LORENA GUIMARÃES LIMA AMATO

**Novas perspectivas no estudo genético do
hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI)
por meio da técnica de sequenciamento paralelo
em larga escala**

Versão original

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Dra. Letícia Ferreira Gontijo Silveira

São Paulo

2018

Autorizo a divulgação total ou parcial desse trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Amato, Lorena Guimarães Lima

Novas perspectivas no estudo genético do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) por meio da técnica de sequenciamento paralelo em larga escala / Lorena Guimarães Lima Amato. -- São Paulo, 2018.

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

Programa de Endocrinologia.

Orientadora: Letícia Ferreira Gontijo Silveira.

Descritores: 1.Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito 2.Síndrome de Kallmann 3.Hipogonadismo/genética 4.Transtornos do desenvolvimento sexual 5.Puberdade tardia

USP/FM/DBD-247/18

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por meio do projeto temático 2013/03236-5.

Dedicatória

*Aos meus pais, **Elias e Marly**, ao meu irmão, **Danilo**,
que estão ao meu lado me enchendo de forças
desde o princípio. Ao meu esposo, **Fernando**,
pela compreensão, carinho, por todo amor e apoio
incansável durante a elaboração deste trabalho, e ao
meu querido filho, **Eduardo**.*

Agradecimentos

A realização de um doutorado vai muito além dos conhecimentos teóricos e acadêmicos. Envolve também aprendizado profissional e emocional. Essa etapa da minha vida não seria possível sem a ajuda de pessoas que estiveram ao meu lado nesse caminho, e a essas pessoas aqui estão meus agradecimentos:

À Dra. Letícia Ferreira Gontijo Silveira, pela valiosa orientação e pelo exemplo como pesquisadora e profissional competente e dedicada. Por estar sempre disponível quando precisei, me ajudando com seu vasto conhecimento e experiência. Agradeço-lhe pela atenção, apoio e ensinamentos. Sua orientação tornou possível a construção do nosso trabalho.

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico, por quem eu tenho profunda admiração, pela importante participação em vários momentos, pelo exemplo como professora, também estando sempre presente e disponível, instigando e estimulando seus alunos, proporcionando palavras de conforto e ótimos conselhos em momentos difíceis.

À Profa. Dra. Berenice Mendonça, médica, pesquisadora e professora admirável, sempre incentivando a busca do conhecimento e a pesquisa, colaborando para o crescimento da Endocrinologia nacional.

A Profa. Dra. Elaine Frade Costa, por ter iniciado as pesquisas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico no grupo e por suas contínuas e sempre importantes contribuições ao meu trabalho, também por participar da minha qualificação.

Ao Prof. Dr. Alexander Jorge pelo seu imenso conhecimento na endocrinologia e na genética, sempre compartilhado com seus alunos, sem o qual não seria possível meu crescimento nessa área tão complexa da medicina.

Ao Prof. Dr. Ivo Arnhold pelas suas preciosas sugestões e observações.

As Dra. Ericka Trarbach e Dra. Fernanda Correa, por participarem da qualificação com importantes sugestões e colaborações, que enriqueceram muito meu trabalho, e contribuições diversas que continuaram durante todo meu doutorado.

Ao Dr. Antônio Lerário pelas contribuições na análise de bioinformática. As Dra. Luciana Montenegro e Mirian, por toda contribuição com o trabalho de laboratório e ensinamentos, sempre estando disponíveis para ajudar.

Agradeço às funcionárias Cidinha, Fran, e Suelen, pela boa vontade e competência que tanto facilitam o nosso trabalho no laboratório, assim como à Nilda, Rosangele, Cida e Rosana, por toda ajuda no dia a dia.

Às colegas, Alessandra Renck, Carolina Schnoll e Lorena Lima pelo apoio tornando a convivência no ambulatório mais fácil. À Marilena, Mirela, Raphael Loch, Letícia, Natália, Carolina, Mariana Funari e Mônica França, pela excelente convivência, incentivo e colaboração mútua nessa jornada, e em especial à Marina Cunha e Priscila Sales, grandes amigas cuja a ajuda foi muito além da profissional e acadêmica.

A todos os colegas do LIM/42, que, pela boa convivência, tornaram muito mais agradáveis a vida no laboratório.

À instituição de fomento FAPESP pelo apoio financeiro durante a realização desse trabalho.

Aos meus pais, pelo amor incondicional, incentivo contínuo, e por terem me dado o apoio necessário para que eu chegasse até aqui. Ao meu irmão, que sempre me ajudou e apoiou em todos os momentos da minha vida, e a minha cunhada, que provam que não é preciso estar presente fisicamente para estar ao lado. Aos meus amigos de toda uma vida, Liza Caroline, Mariana Coelho, Nayara, Luanna, Mariana Ribeiro, Mariana Cabral, Ludmila Vieira, Cecília Santillo, Érika Chaul, Marcela Avelino, Amanda Carvalho, Mariana Carvalho, Ana Luiza, família que escolhi. As queridas tias Lourdinha, Socorro, Rosa, Valda, que sempre me apoiam, com muito carinho.

A família maravilhosa que ganhei quando me casei, meu sogro Salvador, cunhados, Alexandre e Marcelo, cunhadas, Juliana e Flávia, aos queridos sobrinhos, a Silvana, que me deram sempre muito apoio, desde que eu os conheci, em especial a minha sogra Marisa cujo apoio foi além do familiar e frequentemente incluindo o acadêmico.

Ao Fernando, meu esposo, meu melhor amigo, meu amor, pelo companheirismo, compreensão, por todo o amor e apoio em todos os momentos.

Aos pacientes e seus familiares pela boa vontade em participar desse projeto.

A todos que acreditaram e que contribuíram para a realização desse trabalho.

Epígrafe

“É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito, nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhece vitória nem derrota.”

Theodore Roosevelt

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. Serviço 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: Serviços de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de símbolos de genes e proteínas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de anexos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Ontogenia dos <i>neurônios secretores de GnRH</i>	2
1.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado.....	3
1.3 Genética do HHI.....	5
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 MÉTODOS	18
3.1 Pacientes.....	19
3.1.1 Critérios clínicos para inclusão dos pacientes	19
3.2 Sequenciamento genético	20
3.3 Extração do DNA genômico de linfócitos periféricos	23
3.4 Elaboração do painel para o sequenciamento paralelo em larga escala	23
3.5 Análise de bioinformática	26
3.6 Critérios para seleção das variantes candidatas	27
3.7 Confirmação das variantes encontradas	29
3.8 Extração de RNA e síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) do gene <i>GNRH1</i>	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Genes clássicos do HHI	35
4.2 Gene <i>GNRH1</i>	39
4.3 Gene <i>CHD7</i>	41

4.4	Gene <i>IGSF10</i>	43
4.5	Genes com poucas descrições no HHI e genes candidatos	45
4.6	Achados oligogênicos.....	48
5	DISCUSSÃO	51
5.1	Genes clássicos do HHI	53
5.2	Gene <i>GNRH1</i>	55
5.3	Gene <i>CHD7</i>	56
5.4	Gene <i>IGSF10</i>	58
5.5	Genes com poucas descrições no HHI	59
5.6	Genes candidatos <i>IGFALS</i> , <i>IGSF1</i> , <i>EBF2</i> e <i>OTX2</i>	64
5.7	Achados oligogênicos.....	65
6	CONCLUSÕES	69
7	REFERÊNCIAS.....	71
	ANEXOS	89

Listas

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
AC	<i>Allele count</i> (contagem de alelos)
ACCD	Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento
ACMG	<i>American College of Medical Genetics</i>
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> (hormônio adrenocorticotrófico)
ALS	Subunidade de ácido lábil
AMH	Hormônio anti-Mulleriano
B	Benigna
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	DNA complementar
CHARGE	Síndrome CHARGE (OMIM 214800): coloboma, anormalidades cardíacas, atresia de coana, anormalidades genitais e auditivas
CNV	<i>Copy number variation</i> (variação do número de cópias)
cRNA	RNA complementar
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
Dx	Diagnóstico
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetracético)
F	Feminino
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FATHMM	<i>Functional Analysis through Hidden Markov Models</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GAP	<i>GnRH-associated peptide</i>

GERP	<i>Genomic evolutionary rate profiling</i>
GH	<i>Growth Hormone</i> (Hormônio do crescimento)
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing Hormone</i> (Hormônio liberador de gonadotrofinas)
GRCh37	Genome Reference Consortium human genome 37
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCl	Ácido clorídrico
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
Ig	Imunoglobulina
IGF	<i>Insulin-like growth factors</i> (fator de crescimento semelhante à insulina)
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
INSL3	<i>Insulin like factor 3</i> (fator semelhante à insulina 3)
kb	Kilo (quilo) pares de bases = 1.000 bp
L	Litro
LH	Hormônio luteinizante
LIM42	Laboratório de Hormônios e Genética Molecular 42
LoF	<i>Loss of Funtion</i> – perda de função
M	Masculino
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i> – frequência alélica mínima
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification</i>
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
ng	Nanograma
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
NH ₄ HCO ₃	Bicarbonato de amônio
NKB	Neurocinina B
OMIN	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P	Patogênica
pb	Pares de bases

PB	Provavelmente benigna
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol
PP	Provavelmente patogênica
PREMiUM	Programa Rede de Equipamentos Multiusuários
PROVEAN	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SDS	Solução de dodecilsulfato de sódio
SELA	Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala
SIFT	<i>Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein</i>
SK	Síndrome de Kallmann
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de um único nucleotídeo)
SNV	<i>Single nucleotide variants</i> (variante de um único nucleotídeo)
SPLE	Sequenciamento paralelo em larga escala
TAE	Tampão TRIS-Acetato-EDTA
TE	Tampão TRIS-HCl EDTA
TRIS-HCl	Tampão Tris-ácido clorídrico
UI	Unidades Internacionais
Unicamp	Universidade Estadual de Campinas
UPSIT	Teste olfatório da Universidade da Pensilvânia
UTR	<i>Untranslated region</i> (região não traduzida)
VCF	<i>Variant Call Format</i>
VEST3	<i>Variant Effect Scoring Tool</i>
VUS	<i>Variant of Undetermined Significance</i> (variante de significado incerto)
WT	<i>Wild type</i> (alelo selvagem)
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromol

SÍMBOLOS DE GENES E PROTEÍNAS

<i>ANOS1</i>	Gene que codifica a anosmina-1, também conhecido com <i>KAL1</i>
<i>CHD7</i>	Gene que codifica a proteína <i>chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7</i>
<i>DMXL2</i>	Gene que codifica a rabconnectina-3 alfa
<i>DUSP6</i>	Gene que codifica a proteína <i>dual specificity phosphatase 6</i>
<i>EBF2</i>	Gene que codifica o Ebf2 (<i>Early B cell fator 2</i>) pertencente à família de fatores de transcrição hélice-alça-hélice (<i>helix-loop-helix</i>)
<i>FGF17</i>	Gene que codifica um fator de crescimento de fibroblasto (<i>fibroblast growth factor</i>) tipo 17
<i>FGF8</i>	Gene que codifica um fator de crescimento de fibroblasto (<i>fibroblast growth factor</i>) tipo 8
<i>FGFR1</i>	Gene que codifica o receptor 1 do fator de crescimento de fibroblasto (<i>fibroblast growth factor</i>)
<i>FLRT3</i>	Gene que codifica a Flrt3 (<i>Fibronectin leucine rich transmembrane protein 3</i>)
<i>GHSR</i>	Gene que codifica o receptor acoplado à proteína G do hormônio do crescimento (<i>Growth hormone secretagogue receptor</i>)
<i>GNRH1</i>	Gene que codifica o hormônio liberados das gonadotrofinas (GnRH)
<i>GNRHR</i>	Gene que codifica o receptor de GnRH
<i>HS6ST1</i>	Gene que codifica o <i>heparan-sulphate 6-O-sulphotransferase 1</i>
<i>IGFALS</i>	Gene que codifica um fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (<i>insulin-like growth factors I</i>)
<i>IGSF1</i>	Gene que codifica a proteína IGSF1 (<i>Immunoglobulin superfamily, member 1</i>)
<i>IGSF10</i>	Gene que codifica a proteína IGSF10 (<i>Immunoglobulin superfamily, member 10</i>)
<i>IL17RD</i>	Gene que codifica o receptor D da interleucina 17
<i>KISS1</i>	Gene que codifica a kisspeptina
<i>KISS1R</i>	Gene que codifica o receptor da kisspeptina
<i>MKRN3</i>	Gene que codifica a proteína <i>makorin ring finger 3</i>

<i>MSX1</i>	Gene que codifica um membro da família de genes homeobox do segmento muscular (<i>muscle segment homeobox</i>)
<i>NELF</i>	Gene que codifica o fator embrionário nasal LHRH, também conhecido como <i>NSMF</i>
<i>OTX2</i>	Gene <i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
<i>PNPLA6</i>	Gene <i>Patatin Like Phospholipase Domain Containing 6</i>
<i>POLR3A</i>	Gene que codifica é a subunidade A da RNA-polimerase III
<i>POLR3B</i>	Gene que codifica é a subunidade B da RNA-polimerase III
<i>PROK2</i>	Gene que codifica a procinetina-2
<i>PROKR2</i>	Gene que codifica o receptor ligado a proteína G da procinetina-2
<i>RNF216</i>	Gene que codifica a <i>Ring Finger Protein 216</i>
<i>SEMA3A</i>	Gene que codifica a Semaforina 3A
<i>SEMA7A</i>	Gene que codifica a Semaforina 7A
<i>SOX10</i>	Gene que codifica um fator de transcrição que atua na crista neural e desenvolvimento de oligodendrócitos
<i>SPRY4</i>	Gene que codifica o SPRY4, um inibidor do via de sinalização MAPK (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
<i>TAC3</i>	Gene que codifica a preprotaquicinina 3
<i>TACR3</i>	Gene que codifica o receptor da preprotaquicinina 3
<i>WDR11</i>	Gene que codifica a proteína Wdr11 (<i>WD repeat domain 11</i>)

FIGURAS

Figura 1 -	Genes envolvidos na etiologia do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito e síndrome de Kallmann	12
Figura 2 -	Fluxograma da classificação das variantes identificadas.....	33
Figura 3 -	Amplificação e sequenciamento das amostras	40
Figura 4 -	Mutações descritas no gene <i>GNRH1</i>	58

TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas e genéticas dos genes já descritos na literatura associados ao HHI	7
Tabela 2 -	Variantes moleculares identificadas no estudo de 260 pacientes com HHI por sequenciamento de Sanger	14
Tabela 3 -	Características dos 130 pacientes incluídos na casuística (Anexo 1)	90
Tabela 4 -	Painel de genes do estudo piloto	21
Tabela 5 -	Painel de genes ampliado	22
Tabela 6 -	Variantes encontrados nos 130 pacientes submetidos ao SPLE (Anexo 5)	102
Tabela 7 -	Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas em 41 pacientes com HHI congênito	34
Tabela 8 -	Variantes identificadas nos genes <i>PROK2</i> e <i>PROKR2</i>	37
Tabela 9 -	Variantes no gene <i>CHD7</i>	42
Tabela 10 -	Variantes no gene <i>IGSF10</i>	44
Tabela 11 -	Achados oligogênicos	49

ANEXOS

Anexo 1 -	Tabela 3. Características dos 130 pacientes incluídos na casuística	90
Anexo 2 -	Termo de consentimento livre e esclarecido	95
Anexo 3 -	Critérios ACMG	97
Anexo 4 -	Extração de RNA com Trisol [®]	100
Anexo 5 -	Tabela 6. Variantes encontrados nos 130 pacientes submetidos ao SPLE.....	102

Resumo

Amato LGL. *Novas perspectivas no estudo genético do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) por meio da técnica de sequenciamento paralelo em larga escala* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

O Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) congênito é uma síndrome clínica rara causada por defeito na produção ou secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo ou por resistência hipofisária à ação do GnRH. O HHI é mais prevalente em homens e cerca de 50% a 60% dos indivíduos afetados apresentam anosmia ou hiposmia associada, caracterizando a síndrome de Kallmann. Diversos genes já foram associados à patogênese do HHI congênito, porém, a maioria dos casos ainda permanece sem diagnóstico molecular definido. Até recentemente, a identificação das causas genéticas dos pacientes com HHI era realizada por sequenciamento de genes candidatos, empregando a técnica de Sanger. No entanto, com o número crescente de genes descritos nos últimos anos, esse processo vem se tornando impraticável. Novas metodologias de sequenciamento (sequenciamento paralelo em larga escala) foram desenvolvidas permitindo a genotipagem simultânea de diversas regiões, com maior velocidade e menor custo relativo. O atual projeto foi desenvolvido com o objetivo de rastrear genes candidatos em pacientes portadores de HHI congênito utilizando-se o sequenciamento paralelo em larga escala, visando ampliar o conhecimento genético do HHI. Realizamos o sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) de 130 pacientes com HHI congênito utilizando um painel contendo 36 genes relacionados ao HHI. Inicialmente, identificamos 104 variantes, potencialmente patogênicas em 77 pacientes (59,2%). Após a filtragem inicial, foi realizada uma análise individualizada de cada variante e com isso foram mantidos 41 (31,5%) pacientes com variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas. Os genes *KAL1*, *FGFR1*, *CHD7* e *GNRHR* foram os mais frequentemente afetados. Esses resultados confirmam a importância dos genes classicamente associados ao HHI congênito. Destaca-se a alta prevalência de variantes no *CHD7* (10,8%), gene bastante extenso, levando à dificuldade técnica de sequenciá-lo pelos métodos tradicionais, até então sem estudos nessa coorte. O *CHD7* é um gene originalmente associado à complexa síndrome de CHARGE, porém, nos últimos anos vem sendo cada vez mais associados ao HHI congênito. Dentre os resultados, ressaltamos a identificação de uma mutação inédita no gene *GNRH1*, causa rara de HHI, e a identificação de variantes deletérias no gene *IGSF10*, recentemente descrito associado ao atraso puberal, mas sem papel claro no fenótipo de HHI, em dois pacientes que tiveram reversibilidade do hipogonadismo. Variantes provavelmente patogênicas em

genes com poucas descrições ou até mesmo sem relatos de associação ao fenótipo de HHI (*SPRY4*, *FLRT3*, *IGSF1*, *NSMF*, *SOX10* e *OTX2*) também foram identificadas nessa coorte, ampliando nosso conhecimento genético do HHI. A oligogenicidade, previamente descrita com prevalência de 2,5% a 7%, em nosso estudo esteve presente em 22% dos pacientes, demonstrando uma ampliação das descrições de oligogenicidade quando comparados aos estudos prévios utilizando somente a técnica de Sanger. A nova técnica de sequenciamento genético (SPLE), utilizada em nosso estudo, foi capaz de ampliar de 22% para 31,5% (41 em 130 pacientes) a porcentagem de pacientes com diagnóstico molecular definido, quando comparado aos dados prévios utilizando a técnica de Sanger, mostrando-se rápida, confiável e eficaz.

Descritores: 1.Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito
2.Síndrome de Kallmann 3.Hipogonadismo/genética 4.Transtornos do desenvolvimento sexual 5.Puberdade tardia

Abstract

Amato LGL. *New perspectives in the genetic study of congenital isolated hypogonadotrophic hypogonadism (IHH) using targeted next-generation sequencing* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

Congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is a rare condition caused by GnRH deficiency, due to defective hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) production or secretion, or by pituitary resistance to the GnRH action. Congenital IHH is more prevalent in men and about 50% to 60% of affected individuals present with associated anosmia or hyposmia, characterizing Kallmann's syndrome. Several genes have already been associated with the pathogenesis of congenital IHH, but most cases still remain without a molecular diagnosis. Until recently, identification of the genetic causes of IHH was performed by sequencing candidate genes using the Sanger technique. However, with the growing number of genes and the genetic complexity of IHH, it has become almost impossible to keep the screening of all candidate genes updated using the traditional techniques. The advent of next-generation sequencing (NGS) has allowed the simultaneous genotyping of several regions, faster and with lower relative cost. The present project was developed with the objective of tracking candidate genes in patients with congenital IHH using large-scale parallel sequencing, in aiming to increase the genetic knowledge of this rare condition. A total of 130 unrelated patients with IHH was studied by targeted NGS, using a panel containing 36 IHH associated genes. Initially, 104 potentially pathogenic variants were identified in 77 patients (59.2%). However, after an individualized analysis of each variant, the number of patients considered to carry pathogenic or probably pathogenic variants dropped to 41 (31.5%). The genes *KAL1*, *FGFR1*, *CHD7* and *GNRHR* were the most frequently affected and these results confirm the importance of genes classically associated with IHH. It is noteworthy the high prevalence of variants in *CHD7* (10.8%), a rather extensive gene, leading to technical difficulty of sequencing by traditional methods, which had not been studied in this cohort. *CHD7* is the causative gene of CHARGE syndrome, however it has been recently identified in a growing number of congenital IHH patients with or without additional features of the syndrome. Among the results, we emphasize a novel mutation in the *GNRH1* gene, a rare cause of IHH, and the identification of deleterious variants in the *IGSF10* gene, recently associated with pubertal delay but without a clear role in the IHH phenotype, in two patients with reversible hypogonadism. Probably pathogenic variants in genes with few descriptions or even no reports of association with the IHH phenotype (*SPRY4*, *FLRT3*, *IGSF1*, *NSMF*, *SOX10* and *OTX2*) were also identified in this cohort, increasing the genetic knowledge of IHH.

Oligogenicity, previously described with a prevalence of 2.5% to 7%, was observed in 22% of our patients, demonstrating an increase in oligogenicity cases when compared to previous studies using only the Sanger sequencing. In conclusion, targeted NGS was able to increase the percentage of patients with molecular diagnosis from 22% to 31.5% in our cohort when compared to the previous data using the Sanger sequencing, and has been shown to be a fast, reliable and effective tool in the molecular diagnosis of congenital IHH.

Descriptors: 1.congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism; 2.Kallmann syndrome; 3.hypogonadism/genetics; 4.disorders of sexual development; 5.delayed puberty.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ontogenia dos neurônios secretores de GnRH

O desenvolvimento puberal normal é dependente da secreção e da ação adequada do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), produzido por um pequeno número de neurônios situados no hipotálamo ventromedial. O GnRH estimula a secreção hipofisária das gonadotrofinas, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), as quais estimulam a esteroidogênese e a gametogênese nas gônadas, culminando no desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e aquisição da capacidade reprodutiva. O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal é ativo durante o período neonatal, seguido por um período de relativa quiescência durante toda a infância. A reemergência dos pulsos secretores de GnRH ocorre no final da infância e coincide com o início do período puberal ⁽¹⁾. Entre os neurônios hipotalâmicos, os neurônios secretores de GnRH são os únicos que têm sua origem fora do sistema nervoso central. Esses neurônios são formados por células progenitoras do epitélio nasal na placa olfatória e migram em associação com os neurônios olfatórios até alcançar a placa crivosa, onde as fibras olfatórias unem-se aos primórdios do bulbo olfatório ⁽²⁾. Os neurônios secretores de GnRH continuam seu percurso atravessando a placa crivosa até alcançarem o hipotálamo, onde param sua migração. Por fim, os neurônios secretores de GnRH projetam seus axônios na eminência média hipotalâmica e secretam GnRH no sistema porta hipofisário. O GnRH age através de seu receptor, que é expresso nas células gonadotróficas da hipófise. Essa ação regula tanto a síntese quanto a liberação do LH e FSH, que por sua vez estimulam a maturação e função gonadal ⁽³⁾.

Nos seres humanos, a migração dos neurônios secretores de GnRH começa na 6ª semana do desenvolvimento embrionário, sendo estes

observados no hipotálamo fetal na 9^a a 10^a semana. Por volta da 14^a a 16^a semana de gestação, esses neurônios já estão posicionados em sua localização anatômica final, conectados ao sistema porta-hipofisário, completando assim, seu desenvolvimento e maturação ⁽⁴⁾.

1.2 Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (HHI) congênito é uma síndrome clínica causada por defeito na produção ou secreção de GnRH pelo hipotálamo ou por resistência hipofisária à ação do GnRH ⁽⁵⁾. O HHI é uma condição rara, com prevalência de 1:4.000 a 1:10.000 homens, sendo 3-5 vezes mais frequente em homens que em mulheres ^(5, 6). Cerca de 50 a 60% dos indivíduos afetados apresentam anosmia ou hiposmia associada, caracterizando a síndrome de Kallmann (SK), cuja etiopatogenia está relacionada a defeitos na migração conjunta dos neurônios olfatórios e neurônios secretores de GnRH durante a embriogênese humana ^(4, 5). O HHI é uma condição clínica e geneticamente heterogênea, podendo se manifestar de forma esporádica ou ser herdada como um traço autossômico dominante, recessivo ou ligado ao X ⁽⁵⁾.

Clinicamente, o HHI é caracterizado pela ausência parcial ou completa de desenvolvimento puberal após os 18 anos nos homens e 16 anos nas mulheres, baixas concentrações séricas de esteroides sexuais, associadas a valores baixos ou normais de gonadotrofinas (LH e FSH), com o restante da função hipofisária normal, além de ausência de causa anatômica que justifique o quadro clínico (achados de imagem da região hipotalâmica-hipofisária normais) ⁽⁵⁾.

Tipicamente, o diagnóstico do HHI congênito é realizado durante a segunda ou terceira década de vida, quando os indivíduos afetados se apresentam com ausência ou retardo do desenvolvimento puberal, amenorreia primária ou infertilidade. A pubarca pode ocorrer espontaneamente, porém costuma ter desenvolvimento parcial ou tardio.

Ginecomastia pode estar presente em cerca de 20% dos casos, porém sua incidência pode aumentar com o início da reposição de testosterona. As mulheres apresentam-se em geral com amenorreia primária e desenvolvimento mamário parcial ou ausente. A ultrassonografia pélvica revela volume uterino e ovariano reduzido para a idade. Pubarca e telarca espontâneas são observadas em cerca de 88% e 50% das mulheres afetadas, respectivamente, e 10% apresentam um ou dois episódios de menstruação, antes de evoluir para amenorreia definitiva ^(7, 8). Em alguns casos, a suspeita diagnóstica do HHI em homens pode ser aventada na infância, devido à presença de micropênis e/ou criptorquidismo, principalmente na vigência de história familiar de hipogonadismo ⁽⁶⁾. A ocorrência de micropênis e criptorquidismo reflete a falência da ativação do eixo gonadotrófico na segunda metade da gestação e no período neonatal, fases nas quais ocorre maior crescimento peniano ⁽⁷⁾.

Outros estigmas fenotípicos não reprodutivos podem estar associados à síndrome de Kallmann com frequência variável. Esses estigmas incluem malformações renais (hipoplasia ou agenesia renal unilateral), malformações craniofaciais (fenda labial e/ou palatina, palato ogival, hipertelorismo ocular), surdez neurossensorial, agenesia dental, anomalias digitais (clinodactilia, sindactilia, camptodactilia) e disfunções neurológicas (ataxia cerebelar, anomalias oculomotoras, sincinesia bimanual) ⁽⁶⁾.

Na última década, alguns paradigmas sobre o HHI foram revistos. Atualmente, estima-se que a reversão do hipogonadismo pode ocorrer em aproximadamente 10 a 20% dos pacientes ^(9, 10), o que alterou o dogma de que esta condição seria permanente ao longo da vida. Clinicamente, suspeita-se de reversão do hipogonadismo em homens quando se observa crescimento testicular ou fertilidade espontânea durante terapia de reposição androgênica. Os mecanismos que levam à reversão não são bem conhecidos. Hipotetiza-se que os esteroides sexuais possam influenciar a plasticidade da rede de neurônios hipotalâmicos, levando à recuperação da função dos neurônios produtores de GnRH. Contudo, a reversão nem sempre é definitiva, a recorrência do hipogonadismo pode ocorrer e foi

observada em até metade dos casos ⁽¹⁰⁾. Mutações em diferentes genes, incluindo *FGFR1*, *GNRHR*, *TAC3/TACR3*, *PROK2/PROKR2*, *HS6ST1*, *CHD7*, foram associados à reversão do HHI congênito ⁽⁹⁾.

Variação substancial na expressão clínica do mesmo defeito genético tem sido observada em famílias nas quais membros afetados podem apresentar-se com síndrome de Kallmann, HHI normósmico, anosmia isolada, fenda lábio-palatina isolada, atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD) ou fenótipo normal. Essas observações sugerem a possibilidade de que a síndrome de Kallmann, HHI normósmico e o ACCD possam fazer parte de um espectro amplo de uma mesma condição clínica ^(6, 11). Essa variabilidade fenotípica foi observada principalmente em famílias com mutações nos genes *FGF8*, *FGFR1*, *PROK2* e *PROKR2* ^(6, 13, 14).

