MARCELA MOURA FRANÇA

Análise dos genes *GHRH* e *GLI2* em pacientes com
deficiência de hormônio do crescimento congênita

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold

Coorientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

França, Marcela Moura

Análise dos genes *GHRH* e *GLI2* em pacientes com deficiência de hormônio do crescimento congênita / Marcela Moura França. -- São Paulo, 2011.

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

Orientador: Ivo Jorge Prado Arnhold.

Coorientador: Alexander Augusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Hormônio do crescimento/deficiência 2.Hipopituitarismo/etiologia
3.Hormônio do crescimento/genética 4.Hormônio liberador de hormônio do
crescimento/genética 5.GLI2 proteína 6.Hipófise/embriologia
7.Neuroipófise/anormalidades 8.Dedos de zinco 9.Fatores de transcrição

USP/FM/DBD-357/11

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Projeto temático 05/04726-0 e Bolsa de Doutorado 07/56490-5.

Dedicatória

Ao Alexandre, meu querido esposo, por todo o seu amor, pelo seu companheirismo e pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus pais, Acy e Marcondes, pelo amor incondicional e pelo incentivo constante na busca de novos conhecimentos.

Agradecimentos

Nesse período de conclusão, lembranças, acontecimentos, momentos dessa trajetória saltam a nossa mente. Recordo um começo incerto, cheio de dúvidas e receios: conhecer um mundo novo, conviver com pessoas diferentes, e ser aceita pelo grupo.

Generosamente, fui acolhida pela Profa. Berenice Mendonça, uma pessoa iluminada, que sabe reconhecer e cultivar o melhor de cada um, um exemplo de liderança. Seu convívio trouxe a oportunidade de um inestimável aprendizado profissional e pessoal, que certamente contribuíram para a minha formação.

Também sou grata à Dra. Berenice pela escolha de meu orientador. Não sei se por sorte, destino ou desígnio divino, a Dra. Berenice me presenteou com esta escolha perfeita.

Num primeiro instante, acredito que tenha ocorrido um receio mútuo, afinal a escolha da orientação não tinha sido do orientador e nem da orientanda. Mas, logo pude perceber a grande honra de ser orientada pelo tão querido Prof. Ivo Arnhold. Meu orientador é uma pessoa de adorável convívio, com infinitas qualidades e, sendo bem sincera, até hoje não descobri defeitos, enfim um ser humano evoluído. Agradeço imensamente toda a atenção dedicada, o cuidado, a presença constante, o incentivo e a

confiança que tornaram esse percurso mais tranquilo. Muito obrigada pela contribuição de forma definitiva para minha formação profissional e pessoal.

Uma enorme satisfação, nessa caminhada, foi ter como meu coorientador, o Prof. Alexander Jorge, uma pessoa de notável inteligência que nos contagia com o gosto pela pesquisa. Mesmo com tantas alunas para orientar, dedicou seu precioso tempo para discutirmos sobre os trabalhos de bancada, os resultados encontrados ao longo do doutorado e das pesquisas paralelas. Muito obrigada pela dedicação, pelo incentivo e pelos enriquecedores ensinamentos.

Certamente, as amizades que fiz ao longo desse período tornaram a pós-graduação bem mais prazerosa. Agradeço as minhas queridas amigas da pós-graduação pelo carinho e incentivo; e por compartilharem boa parte das dificuldades e vitórias durante essa jornada. Luciana Montenegro, Débora Coutinho e Everlayny Costalonga por terem me apresentado à bancada. Aline Otto e Fernanda Corrêa, queridas amigas que compartilharam a árdua tarefa de organizar a casuística de hipopituitarismo e dividiram bons e maus momentos nas manhãs de ambulatório. Alexsandra Malaquias, uma amiga muito especial, exemplo de dedicação à família e aos pacientes, na qual sempre encontrei apoio e atenção. Adriana Braz e Andréa Leal pela atenção, carinho e incentivo. Patrícia Pugliesi, Ana Canton, Renata Scalco, Gabriela Vasques e Andria Lido pelo adorável convívio. Maíra Brandão que iniciou comigo a pós-graduação e compartilhou as angústias do começo dessa caminhada.

