalização máxima ($p < 0.01$; Figura 13 C).

Complementarmente foram realizados estudos de expressão protéica para avaliar o potencial mecanismo molecular causador da redução da atividade de sinalização observada. A expressão protéica total e o nível de maturação da variante p.Arg448Trp foram similares aos da proteína selvagem, sugerindo normalidade nos processos de síntese protéica e dobradura (Figura 14 A, B e C). Entretanto os valores de expressão na superfície celular da variante foram significativamente aumentados comparados ao selvagem (~ 20%, $p < 0.05$; Figura 14 D), sugerindo um defeito no processo de internalização do receptor.

Figura 13 – Análise funcional das variantes do *FGFR1*. **A-C** Atividade de sinalização dos receptores selvagem e alterados do FGFR1 em mioblastos L6. Estão plotadas as médias $\pm$ SE (standard error) de 3 experimentos independentes. As variantes p.Ser107Leu (A) e p.Pro772Ser (B) apresentaram atividade de sinalização normal, enquanto que a variante p.Arg448Trp apresentou atividade de sinalização máxima reduzida (C)

Figura 14 – **A**, Análise por Western blot de células CHO transitoriamente transfectadas com vetor vazio (EV), FGFR1 selvagem (WT) ou construtos p.Arg448Trp. UT= untreated, EH = EndoH treated, PG = PNGase treated. **B-D**, análise densitométrica dos valores de proteína total e madura dos receptores selvagens e p.Arg448Trp. Plotados em média $\pm$ SE (standard error) de 3 experimentos independentes. **D**, valores da expressão na superfície celular dos receptores selvagem e p.Arg448Trp avaliados em células COS7 vivas transfectadas transitoriamente. Plotados em média $\pm$ SE de 5 experimentos independentes

4.5 ESTUDO FUNCIONAL DAS VARIANTES IDENTIFICADAS NA *PROKR2*

As variantes p.Arg85Cys e p.Arg248Glu já haviam sido anteriormente identificadas em pacientes com SK/HHi e submetidas a estudos funcionais por diferentes grupos (27, 33, 34) de modo que os aspectos funcionais serão apresentados na discussão.

5 Discussão

DISCUSSÃO

O hipopituitarismo congênito causa morbidade e leva à mortalidade prematura ⁽²⁾. Embora a etiologia genética tenha sido esclarecida em alguns casos, a maioria dos pacientes permanece sem diagnóstico definido ^(3, 8). Para elucidar o diagnóstico desses pacientes investigamos a presença de mutações inativadoras em genes candidatos em 2 populações distintas: 51 pacientes com deficiência isolada de GH (DIGH) e 156 pacientes com deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM). Nos pacientes com DIGH investigamos a presença de mutações inativadoras no *NEUROD4*, um gene envolvido na diferenciação e maturação dos somatotrofos. Em contrapartida, na casuística de pacientes com DHHM, em virtude da sobreposição clínica e genética entre o hipopituitarismo e o hipogonadismo hipogonadotrófico isolado/síndrome de Kallmann (HHI/SK) ⁽¹⁷⁾, investigamos a presença de mutações inativadoras em genes classicamente envolvidos no HHI/SK: *FGFR1* e *PROKR2*.

O *NEUROD4* é um fator de transcrição importante na fase final da embriogênese hipofisária para maturação dos somatotrofos, e foi por isto considerado um bom gene candidato a apresentar mutações inativadoras causadoras de DIGH ⁽¹⁴⁾. Não há relatos anteriores do estudo deste gene em pacientes com DIGH. Apesar da plausibilidade como candidato não identificamos mutações inativadoras neste gene nos pacientes com DIGH, foram identificados apenas 2 polimorfismos, o rs2656804 e o rs138982886 em uma frequência alélica de 51 e 4% respectivamente nos pacientes afetados.

Os genes *FGFR1* e *PROKR2* estão classicamente envolvidos na morfogênese dos bulbos olfatórios e na migração dos neurônios de GnRH e mutações inativadoras nestes genes são causa de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado com e sem alteração olfatória ⁽¹⁸⁻²²⁾.

O *FGFR1*, é um receptor tirosina-kinase que atua em múltiplas etapas da embriogênese. A primeira associação de DHHM com alterações no *FGFR1* foi descrita em um paciente masculino com uma deleção submicroscópica que incluía este gene. O paciente apresentava deficiências de GH e LH/FSH associadas à

anosmia e esferocitose ⁽³⁵⁾. Outra deleção submicroscópica englobando o *FGFR1* foi descrita em um estudo que analisou 69 pacientes japoneses com DHHM. A paciente descrita apresentava DHHM associada à epilepsia, dificuldade de aprendizado e malformação de Chiari to tipo I ⁽³⁶⁾. Neste estudo, além da deleção submicroscópica foram descritas duas variantes *missense* (p.Val102Iso e p.Ser107Leu) no *FGFR1* em dois pacientes não relacionados. Essas variantes foram encontradas em baixa frequência (1%) no grupo controle japonês. O estudo funcional destas variantes mostrou, em ensaios de luciferase, transativação praticamente normal em relação ao selvagem (tabela 9).

A variante p.Ser107Leu no *FGFR1* também foi identificada em nossa casuística em uma paciente nascida de pais japoneses (Paciente I). Como esperado, não encontramos essa variante em nosso grupo controle de 400 brasileiros saudáveis (Tabela 9). O estudo funcional foi repetido pelo nosso grupo e não houve diferença na transativação em comparação à proteína selvagem, confirmando os achados da população japonesa ⁽³⁶⁾. Considerando a presença desta variante em controles japoneses e bancos dos dados populacionais 1000GENOMES e ESP6500, a existência de um parente de primeiro grau carreador não afetado e os dados dos estudos *in vitro*, é improvável que esta variante seja responsável isoladamente pelo fenótipo.

A variante p.Pro772Ser do *FGFR1* foi encontrada em nossa casuística em 2 pacientes masculinos não relacionados. Essa variante foi encontrada numa frequência alélica de 1,25% em nosso grupo controle de brasileiros normais (Tabela 9); a frequência do alelo menor (MAF) é de 4,2% em população afro-americana no banco de dados ESP6500, e a mãe do paciente III é uma carreadora não afetada. Esses dados, somados ao estudo funcional que mostrou atividade de transativação semelhante ao selvagem, nos levaram a concluir que a variante p.Pro772Ser do *FGFR1* trata-se de um polimorfismo benigno raro.