1.3 Genética do HHI

Os neurônios de GnRH pós migratórios estão embebidos numa complexa rede de aferências que enviam sinais estimulatórios, inibitórios e permissivos para estas células, apresentando grande importância na regulação do eixo reprodutivo. A complexa organização e regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal humano torna-o suscetível a diversas disfunções, visto o grande número de alterações genéticas identificadas em proteínas reguladoras desse eixo, as quais levam a graus variáveis de deficiência de GnRH ^(7, 11). Nas últimas décadas, múltiplos genes envolvidos em diferentes estágios do desenvolvimento e função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal foram implicados na etiopatogenia do HHI ⁽⁷⁾. Os genes associados ao HHI codificam uma rede complexa de fatores de transcrição, proteínas de matriz, neurotransmissores, enzimas e receptores hormonais cujas ações são fundamentais para a aquisição e manutenção da função reprodutiva normal ⁽⁷⁾. Esses genes foram identificados por diversas técnicas, como caracterização de deleções e translocações equilibradas,

analogia com fenótipos de modelos animais e clonagem posicional de portadores de HHI provenientes de grandes famílias consanguíneas⁽¹²⁾.

Atualmente, mais de 30 genes já foram associados a formas sindrômicas e não sindrômicas do HHI⁽³⁾. Os detalhes genéticos e as particularidades clínicas de cada gene, já descritos na literatura associados ao HHI, estão descritos na Tabela 1. Os genes classicamente relacionados à patogênese do HHI incluem o *KAL1*, na síndrome de Kallmann ligada ao X e *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3* e *TACR3* no HHI normósmico e *FGF8*, *FGFR1*, *PROK2* e *PROKR2*, associados tanto à síndrome de Kallmann quanto ao HHI normósmico⁽³⁾. Apesar do vasto histórico de estudo das causas genéticas do HHI, apenas cerca de 30% dos pacientes apresentam diagnóstico molecular definido⁽¹⁵⁾.

Tabela 1 - Características clínicas e genéticas dos genes já descritos na literatura associados ao HHI

Gene	Localização cromossômica	Fenótipos	Características clínicas associadas	Síndromes associadas	Herança	Prevalência na literatura
<i>KAL1</i> (<i>ANOS1</i>)	Xp22.31	SK	Sincinesia bimanual Agenesia renal unilateral		Ligada ao X	5%
<i>FGFR1</i>	8p11.23	SK HHIn	Fenda palatina e/ou labial Anormalidades esqueléticas Displasia septo-ótica Malformação pé mão Deficiências hipofisárias combinadas	Síndrome Hartfield	Autossômica dominante	10%
<i>GNRHR</i>	4q13.2	HHIn			Autossômica recessiva	6-16%
<i>CHD7</i>	8q12.2	SK HHIn	Surdez congênita Hipoplasia do canal semicircular	Síndrome CHARGE	Autossômica dominante	6%
<i>PROK2</i>	3p13	SK HHIn			Autossômica recessiva	3-6%
<i>PROKR2</i>	20p12.3	SK HHIn		Síndrome Morning Glory	Autossômica recessiva	3-6%
<i>IL17RD</i>	3p14.3	SK	Surdez congênita		Autossômica recessiva	3%
<i>FGF8</i>	10q24.32	SK HHIn	Fenda palatina e/ou labial Anormalidades esqueléticas Sincinesia bimanual Deficiências hipofisárias combinadas		Autossômica dominante	< 2%
<i>KISS1</i>	1q32.1	HHIn			Autossômica recessiva	Raro
<i>KISS1R</i>	19p13.3	HHIn			Autossômica recessiva	Raro
<i>TAC3</i>	12q3	HHIn			Autossômica recessiva	Raro

Tabela 1 - Características clínicas e genéticas dos genes já descritos na literatura associados ao HHI (conclusão)

Gene	Localização cromossômica	Fenótipos	Características clínicas associadas	Síndromes associadas	Herança	Prevalência na literatura
<i>TACR3</i>	4q24	HHIn			Autossômica recessiva	Raro
<i>GNRH1</i>	8p21.2	HHIn			Autossômica recessiva	Raro
<i>SOX10</i>	22q13.1	SK	Surdez congênita	Síndrome Waardenburg	Autossômica dominante	2%
<i>WDR11</i>	10q26.12	SK HHIn	Deficiências hipofisárias combinadas		Autossômica dominante	Raro
<i>SEMA3A</i>	7q21.11	SK			Autossômica dominante	Raro
<i>SEMA7A</i>	15q24.1	SK HHIn			Autossômica dominante	Raro
<i>FGF17</i>	8p21.3	SK HHIn		Síndrome Dandy-Walker	Autossômica dominante	Raro
<i>HS6ST1</i>	2q14.3	SK HHIn	Fenda palatina e/ou labial Anormalidades esqueléticas		Autossômica dominante	Raro
<i>NSMF (NELF)</i>	9q34.3	SK HHIn				Raro
<i>RNF216</i>	7p22.1	HHIn	Ataxia cerebelar	Síndrome de Gordon Holmes	Autossômica recessiva	Raro
<i>PNPLA6</i>	19p13.2	HHIn	Ataxia cerebelar	Síndrome de Gordon Holmes	Autossômica recessiva	Raro

Fonte: Boehm, U. et al. Nat. Rev. Endocrinol. 2015;11, 547–564; Tusset, C. et al. Arq Bras Endocrinol Metab. 2011;55.

O gene *GNRHR*, que codifica o receptor de GnRH, foi o primeiro associado à patogênese do HHI normósmico e até hoje é considerado a causa genética mais comum dessa condição ⁽¹⁸⁾. Por outro lado, mutações inativadoras do *GNRH1*, gene que codifica GnRH, apesar de terem sido extensamente investigadas por serem consideradas causa óbvia para a deficiência de GnRH, são extremamente raras, sendo descritas até o momento somente três diferentes mutações em homozigose nesse gene. Outros genes associados exclusivamente ao HHI normósmico, incluem os genes *KISS1/KISS1R* e *TAC3/TACR3*, que codificam neuropeptídeos hipotalâmicos e seus receptores, essenciais para regulação da secreção do GnRH. A kisspeptina, codificada pelo gene *KISS1*, e seu receptor, codificado pelo gene *KISS1R*, expresso na superfície dos neurônios GnRH, são moléculas-chave para o desenvolvimento puberal em humanos ⁽¹⁹⁻²¹⁾. A kisspeptina é secretada por neurônios hipotalâmicos, e reconhecida como o principal neuropeptídeo estimulatório da secreção de GnRH, sendo essencial para o início do desenvolvimento puberal ⁽²²⁻²⁴⁾. Outro componente importante para o controle da secreção de gonadotrofina em humanos e início da puberdade é a sinalização pela neurocinina B (NKB), codificada pelo gene *TAC3*, secretada pelos mesmos neurônios hipotalâmicos que produzem a kisspeptina ⁽²⁵⁾.

Vários genes relacionados à síndrome de Kallmann afetam a migração dos neurônios da GnRH. O *KAL1*, recentemente renomeado para *ANOS1*, foi primeiro gene causal identificado na síndrome de Kallmann. O *KAL1* codifica a anosmina-1, uma proteína de matriz extracelular que atua no processo de migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH ^(26, 27). Estão também envolvidos na migração dos neurônios secretores de GnRH os genes *FGFR1*, *FGF8*, *PROK2* e seu receptor *PROKR2*, *NSMF* (*NELF*), *CHD7*, *HS6ST1*, *WDR11*, *SEMA3A* e *IGSF10*. Os genes *FGF8*, *CHD7*, *SOX10* estão relacionados ao nicho neurogênico na área nasal e ao desenvolvimento craniofacial ^(15, 28-34). A maioria desses genes já têm relatos na literatura em pacientes com HHI normósmico, reforçando a ideia de que Síndrome de Kallmann e HHI normósmico nem sempre representem

entidades completamente distintas ⁽³⁾. Atualmente, cada gene já associado ao HHI, isoladamente, esclarece menos de 10% dos casos ^(14, 15).

O HHI também pode apresentar-se como parte de algumas síndromes complexas. O gene *FGFR1* já foi descrito associado à síndrome Hartsfield (OMIM 615465) que se caracteriza por holoprosencefalia, ectrodactilia e fenda palatina, assim como à displasia septo-óptica. O gene *SOX10* está associado a síndrome Waardenburg (OMIM 193500), caracterizada por surdez, hipopigmentação dos cabelos, da pele e dos olhos, além de outras alterações variáveis, como doença de Hirschsprung. O gene *CHD7* está associado a síndrome CHARGE (OMIM214800), nome que representa as manifestações clínicas da síndrome: coloboma do olho (C), defeitos cardíacos (*Heart defects* - H), atresia das coanas nasais (A), retardo no crescimento e/ou desenvolvimento (R), anormalidades genitais e/ou urinárias (*Genital and/or urinary abnormalities* - G), anormalidades da orelha e surdez (*Ear abnormalities and deafness* - E). O gene *FGF17* está associado a síndrome Dandy-Walker (OMIM 220200) que tem como principais características o alargamento do quarto ventrículo, a ausência completa ou parcial da área entre os dois hemisférios cerebelares e a formação de cistos na base interna do crânio ⁽³⁾. O gene *PROKR2* está associado a síndrome Morning Glory (OMIM 120430) caracterizada por disco óptico de tamanho aumentado com bordas mal definidas e envoltas por anel pigmentado, com escavação profunda, presença de tecido glial ocupando o disco óptico e disposição radial da vascularização retiniana. O gene *DMXL2*, que aparentemente está envolvido na formação de vesículas secretórias, foi associado à uma síndrome neurológica complexa, incluindo dentre outras alterações endocrinológicas o hipogonadismo hipogonadotrófico ⁽³⁵⁾. Mutações em genes que regulam ubiquitinação como *OTUD4*, *RNF216* ⁽³⁶⁾ e *PNPLA6* ^(37, 38) também foram associados a síndrome de Gordon Holmes (OMIM 212840) que inclui ataxia espinocerebelar e hipogonadismo hipogonadotrófico. Em alguns casos, esses genes relacionados a síndromes também foram associados ao HHI normósmico ou síndrome de Kallmann sem outros estigmas, ou com apenas uma

característica isolada, como por exemplo, surdez, nos casos de mutações nos genes *CHD7* e *SOX10*, podendo-se aventar que casos de HHI poderiam ser formas incompletas de uma síndrome.

O gene *IGSF10* foi recentemente associado ao fenótipo de atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD) ⁽³⁹⁾. No mesmo estudo, defeitos no *IGSF10* foram encontrados também em pacientes com HHI funcional, como amenorreia hipotalâmica. Estudos anteriores já pesquisaram genes classicamente relacionados ao HHI em pacientes com ACCD com resultados variáveis. Mutações nos genes relacionados ao HHI já foram descritas em famílias com um amplo espectro fenotípico variando de atraso puberal a hipogonadismo completo ^(6, 11, 40, 41). Dessa forma, considera-se que o ACCD poderia representar uma variante mais leve do HHI ⁽³⁹⁾.

Uma relativa correlação genótipo-fenótipo pode ser observada no HHI congênito. As formas de síndrome de Kallmann com mutações no gene *KAL1*, costumam apresentar fenótipo reprodutivo mais grave e estão particularmente associadas a estigmas como sincinesia bimanual e agenesia renal unilateral, presentes em cerca de 40-70% e 30% dos casos, respectivamente ^(7, 42). Fenda labial ou palatina e alterações esqueléticas estão associadas a mutações nos genes *FGFR1* e *FGF8*. Defeitos em genes envolvidos no controle da produção, secreção e ação do GnRH, como *GNRH1/GNRHR*, *KISS1R*, *TAC3/TACR3*, causam exclusivamente HHI normósmico sem associação de outros estigmas não reprodutivos ^(6, 7, 42). O HHI associado à surdez sugere mutações nos genes *IL17RD*, *CHD7* e *SOX10*. A atuação de cada um dos genes já descritos associados ao HHI está ilustrada na Figura 1.

Fonte: ilustração do próprio autor.

Figura 1 – Genes envolvidos na etiologia do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito e síndrome de Kallmann

De acordo com a literatura, os genes mais comumente afetados são *KAL1*, em cerca de 8% a 11% dos casos esporádicos e 14% a 50% dos casos familiares de síndrome de Kallmann ligada ao X ⁽⁴⁵⁾; *FGFR1* em 10% a 17% dos casos, tanto na síndrome de Kallmann quanto no HHI normósmico ⁽⁴⁶⁾ e *GNRHR* em cerca de 23% dos casos de HHI normósmico ⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. Mutações no gene da kisspeptina, *KISS1*, considerado o mais potente estimulador da secreção de LH dependente de GnRH identificado até o momento, bem como seu receptor *KISS1R*, são consideradas uma causa infrequente de HHI, com uma frequência inferior a 5% em casos esporádicos (1,6%), porém com frequência mais elevada entre os casos familiares (20,8%) ^(21,51,52). Mutações nos genes *TAC3* e *TAC3R* ocorrem em cerca de 5% dos pacientes com HHI normósmico ⁽⁵³⁾.

Até recentemente, a identificação das causas genéticas dos pacientes com HHI era realizada por meio do rastreamento de genes candidatos, empregando a metodologia de sequenciamento genético conhecida como técnica de Sanger ⁽⁴³⁾ que permite o sequenciamento de até cerca de 700 pares de bases (pb) de uma determinada região alvo em cada reação. O Projeto Genoma Humano utilizou essa metodologia, tendo sido concluído em 2003, treze anos após o seu início, envolvendo mais de 500 pesquisadores e com um custo estimado de US\$ 3,8 bilhões ⁽⁴⁴⁾. Nas últimas décadas, a popularização da técnica de Sanger permitiu a identificação de diversos genes associados a doenças monogênicas. No entanto, a manutenção desta metodologia na rotina diagnóstica vem se tornando difícil devido a diversos fatores, como o aumento do número de genes candidatos, o fato de algumas doenças apresentarem grande heterogeneidade genética e alguns genes candidatos serem muito extensos, sem claras regiões alvos (“hotspots”) para mutações. Portanto, novas metodologias de sequenciamento foram desenvolvidas visando o sequenciamento simultâneo de diversas regiões do genoma, com maior velocidade e menor custo (“sequenciamento de nova geração” ou *next generation sequencing* – NGS / sequenciamento paralelo em larga escala – SPLE). Desta forma, tornou-se possível que vários genes fossem analisados em uma única reação com baixo custo relativo, viabilizando o uso dessas novas técnicas de sequenciamento na rotina diagnóstica de diversas doenças. Antes das técnicas de SPLE, apesar dos diferentes genes implicados na etiopatogenia do HHI, o diagnóstico molecular era esclarecido em apenas cerca de 30% dos casos. Com as novas técnicas de sequenciamento genético essa porcentagem vem aumentando para até 50% ^(3, 15, 70).

Além disso, a expansão do conhecimento sobre as bases moleculares HHI, revelando novos genes associados a esta condição, permitiu a mudança do conceito do modelo mendeliano clássico como a única forma de herança genética para esta doença ^(14, 15). O avanço das técnicas de rastreamento genético permitiu a identificação de variantes em mais de um gene em pacientes afetados, colocando em questão o conceito prévio do

HHI como doença estritamente monogênica ⁽¹⁴⁾. O modelo de herança digênica ou oligogênica da deficiência da secreção de GnRH, bem como fatores epigenéticos ou ambientais poderiam contribuir para a variabilidade fenotípica e penetrância incompleta observadas em determinadas famílias (14, 16, 17).

Nas últimas décadas, a o Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ LIM42 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) desenvolveu uma linha de pesquisa caracterizada pelo estudo dos genes relacionados ao HHI congênito, incluindo *KAL1*, *FGF8*, *FGFR1*, *PROK2*, *PROKR2*, *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, *WDR11* e *HS6ST1* ⁽⁷⁾. Contamos com uma grande coorte de pacientes, bem caracterizados clinicamente, muitos deles sem causa genética definida. Atualmente, 260 pacientes já tiveram pelo menos um dos genes classicamente associados ao HHI congênito estudados pela técnica de Sanger, mas apenas 58 (22,3%) desses pacientes tiveram diagnóstico molecular definido. A porcentagem dos genes encontrados nos pacientes com diagnóstico molecular definido está representada na Tabela 2, sendo os genes *FGFR1* e *KAL1* os mais prevalentes.

Tabela 2 - Variantes moleculares identificadas no estudo de 260 pacientes com HHI por sequenciamento de Sanger

Gene	Pacientes estudados	Pacientes com mutação	Porcentagem
<i>KAL1 (ANOS1)*</i>	118	17	14,4%
<i>GNRHR#</i>	110	11	10,0%
<i>FGFR1</i>	199	18	9,0%
<i>PROKR2</i>	240	11	4,6%
<i>TACR3#</i>	73	3	4,1%
<i>PROK2</i>	240	5	2,0%
<i>FGF8</i>	164	2	1,2%
<i>KISS1R#</i>	125	1	0,8%

Fonte: resultados do grupo dos estudos genéticos prévios relacionados ao HHI congênito. *pesquisado apenas nos pacientes com Síndrome de Kallmann, #pesquisado apenas nos pacientes com HHI normósmico. Observação: *KISS1*, *TAC3* e *GNRH1* foram estudados em pacientes HHI normósmico, mas nenhuma alteração foi identificada.

O atual projeto tem como principal objetivo o uso do sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) para a identificação de defeitos moleculares nos pacientes portadores de HHI congênito, identificação de uma segunda variante genética modulando o fenótipo em casos de herança oligogênica ou o achado de uma segunda variante em pacientes com mutações em heterozigose em genes classicamente associados à herança autossômica recessiva. Para tanto, foi elaborado um painel incluindo os genes já associados ao HHI, além de genes candidatos, selecionados por participarem de alguma via relacionada ao desenvolvimento e função do eixo gonadotrófico ou que foram identificados em fenótipos similares em modelos animais, mas que ainda não foram descritos em pacientes com HHI. Esse estudo visa ainda levar ao melhor entendimento da etiopatogenia do HHI, das vias regulatórias eixo gonadotrófico assim como ao maior esclarecimento do seu padrão de herança genética.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Rastreamento genético de uma coorte de pacientes portadores de HHI congênito utilizando técnica de sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE).

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1. Identificar variantes em genes já associados ao HHI em pacientes sem diagnóstico molecular definido.
- 2.2.2. Identificar um segundo defeito genético em pacientes com mutações que não explicam completamente o fenótipo, visando ampliar o entendimento do complexo mecanismo genético do hipogonadismo.
- 2.2.3. Atualizar a perfil genético da nossa coorte de pacientes com HHI.
- 2.2.4. Estabelecer a correlação entre o genótipo mutante e o fenótipo observado nesses pacientes e segregá-los entre os outros membros da família.

3 Métodos

3 MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram incluídos nesse estudo 130 pacientes com HHI congênito (39 mulheres e 91 homens, 55 com síndrome de Kallmann e 75 com HHI normósmico), sendo 26 (20%) casos familiares. As demais características clínicas desses pacientes estão listadas na Tabela 3 no Anexo 1. A maioria dos pacientes (107 dos 130) já havia sido estudada por sequenciamento de Sanger para pelo menos um gene associado ao HHI congênito, incluindo *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROK2*, *PROKR2*, *GNRHR*, *GNRH1*, *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3* e *WDR11*.

Os pacientes foram selecionados no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). Contamos também com a colaboração de colegas para o envio de casos do Hospital das Clínicas da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), assim como casos isolados enviados por colegas endocrinologistas de outros serviços, ampliando nossa casuística. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP (número: 1.175.278). Todos os pacientes ou seus responsáveis assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 2) para participação na pesquisa.

3.1.1 Critérios clínicos para inclusão dos pacientes

Utilizamos os seguintes critérios para a seleção dos pacientes:

- a) desenvolvimento de caracteres sexuais secundários ausente ou incompleto após os 16 anos de idade nas meninas e 18 anos de idade nos meninos;

- b) concentrações de esteroides sexuais (estradiol ou testosterona) abaixo do limite inferior da normalidade estabelecido pelo método utilizado;
- c) concentrações de LH e FSH baixas ou normais em relação limite inferior da normalidade estabelecido pelo método utilizado;
- d) ausência de outras deficiências hormonais hipofisárias associadas;
- e) ressonância magnética da região hipotalâmica-hipofisária sem anormalidades.

A presença de anormalidades olfatórias foi avaliada empregando-se os testes olfatórios desenvolvidos pela Universidade da Pensilvânia (UPSIT)⁽⁵⁴⁾. Também foram incluídos na casuística pacientes com alterações neurológicas associadas, como ataxia e desmielinização, assim como pacientes com outras características sindrômicas, como déficit cognitivo, malformações físicas e dismorfismos, sem caracterizar uma síndrome genética conhecida.

3.2 Sequenciamento genético

Utilizamos para o sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) um painel de genes. Inicialmente, foram selecionados 30 genes para o painel, identificados através de revisão da literatura, a maioria já descritos em associação ao HHI. Dentre os genes incluídos no painel inicial, quatro não apresentavam relatos na literatura de associação ao HHI e foram selecionados por estarem envolvidos na ontogênese e regulação do eixo gonadotrófico, sendo eles *MKRN3*, *EBF2*, *MSX1*, *OTX2*, considerados genes candidatos, pela possibilidade de descrições inéditas associadas ao HHI. O gene *MKRN3* está envolvido na patogênese da puberdade precoce dependente de gonadotrofinas⁽⁵⁵⁾. Os genes *EBF2*, *OTX2* e *MSX1* são

fatores de transcrição que estão envolvidos na migração dos neurônios secretores de GnRH, expressão do GnRH e expressão do GnRHR, respectivamente ⁽⁵⁶⁻⁵⁸⁾. Com esse primeiro painel de 30 genes (Tabela 4), foram sequenciados doze pacientes como estudo piloto, no qual foram incluídos seis pacientes com diagnóstico molecular definido (controles positivos), sendo que todos os controles positivos foram adequadamente identificados pelo SPLE. Posteriormente, por novos dados publicados na literatura, foram acrescentados ao painel mais seis genes, sendo quatro já descritos associados ao HHI (*GHSR*, *DMXL2*, *IGSF10* e *PNPLA6*) e mais dois genes candidatos (*IGSF1* e *IGFALS*), completando o painel final com o total de 36 genes, demonstrados na Tabela 5. A justificativa para a inclusão do gene *IGSF1* como candidato foi a publicação de artigos relacionando mutações nesse gene com variações nos níveis de testosterona, aumento do tamanho testicular e atraso na idade da menarca dos pacientes com mutações ^(59, 60). A inclusão do gene *IGFALS* foi devido a descrição de mutações em pacientes com atraso puberal e baixa estatura ⁽⁸⁴⁾. Após o estudo piloto inicial, com o novo painel ampliado, foi feito o sequenciamento de mais 118 pacientes.

Tabela 4 - Painel de genes do estudo piloto

Genes		
<i>KAL1</i>	<i>PROKR2</i>	<i>POLR3B</i>
<i>FGFR1</i>	<i>CHD7</i>	<i>FGF17</i>
<i>FGF8</i>	<i>SEMA3A</i>	<i>FLRT3</i>
<i>GNRH1</i>	<i>SEMA7A</i>	<i>SPRY4</i>
<i>GNRHR</i>	<i>IL17RD</i>	<i>SOX10</i>
<i>TAC3</i>	<i>HS6ST1</i>	<i>NSMF</i>
<i>TACR3</i>	<i>RNF216</i>	<i>MKRN3</i>
<i>KISS1</i>	<i>DUSP6</i>	<i>MSX1</i>
<i>KISS1R</i>	<i>WDR11</i>	<i>OTX2</i>
<i>PROK2</i>	<i>POLR3A</i>	<i>EBF2</i>

Tabela 5 - Painel de genes ampliado

Gene	GeneCards ID	Referência
<i>KAL1</i>	GC0XM008528	Legouis et al. 1991
<i>FGFR1</i>	GC08M038411	Dodé et al. 2003
<i>FGF8</i>	GC10M101770	Falardeau et al. 2008
<i>GNRH1</i>	GC08M025419	Bouligand et al. 2009
<i>GNRHR</i>	GC04M067737	DeRoux et al. 1997
<i>TAC3</i>	GC12M057009	Topaloglu et al. 2009
<i>TACR3</i>	GC04M103586	Topaloglu et al. 2009
<i>KISS1</i>	GC01M204190	Topaloglu et al. 2012
<i>KISS1R</i>	GC19P000917	Seminara et al. 2003
<i>PROK2</i>	GC03M071820	Dodé et al. 2006
<i>PROKR2</i>	GC20M005301	Dodé et al. 2006
<i>CHD7</i>	GC08P060678	Kim et al. 2008
<i>FGF17</i>	GC08P022042	Tornberg et al. 2011
<i>SEMA3A</i>	GC07M083955	Young et al. 2012
<i>SEMA7A</i>	GC15M074409	Känsäkoski et al. 2014
<i>IL17RD</i>	GC03M057124	Miraoui et al. 2013
<i>HS6ST1</i>	GC02M128236	Tornberg et al. 2011
<i>RNF216</i>	GC07M005661	Margolin et al. 2013
<i>DUSP6</i>	GC12M089347	Miraoui et al. 2013
<i>WDR11</i>	GC10P120851	Kim et al. 2010
<i>POLR3A</i>	GC10M077969	Timmons et al. 2006
<i>POLR3B</i>	GC12P106357	Saitsu et al. 2011
<i>FLRT3</i>	GC20M014322	Miraoui et al. 2013
<i>SPRY4</i>	GC05M142272	Miraoui et al. 2013
<i>SOX10</i>	GC22M039963	Pingault et al. 2013
<i>NSMF</i>	GC09M137447	Miura et al. 2004
<i>MKRN3</i>	GC15P024015	Abreu et al. 2013
<i>MSX1</i>	GC04P004861	Van Den Boogaard et al. 2000
<i>OTX2</i>	GC14M056799	Diaczok et al. 2008
<i>EBF2</i>	GC08M025841	Hackel et al. 2005
<i>GHSR</i>	GC03M172443	Howard et al. 1996
<i>IGSF1</i>	GC0XM131273	Sun et al. 2012
<i>DMXL2</i>	GC15M051447	Tata et al. 2014
<i>IGSF10</i>	GC03M151425	Howard et al. 2016
<i>IGFALS</i>	GC16M001790	Domene et al. 2004
<i>PNPLA6</i>	GC19P007534	Topaloglu et al. 2014

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

3.3 Extração do DNA genômico de linfócitos periféricos

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos pacientes selecionados e seus familiares quando disponíveis. Quinze mL de sangue venoso foram colhidos em ácido etileno diaminotetracético (EDTA 25 mM) e submetidos ao método de extração com NaCl saturado ⁽⁶¹⁾. Esta técnica possui duas etapas: na primeira é feita a lise de hemácias (NH₄Cl 114 mM; NH₄HCO₃ 1 mM) e na segunda etapa a lise de leucócitos (NaCl 150 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM pH 8,0) utilizando solução de dodecilsulfato de sódio (SDS 10%) e proteinase K (10 mg/mL). A precipitação do DNA foi feita com etanol absoluto gelado seguida de lavagem com etanol 70%, finalizando com sua suspensão em TE (10:0,1) (10 mM TrisHCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA pH 8,0). A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro (Biophotometer, Eppendorf, Alemanha) no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade densidade óptica 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001M pH 8,0) contendo o corante SYBR Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) na concentração de 1x e observadas em um transiluminador com luz ultravioleta a fim de verificar sua integridade. Como padrões de massa foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ HindIII (250 ng/µL) e 20 ng do λ DNA (10 ng/µL).

3.4 Elaboração do painel para o sequenciamento paralelo em larga escala

O painel customizado para o sequenciamento paralelo em larga escala dos genes selecionados relacionados ao HHI foi elaborado a partir do *software* Agilent SureDesign 2.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA,

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

O sequenciamento envolve três etapas fundamentais:

1) Confeção de bibliotecas de fragmentos de DNA

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

2) Amplificação clonal

Nesta etapa, as bibliotecas, com seus fragmentos de DNA ligados aos adaptadores, foram depositadas em uma lâmina especial, denominada *flowcell*, em cuja superfície encontram-se fixados de maneira paralela duas espécies de oligonucleotídeos. Estes são complementares às moléculas adaptadoras acopladas às extremidades dos fragmentos de DNA da biblioteca. Após a ligação dos fragmentos aos seus oligonucleotídeos

complementares presentes na superfície da *flowcell*, acontece a amplificação, neste momento cada molécula é amplificada várias vezes através de uma reação conhecida como reação em cadeia da polimerase (PCR) em ponte (*bridge PCR*). Ao final desta etapa, são gerados agregados de clones (*clusters*) de moléculas de DNA idênticas à molécula original, ligadas covalentemente à superfície da *flowcell*.