Foi muito gratificante a oportunidade de poder conviver de perto e aprender com as estimadas professoras Profa. Elaine Costa, Profa. Tania Bachega e Profa. Candida Fragoso. Um agradecimento especial à Profa. Ana Cláudia Latrônico, pela sua capacidade de motivar e pelas preciosas sugestões.

Agradeço a todos os pós-graduandos, pós-graduados e médicos assistentes do LIM/42, pelo amigável convívio. Ao amigo Madson pelo grande apoio e por facilitar minha entrada no grupo, me apresentando à Dra. Berenice. À Luciani Carvalho pelos ensinamentos moleculares e pelas empolgantes discussões sobre hipopituitarismo. Aos colegas Letícia Gontijo e Bruno Ferraz pela ajuda nas apresentações orais.

Agradeço a todos os funcionários do LIM/42 pelo trabalho dedicado. À Mirian Nishi, Mariana Funari e Cidinha pela atenção e pelas valiosas dicas de bancada. Aos funcionários Cristina Rossi, Rosana Midori, Fran, Rosangele e Ricardo pela disponibilidade. Em particular, gostaria de agradecer à secretária Nilda Oliveira, pela sua admirável eficiência e pelo empenho em sempre me ajudar.

Meu agradecimento especial às amigas Lorena Lima, Bárbara Melo, e Ana Regina, pessoas muito queridas que me ajudaram no início de minha trajetória em São Paulo e pela participação em importantes momentos da minha vida.

Aos pacientes que são a nossa maior fonte de ensinamentos e de inspiração para a pesquisa, sem os quais essa tese não teria razão de ser, meu sincero agradecimento pela colaboração.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), o meu reconhecido agradecimento, pelo apoio financeiro.

A conclusão dessa tese representa mais que uma conquista profissional, mas também pessoal, e teve a fundamental participação da minha família, que é o meu alicerce, e de Deus, que está sempre me guiando.

Agradeço aos meus pais, Acy e Marcondes, pelo amor, pela educação proporcionada e por não medirem esforços para proporcionar o melhor para mim e meus irmãos. À minha mãe que sempre colocou os filhos em primeiro lugar; uma supermãe que sempre confiou no meu potencial e acreditou no meu sucesso; e que como bióloga me motivou com gosto pelo estudo dos seres vivos. Ao meu pai, um homem vencedor, um professor universitário, que certamente me transmitiu genes ligados ao interesse pelas descobertas e novos conhecimentos. Ao meu irmão mais velho Marcondes Jr., pessoa extremamente inteligente e humilde, um jovem professor, exemplo de dedicação à ciência; e ao meu irmão caçula Marden pelo carinho e pela disponibilidade em ajudar. Aos meus sogros, Lúcia e Barbosa que me acolheram com carinho e amor de pais. Às minhas cunhadas Andréa, Renata, Lia e Raquel, que são para mim as irmãs que eu não tenho, e sempre me incentivaram. Aos meus avós e tios pelo apoio constante, principalmente à querida tia Sonia.

Gostaria de destacar meu sincero agradecimento à minha família pela mobilização para revisar e corrigir este trabalho, principalmente ao meu pai, a minha mãe, ao primo Leonardo Pildas e aos tios Mavignier e Tânia.

Ao Alexandre, meu marido, meu agradecimento mais do que especial! Sua participação plena em todos os instantes da minha vida é minha fonte de equilíbrio e sabedoria. Faltam palavras para descrever toda a gratidão que tenho, pelo amor, e pela dedicação sem limites, mas, principalmente, pela compreensão de dividir minha atenção com essa tese. Não posso deixar de mencionar sua participação ativa para essa conquista, prontamente se disponibilizando para viajar comigo em busca de colher os dados e coletar o sangue dos membros da família Magalhães. Isto fez toda a diferença para os resultados dessa tese.

Por fim, agradeço a Deus, por tantas alegrias na minha vida e, por sempre me proporcionar serenidade e fortaleza para enfrentar as dificuldades.

Epígrafe

“A única maneira de fazer um bom trabalho é amando o que você faz. Se você ainda não encontrou, continue procurando. Não se contente. Assim como no amor, você saberá quando tiver encontrado”.