Por outro lado, a variante p.Arg448Trp do *FGFR1*, encontrada em uma paciente feminina, não foi descrita até o presente momento nos principais bancos de dados populacionais públicos (1000GENOMES e ESP6500) e tampouco esteve presente na população controle brasileira, foi considerada deletéria em 3 ferramentas de predição *in silico* e mostrou redução de atividade de sinalização em relação ao

selvagem nos estudos *in vitro*. O mecanismo provável seria um defeito no processo de internalização do receptor. Somando todas as informações anteriores é muito provável que esta variante contribua para a ocorrência do fenótipo encontrado nessa paciente com penetrância incompleta, uma vez que familiares de primeiro grau não afetados são carreadores da mesma variante. A influência de fatores ambientais ou a ocorrência de outro mecanismo genético como, por exemplo, a oligogenicidade tal como observado no HHI/SK, não podem ser afastadas nestes casos ⁽³⁷⁾.

Em outro estudo enfocando a superposição genética da DHHM, SK e DSO em 103 pacientes com DHHM e DSO, foram identificadas três variantes em heterozigose no FGFR1 (p.Thr112Thr, p.Ser450Phe e p.Pro483Ser) em três pacientes não relacionados. As variantes p.Ser450Phe e p.Pro483Ser apresentaram redução da atividade de sinalização nos ensaios utilizando a luciferase como gene reporter. Em contrapartida apresentaram expressão total e maturação, avaliados por *western blotting*, similar a do alelo selvagem (tabela 9) ⁽¹⁷⁾.

Considerando o nosso estudo e os dados previamente publicados das duas coortes descritas acima ^(17, 36), até o momento um total de 328 pacientes com DHHM e/ou DSO foram avaliados quanto à presença de mutações no *FGFR1*, e em 9 pacientes (2,7%) foram identificadas 8 variantes diferentes em heterozigose no *FGFR1*, cada uma delas com diferentes resultados nos estudos funcionais e diferentes probabilidades de ter um papel significativo no fenótipo dos pacientes.

A PROKR2 é um dos receptores das procinetinas, proteínas envolvidas na morfogênese dos bulbos olfatórios e do sistema reprodutivo, bem como angiogênese e migração neuronal que está expresso preferencialmente no sistema nervoso central. Mutações na *PROKR2* foram previamente pesquisadas em hipopituitarismo. Reynaud et al estudaram 72 pacientes com a Síndrome da Interrupção da Haste Hipofisária (SIHH) e encontraram 3 variantes *missense* em heterozigose (p.Leu173Arg, p.Arg85His e p.Ala51Thr). As duas primeiras foram consideradas deletérias nos estudos funcionais, evidenciando, de acordo com os autores, um papel causativo no fenótipo ⁽³⁸⁾. McCabe et al avaliaram 422 pacientes com hipopituitarismo congênito, holoprosencefalia (HPE) e/ou DSO e identificaram 5 variantes *missense* em 11 pacientes não relacionados, 3 das quais (p.Arg85Leu, Leu173Arg, Arg268Cys) deletérias nos estudos funcionais ⁽³⁹⁾. Neste estudo, a

variante p.Leu173Arg, deletéria no estudo funcional, foi herdada pelo paciente de sua mãe não afetada que apresentava a variante em homozigose. De modo que esta correlação genótipo-fenótipo pobre levou os autores a concluir que a contribuição das variantes da PROKR2 para o fenótipo de hipopituitarismo é duvidosa⁽³⁹⁾.

As variantes na PROKR2 encontradas na nossa casuística de 156 pacientes não haviam sido ainda descritas em hipopituitarismo congênito, SIHH ou DSO, mas foram previamente descritas em pacientes com SK/HHI e confirmadas como deletérias em estudos funcionais^(27, 33, 34).

A variante p.Arg85Cys não apresentou comprometimento de sua ligação com a PROK2, porém apresentou significativa redução na atividade máxima da MAPK. Na análise por Western Blot a expressão do receptor na membrana foi similar à do selvagem⁽³³⁾.

A variante p.Arg248Glu está localizada na última alça intracelular e sua análise funcional evidenciou uma atividade de transcrição normal no ensaio de Erg-Luc porém reduzida atividade de mobilização do cálcio (72% do selvagem) em ensaios de fluxo de Ca^{2+} *aequorin based*. Sua expressão na membrana é semelhante ao selvagem em experimentos de Western Blot (27). Esta variante não possui uma MAF descrito em bancos de dados populacionais, e a mãe não afetada da pacientes é carreadora.

Até o momento, incluindo a nossa casuística, 650 pacientes com DHHM e/ou DSO foram estudados para a identificação de possíveis mutações inativadoras na PROKR2, e 16 pacientes (2,5%) apresentaram 8 variantes diferentes em heterozigose. Estudos funcionais foram realizados para todas as variantes e 6 delas apresentaram-se como no mínimo parcialmente deletérias.

Em concordância com os estudos prévios, acreditamos que variantes no *FGFR1* e na *PROKR2* podem contribuir para o fenótipo dos pacientes com DHHM, e que outros fatores genéticos e/ou ambientais provavelmente estão envolvidos na etiologia do DHHM.

Tabela 9 – Características das variantes *missense* do *FGFR1* encontradas em pacientes com DHHM

Variante	Atividade de Sinalização	Expressão	Pacientes		Controles		Referência
			n	Frequência	n	Frequência	
p.Thr112Thr	NR	NR				0	
p.Ser450Phe	↓↓	=	103 *	3%	268	0	Raivio et al. ⁽¹⁷⁾
p.Pro483Ser	↓↓	=				0	
p.Val102Ile	↓	NR	69	3%	100	2/100	Fukami et al. ⁽³⁶⁾
p.Ser107Leu	=	NR				1/100	
p.Ser107Leu	=	NR				0	
p.Arg448Trp	↓	=	156	2%	400	0	Estudo atual
p.Pro772Ser	=	NR				5/400	

Abreviações: NR – Não Realizado; = similar ao selvagem.

* Pacientes com DHHM e/ou DSO.

6 Conclusões

CONCLUSÕES

- 1- Nossa hipótese de que mutações inativadoras no *NEUROD4* poderiam ser a uma nova causa de DIGH não foi confirmada, uma vez que encontramos apenas polimorfismos.
- 2- Nos pacientes com DHHM foram identificadas três variantes do tipo *missense* em heterozigose no *FGFR1* em quatro pacientes não relacionados e duas variantes *missense* em heterozigose na *PROKR2* em duas pacientes não relacionadas.
- 3- Três variantes causaram efeito deletério na atividade da proteína, uma localizada no FGFR1 e duas na PROKR2.
- 4- Variantes no *FGFR1* e *PROKR2* podem contribuir para o fenótipo dos pacientes com DHHM porém é improvável que sejam responsáveis isoladamente por este fenótipo.