3) Sequenciamento

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

As sequências das regiões codificadoras foram analisadas na plataforma de SPLE NextSeq da Illumina (Illumina, Inc, San Diego, CA, EUA) no laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) do Programa Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM), da Faculdade de Medicina da USP. Para maior acurácia, as sequências foram lidas na configuração *paired-end* (quando as duas extremidades da molécula do DNA são lidas), permitindo leituras de fragmentos de até 200 pares de base.

3.5 Análise de bioinformática

O grande volume de dados gerados pelos sequenciadores de nova geração requer o emprego de ferramentas de bioinformática sofisticadas, a fim de que as poucas alterações genéticas de interesse sejam identificadas em meio a centenas ou milhares de polimorfismos, não relacionados ao fenótipo. Este processo é realizado por diversos programas de computador que funcionam em cadeia (*pipelines*).

Para esta análise contamos com a colaboração do Dr. Antonio Marcondes Lerário, da Universidade de Michigan. Inicialmente, temos os dados brutos gerados pelo sequenciador (as sequências propriamente ditas - arquivo FASTQ, que contém as sequências de leitura dos genes, as *reads*, dispostas aleatoriamente). O FASTQ é um formato padrão para representação biológica das sequências de dados ⁽⁶²⁾. Este formato é uma representação das sequências baseada em texto e foi desenvolvido para incorporar os escores de qualidade para facilitar a avaliação da qualidade da sequência, sendo amplamente aceito como o formato padrão para dados brutos de SPLE ⁽⁶²⁾. Em sequência, as principais etapas da análise dos dados são:

- a) alinhamento das leituras ao genoma de referência, versão 19 do genoma humano (*Genome Reference Consortium human genome 37 - GRCh37*, Fev2009), com alta eficiência e precisão, utilizado o programa BWA (<http://bio-bwa.sourceforge.net/bwa.shtml>) ⁽⁶³⁾; gerando no final um arquivo BAM (este arquivo, gerado pelo *software* de alinhamento, contém as leituras dos genes (*reads*) alinhados ao genoma humano);
- b) recalibragem das sequências alinhadas o que consiste no realinhamento de forma contextualizada. Nesta etapa, é utilizado o *software* GATK (<http://www.broadinstitute.org/gatk/>) ⁽⁶⁴⁾;
- c) genotipagem, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos do genoma da amostra (as bases de

cada par do cromossomo para uma dada posição) novamente utilizando o *software* GATK, que identifica SNVs (*single nucleotide variants*) e *Indels* (inserções e deleções);

- d) recalibragem da genotipagem, nesta fase, falsos positivos são detectados e sinalizados a fim de que sejam descartados do processo, utilizando a ferramenta GATK.

Em seguida, são listadas todas as alterações divergentes da sequência referência (*Variant Call Format* - VCF), surgindo milhares de alterações, sendo inviável a verificação manual de cada uma delas. Por isso, é feito um processo automatizado de filtragem destas alterações através do cruzamento de informações com bancos de dados públicos e com emprego de algoritmos de predição por análise computacional (predição *in silico*) do impacto funcional de determinadas variantes, utilizando-se o programa ANNOVAR⁽⁶⁵⁾. *Copy number variation* (CNVs) identificados não são recalibrados.

3.6 Critérios para seleção das variantes candidatas

A partir das variantes genéticas encontradas, foram utilizados os seguintes critérios para priorização das variantes candidatas:

- a) seleção de variantes com frequência menor que 1% nas bases populacionais 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>), Exome Aggregation Consortium – ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>) e Genome Aggregation Database – GnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org>);
- b) seleção de variantes localizadas em éxons e sítios de *splicing*;
- c) exclusão das variantes sinônimas;
- d) análise *in silico* do efeito da variante sobre proteína: foram selecionadas somente as variantes com escore GERP (*genomic*

evolutionary rate profiling) > 2,5 (o que prediz conservação do aminoácido avaliado), escore CADD - *Combined Annotation Dependent Depletion* (<http://cadd.gs.washington.edu>) > 10 e com predição de serem deletérias em pelo menos dois sites de predição dentre os quais:

- SIFT – *Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein* (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html);
- PolyPhen2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>);
- Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org>);
- Mutation Assessor (<http://mutationassessor.org/r3/>);
- FATHMM – *Functional Analysis through Hidden Markov Models* (<http://fathmm.biocompute.org.uk>);
- PROVEAN – *Protein Variation Effect Analyzer* (<http://provean.jcvi.org/index.php>).

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

Após a identificação das variantes possivelmente patogênicas, foi realizada a pesquisa de relatos prévios de ocorrência destas variantes no site Ensembl (<http://www.ensembl.org>) e no *The Human Gene Mutation Database* (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Todas essas variantes foram também pesquisadas no banco de dados de 609 exomas de idosos brasileiros saudáveis presentes no Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) ⁽⁶⁶⁾ assim como no banco de dados interno (SELA) composto pelo exoma de 774 alelos. As variantes foram classificadas quanto a patogenicidade de acordo com os critérios da *American College of Medical Genetics* (ACMG) ⁽⁶⁷⁾ descritos no Anexo 3. Finalizamos a avaliação das variantes realizando uma classificação final de acordo com nossa interpretação sobre o impacto da variante no fenótipo dos pacientes.

3.7 Confirmação das variantes encontradas

As variantes identificadas foram confirmadas e submetidas a segregação familiar, nos casos em que o DNA dos familiares estava disponível, pelo sequenciamento por técnica de Sanger ⁽⁴³⁾. Inicialmente, o DNA genômico foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se pares de oligonucleotídeos específicos para o gene em questão, seguido de sequenciamento automático. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL. Para cada reação foram utilizados 100 a 200 ng de DNA genômico, 100 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 1,0 U de enzima Go Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, EUA) e 5,0 µL do tampão 5x Green Flexi Reaction Buffer (Promega, Madison, WI, EUA). A reação de amplificação foi realizada no termociclador Veriti[®] 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

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

3.8 Extração de RNA e síntese de cDNA e reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR) do gene *GNRH1*

O RNA foi extraído a partir de leucócitos de sangue periférico do paciente afetado, seus pais e sua irmã não afetados utilizando-se o reagente Trizol[®] de acordo com as instruções do fabricante (protocolo no Anexo 4). A síntese de cDNA total foi realizada por transcrição reversa utilizando-se o produto comercial QuantiTect Reverse Transcription Kit (*Qiagen, Germany, 2009*), de acordo com as instruções do fabricante. Foram reversamente transcritos 1 µg de RNA total de cada amostra, utilizando-se oligonucleotídeos randômicos fornecidos pelo fabricante.

O cDNA do gene *GNRH1* foi amplificado por PCR utilizando-se os seguintes pares de oligonucleotídeos, localizados nos éxons 1 e 2, respectivamente:

GNRH1cDNA-f: 5' – GCC AGC AAG TGT CTC TGA GT - 3'

GNRH1cDNA-r : 5' – TGT GCA ACT TGG TGT AAG GA - 3'

A região amplificada pelos oligonucleotídeos compreendia a região alvo de interesse do RNA mensageiro (mRNA), entre os éxons 1 e 2. O tamanho da sequência a ser amplificada era de 556 pb. A reação foi realizada num volume final de 25 µL utilizando-se 100-200 ng de cDNA, 100 µmol de dNTPs, 5 pmol de cada oligonucleotídeo, 5 µL tampão de PCR 1x e 1,25 U de enzima Taq polimerase. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio e visualizado por transiluminação em luz ultravioleta.

4 Resultados

4 RESULTADOS

Nos 130 pacientes estudados, a cobertura do SPLE variou entre 93 a 973 leituras. O menor índice de cobertura foi de 98% das regiões-alvo com cobertura superior a 20 vezes, sendo que a grande maioria dos pacientes, tiveram cobertura superior a 50 vezes em 99% das regiões-alvo.

Os critérios de seleção de variantes, descritos no item 3.6. da seção Métodos, buscaram identificar as variantes que potencialmente seriam patogênicas, esclarecendo o diagnóstico molecular dos pacientes. Nessa filtragem inicial, encontramos 77 pacientes (59,2%) portadores de variantes com potencial de patogenicidade em um ou mais genes, perfazendo um total de 104 variantes, sendo 89 distintas, potencialmente patogênicas, identificadas em 29 genes.

Das 89 variantes distintas inicialmente identificadas, 84 (94,5%) encontravam-se em genes classicamente associados ao HHI ou com pelo menos uma descrição prévia na literatura em associação com o HHI. Cinco variantes foram identificadas em genes sem relatos prévios de associação com o HHI: *IGSF1*, *OTX2*, *EBF2* e duas variantes no gene *IGFALS*. Os genes *FGFR1*, *CHD7* e *KAL1* foram os com maior número de variantes. Dados sobre cada variante, suas prevalências populacionais, predição *in silico* e a interpretação final do papel da variante no fenótipo dos pacientes, estão expostos na Tabela 6 no Anexo 5.

Após a filtragem inicial, foi realizada uma análise individualizada de cada variante inicialmente identificada. Para tanto, foram aplicados os critérios do ACMG⁽⁶⁷⁾, avaliados os dados de segregação familiar e o padrão de herança esperado para cada gene (as variantes em genes com padrão de herança autossômica recessiva deveriam estar em homozigose ou heterozigose composta para serem consideradas causadoras da doença). Depois dessa análise mais refinada, foram mantidos 41 pacientes com

variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas (Figura 2) (Tabela 6). As demais variantes, inicialmente incluídas, foram classificadas como de significado incerto (*Variant of Undetermined Significance* – VUS), provavelmente benignas ou benignas. Considerando todos os pacientes identificados com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, obtivemos uma porcentagem de pacientes com provável diagnóstico molecular definido de 31,5% (41 pacientes em 130).

Fonte: Ilustração do próprio autor

Figura 2 – Fluxograma da classificação das variantes identificadas

Considerando somente as variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, as maiores prevalências nessa coorte foram dos genes *FGFR1*, *CHD7* seguido por *KAL1* (Tabela 7).

Tabela 7 - Variantes patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas em 41 pacientes com HHI congênito

Gene	n	%
<i>FGFR1</i>	11	8,5
<i>CHD7</i>	9	6,9
<i>KAL1</i>	6	4,6
<i>GNRHR</i>	3	2,3
<i>TACR3</i>	3	2,3
<i>FGF8</i>	2	1,5
<i>IGSF10</i>	2	1,5
<i>FGF17</i>	1	0,8
<i>FLRT3</i>	1	0,8
<i>GNHR1</i>	1	0,8
<i>IGSF1</i>	1	0,8
<i>IL17RD</i>	1	0,8
<i>NSMF</i>	1	0,8
<i>OTX2</i>	1	0,8
<i>PROK2</i>	1	0,8
<i>SOX10</i>	1	0,8
<i>SPRY4</i>	1	0,8
<i>TAC3</i>	1	0,8
<i>WDR11</i>	1	0,8

n, número de pacientes com a variante

4.1 Genes clássicos do HHI

Nesse grupo consideramos os genes *KAL1*, *GNRHR*, *GNRH1*, *FGFR1*, *FGF8*, *TACR3*, *TAC3*, *KISS1R*, *KISS1*, *PROKR2* e *PROK2*. Nosso grupo já havia estudado esses genes por sequenciamento de Sanger e muitos pacientes com mutações previamente detectadas não foram incluídos no estudo atual, por já terem o diagnóstico molecular estabelecido.

KAL1

Mutações inativadoras foram identificadas no gene *KAL1* em seis homens portadores de síndrome de Kallmann (4,6%), três desses sendo casos familiares. Os seis pacientes apresentavam um fenótipo reprodutivo grave, hipogonadismo completo, com criptorquidia e micropênis. O paciente 5 era portador de uma mutação *nonsense* no *KAL1* (p.Trp462X) associada à uma variante classificada como provavelmente patogênica no *CHD7* (p.Arg1054Gln). A mutação p.Met1Val foi identificada no paciente 30 assim como em seu irmão com síndrome de Kallmann, demais familiares não afetados não possuíam a variante. Os outros quatro pacientes também eram portadores de mutações deletérias, sendo uma em sítio de *splicing* (c.1062+1G>T) e três *frameshifts* p.Ala30fs, p.E189fs e p.Leu544fs. O paciente 31 possuía o fenótipo adicional de palato ogival e retardo mental leve.

FGFR1/FGF8

Variantes no gene *FGFR1*, todas em heterozigose, foram identificadas em onze pacientes (8,5%), cinco com síndrome de Kallmann e seis com HHI normósmico. Cinco pacientes apresentavam variantes adicionais em um ou mais genes:

- paciente 11 (síndrome de Kallmann): *FGFR1* p.Gly97Ser, *CHD7* p.Thr2738Met, *WDR11* p.Met769Val e *EBF2* p.Thr217Met;

- paciente 15 (HHI normósmico e baixa estatura idiopática): *FGFR1* p.Pro28Leu, *IL17RD* p.Pro566Leu (homozigose), *IL17RD* p.Glu536fs e *DMXL2* p.Ser1724Leu;
- paciente 17 (HHI normósmico): *FGFR1* p.P286fs e *SPRY4* p.Ser241Tyr;
- paciente 18 (HHI normósmico): *FGFR1* p.Lys321fs, *IGSF10* p.Asp1802Val e *POLR3B* p.Ala309Gly.

O paciente 16, com síndrome de Kallmann, portador da variante p.Arg250Trp no *FGFR1*, apresentava o fenótipo adicional de agenesia de dois dentes, epilepsia, déficit cognitivo leve, hipoacusia unilateral e sincinesia bimanual. Os pacientes 19 e 23, com as variantes p.Ala343Val e p.Cys767Tyr, respectivamente, apresentavam também déficit auditivo.

Dois pacientes, 54 e 55 com HHI normósmico e síndrome de Kallmann, respectivamente, apresentavam variantes no gene *FGF8* (1,5%), sem variantes nos demais genes do painel. O paciente 55 possuía história familiar de atraso puberal e o fenótipo adicional de retardo mental leve.

PROK2/PROKR2

Variantes no sistema *PROK2/PROKR2* foram identificadas em oito pacientes (6,1%), sendo somente uma homozigose no gene *PROK2* (p.Gly100fs). Os dados desses pacientes, sendo seis com síndrome de Kallmann e dois com HHI normósmico, estão expostos na tabela 8. Somente o paciente 40, com a variante p.Glu39Lys na *PROKR2*, apresentava fenótipo adicional de palato ogival e cúbito valgo. Oligogenicidade foi identificada em três desses pacientes.

Tabela 8 - Variantes identificadas nos genes *PROK2* e *PROKR2*

ID	Sexo	Diagnóstico	Variantes <i>PROK2</i> / <i>PROKR2</i>	Segunda variante	Dados clínicos	Dados de segregação
40	M	SK	<i>PROKR2</i> p.Glu39Lys/WT		Palato ogival, cúbito valgo, micropênis	
41	M	SK	<i>PROKR2</i> p.Leu173Arg/WT	<i>WDR11</i> p.Gly1191Ser/WT	Pais consanguíneos, hipoplasia de bulbos olfatórios, micropênis	
42	F	SK	<i>PROKR2</i> p.Leu173Arg/WT		Hipoplasia de bulbos olfatórios	
6	M	SK	<i>PROK2</i> p.Gly100fs/p.Gly100fs	<i>CHD7</i> p.Tyr1325His/WT	Pais consanguíneos	
43	M	HHIn	<i>PROK2</i> p.Ile55X/WT	<i>WDR11</i> p.Val356Ile/WT	Micropênis	
44	M	HHIn	<i>PROK2</i> p.Ile55X/WT			
45	F	SK	<i>PROK2</i> p.Gly100fs/WT		Hipoplasia de bulbos olfatórios	Mãe saudável não apresenta a variante
46	M	SK	<i>PROK2</i> p.Pro111Gln/WT			

ID, identificação; SK, síndrome de Kallmann; HHIn, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normômico; F, feminino; M, masculino; WT, wild type

Outros genes classicamente associados ao HHI normósmico

Mutações bialélicas no gene *GNRHR* foram identificadas em três pacientes com HHI normósmico (2,3%) (Tabela 6). A variante p.Gln106Arg foi identificada em heterozigose em quatro pacientes, três com síndrome de Kallmann (pacientes 10, 26 e 27) e um com HHI normósmico (paciente 25), aqui considerada benigna por estar em heterozigose. Estudos funcionais prévios demonstraram que a variante p.Gln106Arg é parcialmente inativadora⁽¹⁸⁾, sendo comum em coortes de HHI e também identificada com uma frequência relativamente alta em controles no estado de heterozigose que, no entanto, não é suficiente para causar fenótipo de HHI.

Variantes no complexo *TAC3/TACR3* foram identificadas em seis pacientes portadores de HHI normósmico. Cinco pacientes apresentavam variantes no gene *TACR3* (3,8%), sendo duas em heterozigose. A variante p.Trp275X no gene *TACR3* foi recorrente, tendo sido identificada em quatro pacientes, duas vezes em heterozigose, uma em homozigose e uma em heterozigose composta (p.Leu147Phe/p.Trp275X). A paciente 8 apresentava uma mutação claramente deletéria em homozigose no gene *TAC3* (c.209-1G>C) associada a uma variante classificada como provavelmente patogênica no gene *CHD7* (p.Arg2418Gln). Nenhum paciente apresentava características clínicas adicionais. Dois pacientes com variantes em homozigose tinham pais consanguíneos (pacientes 8 e 36) e metade dos pacientes tinha história familiar de HHI ou atraso puberal. Três pacientes, 8, 36 e 37, possuíam uma segunda variante em outro gene: *CHD7* p.Arg2418Gln, *IGFALS* p.Pro42Leu e *POLR3B* p.Lys324Arg, respectivamente.

Nenhuma variante potencialmente patogênica foi identificada nos genes *KISS1* e *KISS1R*.

4.2 Gene *GNRH1*

Dois pacientes apresentaram variantes no *GNRH1*. A variante p.Glu47Asp foi identificada em heterozigose em uma paciente portadora de síndrome de Kallmann (paciente 53), sendo o gene *GNRH1* associado exclusivamente a HHI normósmico e com herança autossômica recessiva, essa variante foi considerada benigna.

A segunda variante foi identificada em homozigose em região de *splicing* (c.142-2A>C) em um paciente do sexo masculino portador de HHI normósmico (paciente 52), filho de pais consanguíneos (primos de primeiro grau). O paciente tinha histórico de criptorquidismo bilateral, sem outros estigmas fenóticos e sem história de familiares acometidos. A variante genética identificada é de uma troca de adenosina (A) por cistina (C) na região aceptora de *splicing*, localizada no final do primeiro íntron, duas bases antes do início do segundo éxon. A mesma variante foi identificada em heterozigose na irmã e nos pais do paciente, todos com história de desenvolvimento puberal normal.

Para predição de patogenicidade dessa variante, foi realizada a avaliação *in silico* utilizando dois sites de predição de mutações em região de *splicing*: *Human Splicing Finder Version 2.4.1* (<http://www.umd.be/HSF/>) e *NetGene2* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>), e em ambos a mutação foi predita como patogênica.

A partir desses dados iniciais partimos para a avaliação do impacto da variante encontrada na expressão do gene. O RNA foi extraído a partir de leucócitos do sangue periférico do paciente, de sua mãe e de um controle adulto com história de desenvolvimento puberal normal, e submetido a reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa (RT-PCR). A escolha dos leucócitos do sangue periférico foi feita a partir da verificação, por dados da literatura, da expressão do *GNRH1* nestas células ⁽⁶⁹⁾. A amplificação adequada foi verificada nas três amostras estudadas e os produtos de PCR foram sequenciados pelo método de Sanger. O resultado

da amplificação e do sequenciamento podem ser visualizados na Figura 3. Nota-se que o paciente, com a mutação em homozigose, teve um sítio de *splicing* alternativo quatro nucleotídeos após a região aceptora de *splicing* do éxon 2, levando à perda desses nucleotídeos e consequentemente à uma alteração da fase de leitura.

Fonte: foto do gel de agarose a 1% e do sequenciamento automático.

Figura 3 - Amplificação e sequenciamento das amostras

4.3 Gene *CHD7*

No gene *CHD7*, foram identificadas 12 variantes em 14 pacientes não relacionados (10,8%), seis com síndrome de Kallmann e oito com HHI normósmico, todas em heterozigose (Tabela 6). Destes pacientes, cinco tinham fenótipos adicionais: o paciente 3 apresentava surdez unilateral e rim esquerdo de tamanho reduzido; o paciente 9 apresentava assimetria corporal e surdez unilateral; o paciente 10 apresentava agenesia de oito dentes, palato ogival, ectasia pielocalicial e as pacientes 7 e 14 apresentavam palato ogival e fenda palatina, respectivamente. Os demais pacientes não apresentavam alterações auditivas, dismorfismo em orelhas ou algum outro fenótipo característico da síndrome de CHARGE (Tabela 9)⁽⁶⁸⁾. Dos pacientes com variantes no gene *CHD7*, sete apresentavam oligogenicidade com variantes raras em outros genes (que serão descritas a frente na seção sobre oligogenicidade). O DNA de um familiar de primeiro grau não afetado de quatro pacientes estava disponível para análise de segregação. As variantes p.Ala2259Thr e p.Leu2806Val foram identificadas também nos familiares não afetados dos pacientes 7 e 14, respectivamente, sendo consideradas benignas. A variante p.734_735del, presente no paciente 4, por estar presente no banco de dados interno (SELA) foi considerada VUS.

Tabela 9 - Variantes no gene CHD7

ID	Sexo	Dx	Variante CHD7	Variante 2	Variante 3	História familiar	Dados clínicos e exames de imagem	Dados de segregação
1	F	HHIn	p.Gly204Val	FGFR1 p.Arg609X				
2	M	HHIn	p.Pro653Leu					
3	M	HHIn	p.Ser699Gly				Surdez neurosensorial E, rim E de tamanho reduzido, micropênis e criptorquidismo bilateral	
4	M	HHIn	p.734_735del				Micropênis, criptorquidismo bilateral	
5	M	SK	p.Arg1054Gln	KAL1 p.Trp462X			Criptorquidismo bilateral. Bulbos olfatórios atróficos na RM	
6	M	SK	p.Tyr1325His	PROK2 p.Gly100fs (homozigose)		1 irmão com SK	Pais consanguíneos Micropênis Bulbos olfatórios diminuídos na RM	Irmão com SK tem a mesma variante
7	F	HHIn	p.Ala2259Thr	IGSF10 p.Gly709Val			Palato ogival	Mãe não acometida tem a mesma variante
8	F	HHIn	p.Arg2418Gln	TAC3 c.209-1G>C (homozigose)				
9	M	SK	p.Gly2655fs				Assimetria corporal, surdez E	
10	M	SK	p.2690_2692del	GNRHR p.Gln106Arg			Hipertrofia gengival, agenesia de 8 dentes, palato ogival, ectasia pielocalicial E	
11	M	SK	p.Thr2738Met	FGFR1 p.Gly97Ser	WDR11 p.Met769Val		Micropênis. Bulbos olfatórios diminuídos na RM	Pai não acometido não tem a variante
12	M	HHIn	p.Leu2806Val					
13	M	HHIn	p.Leu2806Val				Micropênis	
14	F	HHIn	p.Leu2806Val				Fenda palatina, hérnia umbilical	Mãe não acometida tem a mesma variante. Pai não acometido não tem a variante

ID, identificação; Dx, diagnóstico; SK, síndrome de Kallmann; HHIn, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico; F, feminino; M, masculino; RM, ressonância magnética; E, esquerda

4.4 Gene *IGSF10*

No gene *IGSF10*, identificamos seis variantes distintas em sete pacientes portadores de HHI normósmico (seis homens e uma mulher), sendo que um paciente apresentava duas variantes (heterozigose composta) e três pacientes portavam também variantes em mais um gene (Tabela 10). Em três pacientes o DNA de um familiar estava disponível para análise de segregação. A variante p.Asp1802Val estava presente no paciente 18 e em sua mãe não afetada, e pela ausência de segregação foi considerada benigna. As variantes p.Gly709Val e p.Ala2406Val, por estarem presentes no banco de dados ABrOM⁽⁶⁶⁾, foram consideradas de significado incerto (VUS). O paciente 49, portador de duas variantes no gene *IGSF10*, p.Asp2277Gly e p.Thr1538Ile, classificadas como provavelmente patogênica e VUS, respectivamente, e o paciente 47, portador da variante inativadora p.Gln433fs, ambos com HHI normósmico, apresentaram reversão do hipogonadismo, sendo no paciente 49 a duração da reversão de aproximadamente dois anos com posterior recaída e no paciente 47 iniciada há aproximadamente um ano e meio persistindo até o momento atual.

Tabela 10 - Variantes no gene *IGSF10*

ID	Sexo	Dx	Variante <i>IGSF10</i>	Variante 2	Variante 3	História familiar	Dados clínicos	Dados de segregação
7	F	HHIn	p.Gly709Val	<i>CHD7</i> p.Ala2259Thr			Palato ogival	Mãe não acometida não tem a variante
18	M	HHIn	p.Asp1802Val	<i>FGFR1</i> p.Lys321fs	<i>POLR3B</i> p.Ala309Gly		Micropênis	Mãe não acometida tem a variante
47	M	HHIn	p.Gln433fs				Criptorquidismo a direita, micropênis. Período de reversão do hipogonadismo iniciado em 2016	Mãe não acometida não tem a variante
48	M	HHIn	p.Gly709Val	<i>SPRY4</i> p.Ser259Phe				
49	M	HHIn	p.Asp2277Gly /p.Thr1538Ile				Micropênis, testículos retráteis. Período de reversão do hipogonadismo (de 2008 a 2015)	
50	M	HHIn	p.Asp1802Val					
51	M	HHIn	p.Ala2406Val			Pais com atraso puberal		

ID, identificação; Dx, diagnóstico; SK, síndrome de Kallmann; HHIn, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normósmico; F, feminino; M, masculino

4.5 Genes com poucas descrições no HHI e genes candidatos

IL17RD

No gene *IL17RD*, identificamos quatro variantes distintas em três pacientes (Tabela 6). O paciente 15, portador de HHI normósmico esporádico associado a baixa estatura idiopática, apresentou as variantes p.Pro566Leu/p.Pro566Leu e p.Glu536fs/WT, sendo que seus pais, com desenvolvimento puberal normal, tinham ambos a variante p.Pro566Leu/WT e não possuíam a variante p.Glu536fs/WT, sendo este um achado *de novo*. A variante p.Ser668Phe foi identificada em heterozigose no paciente 57, portador de síndrome de Kallmann esporádica, tetralogia de Fallot, hipospádia e período de reversão do hipogonadismo. Esta variante, predita como patogênica na maioria dos sites de predição *in silico*, estava ausente nos bancos de dados internacionais analisados (ExAC, 1000 Genomes e GnomAD), mas presente no ABraOM ⁽⁶⁶⁾ (frequência 0,08%) e no banco de dados do SELA (frequência 0,13%), tendo sido também identificada na mãe não afetada do paciente, portanto classificada como benigna. A variante p.Pro293Leu foi identificada em heterozigose no paciente 56, portador de síndrome de Kallmann esporádica. Esta variante também estava presente no ABraOM ⁽⁶⁶⁾ (frequência 0,08%) e no SELA (frequência 0,26%), sendo classificada como VUS.

WDR11

No gene *WDR11*, foram identificadas cinco variantes missenses em heterozigose em quatro pacientes com síndrome de Kallmann e em um com HHI normósmico, sem peculiaridades fenotípicas. Quatro dessas variantes foram classificadas como VUS por estarem presentes nos bancos de dados ABraOM ⁽⁶⁶⁾ ou no banco de dados interno (SELA). Apenas a variante p.Ser531Cys, identificada no paciente 68, portador de síndrome de Kallmann foi considerada provavelmente patogênica. Os pacientes 11, 41 e 43, além da variante no *WDR11*, apresentavam variantes adicionais em outros genes (oligogenicidade) (Tabela 11).

FLRT3

Uma variante no gene *FLRT3* (p.Tyr274Cys), foi identificada em heterozigose em uma paciente portadora de HHI normósmico (paciente 59), associado a hipoacusia neurosenorial leve à esquerda. Essa variante foi considerada patogênica em todas as ferramentas de predição *in silico*, além de não ter sido identificada em banco de dados populacionais, sendo classificada como provavelmente patogênica. A paciente possuía também a variante em heterozigose p.Arg582Leu no gene *POLR3A*, considerada benigna.

FGF17

No gene *FGF17*, uma variante provavelmente patogênica (p.Val66Met) foi identificada em heterozigose no paciente 72 portador de HHI normósmico.