Steve Jobs

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. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de Abreviaturas e Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A embriogênese hipofisária e os defeitos genéticos.....	3
1.2 Sonic Hedgehog e GLI2	7
1.3 Deficiência de GH isolada e defeitos na síntese ou secreção de GH	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. MÉTODOS.....	16
3.1 Considerações éticas	17
3.2 Casuística.....	17
3.3 Avaliação clínica.....	18
3.4 Avaliação hormonal	19
3.5 Avaliação por imagem	21
3.6 Análise molecular do GHRH e GLI2	22
3.7 Análise in silico das variantes encontradas	22
4. RESULTADOS.....	24
Capítulo 1 “Absence of GH releasing-hormone (GHRH) mutations in selected patients with isolated GH deficiency”.....	25
Capítulo 2 “Novel heterozygous nonsense <i>GLI2</i> mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly”	35
Capítulo 3 “Considerável frequência de variantes alélicas no gene <i>GLI2</i> identificadas nos pacientes com deficiência de GH congênita”	49
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES.....	68
7. ANEXO - Yearbook of Pediatric Endocrinology, 2011	71
8. REFERÊNCIAS	75

Listas

Lista de Abreviaturas e Siglas

	Aminoácidos
A	Alanina
C	Cisteína
D	Ácido aspártico
E	Ácido glutâmico
F	Fenilalanina
G	Glicina
H	Histidina
I	Isoleucina
L	Leucina
M	Metionina
N	Asparagina
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
T	Treonina
V	Valina
W	Triptofano
ACTH	Hormônio corticotrófico
ADH	Hormônio antidiurético
DGHI	Deficiência de hormônio do crescimento isolada
DGH	Deficiência de hormônio do crescimento
DHHM	Deficiência hipotálamo hipofisária múltipla
FSH	Hormônio folículo-estimulante

GH	Hormônio do crescimento
GH1	Gene que codifica o hormônio do crescimento
GHRH	Hormônio liberador de hormônio do crescimento
GHRHR	Receptor do hormônio liberador de hormônio do crescimento
GLI2	<i>GLI-Kruppel family member 2</i>
HPE	Holoprosencefalia
IGF-1	Fator de crescimento insulino-símile tipo 1
IGFBP-3	Proteína ligadora de IGFs tipo 3
IFMA	Ensaio imunofluorimétrico
IRMA	Ensaio imunorradiométrico
kb	Kilobases
LH	Hormônio luteinizante
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRL	Prolactina
PROP1	Profeta do Pit1
RIA	Radioimunoensaio
RM	Ressonância magnética
SHH	Sonic Hedgehog
SNC	Sistema nervoso central
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio tireotrófico
Z	Escore de desvio-padrão

Lista de Figuras

Figura 1 -	Esquema da embriogênese hipofisária	4
Figura 2 -	Ontogenia das moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição na embriogênese pituitária de camundongos	5
Figura 3 -	Sinalização Sonic Hedgehog	7
Figura 4 -	Modelo esquemático representativo da estrutura gênica e proteica do <i>GLI2</i>	10
Figura 5 -	Eixo somatotrópico.....	11
Figura 6 -	Modelo esquemático representativo da estrutura gênica e proteica do <i>GHRH</i>	13
Figura 7 -	Modelo esquemático da proteína <i>GLI2</i> com a localização das variantes com troca de aminoácido identificadas	54
Figura 8 -	Modelagem da região de ligação ao DNA da proteína <i>GLI2</i> com p.R473H	57

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Características dos pacientes selecionados	18
Tabela 2 -	Características dos pacientes com variantes não-sinônimas no <i>GLI2</i>	52
Tabela 3 -	Avaliação dos efeitos biológico das variantes não-sinônimas no <i>GLI2</i> : características físico-químicas e conservação dos aminoácidos, análise <i>in silico</i> e estudo em população controle.....	55
Tabela 4 -	Variantes silenciosas identificadas no <i>GLI2</i>	60
Tabela 5 -	Variantes identificadas na região intrônica do <i>GLI2</i>	61
Tabela 6 -	Polimorfismos no <i>GLI2</i> identificados nos pacientes com DGH	61

Resumo

França MM. *Análise dos genes GHRH e GLI2 em pacientes com deficiência de hormônio do crescimento congênita* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011. 82 p.