7 Referências

REFERÊNCIAS

1. Kronenberg H, Williams RH. Williams textbook of endocrinology. 11th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier; 2008. xix, 1911 p.
2. Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, Wheatley K, Clayton RN, Bates AS, Sheppard MC, Stewart PM. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. *Lancet*. 2001;357(9254):425-31.
3. Mehta A, Hindmarsh PC, Mehta H, Turton JP, Russell-Eggitt I, Taylor D, Chong WK, Dattan MT. Congenital hypopituitarism: clinical, molecular and neuroradiological correlates. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009;71(3):376-82.
4. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Before we are born: essentials of embryology and birth defects. 7th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2008. x, 353 p.
5. Bailey AP, Streit A. Sensory organs: making and breaking the pre-placodal region. *Curr Top Dev Biol*. 2006;72:167-204.
6. Streit A. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol*. 2007;51(6-7):447-61.
7. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*. 2007;87(3):933-63.

8. Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, Estefan V, Mendonça BB, Arnhold IJ. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5076-84.
9. Wit JM, Kiess W, Mullis P. Genetic evaluation of short stature. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(1):1-17.
10. Alatzoglou KS, Webb EA, Le Tissier P, Dattani MT. Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: recent advances. *Endocr Rev.* 2014;35(3):376-432.
11. Franca MM, Jorge AA, Alatzoglou KS, Carvalho LR, Mendonca BB, Audi L, Carrascosa A, Dattani MT, Arnhold IJ. Absence of GH-releasing hormone (GHRH) mutations in selected patients with isolated GH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(9):E1457-60.
12. França MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, Mendonça BB, Arnhold IJ. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(11):E384-91.
13. Duriez B, Duquesnoy P, Dastot F, Bougnères P, Amselem S, Goossens M. An exon-skipping mutation in the btk gene of a patient with X-linked agammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency. *FEBS Lett.* 1994;346(2-3):165-70.
14. Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J, Ohsawa R, Bresnick EH, Guillemot F, Kageyama R, Rosenfeld MG. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev.* 2006;20(19):2739-53.

-
15. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev.* 2009;30(7):790-829.
 16. Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Carninci P, Mortensen AH, Hayashizaki Y, Arnhold IJ, Mendonça BB, Brue T, Camper SA. Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: In search of novel regulatory genes. *Mol Cell Endocrinol.* 2010;323(1):4-19.
 17. Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, Dwyer AA, Tommiska J, Sykiotis GP, Gregory LC, Diaczok D, Tziaferi V, Elting MW, Padidela R, Plummer L, Martin C, Feng B, Zhang C, Zhou QY, Chen H, Mohammadi M, Quinton R, Sidis Y, Radovick S, Dattani MT, Pitteloud N. Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):E694-9.
 18. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pêcheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003;33(4):463-5.
 19. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonça BB, Latronico AC. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4006-12.

-
20. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A, Morgan G, Murat A, Toublanc JE, Wolczynski S, Delpech M, Petit C, Young J, Hardelin JP. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e175.
21. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY, Crowley WF Jr. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(44):17447-52.
22. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonça BB, Latronico AC. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(10):4113-8.
23. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development.* 1998;125(6):1005-15.
24. Groth C, Lardelli M. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *Int J Dev Biol.* 2002;46(4):393-400.
25. Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S, Minowada S, Shimotsuka A, Shishiba Y, Yokozawa M, Yasuda T, Nagasaki K, Hasegawa D, Hasegawa Y, Tachibana K, Naiki Y, Horikawa R, Tanaka T, Ogata T. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(3):1079-88.

-
26. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, Puellas E, Gerrelli D, Farooqi IS, Raza J, Walker J, Kavanaugh SI, Tsai PS, Pitteloud N, Martinez-Barbera JP, Dattani MT. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(10):E1709-18.
27. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ, Seminara SB, Huot C, Alos N, Speiser P, Takeshita A, Van Vliet G, Pearce S, Crowley WF Jr, Zhou QY, Pitteloud N. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3551-9.
28. Matsumoto S, Yamazaki C, Masumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiyama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M, Matsuo A, Ishii H, Kobori M, Katoh M, Matsushime H, Furuichi K, Shigeyoshi Y. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(11):4140-5.
29. Lin DC, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen JL, Tian H, Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 2002;277(22):19276-80.
30. Brasil. Conselho Nacional de Saúde. Resolução 466, de 12 de Dezembro de 2012. Diário Oficial da União - Conselho Nacional de Saúde, DF, Brasil, de 13/06/2013.
31. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. II. *Arch Dis Child.* 1966;41(220):613-35.

-
32. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A, Jacobson-Dickman E, Quinton R, Van Vliet G, Lavoie H, Hughes VA, Dwyer A, Hayes FJ, Xu S, Sparks S, Kaiser UB, Mohammadi M, Pitteloud N. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(11):4380-90.
33. Abreu AP, Noel SD, Xu S, Carroll RS, Latronico AC, Kaiser UB. Evidence of the importance of the first intracellular loop of prokineticin receptor 2 in receptor function. *Mol Endocrinol.* 2012;26(8):1417-27.
34. Monnier C, Dode C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP, Rondard P. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet.* 2009;18(1):75-81.
35. Vermeulen S, Messiaen L, Scheir P, De Bie S, Speleman F, De Paepe A. Kallmann syndrome in a patient with congenital spherocytosis and an interstitial 8p11.2 deletion. *Am J Med Genet.* 2002;108(4):315-8.
36. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T. Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J.* 2013;60(8):1013-20.
37. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF, Seminara SB, Crowley WF Jr, Pitteloud N. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(34):15140-4.
38. Reynaud R, Jayakody SA, Monnier C, Saveanu A, Bouligand J, Guedj AM, Simonin G, Lecomte P, Barlier A, Rondard P, Martinez-Barbera JP, Guiochon-Mantel A, Brue T. PROKR2 variants in multiple hypopituitarism with pituitary stalk interruption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):E1068-73.

-
39. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Gregory LC, Alatzoglou KS, Tziaferi V, Sbai O, Rondard P, Masumoto KH, Nagano M, Shigeyoshi Y, Pfeifer M, Hulse T, Buchanan CR, Pitteloud N, Martinez-Barbera JP, Dattani MT. Variations in PROKR2, but not PROK2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E547-57.

8 Apêndice

Correa FA, Trarbach EB, Tussef C, Latronico AC, Montenegro LR, Carvalho LR, França MM, Otto AP, Costalonga EF, Brito VN, Abreu AP, Nishi MY, Jorge AAL, Arnhold IJP, Sidis Y, Pitteloud N, Mendonça BB. *FGFR1* and *PROKR2* rare variants found in patients with combined pituitary hormone deficiencies. *Endocrine Connections*. 2015;4:100-107.

Research

Open Access

F A Correa et al.