NSMF

No gene *NSMF* foram identificadas duas variantes em heterozigose. A variante p.Ala241Thr, provavelmente patogênica, estava presente no paciente 70 com síndrome de Kallmann, hipoacusia e assimetria corporal. A variante p.Val485Ile, considerada de significado incerto (VUS) por estar presente no ABraOM ⁽⁶⁶⁾, foi identificada na paciente 71 com HHI normósmico.

SPRY4

No gene *SPRY4* foram identificadas duas variantes em heterozigose em dois pacientes com HHI normósmico, ambas em digenicidade com outros genes. A variante p.Ser241Tyr, considerada benigna por estar presente em homozigose no banco de dados GnomAD, estava em digenicidade com uma variante patogênica no *FGFR1* (p.Pro286fs) (paciente 17). O paciente 48 apresentava uma variante provavelmente patogênica no *SPRY4* (p.Ser259Phe), associada a uma variante de significado incerto no *IGSF10* (p.Gly709Val) (Tabela 11).

SOX10 e OTX2

Na paciente 75, portadora de HHI normósmico, foram identificadas duas variantes nos genes *OTX2* (p.Ala55Ser) e *SOX10* (p.Val340Met) em digenicidade, ambas consideradas provavelmente patogênicas (Tabela 6).

IGSF1

Uma variante em heterozigose no gene *IGSF1* (p.Pro237Ala), provavelmente patogênica, foi identificada em heterozigose em uma paciente portadora de HHI normósmico (paciente 74), sem outras endocrinopatias, e com história do pai com atraso puberal.

Nos genes *POLR3A*, *POLR3B*, *SEMA3A*, *SEMA7A*, *PNPLA6*, *DMXL2*, *RNF216*, *IGFALS* e *EBF2* não foram identificadas variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas (Tabela 6). Dois pacientes portadores de variantes no *POLR3B* apresentavam uma segunda variante patogênica em outros genes (*FGFR1* e *TACR3*, nos pacientes 18 e 37, respectivamente), que já justificava o diagnóstico. A variante no gene *RNF216* apesar de rara e ausente no ABraOM ⁽⁶⁶⁾, estava presente em um paciente sem fenótipo de HHI de nosso banco de dados interno (SELA). No gene *IGFALS*, foram identificadas duas variantes em heterozigose, uma no paciente 36 (HHI normósmico), associada a uma variante *nonsense* em homozigose no *TACR3* (p.Trp275X), e uma em no paciente 73 (síndrome de Kallmann), sem alterações em outros genes, consideradas benigna e provavelmente benigna respectivamente. No gene *EBF2* foi identificada apenas uma variante de significado incerto (VUS) em um paciente com síndrome de Kallmann (paciente 11), que já apresentava variantes provavelmente patogênicas em oligogenicidade nos genes *FGFR1* e *CHD7*, que já justificariam o diagnóstico.

4.6 Achados oligogênicos

Dentre os 77 pacientes nos quais foram encontradas variantes potencialmente patogênicas, 17 (22%) apresentaram variantes em mais de um gene (Tabela 11). O gene mais comumente identificado em oligogenicidade foi o *CHD7*, seguido pelo *FGFR1*

Nos paciente 11 e 15 a terceira e quarta variantes foram classificadas como VUS e benignas, respectivamente. Nos pacientes 18, 36, 37, 48 e 59 as segundas variantes foram consideradas VUS ou benignas, e os pacientes 7, 41 e 43 portavam duas variantes cada, uma considerada VUS e a segunda considerada provavelmente benigna. Portanto, somente sete de todos os pacientes com oligogenicidade eram portadores de duas ou mais variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas. Mantivemos na classificação de oligogenicidade mesmo os pacientes com uma segunda variante considerada benigna ou VUS pela possibilidade de um papel sinérgico dessas variantes no fenótipo do paciente, variantes essas que isoladamente não justificariam o fenótipo de HHI (por isso benignas) mas de papel incerto quando em oligogenicidade.

Tabela 11 - Achados oligogênicos

ID	Sexo	Dx	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4	História familiar	Dados clínicos
1	F	HHIn	<i>FGFR1</i> p.Arg640X P	<i>CHD7</i> p.Gly204Val PP				Pais consanguíneos
5	M	SK	<i>KAL1</i> p.Trp462X P	<i>CHD7</i> p.Arg1054Gln PP				Criptorquidismo bilateral. Bulbos olfatórios diminuídos
6	M	SK	<i>PROK2</i> p.Gly100fs (homozigose) P	<i>CHD7</i> p.Tyr1325His PP			Um irmão com SK	Micropênis. Bulbos olfatórios diminuídos. Pais consanguíneos
7	F	HHIn	<i>IGSF10</i> p.Gly709Val*** VUS	<i>CHD7</i> p.Arg2259Thr# PB				Palato ogival
8	F	HHIn	<i>TAC3</i> c.209-1G>C (homozigose) P	<i>CHD7</i> c.7253G>A p.Arg2418Gln PP				Pais consanguíneos
10	M	SK	<i>CHD7</i> p.2690_2692del PP	<i>GNRHR</i> p.Gln106Arg B				Hipertrofia gengival, agenesia de 8 dentes, palato ogival, ectasia pielocalicial E
11	M	SK	<i>FGFR1</i> p.Gly97Ser* P	<i>CHD7</i> p.Thr2738Met* PP	<i>WDR11</i> p.Met769Val* VUS	<i>EBF2</i> p.Thr217Met VUS		Micropênis. Bulbos olfatórios diminuídos
15	M	HHIn	<i>FGFR1</i> p.Pro28Leu P	<i>IL17RD</i> p.Pro566Leu (homozigose) P	<i>IL17RD</i> p.Glu536fs P	<i>DMXL2</i> p.Ser1724Leu PB		
17	F	HHIn	<i>FGFR1</i> p.P286fs P	<i>SPRY4</i> p.Ser241Tyr P				
18	M	HHIn	<i>FGFR1</i> p.Lys321fs*** P	<i>IGSF10</i> p.Asp1802Val# B	<i>POLR3B</i> p.Arg309Gly# B			Micropênis

continua

Tabela 11 - Achados oligogênicos (conclusão)

ID	Sexo	Dx	Variante 1	Variante 2	Variante 3	Variante 4	História familiar	Dados clínicos
36	M	HHIn	<i>TACR3</i> p.Trp275X (homozigose) P	<i>IGFALS</i> p.Pro42Leu B				
37	M	HHIn	<i>TACR3</i> p.Gln336Arg (homozigose) P	<i>POLR3B</i> p.Lys324Arg B			Um irmão com atraso puberal	Micropênis
41	M	SK	<i>WDR11</i> p.Gly1191Ser VUS	<i>PROKR2</i> p.Leu173Arg PB				Micropênis. Bulbos olfatórios diminuídos. Pais consanguíneos
43	M	HHIn	<i>WDR11</i> p.Val356Ile VUS	<i>PROK2</i> p.Ile55X PB				Micropênis
48	M	HHIn	<i>SPRY4</i> p.Ser259Phe PP	<i>IGSF10</i> p.Gly709Val VUS				
59	F	HHIn	<i>FLRT3</i> p.Tyr274Cys PP	<i>POLR3A</i> p.Arg582Leu B				
75	F	HHIn	<i>SOX10</i> p.Val340Met PP	<i>OTX2</i> p.Ala55Ser PP				

ID, identificação; Dx, diagnóstico; SK, síndrome de Kallmann; HHIn, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normômico; F, feminino; M, masculino; P, variante patogênica; PP, variante provavelmente patogênica, VUS, variante de significado incerto; PB, variante provavelmente benigna; B, variante provavelmente não tem a variante, ** pai saudável tem a variante, *** mãe saudável não tem a variante, # mãe saudável tem a variante

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo, incluindo 130 pacientes, representa a maior casuística utilizando SPLE em pacientes com HHI congênito até o momento, quando comparado a estudos publicados na literatura. Esse dado demonstra a relevância desse trabalho, posto tratar-se de uma doença rara com poucos estudos com SPLE em coortes de pacientes com HHI ^(70, 90).

Utilizando um painel contendo 36 genes, sendo 30 previamente associados ao HHI congênito e seis genes candidatos (*EBF2*, *MSX1*, *MKRN3*, *OTX2*, *IGFALS* e *IGSF1*), foi possível estabelecer o diagnóstico molecular de 41 dos 130 pacientes estudados (31,5%). Como 107 desses pacientes já faziam parte da casuística estudada pelo método de Sanger, apenas 23 novos casos foram acrescentados à casuística anterior de 260 pacientes, perfazendo um total de 283 pacientes geneticamente estudados. Somando os resultados obtidos por Sanger e por SPLE, chegamos a 99 pacientes com diagnóstico molecular, aumentando a porcentagem de casos geneticamente esclarecidos de 22,3% para 35%. Recentemente, Cassatella, D. et al. realizaram sequenciamento exômico em 116 pacientes com HHI congênito e fizeram uma análise direcionada para 24 genes previamente relacionados ao HHI ⁽⁷⁰⁾. Variantes raras em pelo menos um dos genes estudados foram identificadas em 51% dos pacientes. Nesse estudo, foram selecionadas variantes com frequência menor que 1% e com predição de patogenicidade em pelo menos um site de predição *in silico* (SIFT ou PolyPhen-2). É importante destacar que em nosso estudo, utilizamos critérios mais rigorosos para a seleção de variantes (descritos no item 3.6. da seção de Métodos), o que incluiu avaliação da conservação do aminoácido trocado (escore GERP) e previsão de patogenicidade em pelo menos dois sites de predição *in silico*. Além disso, no caso de genes sabidamente com herança autossômica recessiva, consideramos o diagnóstico molecular esclarecido apenas na presença de mutações

bialélicas. Miraoui et al., analisando 17 genes em 350 indivíduos portadores de HHI congênito, identificaram mutações em 35% dos casos ⁽¹⁵⁾. Na literatura, a porcentagem de pacientes com mutações identificadas varia de 30 a 50% ^(14, 15, 70, 71). Essa variação pode ser atribuída a fatores como critérios de seleção das variantes, escolha dos genes estudados, técnica utilizada e tipo de resultado alcançado. Em alguns estudos são considerados nos resultados todos os pacientes com pelo menos uma mutação identificada, mesmo no caso de variantes monoalélicas em genes associados a herança autossômica recessiva, e não o diagnóstico molecular estabelecido. Em nosso estudo, utilizamos rigorosos critérios de seleção, o que pode justificar a porcentagem relativamente mais baixa de pacientes com diagnóstico molecular instituído.

5.1 Genes clássicos do HHI

As variantes identificadas nos genes *KAL1* e *FGFR1*, todas consideradas patogênicas, e em pacientes com fenótipo grave, confirmam a importância desses genes na etiopatogênese do HHI. Todas as variantes identificadas no gene *KAL1* foram em homens com síndrome de Kallmann, e todas com grave perda de função, reafirmando o clássico padrão de herança ligada ao X e a importância do *KAL1* na genética do HHI. As mutações inativadoras do gene codificador do receptor de GnRH (*GNRHR*) foram a primeira causa monogênica reconhecida de HHI normósmico ⁽¹⁸⁾. Mutações no *GNRHR* têm sido descritas com frequência de 40% entre os pacientes com HHI normósmico familiar e de aproximadamente 15% nos pacientes com a forma esporádica da doença, sendo considerada a causa mais frequente de HHI com herança autossômica recessiva ⁽¹⁰⁴⁾. Em nosso trabalho, o *GNRHR* foi responsável pelo diagnóstico molecular de 4% (3 de 75 pacientes) dos pacientes com HHI normósmico, sendo o quarto gene mais frequente na casuística total.

Todos os genes considerados clássicos do HHI (*KAL1*, *GNRHR*, *GNRH1*, *FGFR1*, *FGF8*, *TACR3*, *TAC3*, *KISS1R*, *KISS1*, *PROKR2* e *PROK2*) já haviam sido vastamente estudados em nossa casuística por meio do sequenciamento de Sanger. Os achados do presente estudo confirmam nossos resultados prévios (Tabela 2) e os dados publicados na literatura internacional, onde os genes mais comumente afetados em coortes com HHI são *KAL1*, *GNRHR* e *FGFR1* ^(3, 26, 28, 31, 72, 73).

Mutações bialélicas e patogênicas no complexo *TAC3/TACR3* foram identificadas em 3% dos pacientes, todos com HHI normósmico, também em acordo com os conhecimentos prévios da literatura. Nenhuma mutação foi identificada nos genes *KISS1/KISS1R*, e considerando toda a nossa casuística, incluindo a estudada previamente por Sanger, temos apenas um paciente, com HHI normósmico, portador de uma mutação inativadora no gene *KISS1R*. Esses dados confirmam que mutações nesses genes são bastante raras, ao contrário da impressão inicial de que mutações no *KISS1R* estariam presentes em cerca de 5% dos casos de HHI normósmico ⁽¹⁰⁵⁾. Mutações no *KISS1* por sua vez são extremamente raras, com apenas uma descrição na literatura associada ao HHI ⁽¹⁹⁾.

Muita discussão existe sobre o padrão de herança do gene *PROK2* e do gene codificador de seu receptor *PROKR2*. Há descrições considerando que variantes em heterozigose nesses genes poderiam levar ao fenótipo de HHI ^(74, 75), e também relatos sugerindo que o fenótipo poderia ser mais grave nas variantes bialélicas da *PROK2* ou *PROKR2* ⁽⁷⁶⁾. No entanto, nosso grupo demonstrou em trabalhos anteriores, que as mutações em heterozigose nesse gene não são suficientes para causar o fenótipo de HHI ⁽⁷⁷⁾. Dentre os oito pacientes identificados com variantes no sistema *PROK2/PROKR2*, apenas um (paciente 6) apresentava uma variante bialélica, justificando o diagnóstico molecular deste paciente. Nós classificamos as variantes em heterozigose como provavelmente benignas por considerar que esses genes apresentam padrão de herança autossômica recessiva ⁽⁷⁷⁾. Alguns grupos de pesquisa internacionais, incluem nos resultados variantes em heterozigose nos genes

PROK2/PROKR2, e isso pode, eventualmente, justificar a porcentagem maior de resultados moleculares de algumas publicações. Em duas ocasiões, nos pacientes 41 e 43, havia oligogenicidade na *PROKR2* e *PROK2* com o gene *WDR11*, variantes p.Gly1191Ser e p.Val356Ile, respectivamente. Nessa situação, ambas as variantes no gene *WDR11* foram consideradas VUS e as no sistema *PROK2* e seu receptor consideradas provavelmente benignas por estarem em heterozigose. Com os conhecimentos atuais, não é possível estabelecer se a combinação dessas alterações em genes diferentes pode exercer um papel sinérgico na patogênese do HHI congênito.

5.2 Gene *GNRH1*

O gene *GNRH1* persiste como causa rara de HHI, apesar dos esforços de diversos grupos na tentativa de identificar mutações nesse gene (Figura 4) ^(46, 47, 79). Identificamos uma nova mutação em homozigose (c.142-2A>C), localizada em região acceptora de *splicing*, no paciente 52. A identificação da mesma variante em heterozigose nos pais e irmã não afetados do paciente confirma o padrão de herança autossômica recessiva prevista para o *GNRH1*. A análise *in silico* sugeriu elevada probabilidade da variante ser deletéria por produzir um produto de transcrição anormal, a qual foi comprovada por RT-PCR do RNA do paciente. A mutação c.142-2A>C leva a uma alteração na janela de leitura iniciada no éxon 2, resultando em um *stopcodon* prematuro no sétimo códon do éxon 2, sendo a consequência provável desta alteração a produção de uma proteína truncada. A mutação não se localiza na região do gene que codifica o decapeptídeo GnRH, e sim, na região que codifica o peptídeo associado ao GnRH, denominado *GnRH-associated peptide* (GAP). Curiosamente, essa região corresponde à mesma que é perdida no modelo animal natural de deficiência de GnRH, o camundongo *hpg* ⁽⁸⁰⁾. A região GAP do pré-pró-hormônio GnRH, que a princípio, foi erroneamente considerada importante para regulação da

liberação da prolactina, ainda não tem função clara definida ⁽⁸⁰⁾. No camundongo *hpg*, que perde os éxons que codificam essa mesma região, já foi demonstrado que a transcrição do *GNRH1* ocorre normalmente, no entanto não ocorre a tradução. Esse achado inédito na região descrita (Figura 4), com papel desconhecido, nos traz a oportunidade de esclarecer a importância funcional da região GAP, que compreende uma extensa porção do pré-pró-hormônio do GnRH, e é um resultado com bastante relevância desse estudo, dado a raridade das descrições de mutações nesse gene.

Fonte: Ilustração do próprio autor.

Figura 4 - Mutações descritas no gene *GNRH1*

5.3 Gene *CHD7*

Em nossos resultados, destaca-se a grande proporção de variantes identificadas no gene *CHD7*, representadas na Tabela 9. É importante destacar que o *CHD7* ainda não havia sido estudado na nossa coorte pelo método de Sanger, e a extensão deste gene (38 éxons) traz a dificuldade prática do seu estudo por essa metodologia. Esse dado certamente influenciou na maior prevalência de variantes identificadas nesse gene (viés de seleção) e representa um exemplo prático das vantagens do SPLE em

relação ao sequenciamento tradicional de Sanger. O gene *CHD7* codifica uma proteína de ligação ao DNA do tipo cromodomínio helicase (*chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7*). É expresso no epitélio olfatório, hipotálamo e hipófise, e tem papel no desenvolvimento neuronal do bulbo olfatório e neurônios de GnRH⁽³⁰⁾. O *CHD7* foi, inicialmente, descrito associado à síndrome CHARGE (OMIM 214800)⁽³⁰⁾ onde mutações em heterozigose têm sido identificadas em aproximadamente 60% a 70% dos casos, ocorrendo na maioria das vezes na forma esporádica⁽³⁰⁾. O estudo pioneiro do *CHD7* em pacientes com HHI foi realizado por Kim et al. onde avaliaram a presença de mutações nesse gene em 197 pacientes com HHI normósmico e síndrome de Kallmann, sem o fenótipo de síndrome CHARGE⁽⁷⁸⁾, encontrando sete mutações em heterozigose no *CHD7*, a maioria missense⁽³⁰⁾. Até o momento, mutações no *CHD7* estão descritas com prevalência de aproximadamente 7% nos pacientes com síndrome de Kallmann, no entanto, quando associadas ao fenótipo de surdez são encontradas em aproximadamente 40% dos pacientes⁽³⁾. Em nosso estudo, dos 14 pacientes com variantes no *CHD7* inicialmente identificadas, após análise de todos os dados em conjunto, consideramos que nove (6,9%) apresentavam variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas: p.Gly204Val, p.Pro653Leu, p.Ser699Gly, p.Arg1054Gln, p.Tyr1325His, p.Arg2418Gln, p.G2655fs, p.2690_2692del e p.Thr2738Met. Dentre as variante consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas, o *CHD7* correspondeu ao gene com a segunda maior prevalência de variantes identificadas, correspondendo a 18,7% do total dessas variantes (Tabela 6). Cinco desses pacientes tiveram variantes identificadas também em um segundo gene, que isoladamente, já justificariam o fenótipo de HHI (*FGFR1* p.Arg609X/WT; *KAL1* p.Trp462X; *PROK2* p.Gly100fs/p.Gly100fs; *TAC3* c.209-1Gly>Cys/c.209-1Gly>Cys; *FGFR1* p.Gly97Ser/WT). Esses segundos achados foram identificados em pacientes com variantes missense no gene *CHD7*. Esse dado, associado ao peso de variantes em genes classicamente associados ao HHI, em nossa impressão, enfraquecem a responsabilidade das variantes no gene *CHD7* no

fenótipo de HHI dos pacientes, mas não sendo suficiente para classificá-las como benignas. A presença de surdez em dois pacientes dessa coorte, reforçou este fenótipo associado a mutações no gene *CHD7*.

5.4 Gene *IGSF10*

Recentemente, o gene *IGSF10* foi relacionado ao eixo gonadotrófico e aos neurônios de GnRH ⁽³⁹⁾. Em 2016, Howard et al., utilizando sequenciamento exômico, identificaram mutações inativadoras no *IGSF10* em seis famílias com atraso constitucional do desenvolvimento e em duas pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico funcional ⁽³⁹⁾. No mesmo trabalho, foi estudada uma coorte de 334 pacientes com HHI, tanto congênito (síndrome de Kallmann e HHI normósmico), quanto com hipogonadismo funcional. Variantes raras e preditoras de efeito deletério no gene *IGSF10*, todas em heterozigose, foram identificadas em 10,2% desses pacientes. Dois pacientes com hipogonadismo funcional, associado a estressores ambientais, apresentavam uma mutação sabidamente inativadora (p.L2452fs) ⁽³⁹⁾. Os autores demonstraram que o mRNA do *IGSF10* é fortemente expresso no mesênquima nasal embrionário durante a migração dos neurônios secretores de GnRH para o hipotálamo, e a inativação desse gene no modelo animal *zebrafish* levou à redução da migração desses neurônios ⁽³⁹⁾. Esses resultados nos motivaram a pesquisar alterações nesse gene em pacientes com HHI congênito, incluindo o *IGSF10* no painel de genes. Em nossa coorte 12 pacientes (9,2%) apresentavam história familiar de atraso puberal, sendo esta frequência semelhante aos 10% descritos na literatura dentre os familiares de pacientes com HHI ⁽⁴¹⁾, e mais alta que na população geral, onde atraso puberal é descrito com frequência de 2 a 2,5% ⁽⁸¹⁾. Em publicação também recente, utilizando SPLE, foram identificadas variantes preditas como patogênicas no *IGSF10* em 16,4% dos pacientes com HHI congênito, porém, essa prevalência foi similar nos controles, colocando em questão o papel dessas variantes na patogênese do *IGSF10* nesses pacientes ⁽⁷⁰⁾. Em nosso estudo, das oito

variantes raras inicialmente identificadas, somente duas permaneceram como provavelmente patogênicas (p.Gln433fs e p.Asp2277Gly), perfazendo uma frequência 1,5% nessa coorte.

Os pacientes 47 e 49, portadores de HHI normósmico, com as variantes p.Gln433fs/WT e p.Thr1538Ile/p.Asp2277Gly, respectivamente, apresentaram reversão do hipogonadismo. A reversibilidade está descrita em aproximadamente 10% dos casos de HHI, após o início do tratamento com esteróides sexuais, especialmente em pacientes com o fenótipo de HHI parcial. Cerca de 50% dos casos que reverterem, apresentam recaída do quadro de hipogonadismo ⁽¹⁰⁾. O mecanismo da reversão não é conhecido e tem sido sugerido que a exposição aos androgênios possa modular a regulação neuroendócrina da secreção de GnRH ⁽³⁾. Esses dois casos corroboram o potencial de mutações de *IGSF10* para contribuir ou mesmo ser a causa do HHI nestes pacientes. É plausível a hipótese de que os genótipos mais graves no gene *IGSF10* estejam associados fenótipos mais leves do hipogonadismo, provavelmente por ter um papel somente modulador na plasticidade dos neurônios GnRH; e genótipos mais leves não causariam danos importantes no eixo gonadotrófico, com fenótipos brandos ou inexistentes, e portanto, não relevantes para o diagnóstico de HHI congênito, situação onde há um grave prejuízo, na maioria das vezes irreversível, da função gonadotrófica. Estudos funcionais, para avaliar as consequências destas variantes específicas, poderiam esclarecer essas questões.

5.5 Genes com poucas descrições no HHI

Genes envolvidos na via de sinalização do FGFR1

O complexo de sinalização do *FGFR1* tem um papel crucial na migração dos neurônios olfatórios e de GnRH, agindo em sinergia com a anosmina-1, e seu envolvimento na patogênese do HHI congênito é bem conhecido ^(28, 31, 112, 113). O *FGF8* é considerado o principal ligante do *FGFR1*

na ontogenia dos neurônios GnRH, com algumas mutações descritas tanto em síndrome de Kallmann quanto em HHI normósmico ⁽³¹⁾. Posteriormente, outros genes envolvidos na via de sinalização do *FGFR1* foram associados ao HHI, incluindo *IL17RD*, *HS6ST1*, *FGF17*, *FLRT3* e *SPRY4*. Os genes *IL17RD* e *HS6ST1* desempenham um papel na via de sinalização pós receptor, o *FGF17* é um dos ligantes do *FGFR1* e os genes *FLRT3* e *SPRY4*, pertencem ao grupo de genes com expressão semelhante ao *FGF8*. Foi demonstrado que os genes *FGF17*, *FLRT3* e *SPRY4* interferem na regulação do crescimento de células neuronais em ratos, atuando como sinal de orientação ^(15, 83).

Mutações no gene *IL17RD* foram descritas, inicialmente, na síndrome de Kallmann associada a déficit auditivo e posteriormente em alguns casos de atraso constitucional do desenvolvimento ^(3, 15, 41). Estudos prévios sugeriram que apenas um defeito alélico no gene *IL17RD*, provavelmente, não seria suficiente para causar o fenótipo de HHI e que alelos afetados adicionais no mesmo ou em outros genes seriam necessários para o fenótipo de síndrome de Kallmann com perda auditiva ^(15,41). Portanto, sugeriu-se que variantes em heterozigose no *IL17RD* poderiam resultar em fenótipos endócrinos reprodutivos de gravidade variável ⁽⁴¹⁾. No paciente 15, portador de HHI normósmico com audição normal, foram identificadas duas variantes no *IL17RD*, uma missense em homozigose associada a uma frameshift em heterozigose. Esse paciente apresentava ainda variantes em heterozigose no *FGFR1* e no *DMXL2*. As variantes do *IL17RD* e *FGFR1* foram consideradas como patogênicas e provavelmente patogênicas, e do *DMXL2*, provavelmente benigna, porém não se sabe o grau de contribuição de cada uma dessas variantes para o fenótipo de HHI nesse paciente. Alterações no *IL17RD* haviam sido descritas apenas em pacientes com síndrome de Kallmann e atraso constitucional do desenvolvimento. O resultado atual expande a gama de fenótipos associados à esse gene.

Variantes nos genes *FGF17* e *SPRY4* foram descritas por Miraoui, et al. em pacientes tanto com síndrome de Kallmann quanto com HHI normósmico, e somente em pacientes com síndrome de Kallmann no gene

FLRT3⁽¹⁵⁾. Em nosso estudo, todas as variantes nos genes *FGF17*, *FLRT3* e *SPRY4* foram classificadas como provavelmente patogênicas. A exceção foi a variante p.Ser241Tyr no gene *SPRY4* identificada no paciente 17, classificada como benigna por estar presente nos bancos de dados ABraOM e GnomAD, inclusive em homozigose. Esse paciente apresentava também uma mutação no gene *FGFR1* (p.Pro286fs) que já justificava seu diagnóstico molecular. No gene *FLRT3*, identificamos a variante p.Tyr274Cys na paciente 59, com olfato normal e surdez neurosensorial leve, diferente do fenótipo de síndrome de Kallmann sem alterações auditivas, inicialmente associado a esse gene⁽¹⁵⁾. Considerando que o *FLRT3* é um gene com associação ao HHI relativamente recente e que faz parte da via de expressão do *FGF8*, que manifesta-se tanto com anosmia quanto HHI normósmico, é pertinente hipotetizar que as peculiaridades fenotípicas aqui descritas são uma ampliação do conhecimento do espectro de manifestações clínicas desse gene.

NSMF (NELF)

O gene *NSMF* é expresso nas células sensoriais olfatórias e de GnRH durante o desenvolvimento embrionário, e o produto de sua transcrição age como uma molécula guia comum tanto para os axônios olfatórios quanto para os neurônios de GnRH⁽⁹⁶⁾. Variantes missenses em heterozigose foram descritas nesse gene associadas tanto ao HHI normósmico quanto à síndrome de Kallmann^(98, 99). Das duas variantes identificadas no gene *NSMF*, a p.Val485Ile no paciente 71 com HHI normósmico foi considerada VUS por estar presente ABraOM⁽⁶⁶⁾. A variante p.Ala241Thr, provavelmente patogênica, foi identificada no paciente 70, com síndrome de Kallmann, hipoacusia e assimetria corporal. Até o momento, essas características não haviam sido descritas associadas ao *NSMF*, ampliando o espectro fenotípico descrito para esse gene.