Introdução: Alterações em genes relacionados com a secreção de GH ou a organogênese hipofisária foram identificadas em pacientes com deficiência de hormônio do crescimento (DGH) congênita. Entretanto, poucos casos de DGH têm sua etiologia esclarecida. O GHRH é um candidato óbvio para explicar a deficiência isolada de GH (DIGH). Na literatura, os estudos de análise do *GHRH* não conseguiram identificar mutações, porém são antigos e utilizaram uma metodologia com limitações. A maioria dos pacientes com deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHMM) apresenta neuroipófise ectópica sugerindo a importância do estudo de genes que atuam no início do desenvolvimento hipofisário, com expressão inclusive no infundíbulo. O *GLI2* é um fator de transcrição na sinalização Sonic Hedgehog, envolvido com o início da embriogênese hipofisária, expresso na bolsa de Rathke primordial e no diencéfalo ventral. Previamente, mutações no *GLI2* foram encontradas em pacientes com holoprosencefalia, e também alterações hipofisárias.

Objetivos: Analisar o *GHRH* em 151 pacientes com DIGH (42 brasileiros e 109 encaminhados de centros internacionais) e analisar o *GLI2* em 180 pacientes brasileiros com DIGH ou DHMM por PCR e sequenciamento automático dos genes; e descrever o fenótipo dos pacientes com mutações identificadas. **Resultados:** No *GHRH* foram identificadas seis variantes em heterozigose com previsão benigna pelas análises *in silico*. A análise do *GLI2* identificou três mutações novas em heterozigose com códon de parada prematuro (p.L788fsX794, p.L694fsX722 e p.E380X), e geração de proteínas truncadas, com perda do domínio responsável pela ativação transcricional. A mutação p.L788fsX794 foi identificada numa paciente com baixa estatura, polidactilia, epilepsia e hipoglicemias. Apresentava deficiência de GH, TSH,

ACTH, prolactina, LH e FSH. Na investigação familiar foi diagnosticada DIGH em dois tios e DHHM numa prima. Estes familiares, além de sua mãe e outros parentes maternos também apresentaram a mutação e polidactilia. A mutação p.L694fsX722 foi identificada num menino com baixa estatura por deficiência de GH, além de lábio leporino e fenda palatina. Seu pai, embora saudável, também apresentou a mutação. A mutação p.E380X foi identificada numa lactente com retardo no desenvolvimento, hipoglicemias, poliúria e polidipsia. Apresentava deficiência de GH, ACTH, TSH e ADH. Sua mãe aparentemente normal também apresentou a mutação. Todos os pacientes com DGH e mutação no *GLI2* apresentaram neuroipófise ectópica (não visualizada na paciente com p.E380X), adenoipófise hipoplásica e ausência de holoprosencefalia na ressonância magnética. Dezoito variantes não-sinônimas também foram identificadas no *GLI2* em 24 pacientes. Dezesesseis dessas variantes foram consideradas deletérias em pelo menos um programa de predição *in silico* e dez delas não foram encontradas em população controle. O fenótipo dos pacientes foi predominante de DHHM e com neuroipófise ectópica e sem holoprosencefalia. Variantes silenciosas, intrônicas e polimorfismos foram identificados no *GLI2*, mas aparentemente sem alteração funcional. **Conclusão:** Não identificamos mutação no *GHRH* e se realmente existe mutação neste gene como causa de DGH, deve ser muito rara. Variantes no *GLI2* são frequentes (15%), indicando seu importante papel na etiologia da DGH congênita. Além disso, ampliamos o espectro fenotípico dos pacientes com mutações no *GLI2*, que foi caracterizado por DIGH ou DHHM, inclusive com diabetes insipidus, neuroipófise ectópica (maioria) e ausência de holoprosencefalia. Outras características observadas foram polidactilia, defeito de linha média facial e herança autossômica dominante com penetrância incompleta.

Descritores: 1.Hormônio do crescimento/deficiência 2.Hipopituitarismo/etiologia 3.Hormônio do crescimento/genética 4.Hormônio liberador de hormônio do crescimento/genética 5.GLI2 proteína 6.Hipófise/embriologia 7.Neuroipófise/anormalidades 8.Dedos de zinco 9.Fatores de transcrição

Abstract

França MM. *GHRH and GLI2 genes analysis in patients with congenital growth hormone deficiency* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2011. 82 p.