FGFR1 and *PROKR2* in CPHD

1–8

4:100

FGFR1 and *PROKR2* rare variants found in patients with combined pituitary hormone deficiencies

Fernanda A Correa¹, Ericka B Trarbach¹, Cintia Tusset¹, Ana Claudia Latronico¹, Luciana R Montenegro¹, Luciani R Carvalho¹, Marcela M Franca¹, Aline P Otto¹, Everlayny F Costalonga¹, Vinicius N Brito¹, Ana Paula Abreu⁴, Mirian Y Nishi¹, Alexander A L Jorge², Ivo J P Arnhold¹, Yisrael Sidis³, Nelly Pitteloud³ and Berenice B Mendonça¹

¹Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, and

²Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM25, Hospital das Clínicas, Disciplina de Endocrinologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 255, 05403-000 São Paulo, Brazil

³Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), Faculté de Biologie et Médecine de l'Université de Lausanne, Lausanne, Switzerland

⁴Division of Endocrinology, Diabetes, and Hypertension, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Correspondence should be addressed to F A Correa
Email: fernandacorrea@usp.br

Abstract

The genetic aetiology of congenital hypopituitarism (CH) is not entirely elucidated. *FGFR1* and *PROKR2* loss-of-function mutations are classically involved in hypogonadotrophic hypogonadism (HH), however, due to the clinical and genetic overlap of HH and CH; these genes may also be involved in the pathogenesis of CH. Using a candidate gene approach, we screened 156 Brazilian patients with combined pituitary hormone deficiencies (CPHD) for loss-of-function mutations in *FGFR1* and *PROKR2*. We identified three *FGFR1* variants (p.Arg448Trp, p.Ser107Leu and p.Pro772Ser) in four unrelated patients (two males) and two *PROKR2* variants (p.Arg85Cys and p.Arg248Glu) in two unrelated female patients. Five of the six patients harbouring the variants had a first-degree relative that was an unaffected carrier of it. Results of functional studies indicated that the new *FGFR1* variant p.Arg448Trp is a loss-of-function variant, while p.Ser107Leu and p.Pro772Ser present signalling activity similar to the wild-type form. Regarding *PROKR2* variants, results from previous functional studies indicated that p.Arg85Cys moderately compromises receptor signalling through both MAPK and Ca²⁺ pathways while p.Arg248Glu decreases calcium mobilization but has normal MAPK activity. The presence of loss-of-function variants of *FGFR1* and *PROKR2* in our patients with CPHD is indicative of an adjuvant and/or modifier effect of these rare variants on the phenotype. The presence of the same variants in unaffected relatives implies that they cannot solely cause the phenotype. Other associated genetic and/or environmental modifiers may play a role in the aetiology of this condition.

Key Words

- combined pituitary hormone deficiencies
- *FGFR1*
- *PROKR2*
- hypopituitarism

Endocrine Connections
(2015) 4, 100–107

Introduction

Combined pituitary hormone deficiencies (CPHD) are defined as the deficiency of two or more pituitary hormones. They can be associated with complex phenotypes such as cranial/facial midline defects and other extra-pituitary features. Mutations in transcription factors such as *PROP1*, *POU1F1*, *GLI2*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *SOX2*, *SOX3* and *OTX2* underlie CPHD (1, 2). There is clinical and genetic overlap between CPHD and isolated hypogonadotrophic hypogonadism (IHH) and/or Kallmann syndrome (KS), such as midline cerebral and facial defects (3). The adenohypophyseal and olfactory placodes share a common embryological origin as they both emerge from the preplacodal field, which could explain this overlap (4).

FGFR1, a tyrosine kinase receptor, is expressed in Rathke's pouch and ventral diencephalon in the developing human embryo (5). PROKR2 is a G protein-coupled receptor essential for normal olfactory bulb development and sexual maturation in mice (6), and it is also involved in angiogenesis and neuronal migration (7).

Loss-of-function mutations in *FGFR1* and *PROKR2* are classically associated with IHH and/or KS (8, 9, 10, 11, 12). Furthermore, mutations in *FGFR1*, *PROKR2* and *FGF8*, the *FGFR1* ligand, have already been found to be associated with hypothalamus–pituitary dysfunction (3, 5, 13).

Our aim was to screen a large cohort of Brazilian patients with CPHD for loss-of-function mutations in *FGFR1* and *PROKR2* to investigate the role of these genes in the aetiology of hypopituitarism.

Subjects and methods

Selection of patients

We studied 156 Brazilian patients with CPHD recruited consecutively from the Hospital das Clínicas, University of São Paulo Medical School after approval of the ethical committee. In addition, informed written consent was obtained from patients and/or parents. The clinical and radiological features of this cohort are detailed in Supplementary Table 1, see section on supplementary data given at the end of this article.

The diagnosis of CPHD was based on the failure to have a normal response to a combined pituitary stimulation test (0.05–0.1 U/kg insulin, 200 µg thyrotrophin-releasing hormone and 100 µg gonadotrophin-releasing hormone, i.v.) and/or low basal insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF-binding protein 3, free thyroxine, luteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), oestradiol or

testosterone and cortisol levels. Height was measured with a stadiometer, and height standard deviation was calculated using British references (14). Magnetic resonance imaging (MRI) scans were performed in a 1.5 Tesla unit (Sigma; GE, Milwaukee, WI, USA) using T1- and T2-weighted sagittal and coronal scans. The control group consisted of 400 healthy Brazilian adults.

Genetic analyses

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes by standard techniques. The entire coding region and exon–intron junctions of the *FGFR1* (ENST00000341462) and *PROKR2* (ENST00000217270) genes were amplified by PCR and sequenced, using primers and conditions described previously (8, 12). All mutations were confirmed in two separate PCR. The variants in DNA and protein sequences are presented according to HGVS nomenclature recommendations (www.hgvs.org/). Mutations in *GLI2*, *LHX4*, *HESX1*, *OTX2* and *SOX3* were searched for in the patients harbouring *FGFR1* and *PROKR2* variants.

In silico analysis

Computational analysis using algorithms from web-based tools such as Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) and Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) was performed for prediction of the pathological effects of the substitutions on protein sequence.

Functional studies

Luciferase reporter assays ► Signalling activity of FGFR1 mutants was assessed using L6 myoblast cells as described previously (15). In brief, cells were transiently transfected with WT or altered FGFR1c expression vector in combination with the osteocalcin FGF response element luciferase reporter. Cells were treated with increasing doses of FGF2 and assayed for luciferase activity. The data were plotted and fitted with three-parameter sigmoidal dose–response curves using Prism Software (version 5; GraphPad, La Jolla, CA, USA). Transfection experiments were performed in triplicate and repeated three times. Results of individual experiments were expressed as percentages of the WT value, and the calculated mean maximal activity (top of the curve)

from three independent experiments was compared using Prism's F-test function.