WDR11

O gene *WDR11* codifica uma proteína expressa durante o desenvolvimento na via migratória dos neurônios olfatórios e produtores de

GnRH⁽¹⁰⁶⁾. Variantes em heterozigose no gene *WDR11* foram previamente descritas associadas tanto ao fenótipo de síndrome de Kallmann quanto ao de HHI normósmico⁽⁹⁵⁾. Outros grupos pesquisaram o *WDR11* em pacientes com HHI congênito, mas após a publicação inicial, nenhuma outra alteração patogênica foi descrita nesse gene^(107, 108). Identificamos apenas uma variante provavelmente patogênica no gene *WDR11*, em um paciente com síndrome de Kallmann (paciente 64). Outras quatro variantes encontradas, foram consideradas de significado incerto (VUS) por estarem presentes no ABraOM⁽⁶⁶⁾ ou por ausência de segregação familiar. Esses resultados confirmam que mutações no *WDR11* são causa muito rara de HHI congênito.

As semaforinas são uma classe de proteínas que agem como moléculas guia de axônios. Em camundongos, mutações nos genes *Sema3A* e *Sema7A* reduzem o número de neurônios de GnRH, sendo o *Sema3A* essencial para a migração de axônios vomeronasais, enquanto o sistema olfatório nas mutações no *Sema7A* parece estar inalterado. Portanto, considera-se o gene *SEMA3A* como um candidato para síndrome de Kallmann e o *SEMA7A* para HHI normósmico^(100, 101). Variantes missense em heterozigose já foram descritas associadas a síndrome de Kallmann no gene *SEMA3A*^(100, 101). No entanto, as variantes descritas na literatura no *SEMA7A* em pacientes com HHI estavam associadas à mutações deletérias em genes clássicos do HHI (*KISS1R* e *KAL1*)⁽³²⁾. Estudos funcionais prévios com a variante p.Arg733His no gene *SEMA3A*, na mesma posição da variante identificada no paciente 62 (p.Arg733Cys), demonstraram efeito deletério⁽¹⁰¹⁾. Nesse mesmo estudo, apesar da previsão de efeito deletério *in vitro*, as variantes missense em heterozigose identificadas estavam associadas a oligogenicidade em genes clássicos do HHI, concluindo os autores que a sinalização insuficiente das semaforinas contribui para a patogênese da síndrome de Kallmann, mas permanecendo incerto o papel de variantes isoladas⁽¹⁰¹⁾. Em nosso estudo, todas as variantes, tanto no *SEMA3A* quanto no *SEMA7A*, foram identificadas isoladas nos pacientes, e por terem sido encontradas também

em bando de dados de indivíduos sem o fenótipo de HHI, e no caso da variante p.Arg136Trp/WT no *SEMA7A* ainda com segregação familiar negativa, foram todas consideradas de significado incerto (VUS), portanto não esclarecedoras do diagnóstico molecular dos pacientes.

Genes associados a síndromes neurológicas

Variantes no gene *DMXL2* foram recentemente associadas a uma síndrome complexa envolvendo hipogonadismo hipogonadotrófico, hipotireoidismo central, hipoglicemia neonatal grave progredindo para diabetes *mellitus* insulino-dependente não autoimune, além de desmielinização periférica com polineuropatia e retardo mental. Familiares carreadores de variante em heterozigose não demonstravam qualquer fenótipo, atribuindo-se padrão de herança autossômica recessiva para as endocrinopatias relacionadas a esse gene ⁽¹⁰²⁾. Em nosso estudo, variantes em heterozigose foram identificadas em quatro pacientes, três com HHI normósmico e um com síndrome de Kallmann associada a surdez (pacientes 15, 65, 66 e 67). Há descrições que variantes missenses em heterozigose nesse gene possam causar o fenótipo de surdez ⁽¹⁰³⁾, característica presente no paciente 66, portador da variante p.Arg1756His/WT. No entanto, a etiopatogenia do HHI nesses pacientes não pode ser atribuída às variantes no *DMXL2*, sendo todas consideradas benignas por estarem em heterozigose. O paciente 15 apresentava ainda variantes em oligogenicidade nos genes *FGFR1* e *IL17RD*, suficientes para justificar seu quadro reprodutivo.

Identificamos variantes em heterozigose nos genes *POLR3A*, *POLR3B*, *PNPLA6*, *RNF216* e *DMXL2*, todos associados a raras descrições de HHI associado a síndromes com manifestações neurológicas (ataxia cerebelar ou síndrome desmielinizante), com padrão de herança autossômica recessiva ^(37, 38, 82, 93). Devido à presença em bancos de dados de indivíduos sem o fenótipo de HHI, ausência de segregação familiar e por se apresentarem em heterozigose, essas variantes foram classificadas como

beningas ou provavelmente benignas, portanto descartadas como esclarecedoras do diagnóstico molecular desses pacientes.

5.6 Genes candidatos *IGFALS*, *IGSF1*, *EBF2* e *OTX2*

Dentre as 77 variantes potencialmente patogênicas identificadas, cinco foram em genes sem relato prévio de associação ao HHI. Nesse grupo, apenas as variantes nos genes *IGSF1* e *OTX2* foram consideradas patogênicas.

O gene *IGSF1* está localizado no cromossomo X e codifica um membro da superfamília das imunoglobulinas (Igs) com alta expressão na bolsa de Rathke e hipófise anterior, tendo sido demonstrada sua expressão também nos testículos^(58,86,87). Mutações no gene *IGSF1* foram associadas ao fenótipo de hipotireoidismo central, aumento de volume testicular, baixas concentrações de prolactina, deficiência parcial de hormônio do crescimento (GH), infertilidade, atraso na menarca e até relatos mais recentes envolvendo diversas manifestações neurológicas, como hipotonia, atraso no desenvolvimento psicomotor e transtorno de déficit de atenção^(59, 86, 87, 88). Um estudo envolvendo 125 pacientes com mutações no *IGSF1* observou tempo de puberdade e volume testicular normais, apesar da identificação de atraso na elevação dos níveis de testosterona em homens⁽⁸⁸⁾. A paciente do nosso estudo (paciente 74) na qual foi identificada uma variante rara no gene *IGSF1* (p.Pro237Ala) era portadora de HHI normósmico com estatura normal (Z +0,96), e valores séricos de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) normais, afastando a possibilidade de deficiência de GH. No entanto, mesmo na ausência de deficiência de GH ou hipotireoidismo central descritos previamente em casos de mutações do gene *IGSF1*, com menor prevalência nas mulheres carreadoras de mutação, o fato da variante ter sido classificada como provavelmente patogênica pelos critérios do ACMG, associado à história familiar do pai com atraso puberal, em um gene com padrão de herança ligada ao X (DNA paterno não

disponível para análise de segregação familiar), reforça a hipótese de causalidade da mutação encontrada. Não há, até o momento, descrição de associação de mutações no gene *IGSF1* ao HHI, mas há relatos de associação com alterações puberais discretas. Consideramos haver possibilidade do HHI ser uma nova manifestação clínica descrita associada à mutações no gene *IGSF1*, e para esclarecermos essa hipótese, estudos mais aprofundados da função desse gene no eixo gonadotrófico precisam ser realizados.

Mutações com perda de função foram descritas no gene *OTX2* associadas a uma síndrome clínica que envolve microftalmia e deficiências hipofisárias múltiplas (ACTH, GH, LH, FSH) e distrofia de retina sem deficiências hipofisárias ^(56, 94). Identificamos uma variante rara no gene *OTX2* na paciente 75, portadora de HHI normósmico, considerada provavelmente patogênica pelos critérios adotados. A mesma paciente possuía também uma variante classificada com provavelmente patogênica no gene *SOX10*, um gene inicialmente associado a síndrome de Waardenburg, caracterizada por perda auditiva bilateral, doença de Hirschsprung e anormalidades pigmentares, em pele, cabelos e íris ⁽¹⁰⁹⁾. Devido à evidências de agenesia de bulbo olfatório em alguns indivíduos com a síndrome de Waardenburg, mutações no gene *SOX10* foram pesquisadas em pacientes com síndrome de Kallmann, tendo sido associado também a esse fenótipo, principalmente quando a característica de déficit auditivo estava presente ^(110, 111). Apesar dos relatos prévios relacionarem mutações no *OTX2* à deficiências hipofisárias combinadas e microftalmia, e no *SOX10* à pacientes com síndrome de Kallmann e déficit auditivo, o HHI normósmico poderia ser uma ampliação do espectro fenotípico associado à esses genes, apesar do papel da associação dessas duas variante, numa mesma paciente, permanecer incerto.

5.7 Achados oligogênicos

A importância das mutações digênicas e oligogênicas no HHI já é bem reconhecida ⁽⁸⁹⁾. Acredita-se que dois defeitos genéticos diferentes possam ter efeito sinérgico para produzir um fenótipo mais grave em famílias com HHI e que esse modelo genético poderia ser responsável pela heterogeneidade fenotípica vista nesta doença. No caso do HHI, estudar a interação desses genes, sem dúvida, aumenta a compreensão da ampla variabilidade existente no tempo de início da puberdade normal e das várias formas de apresentação do hipogonadismo hipogonadotrófico, desde formas congênitas, algumas reversíveis, até casos de hipogonadismo funcional. Além disso, auxilia o esclarecimento do diagnóstico molecular de pacientes que apresentam mutações que isoladamente não justificam o fenótipo, como por exemplo os achados em heterozigose em genes com herança tipicamente autossômica recessiva. Em nosso estudo encontramos variantes em mais de um gene em 22% dos pacientes portadores de variantes potencialmente patogênicas, sendo o *CHD7* o gene mais frequentemente encontrado em oligogenicidade, com sete achados oligogênicos, seguido pelo *FGFR1*, com três achados. Estudos recentes utilizando SPLE identificaram oligogenicidade em aproximadamente 15% dos casos ^(14, 90). Na literatura, o gene mais frequentemente envolvido em oligogenicidade é o *FGFR1*, sendo que as referências mais antigas não incluíam o *CHD7* ⁽¹⁴⁾. Em Cassatella et al., a combinação de genes mais frequentemente encontrada também foi entre os genes *FGFR1* e *CHD7* ⁽⁷⁰⁾. Podemos aventar a possibilidade de que esses dois genes desempenham papéis coordenados durante o desenvolvimento e migração de neurônios GnRH, uma vez que o *CHD7* está envolvido na regulação e transcrição do *Fgf8* ^(70, 114). Estudos anteriores também sugeriram interações funcionais entre esses genes, já que pacientes com HHI portando mutações nos genes *FGFR1* e *CHD7* exibem sobreposições de fenótipos associados: fissura labial ou palatina, coloboma ou anomalias da orelha ⁽⁷⁰⁾. Dados prévios da literatura, antes da utilização do SPLE, traziam valores de 2,5% a 7% de oligogenicidade ^(14, 15, 91). Esses resultados mais recentes em coortes com HHI já demonstram uma ampliação das descrições de oligogenicidade

quando comparados aos estudos prévios utilizando somente a técnica de Sanger, e corrobora nosso objetivo inicial de ampliar o conhecimento da influência da oligogenicidade no HHI. As tentativas prévias de demonstrar fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico completo no caso de digenicidade e fenótipos parciais como de atraso puberal ou anosmia isolados nos pacientes com somente um gene alterado falharam devido à discordâncias em alguns fenótipos ⁽¹⁴⁾. A grande quantidade de genes associados ao HHI e as possíveis influências do ambiente em alguns fenótipos são fatores que dificultam a comprovação que genótipos múltiplos levariam a fenótipos mais graves. Três dos pacientes nos quais foi identificada oligogenicidade em nosso estudo tinham DNA de familiares disponíveis para avaliação. Nessa análise pudemos notar que nesses três casos o familiar saudável era portador de menos variantes quando comparado ao familiar acometido com HHI (Tabela 11). No entanto, somente com esses dados, ainda não é possível caracterizar um padrão fenotípico associado à oligogenicidade ou atribuir maior gravidade ao fenótipo oligogênico. É importante levar em consideração que observamos que em muitos casos de oligogenicidade, uma das variantes isoladamente já seria capaz de justificar o quadro clínico, por ser claramente patogênica (Tabela 11). A segunda e terceira variantes muitas vezes eram de significado incerto. Isso nos fez questionar se nesses casos, a identificação de uma segunda ou terceira variante no mesmo paciente não seria apenas um achado inespecífico, sem peso no fenótipo. Nos casos de oligogenicidade, é extremamente difícil determinar, sem auxílio de um estudo funcional, se ambas as variantes contribuem para o fenótipo ⁽⁹⁰⁾. É importante ressaltar que a herança oligogênica foi relatada como raramente encontrada em controles (2%), apoiando ainda mais o modelo de oligogenicidade na patogênese do HHI ⁽⁷⁰⁾.

Em nosso estudo, foi possível destacar a importância do SPLE para a elucidação do diagnóstico molecular dos pacientes nos quais o estudo prévio por Sanger não permitiu essa definição. Além disso, demonstrou-se importância para a identificação de oligogenicidade, já que nos pacientes

onde foi encontrada uma segunda variante, muitos já haviam sido previamente estudados por Sanger. O SPLE traz ainda a vantagem de podermos avaliar genes extensos, como o exemplo do *CHD7*, com 38 éxons, de forma rápida e efetiva, além de avaliarmos vários genes simultaneamente. A médio prazo, essa característica pode ser economicamente vantajosa em relação ao Sanger. Pudemos observar também que o painel de genes, diferentemente do que ocorre com o sequenciamento exômico, não é adequado para identificação de novos genes associados ao HHI (“genes candidatos”), já que a grande maioria das mutações foram encontradas em genes já classicamente associados ao HHI. A função mais adequada para o painel de genes seria a de fazer um rastreamento dentre genes já conhecidamente associados a uma doença, que tipicamente tenha vários genes como causadores do fenótipo. Outros estudos, utilizando painéis de genes, chegaram à mesma conclusão ao incluírem genes candidatos e identificarem mutações majoritariamente nos genes clássicos ^(70, 92).

Identificamos 89 variantes distintas potencialmente patogênicas, em 77 pacientes. Destas 89 variantes distintas inicialmente identificadas, 52 foram classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas, esclarecendo o diagnóstico molecular de 41 pacientes (31,5%). Apesar da ampliação dos pacientes com diagnóstico molecular estabelecido e da porcentagem de pacientes com oligogenicidade utilizando SPLE, o diagnóstico molecular dos pacientes com HHI permanece incerto na maioria dos casos. Esta lacuna, provavelmente será preenchida com o avanço das técnicas de sequenciamento genético. No futuro, resultados mais adequados, menos onerosos e provavelmente mais acurados poderão ser obtidos por essas novas técnicas.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

- O sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) permitiu realizar o diagnóstico molecular de 31,5% (41 pacientes em 130) da coorte estudada, sendo realizado em menor tempo quando comparado à técnica tradicional de Sanger. Isso demonstra a utilidade do uso do painel de genes e do SPLE na abordagem diagnóstica dos pacientes com HHI.
- O painel de genes é uma ferramenta muito útil para o rastreamento de genes conhecidos para uma determinada condição, porém, não se mostrou tão eficiente na identificação de novos genes associados ao HHI, já que a grande maioria dos achados ocorreu em genes já descritos em associação ao HHI.
- Nossos resultados sobre herança oligogênica reforçam o conceito de que esta doença pode ser causada pela combinação de defeitos genéticos em mais de um gene. Múltiplos defeitos genéticos em um mesmo paciente, possivelmente, têm um efeito sinérgico no fenótipo. No entanto, estudos funcionais e análise de segregação mais aprofundadas serão úteis para determinar a real responsabilidade de cada variante no fenótipo desses pacientes.
- A complexidade do modelo genético oligogênico, em doenças até então consideradas monogênicas, torna o estudo de mutações em múltiplos genes simultaneamente, e nesse contexto o emprego de NGS sendo de grande utilidade, cada vez mais importante pela possibilidade de conduzir à maior precisão nas previsões fenotípicas.

7 Referências

7 Referências

1. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: Clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Jun;86(6):2364-8.
2. Wray S, Zoeller RT, Gainer H. Differential effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone gene expression in slice explant cultures prepared from specific rat forebrain regions. *Mol Endocrinol.* 1989 Aug;3(8):1197-206.
3. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015 Sep;11(9):547-64.
4. Schwanzel-Fukuda M. Origin and migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons in mammals. *Microsc Res Tech.* 1999;44(1):2-10.
5. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and kallmann's syndrome): Pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev.* 1998 Oct;19(5):521-39.
6. Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of kallmann syndrome: Towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab.* 2011 Jul;22(7):249-58.

7. Tusset C, Trarbach EB, Silveira LF, Beneduzzi D, Montenegro L, Latronico AC. [Clinical and molecular aspects of congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011 Nov;55(8):501-11.
8. Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, Hughes VA, et al. Expanding the phenotype and genotype of female gnrh deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Mar;96(3):E566-76.
9. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*. 2007 Aug 30;357(9):863-73.
10. Sidhoum VF, Chan YM, Lippincott MF, Balasubramanian R, Quinton R, Plummer L, et al. Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: Resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014 Mar;99(3):861-70.
11. Semple RK, Topaloglu AK. The recent genetics of hypogonadotrophic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010 Apr;72(4):427-35.
12. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*. 2009 Mar;41(3):354-8.
13. Silveira LF, Teles MG, Trarbach EB, Latronico AC. Kallmann syndrome and hypogonadotropic hypogonadism. Karger Publishers; 2010g.
14. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, et al. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug;107(34):15140-4.

15. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, et al. Mutations in *FGF17*, *IL17RD*, *DUSP6*, *SPRY4*, and *FLRT3* are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet*. 2013 May 2;92(5):725-43.
16. Trarbach EB, Costa EMF, Versiani B, de Castro M, Baptista MTM, Garmes HM, et al. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Oct;91(10):4006-12.
17. Abreu AP, Kaiser UB, Latronico AC. The role of prokineticins in the pathogenesis of hypogonadotropic hypogonadism. *Neuroendocrinology*. 2010 May 21;91(4):283-90.
18. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, Milgrom E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med*. 1997 Nov 27;337(22):1597-602.
19. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*. 2012, Feb 16;366(7):629-35.
20. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003 Oct 23;349(17):1614-27.
21. de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep;100(19):10972-6.

22. Seminara SB, Crowley WF. Kisspeptin and GPR54: Discovery of a novel pathway in reproduction. *J Neuroendocrinol*. 2008 Jun;20(6):727-31.
23. Silveira LF, Teles MG, Trarbach EB, Latronico AC. Role of kisspeptin/GPR54 system in human reproductive axis. *Front Horm Res*. 2010;39:13-24.
24. Navarro VM. New insights into the control of pulsatile gnRH release: The role of kiss1/neurokinin B neurons. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:48.
25. Navarro VM, Bosch MA, León S, Simavli S, True C, Pinilla L, et al. The integrated hypothalamic tachykinin-kisspeptin system as a central coordinator for reproduction. *Endocrinology*. 2015 Feb;156(2):627-37.
26. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, et al. A gene deleted in kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*. 1991 Oct;353(6344):529.
27. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell*. 1991 Oct;67(2):423-35.
28. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant kallmann syndrome. *Nat Genet*. 2003 Apr;33(4):463-5.
29. Kallmann syndrome phenotype in a female patient with CHARGE syndrome and *CHD7* mutation. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/53/6/53_6_741/_article/-char/ja/. Accessed 3 February 2018.

30. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008 Oct;83(4):511-9.
31. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest.* 2008 Aug;118(8):2822-31.
32. Käsäkoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, Vaaralahti K, Hackman P, Pitteloud N, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res.* 2014 May;75(5):641-4.
33. Vaaralahti K, Tommiska J, Tillmann V, Liivak N, Käsäkoski J, Laitinen EM, Raivio T. De novo SOX10 nonsense mutation in a patient with kallmann syndrome and hearing loss. *Pediatr Res.* 2014 Jul;76(1):115-6.
34. Suzuki E, Izumi Y, Chiba Y, Horikawa R, Matsubara Y, Tanaka M, et al. Loss-of-Function SOX10 mutation in a patient with kallmann syndrome, hearing loss, and iris hypopigmentation. *Horm Res Paediatr.* 2015;84(3):212-6.
35. Tata B, Huijbregts L, Jacquier S, Csaba Z, Genin E, Meyer V, et al. Haploinsufficiency of dmxl2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of gnRH neurons in mouse. *PLoS Biol.* 2014 Sep;12(9):e1001952.
36. Margolin DH, Kousi M, Chan YM, Lim ET, Schmahmann JD, Hadjivassiliou M, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med.* 2013 May 23;368(21):1992-2003.

37. Topaloglu AK, Lomniczi A, Kretzschmar D, Dissen GA, Kotan LD, McArdle CA, et al. Loss-of-function mutations in PNPLA6 encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in gordon holmes syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014 Oct;99(10):E2067-75.
38. Synofzik M, Kernstock C, Haack TB, Schöls L. Ataxia meets chorioretinal dystrophy and hypogonadism: Boucher-Neuhäuser syndrome due to PNPLA6 mutations. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 May;86(5):580-1.
39. Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, Mancini A, David A, Storr HL, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):626-42.
40. Pitteloud N, Acierno JS, Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley WF. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1317-22.
41. Zhu J, Choa RE-Y, Guo MH, Plummer L, Buck C, Palmert MR, et al. A shared genetic basis for self-limited delayed puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015 Apr;100(4):E646-54.
42. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JMW, Matfin G, De Zoysa PA, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: Genetic questions addressed through phenotypic characterization*. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001 Aug;55(2):163-74.
43. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.* 1975 May;94(3):441-8.

44. Collins FS, Morgan M, Patrinos A. The human genome project: Lessons from large-scale biology. *Science*. 2003 Apr;300(5617):286-90.
45. Tsai P-S, Gill JC. Mechanisms of disease: Insights into x-linked and autosomal-dominant kallmann syndrome. *Nat Rev Endocrinol*. 2006 Mar;2(3):160.
46. Trarbach EB, Silveira LG, Latronico AC. Genetic insights into human isolated gonadotropin deficiency. *Pituitary*. 2007 Jul;10(4):381-91.
47. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 14;106(28):11703-8.
48. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med*. 2009 Jun 25;360(26):2742-8.
49. Chan Y-M, Broder-Fingert S, Paraschos S, Lapatto R, Au M, Hughes V, et al. GnRH-Deficient phenotypes in humans and mice with heterozygous variants in KISS1/kiss1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Nov;96(11):E1771-81.
50. Mengen E, Tunc S, Kotan LD, Nalbantoglu O, Demir K, Gurbuz F, et al. Complete idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to homozygous GNRH1 mutations in the mutational hot spots in the region encoding the decapeptide. *Horm Res Paediatr*. 2015 Nov 24;85(2):107-11.
51. Irwig MS, Fraley GS, Smith JT, Acohido BV, Popa SM, Cunningham MJ, et al. Kisspeptin activation of gonadotropin releasing hormone neurons and regulation of kiss-1 mrna in the male rat. *Neuroendocrinology*. 2005 Jan 25;80(4):264-72.

52. Lanfranco F, Gromoll J, Eckardstein SV, Herding EM, Nieschlag E, Simoni M. Role of sequence variations of the *gnrh* receptor and G protein-coupled receptor 54 gene in male idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*. 2005 Dec;153(6):845-52.
53. Tusset C, Noel SD, Trarbach EB, Silveira LFG, Jorge AAL, Brito VN, et al. Mutational analysis of TAC3 and TACR3 genes in patients with idiopathic central pubertal disorders. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2012 Dec;56(9):646-52.
54. Doty RL, Shaman P, Dann M. Development of the university of pennsylvania smell identification test: A standardized microencapsulated test of olfactory function. *Physiol Behav*, 1984, Mar;32(3):489-502.
55. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med*. 2013 Jun 27;368(26):2467-75.
56. Kelley CG, Lavgogna G, Clark ME, Boncinelli E, Mellon PL. The *otx2* homeoprotein regulates expression from the gonadotropin-releasing hormone proximal promoter. *Mol Endocrinol*. 2000 Aug;14(8):1246-56.
57. Trarbach EB, Baptista MT, Garmes HM, Hackel C. Molecular analysis of KAL-1, *gnrh-r*, NELF and EBF2 genes in a series of kallmann syndrome and normosmic hypogonadotropic hypogonadism patients. *J Endocrinol*. 2005 Dec;187(3):361-8.
58. Givens ML, Rave-Harel N, Goonewardena VD, Kurotani R, Berdy SE, Swan CH, et al. Developmental regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression by the MSX and DLX homeodomain protein families. *J Biol Chem*. 2005 May;280(19):19156-65.

-
59. Joustra SD, Schoenmakers N, Persani L, Campi I, Bonomi M, Radetti G, et al. The IGSF1 deficiency syndrome: Characteristics of male and female patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Dec;98(12):4942-52.
60. Tenenbaum-Rakover Y, Turgeon MO, London S, Hermanns P, Pohlenz J, Bernard DJ, Bercovich D. Familial central hypothyroidism caused by a novel IGSF1 gene mutation. *Thyroid*. 2016 Dec;26(12):1693-700.
61. Miller SA, Dykes DD, Polesky HA. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988 Feb;16(3):1215.
62. Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H, Feng G. Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform*. 2014;13(Suppl 2):67-82.
63. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with burrows–wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009 Jul;25(14):1754-60.
64. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The genome analysis toolkit: A mapreduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010 Sep;20(9):1297-303.
65. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: Functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010 Sep;38(16):e164-.
66. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of brazilians in the abraom database. *Hum Mutat*. 2017 Jul;38(7):751-63.

67. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the american college of medical genetics and genomics and the association for molecular pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405-24.
68. Jongmans MC, van Ravenswaaij-Arts CM, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten HL, et al. CHD7 mutations in patients initially diagnosed with kallmann syndrome--the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clin Genet*. 2009 Jan;75(1):65-71.
69. Chen A, Ganor Y, Rahimipour S, Ben-Aroya N, Koch Y, Levite M. The neuropeptides gnrh-ii and gnrh-i are produced by human T cells and trigger laminin receptor gene expression, adhesion, chemotaxis and homing to specific organs. *Nat Med*. 2002 Dec;8(12):1421-6.
70. Cassatella D, Howard S, Acierno J, Xu C, Papadakis G, Santoni FA, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty have distinct genetic architectures. *Eur J Endocrinol*. 2018 Apr; 178(4):377-88.
71. Tommiska J, Käsäkoski J, Christiansen P, Jørgensen N, Lawaetz JG, Juul A, Raivio T. Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism in denmark. *Eur J Med Genet*. 2014 Jul;57(7):345-8.
72. Xu N, Qin Y, Reindollar RH, Tho SP, McDonough PG, Layman LC. A mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene causes fully penetrant normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1155-8.

-
73. Teles MG, Trarbach EB, Noel SD, Guerra-Junior G, Jorge A, Beneduzzi D, et al. A novel homozygous splice acceptor site mutation of KISS1R in two siblings with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*. 2010 Jul;163(1):29-34.
74. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, et al. Kallmann syndrome: Mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet*. 2006 Oct 20;2(10):e175.
75. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, et al. 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 Sep;93(9):3551-9.
76. Sarfati J, Dodé C, Young J. Kallmann syndrome caused by mutations in the PROK2 and PROKR2 genes: Pathophysiology and genotype-phenotype correlations. *Front Horm Res*. 2010;39:121-32.
77. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, et al. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Oct;93(10):4113-8.
78. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*. 2008 Oct;83(4):511-9.
79. Mengen E, Tunc S, Kotan LD, Nalbantoglu O, Demir K, Gurbuz F, et al. Complete idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to homozygous GNRH1 mutations in the mutational hot spots in the region encoding the decapeptide. *Horm Res Paediatr*. 2016;85(2):107-11.

80. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS, Phillips HS, Nikolics K, Seeburg PH. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science*. 1986 Dec;234(4782):1366-71.
81. Waldstreicher J, Seminara SB, Jameson JL, Geyer A, Nachtigall LB, Boepple PA, et al. The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Dec;81(12):4388-95.
82. Chen DY, Liu XF, Lin XJ, Zhang D, Chai YC, Yu DH, et al. A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. *Genet Med*. 2017 May;19(5):553-8.
83. Maretto S, Müller PS, Aricescu AR, Cho KW, Bikoff EK, Robertson EJ. Ventral closure, headfold fusion and definitive endoderm migration defects in mouse embryos lacking the fibronectin leucine-rich transmembrane protein FLRT3. *Dev Biol*. 2008 Jun 1;318(1):184-93.
84. Domené HM, Scaglia PA, Lteif A, Mahmud FH, Kirmani S, Frystyk J, et al. Phenotypic effects of null and haploinsufficiency of acid-labile subunit in a family with two novel IGFALS gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Nov;92(11):4444-50.
85. Işık E, Haliloglu B, van Doorn J, Demirbilek H, Scheltinga SA, Losekoot M, Wit JM. Clinical and biochemical characteristics and bone mineral density of homozygous, compound heterozygous and heterozygous carriers of three novel IGFALS mutations. *Eur J Endocrinol*. 2017 Jun;176(6):657-67.