Introduction: Alterations in genes related to GH secretion and pituitary organogenesis have been identified in patients with congenital GH deficiency (GHD). However, in only few cases of GHD the etiology has been established. GH-releasing hormone (GHRH) is an obvious candidate to explain isolated GH deficiency (IGHD). Previous reports in the literature did not identify mutations in *GHRH*, however, the methodology used was limited. Most patients with combined pituitary hormone deficiency (CPHD) have an ectopic posterior pituitary lobe (EPP) suggesting the study of genes involved in early pituitary development and also expressed in the infundibulum. *GLI2* is a transcription factor in Sonic hedgehog signaling expressed in the primordial Rathke's pouch and ventral diencephalon during early pituitary development. Previously, *GLI2* mutations were found in patients with holoprosencephaly and pituitary abnormalities. **Aim:** Analyse *GHRH* in 151 patients with IGHD (42 Brazilian and 101 from international centers) and *GLI2* in 180 Brazilian patients with IGHD or CPHD by PCR and automatic sequencing, and describe the phenotype of patients with mutations. **Results:** In *GHRH*, six heterozygous variants that are benign according to *in silico* analysis were identified. *GLI2* study revealed three novel heterozygous mutations leading to premature stop codons (p.L788fsX794, p.L694fsX722 e p.E380X) and truncated proteins, without the transcriptional activator domain. p.L788fsX794 was identified in a girl with short stature, polydactyly, epilepsy and hypoglycemia. She had GH, TSH, ACTH, prolactina, LH and FSH deficiencies. Two uncles had IGHD and one cousin CPHD. These relatives, the mother and other maternal relatives had polydactyly and carried the mutation. p.L694fsX722 was identified in a boy with short stature due to

GHD who also had cleft lip and palate. His healthy father also carried the mutation. p.E380X was identified in an infant with delayed development, hypoglycemia, polyuria and polydipsia. She had GH, ACTH, TSH and ADH deficiencies. Her apparently normal mother also carried the mutation. All patients with GHD and *GLI2* mutations had an EPP (not visualized in the patient with p.E380X), hypoplastic anterior pituitary lobe and absence of holoprosencephaly on MRI. Eighteen non-synonymous variants in *GLI2* were identified in 24 patients. Sixteen of these were considered deleterious in at least one *in silico* prediction program and ten of these were not found in the control population. The phenotype was mainly of CPHD and EPP without holoprosencephaly. Several synonymous and intronic *GLI2* variants and polymorphisms apparently without functional consequences were identified.

Conclusions: No mutations in *GHRH* were identified and if mutations in this gene exist as a cause of IGHD, they must be very rare. Variants in *GLI2* are frequent (15%) indicating its important role in the etiology of GHD. Furthermore, we expanded the clinical spectrum of patients with *GLI2* mutations characterized by IGHD or CPHD including diabetes insipidus, ectopic posterior pituitary lobe (in most patients) and absence of holoprosencephaly. Additional features were polydactyly and midline facial defects and the inheritance was autosomal dominant with incomplete penetrance.

Descriptors: 1.Growth hormone/deficiency 2.Hypopituitarism/etiology 3.Growth hormone/genetics 4.Growth hormone-releasing hormone/genetics 5.*GLI2* protein 6.Pituitary/embryology 7.Pituitary gland, Posterior/abnormalities 8.Zinc fingers 9.Transcription factors

1 INTRODUÇÃO

A deficiência de hormônio do crescimento (DGH) é uma causa rara de retardo do crescimento e baixa estatura. Sua prevalência em crianças é estimada em 1:3480 a 1:10.000 crianças em diferentes populações estudadas ⁽¹⁻³⁾. Pode apresentar-se de forma isolada (DGHI) ou combinada a outras deficiências hormonais hipofisárias, conhecida como deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM).

A etiologia da DGH está relacionada com uma causa adquirida ou uma causa congênita ⁽⁴⁾. A DGH adquirida está associada a: tumores, irradiação e processos infecciosos, inflamatórios ou traumáticos, envolvendo a região hipotálamo-hipofisária. Entre as causas congênitas estão os insultos perinatais e as alterações genéticas, no entanto, persiste um grande número de casos de DGH congênita, que não tem sua origem estabelecida ⁽⁵⁾.