Receptor expression and maturation studies ▶

Endoglycosidase and western analysis were performed as described previously (15). In brief, COS-7 cells were transiently transfected with Myc-tagged WT or mutated *FGFR1* cDNA. Samples of cleared cell lysate (4 µl, approximately 5 µg of total protein) were subjected to PNGaseF and EndoH digestion (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), resolved on NuPAGE 3–8% Tris-acetate gels (Invitrogen) and then subjected to western analysis using an anti-Myc primary antibody (clone 4A6, 1:2000; Upstate Biotechnology, Inc., Lake Placid, NY, USA) and a goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody (1:20 000; Upstate Biotechnology, Inc.). To control for equal loading, blots were stripped and reprobed with HRP-conjugated anti-β-actin antibody (1:20 000; Abcam, Cambridge, UK). *FGFR1* and β-actin immunoreactivity was quantified by densitometry of film (BioMax, Kodak) acquired images using ImageJ Software (Bethesda, MD, USA). Overall expression levels of WT and mutant receptors were determined from the PNGase-treated samples and were normalized to their respective β-actin levels. Results were expressed as the ratio between mutant and WT levels. For receptor maturation studies, the upper (mature) and lower (immature) band densities were determined individually from the EndoH-treated samples, and the percentage of the mature fraction was calculated and expressed as a ratio of mutant to WT expression. Experiments were repeated three times, and protein expression and maturation levels were compared between mutant and WT proteins using Student's *t*-test. Data are presented as the mean ± s.e.m.

Cell surface expression ▶ Expression of WT or mutant *FGFR1* at the cell surface was quantified using COS-7 cells and an antibody binding assay (15). Experiments were performed in quadruplicate and repeated four times.

Specific cell-surface expression of altered *FGFR1* proteins was compared with that of the WT protein using Student's *t*-test. Data are presented as the mean ± s.e.m.

Results

Genetic analyses

We searched for variants in *GLI2*, *LHX4*, *HESX1*, *OTX2* and *SOX3* genes in the patients harbouring *FGFR1* and *PROKR2* variants. These genes are known to be involved in CPHD and no pathological mutations were found.

FGFR1 ▶ Three missense variants, p.Ser107Leu, p.Arg448Trp and p.Pro772Ser, were identified in a heterozygous state in four unrelated patients (two males), the children of non-consanguineous parents (Table 1). Results of *in silico* analysis indicated that p.Arg448Trp is deleterious according to the Mutation Taster, SIFT and Polyphen-2 tools, whereas p.Ser107Leu and p.Pro772Ser were predicted to be disease-causing only by the Mutation Taster tool.

PROKR2 ▶ Two missense variants, p.Arg85Cys and p.Arg248Glu, were found in a heterozygous state in two unrelated females, the children of non-consanguineous parents (Table 1). Results of *in silico* analysis indicated that p.Arg85Cys is damaging according to Mutation Taster, SIFT and Polyphen-2 whereas p.Arg248Glu was predicted to be benign using the three *in silico* prediction tools.

All the five variants have been detected previously in patients with congenital HH (9, 16, 17). The *FGFR1* p.Pro772Ser variant was found in five out of 400 (1.25%) Brazilian healthy controls, and the *PROKR2* variant p.Arg85Cys was found in one out of 400 (0.25%). The other three variants were not identified in Brazilian healthy controls.

Regarding population genetics, the *FGFR1* variant p.Ser107Leu has a minor allele frequency (MAF) of 0.6%

Table 1 Genotypes and functional *in silico* prediction of *FGFR1* and *PROKR2* variants found in patients.

Patient	Gene	Nucleotide change	Protein change	Functional domain	In silico prediction tools		
					Mutation Taster	SIFT	Polyphen-2
I	<i>FGFR1</i>	c.320C>T	p.Ser107Leu	Ig-like C2-type 1 domain	Disease-causing	Tolerated	Benign
II	<i>FGFR1</i>	c.1342C>T	p.Arg448Trp	Juxta-membrane domain	Disease-causing	Affects protein function	Probably damaging
III	<i>FGFR1</i>	c.2314C>T	p.Pro772Ser	C-terminal tail	Disease-causing	Tolerated	Benign
IV	<i>FGFR1</i>	c.2314C>T	p.Pro772Ser	C-terminal tail	Disease-causing	Tolerated	Benign
V	<i>PROKR2</i>	c.253C>T	p.Arg85Cys	First intracellular loop	Disease-causing	Affects protein function	Probably damaging
VI	<i>PROKR2</i>	c.743G>A	p.Arg248Glu	Third intracellular loop	Polymorphism	Tolerated	Benign

Research	F A Correa et al.	FGFR1 and PROKR2 in CPHD	4-8	4:103
----------	-------------------	--------------------------	-----	-------

Table 2 Phenotypes of patients with *FGFR1* and *PROKR2* variants.

Patient	Gene	Sex	Age at diagnosis (years)	Hormonal deficiencies	MRI	Smell test	Other features
I	<i>FGFR1</i>	F	15	GH, LH and FSH	APH, EPP, normal stalk	NL	Japanese ancestry
II	<i>FGFR1</i>	F	4	GH, TSH, LH and FSH	APH, EPP, absent stalk	NL	
III	<i>FGFR1</i>	M	16	GH, TSH, ACTH, LH and FSH	APH, EPP, thin stalk	NL	Micropenis
IV	<i>FGFR1</i>	M	15	GH, TSH, LH and FSH	APH, EPP, absent stalk	NL	Micropenis
V	<i>PROKR2</i>	F	19	GH, ACTH, LH and FSH	NAP, APP, absent stalk	NL	Diabetes insipidus
VI	<i>PROKR2</i>	F	10	GH, TSH, partial ACTH, LH and FSH	APH, EPP, absent stalk	NL	Diabetes mellitus, facial asymmetry and clinodactyly

F, female; M, male; APH, anterior pituitary hypoplasia; EPP, ectopic posterior pituitary; NAP, normal anterior pituitary; APP, absent posterior pituitary; NL, normal test.

considering all populations (ALL) of the 1000GENOMES project. Since the patient was born to Japanese parents, it is important to consider the MAF in the Japanese population, which is 2.8%. The *FGFR1* variant p.Pro772Ser has a MAF of 0.5% (ALL 1000GENOMES) and a MAF of 4.2% in African-American population of the Exome Sequencing Project (ESP6500). To date, the *FGFR1* variant p.Arg448Trp has not been described in population databases.

The *PROKR2* variant p.Arg85Cys has been described in the databases of the 1000GENOMES project (MAF=0.2% ALL) and the ESP6500 project (MAF=0.6%) in the African-American population. The *PROKR2* variant p.Arg248Glu has no MAF described in databases. Phenotypes of patients carrying the variants are detailed in Table 2.