-
86. Sun Y, Bak B, Schoenmakers N, van Trotsenburg AS, Oostdijk W, Voshol P, et al. Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an x-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. *Nat Genet.* 2012 Dec;44(12):1375-81.
87. Bernard DJ, Brûlé E, Smith CL, Joustra SD, Wit JM. From consternation to revelation: Discovery of a role for IGSF1 in pituitary control of thyroid function. *J Endocr Soc.* 2018 Feb;2(3):220-31.
88. Joustra SD, Heinen CA, Schoenmakers N, Bonomi M, Ballieux BE, Turgeon MO, et al. IGSF1 deficiency: Lessons from an extensive case series and recommendations for clinical management. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Apr;101(4):1627-36.
89. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest.* 2007 Feb;117(2):457-63.
90. Quaynor SD, Bosley ME, Duckworth CG, Porter KR, Kim SH, Kim HG, et al. Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and kallmann syndrome. *Mol Cell Endocrinol.* 2016 Dec 5;437:86-96.
91. Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, Williams T, Chorich LP, Bick DP, et al. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 2011 Dec;96(6):1424-1430.e6.
92. Guran T, Buonocore F, Saka N, Ozbek MN, Ayçan Z, Bereket A, et al. Rare causes of primary adrenal insufficiency: Genetic and clinical characterization of a large nationwide cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jan;101(1):284-92.

-
93. Richards MR, Plummer L, Chan YM, Lippincott MF, Quinton R, Kumanov P, et al. Phenotypic spectrum of POLR3B mutations: isolated hypogonadotropic hypogonadism without neurological or dental anomalies. *J Med Genet*. 2017;54:19-25.
94. Fang Q, George AK, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LYM, et al. Genetics of combined pituitary hormone deficiency: roadmap into the genome era. *Endocr Rev*. 2016 Dec;37(6):636-675.
95. Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*. 2010 Oct 8;87(4):465-79.
96. Miura K, Acierno Jr JS, Seminara SB. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet*. 2004;49(5):265-8.
97. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Nat Acad Sci USA*. 2011 Jul 12;108(28):11524-9.
98. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest*. 2007 Feb;117(2):457-63.
99. Xu N, Kim HG, Bhagavath B, Cho SG, Lee JH, Ha K, et al. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril*. 2011 Apr;95(5):1613-20.e1-7.

100. Young J, Metay C, Bouligand J, et al. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod.* 2012;27:1460-5.
101. Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal path nding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet.* 2012;8:e1002896.
102. Tata B, Huijbregts L, Jacquier S, Csaba Z, Genin E, Meyer V, et al. Haploinsufficiency of Dmxi2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of GnRH neurons in mouse. *PLoS Biol.* 2014 Sep 23;12(9):e1001952.
103. Chen DY, Liu XF, Lin XJ, Zhang D, Chai YC, Yu DH, et al. A dominant variant in DMXL2 is linked to nonsyndromic hearing loss. *Genet Med.* 2017 May;19(5):553-558.
104. Beranova M, Oliveira LM, Bedecarrats GY, Schipani E, Vallejo M, Ammini AC, et al. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1580-8.
105. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2857-67.
106. Valdes-Socin H, Rubio Almanza M, Tomé Fernández-Landreda M, Debray FG, Bours V, Beckers A. Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2014 Jul 9;5:109.

107. Silveira LFG, Montenegro LR, Costa EMF, Latronico AC. Analysis of the WDR11 gene in patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism with and without olfactory defects. ESPE Abstracts. 2014;82 P-D-1-1-207.
108. Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L, Raivio T. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. Orphanet J Rare Dis. 2011 Jun 17;6:41.
109. Elmaleh-Berges M, Baumann C, Noel-Petroff N, Sekkal A, Couloigner V, Devriendt K, et al. Spectrum of temporal bone abnormalities in patients with Waardenburg syndrome and SOX10 mutations. Am J Neuroradiol. 2013;34:1257-63.
110. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A. et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. Am J Hum Genet. 2013;92:707-24.
111. Vaaralahti K, Tommiska J, Tillmann V, Liivak N, Käsäkoski J, Laitinen EM and Raivio T. De novo SOX10 nonsense mutation in a patient with Kallmann syndrome and hearing loss. Pediatr Res. 2014 Jul;76(1):115-6.
112. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A. et al. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab. 2009 Nov;94(11):4380-90.
113. Hu Y, Guimond SE, Travers P, Cadman S, Hohenester E, Turnbull JE. et al. Novel mechanisms of fibroblast growth factor receptor 1 regulation by extracellular matrix proteinanosmin-1. J Biol Chem. 2009 Oct 23;284(43):29905-20.

114. Basson MA. Epistatic interactions between Chd7 and Fgf8 during cerebellar development: Implications for CHARGE syndrome. *Rare Dis.* 2014 Mar 31;2:e28688.

Anexos

ANEXO 1 - Tabela 3 – Características dos 130 pacientes incluídos na casuística

ID	Sexo	Diagnóstico clínico	História familiar	Características clínicas	RNM
1	F	HHIn	Pais consanguíneos		
2	M	HHIn			
3	M	SK	Mãe com atraso puberal. Irmão com SK, pais consanguíneos	Surdez neurossensorial, rim E reduzido. Micropênis e criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
4	M	HHIn		Micropênis e criptorquidismo bilateral	
5	M	SK	Irmão com SK, pais consanguíneos	Criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
6	M	SK		Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
7	F	HHIn	Pais consanguíneos	Palato ogival	
8	F	HHIn			
9	M	SK	Tia materna com anosmia, sobrinho com criptorquidia e micropênis	Surdez a E e assimetria corporal. Micropênis e criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
10	M	SK		Agenesia de 8 dentes, palato ogival, ectasia pielocalicial a E. Micropênis e criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
11	M	SK		Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
12	M	HHIn			
13	M	HHIn		Micropênis	
14	F	HHIn		Fenda palatina	
15	M	HHIn		Baixa estatura	
16	M	SK		Agenesia de dois dentes, epilepsia, déficit cognitivo leve, hipoacusia unilateral e sínchresia. Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
17	F	HHIn	Pais consanguíneos		
18	M	HHIn		Micropênis	
19	M	SK	Avós consanguíneos. Dois irmão com anosmia, pai com agenesia de 1 pododáctilo	Hipoacusia bilateral. Micropênis e criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
20	F	SK			
21	M	SK	Pai com atraso puberal Pai com atraso puberal, dois irmãos com criptorquidismo		
22	F	HHIn			
23	M	HHIn		Palato ogival, surdez a D. Micropênis e criptorquidismo bilateral	continua

ANEXO 1 - Tabela 3 – Características dos 130 pacientes incluídos na casuística (continuação)

ID	Sexo	Diagnóstico clínico	História familiar	Características clínicas	RNM
24	M	HHIn		Micropênis e criptorquidismo unilateral	
25	M	HHIn		Micropênis e criptorquidismo bilateral	
26	M	SK		Micropênis	
27	M	SK		Reversibilidade	
28	M	HHIn		Reversibilidade. Micropênis	
29	M	HHIn	Pais consanguíneos	Micropênis	
30	M	SK	Imão com SK		
31	M	SK	Imã com lábio leporino	Palato ogival, retardo mental leve. Micropênis e criptorquidismo bilateral	
32	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
33	M	SK	Imão com SK	Micropênis e criptorquidismo unilateral	Redução dos bulbos olfatórios
34	M	SK			
35	M	HHIn	Dois irmãos com HHI		
36	M	HHIn	Pais consanguíneos	Micropênis e criptorquidismo bilateral	
37	M	HHIn	Imão com atraso puberal	Micropênis.	
38	M	HHIn familiar		Micropênis e criptorquidismo unilateral	
39	F	HHIn familiar	Imão com HHI		
40	M	SK		Palato ogival, cúbito valgo. Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
41	M	SK	Pais consanguíneos	Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
42	F	SK			
43	M	HHIn		Micropênis	
44	M	HHIn			
45	F	SK			Redução dos bulbos olfatórios
46	M	SK			
47	M	HHIn		Reversibilidade. Micropênis e criptorquidismo unilateral	
48	M	HHIn			
49	M	HHIn		Reversibilidade. Micropênis	
50	M	HHIn			continua

ANEXO 1 - Tabela 3 – Características dos 130 pacientes incluídos na casuística (continuação)

ID	Sexo	Diagnóstico clínico	História familiar	Características clínicas		RNM
51	M	HHIn	Pai com atraso puberal	Micropênis		
52	M	HHIn	Pais consanguíneos	Micropênis e criptorquidismo bilateral		
53	F	SK	Mãe com hiposmia			
54	M	HHIn		Micropênis e criptorquidismo bilateral		
55	F	SK	Mãe com atraso puberal, quatro fios com fenda palatina	Retardo mental leve		
56	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral		
57	M	SK		Tetralogia de Fallot, hipospádia. Micropênis. Reversibilidade	Redução dos bulbos olfatórios	
58	M	SK	Avó e primo com anosmia		Redução dos bulbos olfatórios	
59	F	HHIn		Surdez neurosensorial a E		
60	F	SK	Prima com atraso puberal	Surdez neurosensorial bilateral		
61	F	HHIn				
62	M	HHIn		Depressão		
63	M	SK	Mãe com atraso puberal	Micropênis		Redução dos bulbos olfatórios
64	M	HHIn	Mãe e irmã com atraso puberal	Hipotireoidismo primário, agenesia renal D, CIV perimembranosa, corda ventral peniana. Micropênis e criptorquidismo unilateral		
65	M	HHIn				
66	M	SK		Déficit auditivo. Micropênis e criptorquidismo unilateral	Redução dos bulbos olfatórios	
67	M	HHIn				
68	M	SK		Palato ogival. Micropênis		Redução dos bulbos olfatórios
69	M	SK				
70	M	SK		Hipoacusia a D, assimetria corporal. Micropênis e criptorquidismo unilateral		
71	F	HHIn				
72	M	HHIn		Micropênis		
73	M	SK				
74	F	HHIn	Pai com atraso puberal			
75	F	HHIn				
76	M	SK		Micropênis		Redução dos bulbos olfatórios

continua

ANEXO 1 - Tabela 3 – Características dos 130 pacientes incluídos na casuística (continuação)

ID	Sexo	Diagnóstico clínico	História familiar	Características clínicas	RNM
77	F	HHIn			
78	M	SK		Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
79	M	HHIn	Pais consanguíneos	Micropênis	
80	M	HHIn			
81	F	HHIn			
82	M	SK			
83	M	SK		Psicose. Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
84	M	HHIn			
85	F	HHIn	Tias inférteis	Hipotireoidismo primário	
86	M	HHIn		Gota, crises convulsivas. Micropênis	
87	M	SK	Primo com HHI	Fibrose pulmonar idiopática	
88	F	HHIn			
89	F	HHIn			
90	M	SK	Avó com anosmia	Reversibilidade. Micropênis	Redução dos bulbos olfatórios
91	M	SK		Micropênis	
92	F	HHIn	Mãe com atraso puberal		
93	F	HHIn			
94	M	HHIn		Micropênis	
95	F	HHIn			
96	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral	Redução dos bulbos olfatórios
97	F	HHIn	Mãe e irmã com atraso puberal. Pais consanguíneos		
98	F	HHIn familiar			
99	M	SK	Pais consanguíneos	Micropênis e criptorquidismo unilateral	
100	F	HHIn			
101	M	SK			
102	F	SK			
103	M	SK	Cinco familiares com fenda palatina, irmão com atraso puberal	Fenda palatina, hipertelorismo ocular, implantação baixa da orelha. Micropênis e criptorquidismo unilateral	continua

ANEXO 1 - Tabela 3 – Características dos 130 pacientes incluídos na casuística (conclusão)

ID	Sexo	Diagnóstico clínico	História familiar	Características clínicas	RNM
104	M	HHIn	Irmã infértil	Micropênis	Ectopia dentária, palato ogival, hipertireoidismo Atraso no DNPM, estrabismo, palato ogival, microcefalia, retardo mental leve, rim E com dimensões reduzidas
105	F	HHIn			
106	M	HHIn	Pais consanguíneos		
107	M	HHIn			
108	F	SK			
109	M	SK			
110	M	SK			
111	M	HHIn			
112	F	HHIn			
113	F	HHIn			
114	M	HHIn			
115	M	HHIn			
116	F	HHIn	Retardo mental moderado, etilismo, ideação suicida, agressividade		
117	M	HHIn			
118	F	HHIn			
119	F	HHIn			
120	M	HHIn			
121	M	SK			
122	M	SK		Micropênis	
123	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral	
124	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral	
125	M	HHIn			
126	M	HHIn	Mãe com atraso puberal		
127	M	SK			
128	F	HHIn			
129	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral	
130	M	SK		Micropênis e criptorquidismo bilateral	

ID, identificação; SK, síndrome de Kallmann; HHIn, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normosmico; F, feminino; M, masculino; E, esquerda; D, direita; CIV, comunicação interatrial; DNPM, desenvolvimento neuropsicomotor

ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CAIXA POSTAL, 8091 – SÃO PAULO - BRASIL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
- DATA NASCIMENTO:/...../.....
- ENDEREÇO Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE
- CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
- NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
- DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F
- DATA NASCIMENTO.:/...../.....
- ENDEREÇO: Nº APTO:
- BAIRRO: CIDADE:
- CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **DETERMINAÇÃO DA BASE MOLECULAR DO HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO ISOLADO CONGENITO**
- PESQUISADOR: Dra Letícia Silveira
- CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : 119454
- UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ Disciplina de Endocrinologia e Metabologia
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
SEM RISCO	RISCO MÍNIMO ☒	RISCO MÉDIO
RISCO BAIXO	RISCO MAIOR	
- (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : quatro anos

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

- Justificativa e os objetivos da pesquisa: O hipogonadismo hipogonadotrófico é uma doença que interfere com a maturação sexual e a fertilidade. Várias alterações em diferentes genes foram identificadas como causa desta doença. Entretanto, suspeita-se que outros genes, ainda desconhecidos, possam também participar como causa desta doença. O objetivo deste estudo é realizar análise de genes implicados na origem do hipogonadismo hipogonadotrófico através do estudo do DNA.
- Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Solicitamos ao senhor(a) sua permissão para coletar em tubo com EDTA (anti-coagulante)

cerca de 10 ml de sangue de veia de antebraço, para que seja feita extração de DNA. O DNA obtido será utilizado no estudo de alterações nos genes já conhecidos empregando-se técnicas de estudo molecular.

3. Desconfortos e riscos esperados: Gostaríamos de salientar ao senhor(a) que os riscos e desconfortos da coleta de sangue são mínimos (dor, hematoma ou arroxamento da pele e sinais inflamatórios no local da punção venosa). A coleta será realizada por um profissional treinado e devidamente habilitado para sua realização. Não é preciso estar em jejum e não é necessária a ingestão de nenhum medicamento para a coleta de sangue
4. Benefícios que poderão ser obtidos: Esclarecemos ao senhor(a) que, tentando descobrir a origem dessa doença, poderemos no futuro aumentar as alternativas para o tratamento do hipogonadismo hipogonadotrófico.
5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Prezado senhor(a), se forem identificadas alterações gênicas no seu DNA, isso possibilitará o reconhecimento, por meio de análise genética, de outros indivíduos afetados e com o risco de desenvolver a mesma doença entre os seus familiares.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. O participante terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para o esclarecimento de eventuais dúvidas.
O senhor(a) esta sendo convidado a participar deste projeto e terá livre acesso aos dados colhidos e obtidos assim como será informado sobre os riscos e os benefícios relacionados a pesquisa.
2. Terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo ao seu atendimento no ambulatório.
O senhor(a) terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo sem que isto traga prejuízo ao seu atendimento no ambulatório do HC.
3. Todos os dados são confidenciais e serão mantidos em sigilo, garantindo assim a privacidade do participante
O senhor(a) não terá seu nome revelado em nenhuma hipótese. Todo estudo será realizado com total confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. O participante tem disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa
O senhor(a) terá total e plena assistência no HCFMUSP caso ocorra quaisquer eventuais danos a sua saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Qualquer informação solicitada pelo participante será fornecida, estando a Dra Leticia Gontijo Silveira e a Dra Ana Claudia Latronio (0xx11-3069.7512) disponíveis para o esclarecimento de quaisquer questões referentes a este protocolo de pesquisa.

VI- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de 20__.

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

ANEXO 3

© American College of Medical Genetics and Genomics

ACMG STANDARDS AND GUIDELINES

**Genetics
in Medicine**

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

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

Table 3 Criteria for classifying pathogenic variants

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>) Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact Use caution in the presence of multiple transcripts
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) (Table 6) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 Cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

Table 4 Criteria for classifying benign variants

Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	<p>BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder (see Table 6)</p> <p>BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age</p> <p>BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing</p> <p>BS4 Lack of segregation in affected members of a family</p> <p>Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.</p>
Supporting	<p>BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease</p> <p>BP2 Observed in <i>trans</i> with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant in any inheritance pattern</p> <p>BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function</p> <p>BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease</p> <p>BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p> <p>BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved</p>

ANEXO 4

EXTRAÇÃO DE RNA – com Trisol

COLETA DE MATERIAL E ESTOCAGEM

- Seleção somente de leucócitos do sangue após a lise das hemácias.
- Adiciona-se à esse conjunto de leucócitos 1 mL de Trisol. Reserva no tubo Falcon a -80°C.

PREPARAÇÃO

- 1) Limpeza da bancada e dos materiais com RNAase Away Reagent.
Uso de pipetas, microtubos e ponteiros específicas para uso com RNA.

EXTRAÇÃO DO RNA

- 1) Homogenização do *pellet* de leucócitos do tubo Falcon e transferência de todo esse material para um tubo Eppendorf de 1,5mL.
- 2) Adicionar 200 mcL de colofórmio a cada tubo Falcon com o *pellet* de leucócitos.
- 3) Agitar vigorosamente por 15 segundos.
- 4) Deixar o conjunto por aproximadamente 4 minutos em temperatura ambiente.
- 5) Levar à centrifuga por 15 minutos: 12.000G / 4 graus C.
- 6) Com a pipeta p200 aspirar, lentamente, somente o sobrenadante (RNA) e colocar em outro microtubo.
- 7) Precipitar o RNA: adicionar ao microtubo com o RNA 500 mcL de ISO propanol para cada 1 mL de Trisol. Homogeinizar manualmente.
- 8) Deixar por 10 minutos “descansando” em temperatura ambiente.
- 9) Levar à centrifuga por 10 minutos: 12.000G / 4°C.

- 10) Desprezar a água sobrenadante e manter o *pellet* (“condensado” branco na parede do microtúbulo).
- 11) Adicionar etanol 75% gelado a -20°C: 1 mL para cada 1 mL de Trisol.
- 12) Homogeneizar o conjunto no Vortex.
- 13) Levar à centrifuga por 5 minutos: 7.500G / 4°C.
- 14) Desprezar a água sobrenadante e manter o *pellet* (“condensado” branco na parede do microtúbulo).
- 15) Secar o microtubo para saia todo o álcool (~10 minutos).
- 16) Eluir o material com ~40 mL de água e homogeneizar com *up and down*.
- 17) Aquecer a 55 a 60°C por 20 minutos.

AVALIANDO A QUALIDADE DO MATERIAL

- 1) Nanodrop para avaliar concentração: colocado 1 mL da amostra.
 - Considerada boa qualidade do RNA uma relação 280/260.
- 2) Gel de agarose 1%: nota-se 2 bandas.

ANEXO 5 - Tabela 6 – Variantes encontrados nos 130 pacientes submetidos ao SPLE

ID	Sex	Dx	Dados clínicos adicionais	Gene	cDNA	aa trocado	Padrão de herança	GnomAD MAF (%)	ABraOM MAF (%)	SELA MAF (%)	Sites de predição	Escore CADD	Escore GERP	AC	Impres-são final
1	F	HHIn		CHD7	c.611G>TWT	p.Gly204ValWT	AD	ausente	ausente	ausente	3 de 4	15	5	1	PP
				FGFR1	c.1825C>TWT	p.Arg609XWT	AD	ausente	ausente	ausente	2 de 4	45	4,5	1	P
2	M	HHIn		CHD7	c.1958C>TWT	p.Pro653LeuWT	AD	0,0297	ausente	ausente	3 de 4	25,7	5,3	1	PP
3	M	HHIn	Surdez à E, rim E reduzido	CHD7	c.2095A>GWT	p.Ser699GlyWT	AD	ausente	ausente	ausente	2 de 4	15,4	4,4	1	PP
4	M	HHIn		CHD7	c.2201_2203del/WT	p.734_735del/WT	AD	ausente	ausente	0,13				1	VUS
5	M	SK		CHD7	c.3161G>AWT	p.Arg1054GlnWT	AD	0,0004	ausente	ausente	2 de 4	10	5,5	1	PP
				KAL1	c.1385G>A	p.Trp462X	X-linked	ausente	ausente	ausente		19,8	3,5	1	P
6	M	SK		CHD7	c.3973T>CWT	p.Tyr1325HisWT	AD	0,0057	ausente	ausente	4 de 4	23,3	5,8	1	PP
				PROK2	c.297dupT/c.297dupT	p.Gly100fs/p.Gly100fs	AR	0,0104	ausente	ausente				2	P
7	F	HHIn	Palato ogival	CHD7	c.6775G>AWT	p.Ala2259ThrWT	AD	0,0163	ausente	ausente	3 de 4	22,8	5,4	1	PB
				IGSF10	c.2128G>TWT	p.Gly709ValWT	AD	0,0324	0,24	ausente	3 de 4	19,6	2,8	2	VUS
8	F	HHIn		CHD7	c.7253G>AWT	p.Arg2418GlnWT	AD	0,0072	ausente	ausente	3 de 4	24	5,2	1	PP
				TAC3	c.209-1G>C/c.209-1G>C	0	AR	0,0108	ausente	ausente	2 de 4	23,7	5,9	2	P
9	M	SK	Surdez à E, assimetria corporal	CHD7	c.7963_7970del/WT	p.Gly2655fsWT	AD	ausente	ausente	ausente				1	P
10	M	SK	Agenesia de 8 dentes, palato ogival, ectasia pielocalicial à E	CHD7	c.8068_8076del/WT	p.2690_2692del	AD	ausente	ausente	ausente				1	PP
				GNRHR	c.317A>GWT	p.Gln106ArgWT	AR	0,2712	0,16	0,26	4 de 4	23,2	6,17	4	B
11	M	SK		CHD7	c.8213C>TWT	p.Thr2738MetWT	AD	0,1659	ausente	ausente	3 de 4	34	5,57	1	PP
				FGFR1	c.289G>AWT	p.Gly97SerWT	AD	ausente	ausente	ausente	4 de 4	34	5,4	1	P
				WDR11	c.2305A>GWT	p.Met769ValWT	AD	0,0004	ausente	0,26	3 de 4	23,1	5,5	1	VUS
12	M	HHIn		EBF2	c.650C>TWT	p.Thr217MetWT	?	0,0008	ausente	ausente	3 de 4	27,2	5,6	1	VUS
				CHD7	c.8416C>GWT	p.Leu2806ValWT	AD	0,1189	0,41	0,65	3 de 4	22,8	4,25	3	B
13	M	HHIn		CHD7	c.8416C>GWT	p.Leu2806ValWT	AD	0,1189	0,41	0,65	3 de 4	22,8	4,25	3	B
14	F	HHIn	Fenda palatina	CHD7	c.8416C>GWT	p.Leu2806ValWT	AD	0,1189	0,41	0,65	3 de 4	22,8	4,25	3	B

continua

ANEXO 5 - Tabela 6 – Variantes encontrados nos 130 pacientes submetidos ao SPLE (continuação)

ID	Sex	Dx	Dados clínicos adicionais	Gene	cDNA	aa trocado	Padrão de herança	GnomAD MAF (%)	ABraOM MAF (%)	SELA MAF (%)	Sites de predição	Escore CADD	Escore GERP	AC	Impres-são final
15	M	HHIn	Baixa estatura	FGFR1	c.83C>T/WT	p.Pro28Leu/WT	AD	ausente	ausente	ausente	3 de 4	24	4,58	1	P
				IL17RD	c.1697C>T/c.1697C>T	p.Pro566Leu/p.Pr o566Leu	AD	0,2024	0,8 (todas em heterozigose)	0,39 (todas em heterozigose)	4 de 4	17,5	3,73	2	PP
				IL17RD	c.1608_1611del/WT	p.Glu536fs/WT	AD	ausente	ausente	ausente				1	P
				DMXL2	c.5171C>T/WT	p.Ser1724Leu/WT	AR	ausente	ausente	ausente	3 de 4	34	4,9	1	PB
16	M	SK	Agenesia de dois dentes, epilepsia, déficit cognitivo leve, hipocausia unilateral e sincinesia.	FGFR1	c.748C>T/WT	p.Arg250T/WT	AD	ausente	ausente	ausente	3 de 4	25,3	4,9	1	P
				FGFR1	c.857dupC/WT	p.P286fs/WT	AD	ausente	ausente	ausente				1	P
17	F	HHIn		SPRY4	c.722C>A/WT	p.Ser241Tyr/WT	AD	0,4549 (cinco homozigoses)	0,65	ausente	3 de 4	27,3	5,5	1	B
				FGFR1	c.962_963del/WT	p.Lys321fs/WT	AD	0,0004	ausente	ausente				1	P
18	M	HHIn		IGSF10	c.5405A>T/WT	p.Asp1802Val/WT	AD	0,2723	0,32	ausente	3 de 4	23,2	5,3	1	B
				POLR3B	c.926C>G/WT	p.Ala309Gly/WT	AR	ausente	ausente	ausente	2 de 4	22,4	5,4	1	B
19	M	SK	Hipoacusia bilateral	FGFR1	c.1028C>T/WT	p.Ala343Val/WT	AD	ausente	ausente	ausente	2 de 4	23,3	5,2	1	P
20	F	SK		FGFR1	c.2008G>A/WT	p.Glu670Lys/WT	AD	ausente	ausente	ausente	4 de 4	35	5,9	1	P
21	M	SK		FGFR1	c.2070+1G>A	0	AD	0,0406	ausente	ausente	2 de 4	25,1	5,9	1	P
22	F	HHIn		FGFR1	c.2275G>T/WT	p.Glu759X/WT	AD	ausente	ausente	ausente	2 de 4	43	5,9	1	P
23	M	HHIn	Palato ogival, surdez a D	FGFR1	c.2300G>A/WT	p.Cys767Tyr/WT	AD	ausente	ausente	ausente	4 de 4	28,2	5,3	1	P
24	M	HHIn		GNRHR	c.30T>A; c.31C>A/ c.847T>C	p.Asn10Lys; p.Gln11Lys / p.Tyr283His	AR	0,0135; 0,0135/ 0,0008	ausente	ausente	2 de 4/4 de 4	0,001; 0,002/ 27,3	0,966; 5,18/ 5,43	1	P
25	M	HHIn		GNRHR	c.317A>G/WT	p.Gln106Arg/WT	AR	0,2712	0,16	0,26	4 de 4	23,2	6,17	4	B
26	M	SK		GNRHR	c.317A>G/WT	p.Gln106Arg/WT	AR	0,2712	0,16	0,26	4 de 4	23,2	6,17	4	B
27	M	SK	Reversibilidade	GNRHR	c.317A>G/WT	p.Gln106Arg/WT	AR	0,2712	0,16	0,26	4 de 4	23,2	6,17	4	B

continua

ANEXO 5 - Tabela 6 – Variantes encontrados nos 130 pacientes submetidos ao SPLE (continuação)