Uma frequência aumentada de insultos perinatais, como parto traumático com apresentação pélvica e hipóxia perinatal, foi observada em crianças com deficiência de GH (DGH) ⁽⁶⁾. Com isso, surgiu uma das hipóteses para explicar a etiologia da DGH congênita, a teoria do trauma. Esta se baseia no fato de que apresentações anômalas no parto poderiam acarretar uma lesão traumática-isquêmica da região hipotálamo-hipofisária, assim como a asfixia perinatal, de qualquer etiologia, poderia ocasionar lesões hipóxicas danificando o eixo hipotálamo-hipofisário ^(7, 8).

Por outro lado, a associação da DGH com outras síndromes genéticas, micropênis, defeitos faciais e anormalidades do sistema nervoso central (SNC), como holoprosencefalia e displasia septo-óptica, indicam que

a DGH congênita possa ter sua origem relacionada com um defeito ocorrido desde o período do desenvolvimento pré-natal ^(9, 10).

Além disso, anormalidades em estruturas como o prosencéfalo e os olhos, que compartilham origem embriológica comum à hipófise, são observadas em alguns pacientes com hipopituitarismo congênito ⁽¹¹⁾. Isto sugere que tenha ocorrido uma má formação durante a embriogênese da linha média anterior, sobretudo envolvendo genes que atuam no início do desenvolvimento. A presença de casos familiares também indica que a DGH congênita tenha sua etiologia relacionada com uma causa genética ⁽¹²⁾.

Desde a década de 80, estudos de genes envolvidos na embriogênese hipofisária ^(5, 13) ou na secreção de GH ^(14, 15) foram implicados na etiologia da DGH. No entanto, ainda é pequeno o número de casos em que foram identificadas alterações genéticas.

1.1 Embriogênese hipofisária e defeitos genéticos

A formação da hipófise se inicia a partir da invaginação do ectoderma da cavidade oral, que origina a bolsa de Rathke primitiva. Em contato próximo, ocorre a evaginação do ectoderma neural do diencéfalo ventral, que dá origem ao infundíbulo e à hipófise posterior (Figura 1). Na sequência, a bolsa de Rathke definitiva é formada com suas células progenitoras originando a hipófise anterior. Depois, ocorre a diferenciação espacial e temporal dos vários tipos celulares: somatotrofos, lactotrofos, gonadotrofos,

corticotrofos e tireotrofos, sendo responsáveis pela secreção dos hormônios: GH, prolactina, FSH e LH, ACTH e TSH, respectivamente ⁽¹⁶⁾.

Figura 1 - Esquema da embriogênese hipofisária

A partir de estudos moleculares com modelos animais, principalmente camundongos, ocorreram grandes avanços no conhecimento sobre a embriologia da hipófise. Uma complexa cascata genética com moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição, interagindo num processo coordenado de ativação e repressão, culmina com o desenvolvimento hipofisário normal (Figura 2) ^(5, 17). Defeitos em alguns genes, envolvidos nesta cascata, estão implicados na origem das anormalidades hipotálamo-hipofisárias.

Figura 2 - Ontogenia das moléculas sinalizadoras e fatores de transcrição na embriogênese hipofisária de camundongos (Adaptado de Zhu X, 2007)

Mutações no *PROP1* são a causa genética mais frequente de hipopituitarismo ^(11, 18). Os pacientes com essas mutações apresentam a adenoipófise com tamanho variado, desde pequena até aumentada, e a neuroipófise sempre em posição tópica nas imagens de ressonância magnética (RM) ^(5, 19). Vale ressaltar que o *PROP1* está numa fase mais tardia na cascata de sinalização da embriogênese hipofisária, quando a morfologia da hipófise já está mais definida. Daí se justifica a ausência de alterações morfológicas da neuroipófise nos pacientes com mutações no *PROP1*.

No entanto, as alterações morfológicas da região hipotálamo-hipofisária são frequentemente encontradas nas imagens de RM dos

pacientes com DGH ⁽²⁰⁾. A presença da neuroipófise ectópica é altamente específica e preditiva para DGH e, quando associada com a não visualização da haste hipofisária, é significativamente mais comum em pacientes com DHHM comparado com DGH ^(21, 22). A hipoplasia da adenoipófise é um sinal mais inespecífico, porém também é mais frequente em crianças com DGH, principalmente com DHHM ^(9, 23).