Patients with *FGFR1* variants

p.Ser107Leu variant ▶ The *FGFR1* variant p.Ser107Leu was identified in a female patient born to non-consanguineous Japanese parents (patient I; Table 2). At first presentation, she was 15.5 years old and had severe short stature (−7.6 s.d.), primary amenorrhoea and delayed bone age (10 years). Endocrine evaluation revealed growth hormone (GH) and LH/FSH deficiencies. She was treated for both deficiencies, gained 15.7 cm and attained a final height of 131.7 cm. Neuroimaging showed a small anterior pituitary, normal stalk and ectopic posterior pituitary. Her father was unavailable for genetic study and her mother was not a carrier of the variant, but her unaffected sister is a carrier of the same variant.

p.Arg448Trp variant ▶ The p.Arg448Trp variant was identified in a 4-year-old girl at first presentation (patient II; Table 2). She was born to non-consanguineous parents, and there was no history of short stature in her family.

The initial complaint was severe short stature (−3.0 s.d.), and endocrine evaluation showed GH and thyroid-stimulating hormone (TSH) deficiencies. Both conditions were treated with good response and the patient achieved the family target height percentile. She had no pubertal signs until 13 years of age, and then puberty was induced with conjugated oestrogens. MRI revealed a small anterior pituitary, absent stalk and ectopic posterior pituitary. Her unaffected father and sister are carriers of the same variant.

p.Pro772Ser variant ▶ We identified the *FGFR1* variant p.Pro772Ser in heterozygous state in two unrelated patients. The first patient (patient III; Table 1) had a history of breech presentation with forceps delivery. He first presented at age 16 years and 9 months with severe short stature (−6.7 s.d.) and lack of sexual development with penile length of 4.5×1.9 cm (<−2.5 s.d.), right testes 1.8×1.0 cm and left testes 1.4×0.9 cm. He had GH, TSH, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), LH and FSH deficiencies at laboratory evaluation. He was treated for all deficiencies and achieved a final height of 172.5 cm after 6 years of GH treatment. His unaffected mother is a carrier of the same variant.

The second patient harbouring this variant (patient IV; Table 1) was born at home without health assistance to non-consanguineous parents. At first presentation he was 15 years and 2 months old. The main complaints were short stature (−3.5 s.d.) and lack of sexual development, with penile length 4.5×1.5 cm (<−2.5 s.d.), the left testis was retractable and the right testis was 2.8×1.5 cm. Endocrine tests confirmed GH, TSH, LH and FSH deficiencies. He was treated for all deficiencies, and GH treatment was carried out for 3.5 years with growth to a final height of 172 cm. At adulthood, he developed obesity class 3 and type 2 diabetes mellitus. His mother is not a carrier of the variant and his father was not available for testing.

Patients with *PROKR2* variants

p.Arg85Cys variant ▶ The p.Arg85Cys variant was identified in a 19-year-old female eunuchoid patient who presented with primary amenorrhoea and no breast development (patient V; Table 2). She was born to non-consanguineous parents. Endocrine tests revealed GH, ACTH, LH and FSH deficiencies. She also developed diabetes insipidus 8 years after the diagnosis of hypopituitarism. Neuroimaging revealed a normal anterior pituitary, absent stalk and a non-visualized posterior pituitary. Intriguingly, this patient reached normal final height (168.3 cm) without GH treatment. Her unaffected father carries the same variant.

p.Arg248Glu variant ▶ The female patient with p.Arg248Glu variant first presented at 10 years of age with severe short stature (−5.0 s.d.; patient VI; Table 2). She was born to non-consanguineous parents at 32 gestational weeks by Caesarean section due to premature membrane rupture. Endocrine evaluation detected GH, TSH, LH, FSH

and partial ACTH deficiencies. MRI revealed a small anterior pituitary, absent stalk and ectopic posterior pituitary. She has some dysmorphic features such as facial asymmetry and clinodactyly. She was treated for 8 years, until 18 years of age, for all deficiencies including GH and achieved a final height of 166.5 cm. At 24 years old, she presented with diabetes mellitus and mild elevation of hepatic enzymes with negative serological test results for hepatitis and negative test results for autoimmune diabetes. Her unaffected mother carries the same variant. Her father died from alcoholic hepatic cirrhosis and had diabetes mellitus along with her brother and several uncles.

All the six patients were tested for olfactory function with The Pocket Smell Test or The Brief Smell Identification Test – Sensonics, Inc. (Haddon Heights, NJ, USA) and had a normal sense of smell.

FGFR1 functional studies

All the three *FGFR1* variants were predicted to be pathogenic by at least one of the three prediction programmes

Endocrine Connections

Figure 1 Functional analysis of *FGFR1* variants. (A, B and C) Signalling activity of WT and altered *FGFR1* receptors in L6 myoblasts. Plotted are means $\pm$ s.e.m. of three independent experiments. p.Ser107Leu (A) and p.Pro772Ser (B) variants had normal signalling activity, while p.Arg448Trp had reduced maximal signalling activity (**statistically significant ($P < 0.01$)) (C). (D) Western blot analysis of CHO cells transiently transfected with empty vector (EV), *FGFR1* WT or p.Arg448Trp constructs. UT, untreated; EH, EndoH

treated; PG, PNGase treated. (E and F) Densitometry analysis of total protein and maturation levels of WT and p.Arg448Trp receptors. Plotted are means $\pm$ s.e.m. of three independent experiments. (G) Cell-surface expression levels of WT and p.Arg448Trp receptors assessed in live transiently transfected COS-7 cells. Plotted are means $\pm$ s.e.m. of five independent experiments (*statistically significant ($P < 0.05$)).

tested (Table 1). Signalling activity of these variants was assessed *in vitro* using the well-established FGF-responsive osteocalcin reporter system, which acts downstream of the MAPK pathway. Cells expressing the p.Ser107Leu and p.Pro772Ser variants elicited dose-response curves similar to the WT FGFR1c curve (Fig. 1A and B). The p.Arg448Trp variant, on the other hand, demonstrated a small (approximately 15%) but significant reduction in maximal signalling activity ($P < 0.01$; Fig. 1C). To evaluate potential molecular mechanisms underlying the observed reduced signalling activity, we performed protein expression studies. Overall protein expression and maturation levels of p.Arg448Trp were similar to those for the WT, indicative of normal protein synthesis and folding processes (Fig. 1D, E and F). However, cell-surface expression levels of this variant were significantly increased compared with the WT (approximately 20%, $P < 0.05$; Fig. 1G), indicating a defect in the receptor internalization process.

Discussion

Congenital hypopituitarism (CH) is implicated in considerable morbidity and leads to premature mortality (18). Although many genetic causes have been discovered, the majority of patients remain without genetic diagnosis (19, 20, 21). In this study, due to the clinical and genetic overlap between IHH/KS and CPHD, we investigated the presence of deleterious variants of two genes classically associated with IHH/KS in a large cohort of Brazilian CPHD patients. We found four patients harbouring three different *FGFR1* variants (p.Ser107Leu, p.Arg448Trp and p.Pro772Ser) and two patients with *PROKR2* variants (p.Arg85Cys and p.Arg248Glu).