ID	Sex	Dx	Dados clínicos adicionais	Gene	cDNA	aa trocado	Padrão de herança	GnomAD MAF (%)	ABraOM MAF (%)	SELA MAF (%)	Sites de predição	Escore CADD	Escore GERP	AC	Impres-são final
48	M	HHIn		IGSF10 SPRY4	c.2126G>TWT c.776C>TWT	p.Gly709ValWT p.Ser259PheWT	AD AD	0,0324 ausente	0,24 ausente	ausente ausente	3 de 4 4 de 4	19,6 25,1	2,81 4,9	2 1	VUS PP
49	M	HHIn	Reversibilidade	IGSF10	c.4613C>T/ c.6830A>G	p.Thr1538Ile/ p.Asp2277Gly	AD	0,0285/0,0176	ausente	0,08/ausente	2 de 4	10/13,59 4,03	3,95/ 4,03	1	VUS/PP
50	M	HHIn		IGSF10	c.5405A>TWT	p.Asp1802ValWT	AD	0,2723	0,32	ausente	2 de 4	23,2	5,3	1	B
51	M	HHIn		IGSF10	c.7217C>TWT	p.Ala2406ValWT	AD	0,0801	0,24	ausente	3 de 4	17,9	4,6	1	VUS
52	M	HHIn		GNHR1	c.142- 2A>C/c.142- 2A>C		AR	ausente	ausente	ausente		10,3	5	2	P
53	F	SK		GNHR1	c.141G>CWT	p.Glu47AspWT	AR	0,1492	0,24	0,13	2 de 4	25,3	5,5	1	B
54	M	HHIn		FGF8	c.560_574delWT	p.187_192delWT	AD	ausente	ausente	ausente				1	P
55	F	SK	Retardo mental leve	FGF8	c.G617AWT	p.Arg206GlnWT	AD	ausente	ausente	ausente	4 de 4	34	3,8	1	P
56	M	SK		IL17RD	c.878C>TWT	p.Pro293LeuWT	AD	0,0568	0,08	0,26	3 de 4	26,9	5,5	1	VUS
57	M	SK	Tetralogia de Fallot, hipospádia. Reversibilidade	IL17RD	c.2003C>TWT	p.Ser668PheWT	AD	0,0043	0,08	0,13	4 de 4	29,9	5,79	1	B
58	M	SK		POLR3A	c.1745G>TWT	p.Arg582LeuWT	AR	0,8561 (onze homozigoses)	0,99	3,51	2 de 4	25,9	3,9	2	B
59	F	HHIn	Surdez neurosensorial a E	POLR3A FLRT3	c.1745G>TWT c.821A>GWT	p.Arg582LeuWT p.Tyr274CysWT	AR AD	0,8561 (onze homozigoses) 0,0072	0,99 ausente	3,51 ausente	2 de 4 3 de 4	25,9 24,1	3,9 6	2 1	B PP
60	F	SK	Surdez neurosensorial bilateral	POLR3B	c.1010T>CWT	p.Val337AlaWT	AR	0,0004	ausente	ausente	2 de 4	21,8	5,4	1	B
61	F	HHIn		SEMA3A	c.1923G>CWT	p.Gln641HisWT	AD	0,1102	0,7	0,13	2 de 4	16,4	5,3	1	VUS
62	M	HHIn		SEMA3A	c.2197C>TWT	p.Arg733CysWT	AD	0,0065	0,16	ausente	2 de 4	33	6	1	VUS
63	M	SK		SEMA7A	c.406C>TWT	p.Arg136TrpWT	AD	0,0043	ausente	ausente	2 de 4	25,1	2,9	1	VUS

continua

ANEXO 5 - Tabela 6 – Variantes encontrados nos 130 pacientes submetidos ao SPLE (conclusão)

ID	Sex	Dx	Dados clínicos adicionais	Gene	cDNA	aa trocado	Padrão de herança	GnomAD MAF (%)	ABraOM MAF (%)	SELA MAF (%)	Sites de predição	Escore CADD	Escore GERP	AC	Impressão final
Hipotireoidismo primário, agenesia renal D, CIV perimembranosa, corda ventral peniana															
64	M	HHIn		SEMA7A	c.493G>A>WT	p.Glu165Lys/WT	AD	0,0152	0,08	ausente	2 de 4	22,5	4,6	1	VUS
65	M	HHIn		DMXL2	c.5267G>A>WT	p.Arg1756His/WT	AR	0,0004	ausente	ausente	2 de 4	35	5,5	2	PB
66	M	SK	Deficit auditivo	DMXL2	c.5267G>A>WT	p.Arg1756His/WT	AR	0,0004	ausente	ausente	2 de 4	35	5,5	2	PB
67	M	HHIn		DMXL2	c.1463C>T>WT	p.Thr488Met/WT	AR	0,0408	0,08	ausente	3 de 4	25,4	5	1	B
68	M	SK	Palato ogival	WDR11	c.C1592G>WT	p.Ser531Cys/WT	AD	0,0039	ausente	ausente	3 de 4	24,1	5,8	1	PP
69	M	SK		WDR11	c.2962G>A>WT	p.Glu988Lys/WT	AD	0,1799	ausente	0,39	4 de 4	34	5,8	1	VUS
70	M	SK	Hipoacusia a D, assimetria corporal	NSMF	c.721G>A>WT	p.Ala241Thr/WT	?	0,0024	ausente	ausente	3 de 4	29,5	4,3	1	PP
71	F	HHIn		NSMF	c.1453G>A>WT	p.Val485Ile/WT	?	0,0039	0,08	ausente	3 de 4	22,9	4,8	1	VUS
72	M	HHIn		FGF17	c.196G>A>WT	p.Val66Met/WT	AD	ausente	ausente	ausente	4 de 4	31	4,8	1	PP
73	M	SK		IGFALS	c.1195G>A>WT	p.Gly399Arg/WT	AR	0,0257	ausente	ausente	2 de 4	22,9	2,7	1	PB
74	F	HHIn		IGSF1	c.709C>G>WT	p.Pro237Ala/WT	AD	0,0007	ausente	ausente	2 de 4	13,7	4,27	1	PP
75	F	HHIn		SOX10	c.1018G>A>WT	p.Val340Met/WT	AD	0,0064	ausente	ausente	3 de 4	13,36	4,87	1	PP
75	F	HHIn		OTX2	c.163G>T>WT	p.Ala55Ser/WT	AD	0,0046	ausente	ausente	3 de 4	21,1	5,58	1	PP
76	M	SK		PNPLA6	c.1340C>T>WT	p.Pro447Leu/WT	AR	0,4756 (cinco homozigoses)	0,32	0,78	3 de 4	22,8	4,85	1	B
77	F	HHIn		RNF216	c.2353T>C>WT	p.Ser785Pro/WT	AR	0,0012	ausente	0,13	3 de 4	24	2,94	1	PB

AC, do inglês 'allele count' número de alelos; ID, identificação; Sex, sexo; Dx, diagnóstico; AD, autossômica dominante; AR, autossômica recessiva; M, masculino; F, feminino; D, direita; E, esquerda; SK, síndrome de Kallmann; HHIn, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado normômico; WT, do inglês 'wild type' alelo selvagem; P, patogênica; PP, provavelmente patogênica; VUS, do inglês 'Variant of Undetermined Significance' variante de significado incerto; PB, provavelmente benigna; B, benigna; MAF, do inglês 'Minor Allele Frequency' frequência alélica mínima; GnomAD, genome aggregation database (<http://gnomad.broadinstitute.org>); CADD – Combined Annotation Dependent Depletion (<http://cadd.gs.washington.edu>); GERP – genomic evolutionary rate profiling).

Molecular and Genetic Aspects of Congenital Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism

Lorena Guimaraes Lima Amato, MD,
Ana Claudia Latronico, MD, PhD^{*},
Leticia Ferreira Gontijo Silveira, MD, PhD^{*}

KEYWORDS

- Hypogonadotropic hypogonadism • Kallmann syndrome • GnRH
- Neuronal migration • Sense of smell and genes

KEY POINTS

- Congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is a rare reproductive disorder caused by the deficient production, secretion or action of gonadotropin-releasing hormone (GnRH).
- Kallmann syndrome, a disorder that combines congenital IHH and anosmia or hyposmia, is caused by abnormal embryonic migration of GnRH and olfactory neurons.
- Congenital IHH is clinically and genetically heterogeneous with different modes of inheritance and several causative genes.
- Spontaneous recovery of reproductive function can occur in 10% of patients with IHH, independent of the genetic defects.

INTRODUCTION

Congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is a clinical syndrome characterized by failure of gonadal function secondary to defects on the synthesis, secretion or action of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH), an essential neuropeptide for

The authors have nothing to disclose.

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq # 302849/2015-7); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2013/03236-5) to A.C. Latronico.

Division of Endocrinology, Development Endocrinology Unit, Laboratory of Hormones and Molecular Genetics/LIM42, Clinical Hospital, São Paulo Medical School, São Paulo University, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar 255, 7 andar, sala 7037, São Paulo, SP 05403-000, Brazil

^{*} Corresponding author. Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia, Av. Dr. Eneas de Carvalho Aguiar, 155, 2º andar, bloco 6, São Paulo 05403-900, Brasil

E-mail addresses: anacl@usp.br; leticia.silveira@hc.fm.usp.br

Endocrinol Metab Clin N Am ■ (2017) ■–■

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecl.2017.01.010>

0889-8529/17/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

endo.theclinics.com

the reproductive system of mammals.¹ Congenital IHH is a rare condition with male predominance, with a prevalence of 3 to 5 males to one female.^{2,3} This condition is characterized by absent or incomplete pubertal development and the diagnosis of hypogonadism is typically made during the second or third decades of life, when the affected individuals present with pubertal delay, primary amenorrhea, or infertility. In some cases, the suspected diagnosis can be considered in childhood owing to the presence of micropenis and/or cryptorchidism, especially when there is a positive family history of hypogonadism. Biochemically, the diagnosis is confirmed by the finding of low serum levels of sex steroids associated with low or inappropriately normal luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone serum levels. The remaining pituitary function is normal without anatomic abnormalities of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis.^{1,2} Around 50% to 60% of the affected individuals exhibit olfaction dysfunction (anosmia or hyposmia) in association with IHH, defining Kallmann syndrome. The olfaction defects occur owing to combined abnormal embryonic migration of GnRH neurons and olfactory fibers from their origin in the olfactory placode to the forebrain.^{3–5} These patients usually present with hypoplasia or aplasia of the olfactory tract/bulbs associated to GnRH deficiency.⁶ Currently, it is known that the clinical manifestations of congenital IHH may be heterogeneous. The same family may present with cases of normosmic IHH, Kallmann syndrome, pubertal delay, or isolated abnormalities, such as isolated anosmia or craniofacial malformations.⁷ Developmental anomalies such as cleft lip or palate, dental agenesis, ear anomalies, congenital hearing impairment, renal agenesis, bimanual synkinesis, or skeletal anomalies may be associated with the Kallmann syndrome and some genetic mutations are associated more frequently with some of these defects.⁸

Congenital IHH is genetically heterogeneous, with both sporadic and familial cases. The new techniques of parallel sequencing in large scale have enabled the study of various genes simultaneously (gene panels) or even of the whole exoma, increasing the knowledge of the molecular bases of congenital IHH. The advent of these new techniques allowed an increase in the molecular diagnosis of patients congenital IHH from 30% to approximately 50% of cases.^{8,9} A growing list of genes has been implicated in the molecular pathogenesis of the congenital IHH, highlighting the heterogeneity and complexity of the genetic basis of this condition. These genes encode neuropeptides and proteins involved in the development and migration of GnRH neurons, or in the control of different stages of GnRH function ([Table 1](#)). The genetic causes of congenital IHH are reviewed here and have been categorized according to the stage of development of the gonadotrophic axis in which they participate ([Fig. 1](#)).

GENES IMPLICATED WITH DEVELOPMENT AND MIGRATION OF GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE NEURONS

The development of GnRH neurons is unusual, because they originate outside the central nervous system in the olfactory placode and then migrate in close association with the olfactory fibers into the brain during embryonic development to their ultimate destination in the hypothalamus. This route provides a developmental link between the central control of reproduction and the sense of smell, which are both affected in Kallmann syndrome. Several genes associated to congenital IHH affect the fate and migration of GnRH neurons, being implicated in the pathogenesis of both Kallmann syndrome and normosmic IHH ([Fig. 2](#)).

KAL1* or *ANOS1

The *KAL1* gene, located at Xp22.31, was identified by a positional cloning strategy in 1991.¹⁰ It encodes the glycoprotein anosmin-1, an extracellular 680 amino acid

Table 1
Genes implicated in congenital IHH

Gene	Chromosomal Location	IHH Phenotype	Clinical Features Associated	Syndromes Associated	Inheritance Pattern	Prevalence (%)
<i>KAL1 (ANOS1)</i>	Xp22.31	KS	Bimanual synkinesia Renal agenesis		X-linked	5
<i>IL17RD</i>	3p14.3	KS	Congenital hearing impairment		Autosomal recessive	3
<i>SOX10</i>	22q13.1	KS	Congenital hearing impairment	Waardenburg syndrome	Described in heterozygous state	2
<i>FEZF1</i>	7q31.32	KS			Autosomal recessive	Rare
<i>CCDC141</i>	2q31.2	KS			Autosomal recessive (?)	Rare
<i>SEMA3A</i>	7q21.11	KS			Autosomal dominant	Rare
<i>SEMA7A</i>	15q24.1	KS nIHH			Autosomal dominant	Rare
<i>FGFR1</i>	8p11.23	KS nIHH	Cleft lip and/or palate Septooptic dysplasia Skeletal anomalies Bimanual synkinesia Hand/foot malformation Combined pituitary hormone deficiency	Hartsfield syndrome	Autosomal dominant	10
<i>FGF8</i>	10q24.32	KS nIHH	Cleft lip and/or palate Skeletal anomalies Bimanual synkinesia Combined pituitary hormone deficiency		Autosomal dominant	<2
<i>FGF17</i>	8p21.3	KS nIHH		Dandy-Walker syndrome	Autosomal dominant (?)	Rare

(continued on next page)

Table 1
(continued)

Gene	Chromosomal Location	IHH Phenotype	Clinical Features Associated	Syndromes Associated	Inheritance Pattern	Prevalence (%)
<i>HS6ST1</i>	2q14.3	KS nIHH	Cleft lip and/or palate Skeletal anomalies		Autosomal dominant (?)	Rare
<i>CHD7</i>	8q12.2	KS nIHH	Congenital hearing impairment Semicircular canal hypoplasia	CHARGE syndrome	Autosomal dominant (?)	6
<i>PROK2</i>	3p13	KS nIHH			Autosomal recessive	3–6
<i>PROKR2</i>	20p12.3	KS nIHH	Combined pituitary hormone deficiency	Morning Glory syndrome	Autosomal recessive	3–6
<i>WDR11</i>	10q26.12	KS nIHH	Combined pituitary hormone deficiency		Autosomal dominant	Rare
<i>NELF (NSMF)</i>	9q34.3	KS nIHH			Autosomal dominant (?)	Rare
<i>AXL</i>	19q13.2	KS nIHH			Autosomal dominant (?)	NR
<i>IGSF10</i>	3q24	KS nIHH			Autosomal dominant (?)	Rare
<i>GNRH1</i>	8p21.2	nIHH			Autosomal recessive	Rare
<i>KISS1</i>	1q32.1	nIHH			Autosomal recessive	2
<i>KISS1R (GPR54)</i>	19p13.3	nIHH			Autosomal recessive	2
<i>TAC3</i>	12q3	nIHH			Autosomal recessive	Rare
<i>TACR3</i>	4q24	nIHH			Autosomal recessive	Rare

<i>GNRHR</i>	4q13.2	nIHH			Autosomal recessive	6–16
<i>LEP</i>	7q32.1	nIHH	Early onset of morbid obesity		Autosomal recessive	<2
<i>LEPR</i>	1p31.3	nIHH	Early onset of morbid obesity		Autosomal recessive	<2
<i>PCSK1</i>	5q15	nIHH	Early onset of morbid obesity		Autosomal recessive	<2
<i>OTUD4</i>	4q31.21	nIHH	Cerebellar ataxia	Gordon Holmes syndrome	Autosomal recessive	Rare
<i>RNF216</i>	7p22.1	nIHH	Cerebellar ataxia	Gordon Holmes syndrome	Autosomal recessive	Rare
<i>PNPLA6</i>	19p13.2	nIHH	Cerebellar ataxia	Gordon Holmes syndrome	Autosomal recessive	Rare
<i>DMXL2</i>	15q21.2	nIHH	Polyendocrine deficiencies and polyneuropathies		Autosomal recessive	Rare
<i>NR0B1 (DAX1)</i>	Xp21.2	nIHH	Adrenal hypoplasia		X-linked	Rare
<i>HESX1</i>	3p14.3	KS	Septo-optic dysplasia Combined pituitary hormone deficiency		Autosomal dominant (?)	Rare

Abbreviations: CHARGE syndrome, coloboma, heart defects, choanal atresia, retarded growth and development, genital hypoplasia, ear anomalies and deafness; IHH, isolated hypogonadotropic hypogonadism; KS, Kallmann syndrome; nIHH, normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism.

Fig. 1. Genes implicated in the embryonic development and migration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secreting-neurons as well as in the synthesis, secretion, and action of the hypothalamic GnRH.

protein composed by a cysteine-rich region, a whey acidic protein domain, 4 fibronectinlike type III repeats, and several predicted heparin sulfate binding regions.¹¹ Anosmin-1 is involved in fibroblast growth factor (FGF) signaling, playing different cell functions, including cell adhesion, neurite/axonal elongation and fasciculation, and epithelial morphogenesis as well as in the migratory activity of GnRH neurons.¹² During the development, anosmin-1 is expressed transiently in the basement membranes of the developing olfactory bulb, retina, and kidney, being essential for axonal

Fig. 2. Genes associated with Kallmann syndrome only (left circle) or normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism (nIHH) only (right circle) or both conditions (intersection).

guidance and migration of olfactory and GnRH neurons from the nasal placode to their final location in the brain.¹¹

Mutations in *KAL1* are reported to be present in approximately 5% to 10% of all Kallmann syndrome patients and 15% to 50% of the familial cases with an X-linked pattern of inheritance.^{5,13–16} Patients with *KAL1* mutations usually exhibit an almost uniformly severe and highly penetrant reproductive phenotype.¹⁶ Most patients with X-linked Kallmann syndrome have micropenis and bilaterally undescended testes at birth, reflecting severe congenital GnRH and gonadotropin insufficiency.¹⁶ Other anomalies frequently associated with X-linked Kallmann syndrome include high arched palate, cleft lip and/or palate, short metacarpals, unilateral renal agenesis, sensorineural hearing loss, bimanual synkinesia, and oculomotor abnormalities.

Fibroblast Growth Factors Family and Modulators

FGFs and their cell surface receptors comprise a large and complex family of signaling molecules that have been shown to play crucial roles in multiple aspects of vertebrate and invertebrate embryonic development, angiogenesis, wound healing, and tissue homeostasis.¹⁷ In the presence of heparin sulfate glycosamino glycans, FGFs bind with high affinity to the receptor.

FGF receptor 1 (FGFR1) signaling is required in normal GnRH neuronal migration, differentiation, or survival within the hypothalamus, and also plays an essential role in the morphogenesis of the telencephalon, in particular of the olfactory bulbs.¹⁷ *FGFR1* expression has been detected in the nasal placode, developing olfactory bulbs and the GnRH migratory pathways, as well as the hypothalamic GnRH neurons and their projections.¹⁷

FGFR1 was firstly associated with congenital IHH, in 2003, when Dodé and colleagues¹⁸ reported the association of loss-of-function mutations in *FGFR1* with an autosomal-dominant form of Kallmann syndrome. *FGFR1* mutations may cause isolated defects in GnRH neuronal migration without necessarily affecting olfactory bulbs development and, because of that, *FGFR1* defects have been associated with both Kallmann syndrome and normosmic IHH.^{17,19} Currently, *FGFR1* mutations are the second most common known molecular cause of Kallmann syndrome. *FGFR1* mutations are associated with marked phenotypic variability both within and among families and apparent incomplete penetrance.²⁰

FGF8 is considered as a key ligand of the FGFR1 in the ontogenesis of GnRH neurons.^{7,21} In 2008, Falardeau and colleagues²² reported 6 missense mutations in *FGF8* in congenital IHH probands with variable olfactory phenotypes and different degrees of GnRH deficiency, including the rare adult-onset form of IHH. Like FGFR1, FGF8 mutations cause autosomal-dominant congenital IHH.²³ Other malformations most commonly associated with mutations of the FGF system include cleft lip-palate, dental agenesis, and bone defects, such as syndactyly and hand/foot malformation.^{24,25}

More recently, Miraoui and colleagues⁹ investigated genes belonging to the *FGF8* subfamily and identified *FGF17* heterozygous mutations in one normosmic IHH and 2 Kallmann syndrome patients. *FGF17* has emerged as the second-most critical *FGFR1* ligand for GnRH neuron ontogeny and has a strong sequence identity with *FGF8*.⁹ In the same study, *IL17RD* mutations, either in homozygous or heterozygous state, were identified in 8 Kallmann syndrome patients, 6 of them with hearing loss. The *IL17RD* gene encodes a membrane protein belonging to the interleukin-17 receptor (*IL-17R*) protein family. It is part of a group of modulators of FGF signaling, known as “similar expression to FGFs” (SEF). SEF seems to play critical roles in proliferation, migration, and angiogenesis, and interacts with *FGFR1* in transfected human embryonic kidney cells.²⁶ The localization patterns of *IL17rd* in the nasal region of mouse

embryos suggested that *IL17RD* might have a role in the early stages of GnRH neuron fate specification.⁹

HS6ST1 encodes the heparan sulfate 6-O-sulfotransferase enzyme, an important component of *FGFR1* signaling. Heparan 6-O-sulfation is required for anosmin-1 and *FGFR1* functions. *FGF8* and heparan sulfate bind to *FGFR1*, forming a complex and leading to activation of downstream signaling pathways. Interestingly, anosmin-1 acts as a modulatory co-ligand with *FGF8* to activate the *FGFR1* in a heparan sulfate-dependent manner.^{27,28} Tornberg and colleagues²⁷ identified 7 variants in the *HS6ST1* gene in congenital IHH patients either with normal olfaction or variable degrees of olfactory dysfunction.

Some of the variants in *FGF17*, *IL17RD*, and *HS6ST1* were identified in combination with additional variants in other known IHH-associated genes, such as *FGFR1*, *KISS1R*, and *NELF*. Mutations in these genes might act synergistically in the pathogenesis of IHH, suggesting that one allelic defect in *FGF17*, *IL17RD*, or *HS6ST1* is most likely not sufficient cause the phenotype.^{9,27}

Nasal Embryonic Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Factor

Nasal embryonic luteinizing hormone-releasing hormone factor (*NELF*), also known as *NSMF*, is expressed in the olfactory sensory cells and GnRH cells during embryonic development. It serves as a common guidance molecule for the olfactory axon and GnRH neurons across the nasal region.²⁹ Monoallelic and biallelic mutations were identified in *NELF* in normosmic IHH and Kallmann syndrome patients, some of them in association with other IHH genes, including *FGFR1*, *HS6ST1*, *KAL1*, and *TACR3*.^{30,31} These findings suggest that *NELF* is associated with normosmic IHH and Kallmann syndrome, either singly or in combination with a mutation in another gene.^{7,27,31}

Prokineticin 2 and Prokineticin Receptor 2

Prokineticins are cysteine-rich secreted proteins that were originally identified as potent agents mediating gut motility in the digestive system, but were later shown to promote diverse biological functions, including normal development of the olfactory bulb and sexual maturation.³²

Mutations in *PROKR2*, a G-protein-coupled receptor, and its ligand (*PROK2*) were first described by Dodé and colleagues,³³ who studied a cohort of 192 patients with Kallmann syndrome. Ten *PROKR2* and 4 *PROK2* defects were identified in this study. Later, Abreu and colleagues³⁴ studied a cohort of 107 Brazilian patients with congenital IHH. The identification of healthy patients harboring heterozygous mutations in these genes indicated that *PROKR2* haploinsufficiency is not sufficient to cause Kallmann syndrome or normosmic IHH. However, the frequent finding of heterozygous mutations in *PROKR2* in patients with congenital IHH has raised the question of a possible digenic mode of inheritance in these patients.³⁵ Mutations in *PROK2/PROKR2* are estimated to account for 5% to 10% of all Kallmann syndrome cases.²⁰ Because patients who carry mutations in *PROKR2* or *PROK2* have variable degrees of olfactory and reproductive dysfunction, mutations in *PROK2* and *PROKR2* should be considered in all GnRH-deficient subjects with or without anosmia.³⁴

WDR11

The *WDR11* gene encodes a highly conserved protein throughout vertebrate evolution that is expressed in the developing olfactory and GnRH migratory pathway.³⁶ Kim and colleagues³⁷ screened 201 normosmic and hyposmic/anosmic patients with

congenital IHH for mutations in *WDR11* and identified 5 different heterozygous missense mutations in 6 unrelated probands, including 5 normosmic patients and 1 anosmic patient. Because all *WDR11* mutations have been described in the heterozygous state, the inheritance pattern is most likely autosomal dominant.

Chromodomain-Helicase DNA-Binding Protein 7

CHARGE syndrome (OMIM #214800), is a multisystem disorder classically characterized by a variety of congenital anomalies including coloboma, heart defects, choanal atresia, retarded growth and development, genital hypoplasia, ear anomalies, and deafness. Notably, IHH and anosmia are consistent findings in this syndrome, suggesting that the same embryonic migration process could be disturbed in the Kallmann and CHARGE syndromes.

Dominant mutations in the chromodomain-helicase DNA-binding protein 7 (*CHD7*) cause CHARGE syndrome (60%–70% of cases). Kim and colleagues³⁸ studied 197 patients with Kallmann syndrome or normosmic IHH without other features of the CHARGE phenotype. Several heterozygous mutations were identified in these patients, indicating that congenital IHH represents a milder allelic variant of CHARGE syndrome.³⁸ Later studies reported *CHD7* mutations in patients who had Kallmann syndrome and additional features of CHARGE syndrome.³⁹ These findings suggested that *CHD7* analysis is especially recommended in Kallmann syndrome patients who have at least 2 of the following features: ocular coloboma, choanal atresia/stenosis, characteristic external ear anomaly, cranial nerve dysfunction (facial palsy, sensorineural hearing loss, or hypoplastic cranial nerves on imaging), or balance disturbance. In addition, the *CHD7*-positive patient should also be screened for additional CHARGE features.⁴⁰ Currently, mutations in *CHD7* are reported to be present in approximately 7% of patients with Kallmann syndrome; however, when IHH is associated with hearing loss, *CHD7* mutations could be identified in approximately 40% of patients.⁸

Semaphorins 7A and 3A

Semaphorins are a class of secreted and membrane proteins that act as axonal growth cone guidance molecules. *Sema3A* and *Sema7A*-mutant mice have a reduced number of GnRH neurons in their brains. *Sema3A* is essential for the patterning of vomeronasal axons, whereas in *Sema7A* mutants, the olfactory system seems to remain unaffected.^{41–43} Heterozygous loss-of-function mutations have been identified in *SEMA3A* in 28 patients with Kallmann syndrome, some of them in combination with mutations in other IHH genes.^{43–45} Posteriorly, *SEMA7A* mutations were reported in 1 Kallmann and 1 normosmic IHH patient, both with previously identified mutations in other IHH genes.⁴³ These results suggest that *SEMA3A* and *SEMA7A* play a role in the IHH pathogenesis, but up to now it is not completely clear if single variants in this system, especially in *SEMA7A*, are sufficient to cause the disorder.^{43–45}

Sex determining region Y-Box 10

Sex determining region Y-Box 10 (*SOX10*) belongs to the SOX transcription factor family, whose members are involved in several developmental and cellular processes.⁴⁶ Mutations in *SOX10* are a well-known cause of Waardenburg syndrome, characterized by deafness, skin/hair/iris hypopigmentation, Hirschsprung disease, and neurologic defects.⁴⁷ Study of *SOX10*-null mutant mice revealed a developmental role of *SOX10* in olfactory unsheathing glial cells. These mice showed an almost complete absence of these cells along the olfactory nerve pathway, as well as

defasciculation and misrouting of the nerve fibers, impaired migration of GnRH cells, and disorganization of the olfactory nerve layer of the olfactory bulbs.⁴⁷ In addition, a high frequency of olfactory bulb agenesis was identified recently in patients with Waardenburg syndrome, raising the hypothesis that *SOX10* mutations might be involved in the Kallmann syndrome pathogenesis. Indeed, *SOX10* mutations were identified in 8 individuals with Kallmann syndrome, 7 of them with hearing loss, suggesting that *SOX10* should be screened in patients with Kallmann syndrome and deafness.^{47,48}

FEZ family zinc finger 1 and CCDC141

FEZ family zinc finger 1 (*FEZF1*) encodes a transcriptional repressor selectively expressed during embryogenesis in the olfactory epithelium, amygdala, and hypothalamus.^{49,50} In mice, the *Fezf1* product enables axons of olfactory receptor neurons and GnRH neurons to enter the central nervous system. *Fezf1*-deficient mice have impaired axonal projection of pioneer olfactory receptor neurons, which are not able to cross the cribriform plate toward the olfactory bulb.^{51,52} Kotan and colleagues⁵⁰ screened a cohort of 30 Kallmann syndrome patients using candidate gene screening, autozygosity mapping, and whole-exome sequencing, in the search for new causative genes. Homozygous loss-of-function mutations were identified in *FEZF1* in 2 independent consanguineous families, each with 2 affected siblings. The inheritance pattern in both families was consistent with an autosomal-recessive condition.⁵⁰ Curiously, in one of these families, a nonsense homozygous mutation in the *CCDC141* gene was also found in the same siblings harboring a missense *FEZF1* homozygous mutation, and the parents and unaffected siblings were all heterozygous. *CCDC141* encodes the coiled-coil domain containing protein 141, a cytoskeletal associated protein. The *CCDC141* gene product has been implicated in cortical neuronal migration; however, its function is not well-known.⁵³ Kotan and colleagues⁵⁰ demonstrated that *Ccdc141* is expressed in GnRH neurons and olfactory fibers in mice and that knockdown of *Ccdc141* reduces GnRH neuronal migration. These findings corroborate the hypothesis that mutations in this gene might cause additional detrimental effects in patients with Kallmann syndrome already harboring *FEZF1* defects.⁵⁰

AXL

AXL is a receptor tyrosine kinase described in 1991.⁵⁴ The Tyro3, Axl, and Mer (TAM) family of receptor tyrosine kinases are differentially expressed in GnRH neuronal cells. *Axl*/Tyro3-null mice have delayed first estrus and abnormal cyclicity owing to developmental defects in GnRH neuron migration and survival.⁵⁴ Three *AXL* mutations were recently identified in 2 Kallmann syndrome and 2 normosmic IHH subjects.⁵⁵

Immunoglobulin Superfamily Member 10

Using exome and candidate gene sequencing, Howard and colleagues⁵⁶ recently identified rare mutations in the *IGSF10* gene in 6 families with self-limited delayed puberty. Strong expression of *IGSF10* was demonstrated in embryonic nasal mesenchyme during GnRH neuronal migration to the hypothalamus, suggesting a potential role of the immunoglobulin superfamily member 10 (*IGSF10*), in the regulation of GnRH neuronal migration. In addition, *IGSF10* knockdown caused a reduced migration of immature GnRH neurons in vitro, and impaired the migration and extension of GnRH neurons in a zebrafish model.⁵⁶ Notably, rare predicted damaging variants in *IGSF10* gene were also identified in few patients with functional and congenital IHH patients. However, the definitive role of this gene in the pathogenesis of congenital IHH remains to be determined.⁵⁶

GENES IMPLICATED WITH GONADOTROPIN-RELEASING HORMONE SYNTHESIS AND SECRETION

Gonadotropin-Releasing Hormone 1

The human *GNRH1* gene encodes the preprohormone that is ultimately processed to produce GnRH decapeptide.⁵⁷ Although it may be considered the most obvious candidate gene for congenital IHH, *GNRH1* mutations are a very rare cause of normosmic IHH. Despite a large number of individuals screened, only 3 homozygous *GNRH1* mutations were described in patients with normosmic IHH, in an autosomal-recessive mode of inheritance.^{58–60} In addition, one heterozygous *GNRH1* (p.R31C) mutation that affects the conserved GnRH decapeptide sequence was identified in 9 normosmic IHH subjects from 4 unrelated families, giving evidence for a putative “hot spot.”^{59,61} This mode is in contrast with the autosomic-recessive mode of inheritance observed for the other GnRH1 mutations. In vitro studies showed a reduction of the mutant decapeptide capacity to bind GnRH receptor; however, a dominant negative effect was not demonstrated.⁶¹ An effect of haploinsufficiency has been suggested for this variant, leading to partial hypogonadism.⁶⁰ Nevertheless, the role of this heterozygous p.R31C mutation is not clear and raises a discussion on the pathogenic mechanism underlying GnRH mutations.