Os pacientes com DGH, principalmente quando combinada com a deficiência de outros hormônios hipofisários, costumam apresentar a neuroipófise em posição ectópica. Embora esses casos sejam os mais frequentes, raros pacientes com DGH e neuroipófise ectópica tiveram alterações genéticas identificadas. Os genes que já foram relacionados com DGH e neuroipófise ectópica são *HESX1*, *LHX4*, *SOX3* e *OTX2* ⁽⁵⁾. Esses genes atuam numa fase mais inicial no desenvolvimento hipofisário comparado com o *PROP1*.

Cada vez mais, tem-se demonstrado a importância de genes envolvidos no período inicial da organogênese hipofisária e da estreita interação entre a bolsa de Rathke rudimentar e o diencéfalo ventral para a formação normal da hipófise ⁽²⁴⁾.

Moléculas com expressão no diencéfalo ventral e adjacências, como *Bone morphogenetic proteins 2 e 4 (BMP2 e BMP4)*, *Fibroblast growth factor 8 (FGF8)* e *Sonic hedgehog (SHH)*, têm uma função crítica no início da organogênese hipofisária. O *BMP4* e o *FGF8* atuam em tempos diferentes, respectivamente na indução da formação da bolsa rudimentar e na

regulação dos genes *LHX3* e *LHX4*, essenciais para o desenvolvimento da bolsa de Rathke definitiva ^(24, 25).

1.2 Sonic Hedgehog e GLI2

A via de sinalização SHH (Shh; OMIM*600725) tem importante papel na indução da proliferação celular de modo tecido específico durante a embriogênese ⁽²⁶⁾. O acionamento da via SHH ocorre a partir da clivagem do SHH e acréscimo de uma molécula de colesterol. Em seguida, o SHH se liga ao receptor de transmembrana *Patched*, que ao ser ativado, libera o co-receptor de transmembrana *Smoothened* para que ocorra a ativação dos fatores de transcrição da família GLI. Os fatores de transcrição, GLI1, GLI2 e GLI3 irão ativar ou reprimir genes alvos (Figura 3).

Figura 3 - Sinalização Sonic Hedgehog

O *Shh* está envolvido no desenvolvimento hipofisário, embora esteja ausente na bolsa de Rathke primordial. Está expresso no diencéfalo ventral e no ectoderma oral adjacente à invaginação que dará origem à bolsa de Rathke ⁽²⁷⁾. O *Gli2* é expresso no diencéfalo ventral e na bolsa de Rathke em formação. Sua inativação leva a uma variável ausência da glândula hipofisária e malformações da linha média do diencéfalo ventral, em camundongos ⁽²⁸⁾. A deleção dupla em homozigose do *Gli1/Gli2* resulta na ausência completa da hipófise ⁽²⁸⁾.

Em 2010, foi melhor definido o modo como a sinalização Shh/Gli está envolvida no desenvolvimento hipotálamo-hipofisário. Camundongos com mutação condicional do *Gli2* apresentaram variável hipoplasia da hipófise anterior, associado com um defeito na proliferação das células progenitoras hipofisárias ⁽²⁹⁾. *Gli2* também está implicado no desenvolvimento da hipófise posterior, via expressão de *Bmp4* e *Fgf8*. Camundongos *Gli2* mutantes apresentaram redução importante da expressão de *Bmp4* e *Fgf8* no diencéfalo ventral e ausência da hipófise posterior ⁽²⁹⁾. Camundongos com nocaute condicional do *Gli1* e do *Gli3* não apresentaram anormalidades hipofisárias, indicando que o *Gli2* é o principal fator de transcrição da família Gli na hipófise ⁽²⁹⁾.

A via de sinalização SHH também desempenha função na formação dos dedos ⁽³⁰⁾. Defeitos no *GLI3* foram associados com polidactilia em camundongos e em pacientes com Síndrome de Greig ou Síndrome de Pallister-Hall ⁽³¹⁻³⁴⁾.

O Shh é também expresso em estruturas da linha média como notocorda e assoalho do tubo neural, com importante função na embriogênese do SNC ⁽²⁶⁾.