Variants of *FGFR1*

The first detection of *FGFR1* defects in CPHD patients, to our knowledge, was the identification of a submicroscopic deletion including the *FGFR1* gene in a male patient. This patient had GH, LH and FSH deficiencies associated with anosmia and spherocytosis (22). Another submicroscopic deletion involving *FGFR1*, identified during a study analysing 69 Japanese patients with CPHD, was detected in a female patient with CPHD associated with epilepsy, learning disability and Chiari type 1 malformation (23). In addition to the submicroscopic deletion, in this study, two heterozygous missense variants (p.Val102Ile and p.Ser107Leu) were also found in two unrelated patients. These variants were present at a low frequency in the Japanese control group. Results of functional studies of the two variants revealed nearly normal transactivating functions in luciferase assays (Table 3). The *FGFR1* variant p.Ser107Leu was also found in our cohort, in a patient born to Japanese parents, as would be expected, we did not find the variant in our Brazilian control group. The functional study performed by us (Fig. 1) revealed no difference in transactivation in comparison with the WT, confirming the findings of the previous Japanese population study (23). Taking into account the presence of the variant in Japanese controls and population databases, an unaffected first-degree relative carrying the variant, and the *in vitro* data, it is unlikely that this variant (p.Ser107Leu) alone is causing the phenotype.

Concerning the p.Pro772Ser variant, due to its finding in five of the 400 healthy controls, a MAF of 4.2% in African-based populations – one of the major ethnic populations in Brazil – and the presence of an unaffected mother that carries this variant, it is reasonable to conclude that this is a polymorphism.

Table 3 Characteristics of *FGFR1* missense variants found in patients with CPHD.

Variant	Signalling activity	Expression	Patients		Controls		References
			n	Frequency (%)	n	Frequency (%)	
p.Thr112Thr	NS	NS	103 ^a	3	268	0	(3)
p.Ser450Phe	↓	=				0	
p.Pro483Ser	↓	=				0	
p.Val102Ile	↓	NS	69	3	100	2	(23)
p.Ser107Leu	=	NS				1	
p.Ser107Leu	=	NS	156	2	400	0	Present study
p.Arg448Trp	↓	NS				0	
p.Pro772Ser	=	NS				1.25	

NS, not studied; =, similar to the WT.

^aPatients with CPHD and/or SOD.

Research	F A Correa et al.	FGFR1 and PROKR2 in CPHD	7–8	4:106
----------	-------------------	--------------------------	-----	-------

The p.Arg448Trp variant, on the other hand, has not been described to date in population databases, it shows a reduced signalling activity, probably due to a defect in receptor internalization process (Fig. 1), and is considered deleterious according to three *in silico* prediction tools (Table 1). Taking into account all this information together, it is likely that this variant contributes to the phenotype, although first-degree relatives are unaffected carries. Also, the possibility of an oligogenic mechanism similar to that seen in IHH/KS (17) cannot be discarded.

In an additional study focusing on the genetic overlap in KS, CPHD and septo-optic dysplasia (SOD), a cohort of 103 patients was examined. Three heterozygous variants (p.Thr112Thr, p.Ser450Phe and p.Pro483Ser) were found in *FGFR1* in three different unrelated patients with CPHD and SOD. The latter two variants showed decreased signalling activity in luciferase reporter assays and similar overall expression and maturation levels in western blotting analysis (3).

In summary, considering the present study and the previously published data for the two other cohorts described above (3, 23), to date, a total of 328 patients with CPHD and/or SOD have been screened for *FGFR1* mutations, and nine patients (2.7%) were found to harbour eight different heterozygous *FGFR1* variants with variable probabilities of having a significant role in the phenotype (Table 3).

Variants of *PROKR2*

PROKR2 mutations have been previously screened for in patients with CH. Reynaud and colleagues screened 72 patients with pituitary stalk interruption syndrome (PSIS) and found three heterozygous missense variants (p.Leu173Arg, p.Arg85His and p.Ala51Thr). The first two showed deleterious effects in functional studies supporting, according to the authors, a causative role to the phenotype (24). McCabe and colleagues (25) screened 422 patients with CH, holoprosencephaly and/or SOD and found five missense variants in 11 unrelated patients, three of them (p.Arg85Leu, Leu173Arg and Arg268Cys) proved to be deleterious in functional studies. In the latter study, the p.Leu173Arg variant was inherited by the patient from his unaffected mother, who was proven to be homozygous for the variant. The poor genotype–phenotype correlation led the authors to conclude that the contribution of *PROKR2* variants to the phenotype is uncertain (25).

The *PROKR2* variants found in our cohort of 156 patients have not been previously described in CH, PSIS or SOD, but have already been described in patients with KS/IHH and have been submitted to functional studies

(16, 26, 27). The p.Arg85Cys variant showed modest but a significant 30% reduction in maximal MAPK activation in an Egr1-Luc assay (26). In inositol phosphatidyl (IP) accumulation assays, the variant showed similar dose–response curves to WT *PROKR2*. Also, the p.Arg85Cys variant does not interfere with *PROKR2* ligand binding and its plasma membrane expression is not reduced according to the results of western blot analyses (26). Our patient inherited the variant from an unaffected father.

The p.Arg248Glu variant is located within the last intracellular loop, and results of functional analyses revealed normal transcription activity in an Erg-Luc assay but decreased calcium mobilization activity (72% of WT) in an aequorin-based Ca^{2+} flux assay. Its expression level was similar to that of the WT *PROKR2* in western blot experiments (16). This variant does not have a MAF described in population databases and the patient's mother is an unaffected carrier.

To date, including our cohort, 650 patients with CPHD and/or SOD have been studied for *PROKR2* mutations and 16 patients (2.5%) harbour eight different heterozygous *PROKR2* variants. Functional studies have been performed on all variants and six of them were proved to be at least partially deleterious.

In conclusion, *FGFR1* and *PROKR2* variants may contribute to the phenotype of patients with CPHD but are unlikely to be implicated in isolation. Consistently with the results of previous studies, we believe that it is likely that other associated genetic and/or environmental factors are involved in the aetiology of this condition.

Supplementary data

This is linked to the online version of the paper at <http://dx.doi.org/10.1530/EC-15-0015>.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by grants 305743/2011-2 (to B B Mendonça) and 304678/2012-0 (to A A L Jorge) from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and grant 2013/03236-5 (to A A L Jorge) from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP).