Kisspeptin 1 and Kisspeptin 1 Receptor

Kisspeptin, encoded by the *KISS1* gene, is the most potent known stimulator of GnRH-dependent luteinizing hormone secretion. Kisspeptin acts exclusively through its cognate receptor, *KISS1R*, a heptahelical G-protein-coupled receptor, expressed in the surface of the GnRH secreting neurons. In the central nervous system, kisspeptin expression is highest in the arcuate and anteroventralperiventricular nuclei, known to send projections to the medial preoptic area, where GnRH cell bodies are mainly located. The kisspeptin/*KISS1R* system is currently recognized as the gatekeeper of the reproductive function.^{62–64}

Loss-of-function mutations of *KISS1R* were first reported in patients with congenital IHH belonging to large consanguineous families by 2 independent researcher groups in 2003.^{62,63} Since then, several different loss-of-function mutations have been described in the *KISS1R* gene in patients with partial or complete normosmic IHH.⁶⁵ Family segregation analyses of these patients showed that individuals with heterozygous alterations in *KISS1R* had a normal pubertal development, confirming a model of autosomal-recessive inheritance for this disease. *KISS1R* mutations are responsible for about 5% of cases of normosmic IHH.^{20,65} Patients with mutations in the gene *KISS1R* have no olfactory changes or other associated clinical conditions.

KISS1 mutations were rarely associated with normosmic IHH. In 2012, Topaloglu and colleagues⁶⁶ described the first homozygous mutation in *KISS1* associated with IHH.

Tachykinin 3 and Tachykinin 3 receptor

A genome-wide single nucleotide polymorphism analysis performed in 9 consanguineous Turkish families with multiple members affected by normosmic IHH led to the identification of inactivating mutations in the genes *TAC3* and *TACR3* in 4 unrelated families.⁶⁷ The *TAC3* encodes neurokinin-B, a member of the substance P-related tachykinin family, whereas *TACR3* encodes neurokinin B receptor, a member of the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors.⁶⁷ It is currently known that mutations in the complex *TAC3/TACR3* are a relatively common cause of normosmic IHH, occurring in more than 5% of affected individuals.⁶⁸

Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor

The GnRH receptor (encoded by the *GNRHR* gene) belongs to the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors, composed of 7 helical transmembrane domains, an extracellular amino-terminal domain, characterized by the absence of a cytoplasmic domain intracellular carboxy-terminal present in other receptors of this family.²⁰ The GnRH receptor is expressed on the surface of gonadotrophes. Upon ligand binding, activation of the GnRH receptor increases calcium mobilization and stimulates influx of extracellular calcium activates phospholipase C, increasing inositol triphosphate and resulting in mobilization of intracellular calcium, stimulating the synthesis and release of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone.⁶⁹

Inactivating mutations in the *GNRHR* gene were the first identified genetic causes of normosmic IHH.⁷⁰ Since the first description in 1997 by de Roux and colleagues,⁷⁰ more than 20 different mutations in homozygous or compound heterozygous, were reported in cases of sporadic or familial normosmic IHH, with no other associated malformations, and always with an autosomal-recessive inheritance.^{71,72} *GNRHR* mutations have been shown to be responsible for significant proportion cases of normosmic IHH, with a prevalence of approximately 17% in sporadic cases and 40% in familial cases with the autosomal-recessive pattern of inheritance.^{71–73}

GNRHR mutations have been associated with a broad phenotypic reproductive spectrum, varying from partial to complete GnRH resistance.^{72,74,75} Indeed, a good genotype–phenotype correlation has been observed, considering that individuals homozygous for complete loss-of-function *GNRHR* mutations in general present with a phenotype of complete IHH and patients carrying partially inactivating mutations usually have partial IHH, with reports of reversal of the hypogonadism and milder cases, as the so-called fertile eunuch syndrome.^{72,75}

HYPOGONADOTROPIC HYPOGONADISM ASSOCIATED WITH OTHER SYNDROMES ***Leptin, Leptin Receptor, and PCSK1***

The early onset of severe obesity associated with IHH may suggest loss-of-function mutations in the *LEP*, *LEPR*, or *PCSK1* genes. Leptin is a fat-derived hormone that regulates body weight by inhibiting food intake and stimulating energy expenditure. Leptin acts through the leptin receptor, a single transmembrane domain peptide expressed on human pituitary cells, as well as in many different sites of the central nervous system (choroid plexus, and the arcuate, ventromedial, dorsomedial and paraventricular nuclei).⁷⁶

The importance of leptin in the reproductive axis was suggested because of the observation that leptin-deficient (*ob/ob*) or leptin-resistant (*db/db*) mice also presented with failure of pubertal development.⁷⁷ Furthermore, exogenous administration of leptin accelerated puberty in mice and normalized reproductive deficiencies in leptin-deficient (*ob/ob*) mice, suggesting that leptin may be a link between body fat and reproductive capability.⁷⁷ Accordingly, loss of body fat owing to starvation or excessive exercise is known to suppress reproduction and results in amenorrhea and infertility.^{78–80}

Inactivating mutations in *LEP* or the gene encoding its receptor, *LEPR*, have been found in patients with severe obesity and IHH. These inactivating mutations account for less than 5% of normosmic IHH and have an autosomal-recessive pattern of transmission.⁸¹

Exactly how the effects of leptin are transmitted to GnRH neurons is unknown. Experimental data suggest that kisspeptin neurons are sensitive to changes in leptin concentrations and metabolic conditions, yet they do not express functional leptin

receptor, which indicates the mode of action is indirect.^{82,83} In summary, in humans, leptin and its receptor has a permissive role in the control of reproduction, being necessary but not sufficient for the onset of puberty and maintenance of fertility.⁸⁴

The *PCSK1* gene encoded the proprotein convertase-1, a neuroendocrine convertase 1 (NEC1) that processes large precursor proteins into mature bioactive products.⁸⁵ Proprotein convertase-1 cleaves proopiomelanocortin (POMC) and acts in combination with proprotein convertase-2 to process proinsulin and proglucagon in pancreatic islets.⁸⁵ The first report of a patient with congenital NEC1 deficiency associated with obesity and IHH was published in 1995.⁸⁶ Mutations in this gene have been described in homozygous or compound heterozygous state, suggesting a pattern of autosomal recessive inheritance. The clinical characteristics generally include obesity, abnormal glucose homeostasis, and IHH.^{86–88}

OTUD4/RNF216/PNPLA6

Gordon Holmes syndrome is characterized by cerebellar ataxia/atrophy and normosmic IHH.^{89,90} Using whole-exome sequencing, digenic homozygous mutations in the *RNF216* and *OTUD4* genes were recently identified in a consanguineous family whose members were affected by ataxia and IHH.⁹¹ Additional screening, by targeted sequencing of candidate genes in similarly affected patients, identified compound heterozygous truncating mutations in *RNF216* in an unrelated patient and single heterozygous deleterious mutations in 4 other patients. All patients had progressive ataxia and dementia. Neuronal loss was observed in cerebellar pathways and the hippocampus and defects were detected at the hypothalamic and pituitary levels of the reproductive endocrine axis.⁹¹ Both *RNF216* and *OTUD4* encode proteins that regulate ubiquitination, indicating that abnormalities in this fundamental cellular process can have pathologic effects on pituitary components of the reproductive endocrine cascade.⁹¹ Mutations affecting *RNF216* and *OTUD4* can synergize to cause neurologic syndrome associated with congenital IHH.⁹¹

Investigating the genetic causes of Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes by exome sequencing approach, it was demonstrated that both syndromes were caused by recessive *PNPLA6* mutations.⁹² It has been suggested that the deficiency of *PNPLA6* may cause a delayed neurodegeneration and a reproductive failure is owing to impaired gonadotropin release.⁹⁰

DMXL2

A homozygous in-frame deletion of 15 nucleotides in *DMXL2* gene was identified in 3 brothers with a very complex neurologic endocrine syndrome characterized by gonadotropic axis deficiency, central hypothyroidism, peripheral demyelinating sensorimotor polyneuropathy, mental retardation, and profound hypoglycemia progressing to nonautoimmune insulin-dependent diabetes mellitus.⁹³ The mutated exhibited lower *DMXL2* mRNA expression levels in peripheral blood. Similarly, low levels of Dmxl2 expression in neuronal cells of mice lead to a partial gonadotropic axis deficiency, resulting in a very low fertility, owing to a loss of GnRH neurons in the hypothalamus, suggesting a new mechanism of GnRH deficiency.⁹³

NR0B1

NR0B1 (also known as *DAX1*) is an orphan member of the nuclear receptor superfamily that functions in the proper formation of the adult adrenal gland.⁹⁴ The *NR0B1* gene product is a transcription factor expressed in the adrenal cortex, gonads, hypothalamus, and pituitary gonadotropes.⁹⁵ *DAX1* mutations cause congenital adrenal hypoplasia associated with IHH. The expression of *DAX1* in the first stages of gonadal

and adrenal differentiation and in the developing hypothalamus provided a basis for adrenal insufficiency and IHH in affected males, and was consistent with a role for *DAX1* in gonadal sex function.⁹⁶ More than 60 mutations in the *NR0B1* gene have been described in patients with congenital adrenal hypoplasia and most of these mutations are frameshift or nonsense mutations located throughout the gene, leading to truncation of the carboxy-terminal region and missense mutations are less common.⁹⁷ The pathogenesis of IHH in *NR0B1* mutation is complex and seems to involve combined hypothalamic and pituitary defect.

Homeobox Gene Expressed in Embryonic Stem Cells 1

Homeobox gene expressed in embryonic stem cells 1 (*HESX1*) is a developmental gene identified in mouse that encodes an embryologic transcription repressor important for organ commitment and cell differentiation and proliferation.^{98,99} *HESX1* defects have been associated with the phenotype of septooptic dysplasia, isolated growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency in humans.^{99–101}

Newbern and colleagues¹⁰¹ screened 217 individuals with congenital IHH, including normosmic IHH and Kallmann syndrome, and identified heterozygous missense mutations in 3 Kallmann syndrome patients. It was hypothesized that Kallmann syndrome might represent a milder phenotypic manifestation of *HESX1* mutations in these cases.¹⁰¹

REVERSAL OF HYPOGONADISM

Congenital IHH has been traditionally considered a lifelong and permanent condition. However, anecdotal reports of spontaneous recovery of the reproductive function after testosterone therapy have been described for many years.^{102,103} Currently, the prevalence of IHH reversal is observed in 10% to 15%, occurring in both males and females.¹⁰⁴ Reversal of congenital IHH has been reported in patients with normosmic IHH and Kallmann syndrome, but is more common in patients with a phenotype of partial IHH.^{4,5,68,72} Reversal should be suspected if testicular volume increases during testosterone administration or in cases of spontaneous fertility in IHH patients. A brief discontinuation of hormonal therapy to assess reversibility is indicated in these cases.⁴ Nevertheless, the reversibility may not always be lifelong, and relapse of the hypogonadism has been observed in up to 5% of cases.⁵ Interestingly, IHH reversal has been reported in several patients with confirmed pathogenic mutations in IHH genes, occurring more commonly in association with *GNRHR*, *FGFR1*, *TAC3/TACR3*, *CHD7*, and *PROKR2*. These observations indicate that the effects of a genetic defect can be overcome.³ The triggers leading to reversal of IHH are not well-understood. Potential mechanisms involve the upregulation of genes involved in the regulation of GnRH axis or plasticity of the GnRH-producing neurons in adulthood in response to sexual steroids administration.^{4,5} Interestingly, hypothalamic progenitor cells in rat can give rise to GnRH neurons, suggesting that postnatal genesis of GnRH neurons can occur in certain circumstances.^{3,105}

OLIGOGENIC INHERITANCE

There are several disorders that were thought initially to be monogenic, but have subsequently proven to be caused by more than one gene defect.⁷ Over the years, the traditional Mendelian view of congenital IHH as a monogenic disorder has been revised after the identification of oligogenic forms of congenital IHH. Mutations in more than 1 gene have been reported in several cases in normosmic IHH/Kallmann

syndrome, involving different combinations of genes.^{7,9,30,33,106,107} The genes more frequently associated to digenic inheritance include *FGFR1*, *FGF8*, *KAL1*, *PROKR2*, *PROK2*, *GNRHR*, *KISS1R*, and *NELF*.⁷ In some of these cases, the segregation pattern of these digenic/oligogenic mutations in the pedigree can partially account for the phenotypic variability among individual family members.¹³ Currently, oligogenic inheritance account for 10% to 20% of congenital IHH cases.^{13,108}

SUMMARY

Congenital IHH is a rare disease with an uncovered complex model of genetics (monogenicity and oligogenicity) that might apply to a large proportion of patients. At present, more than 25 different genes have been implicated in congenital IHH, which accounts for approximately 50% of cases.^{8,9} The greater accessibility of new genetic sequencing methods probably will increase the percentage of patients with defined molecular diagnosis through the use of gene panels and new genes not yet described could be associated with congenital IHH using the exomic sequencing techniques.

REFERENCES

1. Silveira LF, Latronico AC. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(5):1781–8.
2. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev* 1998;19(5):521–39.
3. Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, et al. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab* 2011;22(7):249–58.
4. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2007;357(9):863–73.
5. Sidhoum VF, Chan YM, Lippincott MF, et al. Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(3):861–70.
6. Quinton R, Duke VM, De Zoysa PA, et al. The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81(8):3010–7.
7. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest* 2007;117(2):457–63.
8. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, et al. Expert consensus document: European consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2015;11(9):547–64.
9. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, et al. Mutations in *FGF17*, *IL17RD*, *DUSP6*, *SPRY4*, and *FLRT3* are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet* 2013;92(5):725–43.
10. Franco B, Guioli S, Pragliola A, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 1991;353(6344):529–36.
11. Legouis R, Hardelin JP, Leuilliers J, et al. The candidate gene for the x-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 1991;67(2):423–35.

12. Hardelin J-P, Levilliers J, del Castillo I, et al. X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(17):8190–4.
13. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, et al. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(34):15140–4.
14. Kauffman AS, Smith JT. Kisspeptin signaling in reproductive biology. New York: Springer; 2013.
15. Dwyer AA, Sykiotis GP, Hayes FJ, et al. Trial of recombinant follicle-stimulating hormone pretreatment for gnrh-induced fertility in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(11):E1790–5.
16. Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics 1. *The J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1532–8.
17. Kim SH, Hu Y, Cadman S, et al. Diversity in fibroblast growth factor receptor 1 regulation: learning from the investigation of Kallmann syndrome. *J Neuroendocrinol* 2008;20(2):141–63.
18. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 2003;33(4):463–5.
19. Xu N, Qin Y, Reindollar RH, et al. A mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene causes fully penetrant normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(3):1155–8.
20. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol* 2009;5(10):569–76.
21. Olsen SK, Li JY, Bromleigh C, et al. Structural basis by which alternative splicing modulates the organizer activity of FGF8 in the brain. *Genes Dev* 2006;20(2): 185–98.
22. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest* 2008;118(8):2822–31.
23. Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LF, et al. Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(7):3491–6.
24. Costa-Barbosa FA, Balasubramanian R, Keefe KW, et al. Prioritizing genetic testing in patients with Kallmann syndrome using clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(5):E943–53.
25. Villanueva C, Jacobson-Dickman E, Xu C, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism with split hand/foot malformation: a clinical entity with a high frequency of FGFR1 mutations. *Genet Med* 2015;17(8):651–9.
26. Yang RB, Ng CK, Wasserman SM, et al. A novel interleukin-17 receptor-like protein identified in human umbilical vein endothelial cells antagonizes basic fibroblast growth factor-induced signaling. *J Biol Chem* 2003;278(35):33232–8.
27. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 108(28):11524–9.
28. Hu Y, Bouloux P-M. Novel insights in FGFR1 regulation: lessons from Kallmann syndrome. *Trends Endocrinol Metab* 2010;21(6):385–93.
29. Kramer PR, Wray S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes Dev* 2000;14(14):1824–34.

30. Miura K, Acierno JS, Seminara SB. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet* 2004;49(5):265–8.
31. Xu N, Kim H-G, Bhagavath B, et al. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril* 2011;95(5):1613–20.
32. Li JD, Hu WP, Boehmer L, et al. Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *J Neurosci* 2006;26(45):11615–23.
33. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2006;2(10):e175.
34. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, et al. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(10):4113–8.
35. Matsumoto S-I, Yamazaki C, Masumoto K-H, et al. 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.
36. Valdes-Socin H, Almanza MR, Fernández-Ladreda MT, et al. Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Neurological and Psychiatric Disorders in Endocrine Diseases* 2015;29.
37. Kim HG, Ahn JW, Kurth I, et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2010;87(4):465–79.
38. Kim HG, Kurth I, Lan F, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2008;83(4):511–9.
39. Jongmans MC, Admiraal RJ, van der Donk KP, et al. CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *J Med Genet* 2006;43(4):306–14.
40. Bergman JE, de Ronde W, Jongmans MC, et al. The results of CHD7 analysis in clinically well-characterized patients with Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(5):E858–62.
41. Cariboni A, Davidson K, Rakic S, et al. Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Mol Genet* 2011;20(2):336–44.
42. Messina A, Ferraris N, Wray S, et al. Dysregulation of semaphorin7a/β1-integrin signaling leads to defective gnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility. *Hum Mol Genet* 2011;20(24):4759–74.
43. Käsäkoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res* 2014;75(5):641–4.
44. Young J, Metay C, Bouligand J, et al. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod* 2012;27(5):1460–5.
45. Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet* 2012;8(8):e1002896.

46. Elmaleh-Bergès M, Baumann C, Noël-Pétröff N, et al. Spectrum of temporal bone abnormalities in patients with Waardenburg syndrome and SOX10 mutations. *AJNR Am J Neuroradiol* 2013;34(6):1257–63.
47. Pingault V, Bodereau V, Baral V, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet* 2013;92(5):707–24.
48. Vaaralahti K, Tommiska J, Tillmann V, et al. De novo SOX10 nonsense mutation in a patient with Kallmann syndrome and hearing loss. *Pediatr Res* 2014;76(1):115–6.
49. Eckler MJ, McKenna WL, Taghvaei S, et al. Fezf1 and fezf2 are required for olfactory development and sensory neuron identity. *J Comp Neurol* 2011;519(10):1829–46.
50. Kotan LD, Hutchins BI, Ozkan Y, et al. Mutations in FEZF1 cause Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet* 2014;95(3):326–31.
51. Hirata T, Nakazawa M, Yoshihara S, et al. Zinc-finger gene fez in the olfactory sensory neurons regulates development of the olfactory bulb non-cell-autonomously. *Development* 2006;133(8):1433–43.
52. Murata K, Tamogami S, Itou M, et al. Identification of an olfactory signal molecule that activates the central regulator of reproduction in goats. *Curr Biol* 2014;24(6):681–6.
53. Fukuda T, Sugita S, Inatome R, et al. CAMDI, a novel disrupted in schizophrenia 1 (DISC1)-binding protein, is required for radial migration. *J Biol Chem* 2010;285(52):40554–61.
54. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, et al. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991;11(10):5016–31.
55. Salian-Mehta S, Xu M, Knox AJ, et al. Functional consequences of AXL sequence variants in hypogonadotropic hypogonadism. *The J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(4):1452–60.
56. Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med* 2016;8(6):626–42.
57. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, et al. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. *Science* 1986;234(4782):1366–71.
58. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med* 2009;360(26):2742–8.
59. Chan Y-M, de Guillebon A, Lang-Muritano M, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(28):11703–8.
60. Mengen E, Tunc S, Kotan LD, et al. Complete idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to homozygous GNRH1 mutations in the mutational hot spots in the region encoding the decapeptide. *Horm Res Paediatr* 2016;85(2):107–11.
61. Maione L, Albarel F, Bouchard P, et al. R31C GNRH1 mutation and congenital hypogonadotropic hypogonadism. *PLoS One* 2013;8(7):e69616.
62. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 2003;349(17):1614–27.
63. de Roux N, Genin E, Carel J-C, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the kiss1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci* 2003;100(19):10972–6.

64. Navarro VM, Castellano JM, García-Galiano D, et al. Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Rev Endocr Metab Disord* 2007;8(1):11–20.
65. Tusset C, Trarbach B, Silveira LFG, et al. Aspectos clínicos e moleculares do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011;55(8):501–11.
66. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med* 2012;366(7):629–35.
67. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet* 2009;41(3):354–8.
68. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(6):2857–67.
69. Kakar SS, Musgrove LC, Devor DC, et al. Cloning, sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (gnrh) receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;189(1):289–95.
70. de Roux N, Young J, Misrahi M, et al. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 1997;337(22):1597–603.
71. Chevrier L, Guimiot F, de Roux N. GnRH receptor mutations in isolated gonadotropic deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2011;346(1–2):21–8.
72. Beneduzzi D, Trarbach EB, Min L, et al. Role of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in patients with a wide spectrum of pubertal delay. *Fertil Steril* 2014;102(3):838–46.
73. Beranova M, Oliveira LMB, Bedecarrats GY, et al. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism 1. *The J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(4):1580–8.
74. Seminara SB, Beranova M, Oliveira LM, et al. Successful use of pulsatile gonadotropin-releasing hormone (gnrh) for ovulation induction and pregnancy in a patient with gnrh receptor mutations 1. *The J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(2):556–62.
75. Pitteloud N, Boepple PA, DeCruz S, et al. The fertile eunuch variant of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: spontaneous reversal associated with a homozygous mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor 1. *The J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(6):2470–5.
76. Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol* 2000;143(3):293–311.
77. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996;12(3):318–20.
78. Licinio J. Leptin in anorexia nervosa and amenorrhea. *Mol Psychiatry* 1997;2(4):267–9.
79. Hill JW, Elmquist JK, Elias CF. Hypothalamic pathways linking energy balance and reproduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;294(5):E827–32.
80. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998;392(6674):398–401.

81. Strobel A, Issad T, Camoin L, et al. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998;18(3):213–5.
82. Quennell JH, Mulligan AC, Tups A, et al. Leptin indirectly regulates gonadotropin-releasing hormone neuronal function. *Endocrinology* 2009;150(6):2805–12.
83. Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, et al. Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Invest* 2014;124(6):2550–9.
84. Tena-Sempere M. KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology* 2006;83(5–6):275–81.
85. Jansen E, Ayoubi TA, Meulemans SM, et al. Neuroendocrine-specific expression of the human prohormone convertase 1 gene hormonal regulation of transcription through distinct camp response elements. *J Biol Chem* 1995;270(25):15391–7.
86. O'Rahilly S, Gray H, Humphreys PJ, et al. Impaired processing of prohormones associated with abnormalities of glucose homeostasis and adrenal function. *N Engl J Med* 1995;333(21):1386–91.
87. Farooqi IS, Volders K, Stanhope R, et al. Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(9):3369–73.
88. Farooqi IS, O'Rahilly S. Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008;4(10):569–77.
89. Balasubramanian R, Crowley WF. Isolated gnRH deficiency: a disease model serving as a unique prism into the systems biology of the gnRH neuronal network. *Mol Cell Endocrinol* 2011;346(1–2):4–12.
90. Topaloglu AK, Lomniczi A, Kretschmar D, et al. Loss-of-function mutations in PNPLA6 encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(10):E2067–75.
91. Margolin DH, Kousi M, Chan YM, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med* 2013;368(21):1992–2003.
92. Synofzik M, Gonzalez MA, Lourenco CM, et al. PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain* 2014;137(Pt 1):69–77.
93. Tata B, Huijbregts L, Jacquier S, et al. Haploinsufficiency of dmxl2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of gnRH neurons in mouse. *PLoS Biol* 2014;12(9):e1001952.
94. Niakan KK, McCabe ER. DAX1 origin, function, and novel role. *Mol Genet Metab* 2005;86(1–2):70–83.
95. Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. Hypogonadotropic hypogonadism. *Semin Reprod Med* 2002;20(4):327–38.
96. Swain A, Zanaria E, Hacker A, et al. Mouse dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. *Nat Genet* 1996;12(4):404–9.
97. Achermann JC, Jameson JL. Advances in the molecular genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(1):3–15.
98. Hermesz E, Mackem S, Mahon KA. Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 1996;122(1):41–52.

99. Dattani MT, Martinez-Barbera J-P, Thomas PQ, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 1998;19(2):125–33.
100. Carvalho LR, Woods KS, Mendonca BB, et al. A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J Clin Invest* 2003;112(8):1192–201.
101. Newbern K, Natrajan N, Kim HG, et al. Identification of HESX1 mutations in Kallmann syndrome. *Fertil Steril* 2013;99(7):1831–7.
102. Rezvani I, DiGeorge A, Rutano J, et al. Delayed puberty and anosmia; coincidence or Kallmann variant? *Pediatr Res* 1975;9:224.
103. Bauman A. Markedly delayed puberty or Kallmann's syndrome variant. *J Androl* 1986;7(4):224–7.
104. Dwyer AA, Raivio T, Pitteloud N. Management of endocrine disease: reversible hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol* 2016;174(6):R267–74.
105. Salvi R, Arsenijevic Y, Giacomini M, et al. The fetal hypothalamus has the potential to generate cells with a gonadotropin releasing hormone (gnrh) phenotype. *PLoS One* 2009;4(2):e4392.
106. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, et al. 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.
107. Canto P, Munguia P, Söderlund D, et al. Genetic analysis in patients with Kallmann syndrome: coexistence of mutations in prokineticin receptor 2 and KAL1. *J Androl* 2009;30(1):41–5.
108. Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, et al. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril* 2011;96(6):1424–30.e6.