References

- 1 Davis SW, Castinetti F, Carvalho LR, Ellsworth BS, Potok MA, Lyons RH, Brinkmeier ML, Raetzman LT, Caminci P, Mortensen AH *et al*. Molecular mechanisms of pituitary organogenesis: in search of novel regulatory genes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2010 **323** 4–19. (doi:10.1016/j.mce.2009.12.012)

Research	F A Correa et al.	FGFR1 and PROKR2 in CPHD	8-8	4:107
----------	-------------------	--------------------------	-----	-------

2. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC & Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocrine Reviews* 2009 **30** 790–829. (doi:10.1210/er.2009-0008)
3. Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, Dwyer AA, Tommiska J, Sykiotis GP, Gregory LC, Diazok D, Tziaferi V et al. Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012 **97** E694–E699. (doi:10.1210/jc.2011-2938)
4. Streit A. The preplacodal region: an ectodermal domain with multi-potential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *International Journal of Developmental Biology* 2007 **51** 447–461. (doi:10.1387/ijdb.072327as)
5. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, Puellas E, Gerrelli D, Farooqi IS, Raza J et al. Novel FGFR3 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2011 **96** E1709–E1718. (doi:10.1210/jc.2011-0454)
6. Matsumoto S, Yamazaki C, Matsumoto KH, Nagano M, Naito M, Soga T, Hiayama H, Matsumoto M, Takasaki J, Kamohara M et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *PNAS* 2006 **103** 4140–4145. (doi:10.1073/pnas.0508881103)
7. Lin DC, Bullock CM, Ehler JF, Chen JL, Tian H & Zhou QY. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 2002 **277** 19276–19280. (doi:10.1074/jbc.M202139200)
8. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, Garmes HM, Mendonça BB & Latronico AC. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 4113–4118. (doi:10.1210/jc.2008-0958)
9. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paape A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Bavelier F et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genetics* 2003 **33** 463–465. (doi:10.1038/ng1122)
10. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, Lespinasse J, Lienhardt-Roussie A, Mathieu M, Moerman A et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genetics* 2006 **2** e175. (doi:10.1371/journal.pgen.0020175)
11. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, Plummer L, Jacobson-Dickman EE, Mellon PL, Zhou QY et al. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *PNAS* 2007 **104** 17447–17452. (doi:10.1073/pnas.0707173104)
12. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonça BB & Latronico AC. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2006 **91** 4006–4012. (doi:10.1210/jc.2005-2793)
13. Asakura Y, Muroya K, Hanakawa J, Sato T, Aida N, Narumi S, Hasegawa T & Adachi M. Combined pituitary hormone deficiency with unique pituitary dysplasia and morning glory syndrome related to a heterozygous PROKR2 mutation. *Clinical Pediatric Endocrinology* 2015 **24** 27–32. (doi:10.1297/cpe.24.27)
14. Tanner JM, Whitehouse RH & Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965, II. *Archives of Disease in Childhood* 1966 **41** 613–635. (doi:10.1136/adc.41.220.613)
15. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A, Jacobson-Dickman E, Quinton R, Van Vliet G, Lavoie H et al. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 **94** 4380–4390. (doi:10.1210/jc.2009-0179)
16. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, Hughes VA, Dwyer AA, Raivio T, Hayes FJ et al. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2008 **93** 3551–3559. (doi:10.1210/jc.2007-2654)
17. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF et al. Oligogenic basis of isolated gonadotrophin-releasing hormone deficiency. *PNAS* 2010 **107** 15140–15144. (doi:10.1073/pnas.1009622107)
18. Tomlinson JW, Holden N, Hills RK, Wheatley K, Clayton RN, Bates AS, Sheppard MC & Stewart PM. Association between premature mortality and hypopituitarism. West Midlands Prospective Hypopituitary Study Group. *Lancet* 2001 **357** 425–431. (doi:10.1016/S0140-6736(00)04006-X)
19. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N et al. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertility and Sterility* 2014 **102** 1130–1136.e3. (doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.017)
20. Mehta A, Hindmarsh PC, Mehta H, Turton JP, Russell-Eggitt I, Taylor D, Chong WK & Dattani MT. Congenital hypopituitarism: clinical, molecular and neuroradiological correlates. *Clinical Endocrinology* 2009 **71** 376–382. (doi:10.1111/j.1365-2265.2009.03572.x)
21. Osorio MG, Mani S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, Estefan V, Mendonça BB & Arnhold JJ. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2002 **87** S076–S084. (doi:10.1210/jc.2001-011936)
22. Vermeulen S, Messiaen L, Scheir P, De Bie S, Speleman F & De Paape A. Kallmann syndrome in a patient with congenital spherocytosis and an interstitial Sp11.2 deletion. *American Journal of Medical Genetics* 2002 **108** 315–318. (doi:10.1002/ajmg.10295)
23. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S & Ogata T. Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocrine Journal* 2013 **60** 1013–1020. (doi:10.1507/endocrj.EJ13-0023)
24. Reynaud R, Jayakody SA, Monnier C, Saveanu A, Bouligand J, Guedj AM, Simonin G, Lecomte P, Barlier A, Rondard P et al. PROKR2 variants in multiple hypopituitarism with pituitary stalk interruption. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2012 **97** E1068–E1073. (doi:10.1210/jc.2011-3056)
25. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Gregory LC, Alatzoglou KS, Tziaferi V, Sbai O, Rondard P, Matsumoto KH, Nagano M, Shigeyoshi Y et al. Variations in PROKR2, but not PROKR2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** E547–E557. (doi:10.1210/jc.2012-3067)
26. Abreu AP, Noel SD, Xu S, Carroll RS, Latronico AC & Kaiser UB. Evidence of the importance of the first intracellular loop of prokineticin receptor 2 in receptor function. *Molecular Endocrinology* 2012 **26** 1417–1427. (doi:10.1210/me.2012-1102)
27. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, Hardelin JP & Rondard P. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Human Molecular Genetics* 2009 **18** 75–81. (doi:10.1093/hmg/ddn318)

Received in final form 5 March 2015

Accepted 10 March 2015

Supplemental table 1 –Clinical and radiological features of 156 patients with CPHD

Clinical and radiological features	n	%
<u>Sex</u>		
Male	98	63
Female	58	37
<u>Pituitary MRI abnormalities</u>		
Anterior pituitary hypoplasia	130	83
Absent or thin stalk	112	72
Ectopic posterior pituitary	111	71
Absent posterior pituitary	19	12
<u>Cerebral MRI abnormalities</u>		
Septo optic dysplasia	8	5
Empty sella	8	5
Chiari malformation	2	1
Cerebral hemiatrophy	1	
Cerebellar hemiatrophy	1	
Arachnoid cyst	1	
Mammillary bodies asymmetry	1	
<u>Extra pituitary alterations</u>		
Epilepsy	10	6
Midline facial defects	7	4
Cryptorchidism	5	3
Mental retardation	3	2
Micropenis	3	2
Clinodactyly	3	2
Limited neck rotation	2	1
Strabismus	2	1