Em seres humanos, mutações em genes que levam à diminuição da sinalização SHH (como o *SHH*) estão associadas à holoprosencefalia (HPE, OMIM%236100). Trata-se da malformação cerebral mais frequente em seres humanos, resultado da clivagem incompleta do prosencéfalo, entre os dias 18 e 28 de vida embrionária ^(26, 35).

Numa coorte de 390 pacientes com HPE ou fenótipo HPE-símile, Roessler et al. ⁽³⁶⁾ identificaram a presença de cinco mutações em heterozigose no gene *GLI2* com perda de função. Também foi observado que os pacientes afetados apresentavam polidactilia, defeitos faciais e anormalidades hipofisárias, embora a acurada descrição da região hipotálamo-hipofisária e das deficiências hormonais hipofisárias não tenha sido descrita ^(36, 37). Variantes não-sinônimas no *GLI2* também foram descritas em pacientes brasileiros com defeitos de linha média facial e anormalidades cerebrais, mas sem alterações hipofisárias ^(38, 39).

Desta forma, o *GLI2* mostrou-se como interessante gene candidato para pacientes com DGH congênita sem etiologia conhecida, pelo seu destacado papel na embriogênese da hipófise anterior e posterior e, ainda, pela identificação de anormalidades hipofisárias nos pacientes com HPE e mutações no *GLI2*.

O *GLI2* (OMIM*165230) é um gene da família GLI que foi descoberto a partir da sua amplificação em gliomas cerebrais, daí a origem de seu nome, também conhecido como oncogene *GLI2*. Está localizado no braço longo do cromossomo 2, posição q14, abrange uma região de 195,36 kb, possui 13 éxons e codifica a proteína GLI2, com 1586 aminoácidos. Esta proteína é um fator de transcrição que contém: uma região de dedos de zinco, que corresponde ao domínio de ligação ao DNA, uma região amino-terminal (NH₂) com função de repressão da transcrição e uma região carboxi-terminal (COOH) com função de ativação da transcrição (Figura 4).

A análise do *GLI2* em pacientes com DGH foi objeto do artigo ⁽⁴⁰⁾ no capítulo 2 em resultados.

Figura 4 - Modelo esquemático representativo da estrutura gênica e proteica do GLI2

1.3 Deficiência de GH isolada e defeitos na síntese ou secreção de GH

Quando a DGH ocorre de forma isolada (DGHI), o defeito pode estar restrito ao eixo somatotrópico, caracterizado pela síntese ou secreção de GH inadequada. A síntese e a secreção do GH pela hipófise são reguladas, sobretudo por hormônios hipotalâmicos: hormônio liberador de GH (GHRH) que assim como a grelina, secretagogo de GH produzido pelas células parietais gástricas, exercem papel estimulatório, e a somatostatina, que exerce efeito inibitório sobre os somatotrofos na adenoipófise ⁽⁴¹⁾ (Figura 5). O GHRH é secretado pelo núcleo arqueado na circulação porta-hipofisária e age por meio do receptor de GHRH (GHRH-R), localizado na superfície celular dos somatotrofos. Estimula a proliferação dos somatotrofos e a síntese e secreção de GH ⁽⁴²⁾.

Figura 5 - Eixo somatotrópico

Até o momento, os fatores genéticos implicados na etiologia da DGHI incluem os genes que codificam o GH (*GH1*) e o receptor de GHRH (*GHRH-R*). De modo geral, a frequência de mutações nos pacientes com DGHI é de cerca de 10%, dependendo da casuística; em casos familiares, com frequência de até 38% ⁽⁴³⁾. Em famílias com mutação no *GHRH-R*, foi descrito um padrão de herança autossômico recessivo e nas famílias com mutação no *GH1* o modo de herança foi autossômico dominante ou recessivo ⁽⁴⁴⁾. Outro dado interessante é que os pacientes com mutação no *GH1* ou no *GHRH-R*, quando comparados com os pacientes sem mutação, apresentam características de DGH mais grave, com valores de Z da altura significativamente menores ⁽⁴³⁾.

O *GHRH* é um gene candidato óbvio para a etiologia da DGHI, pelo seu importante papel na fisiologia do eixo do GH, entretanto até o momento não foram descritas mutações ⁽⁴⁴⁾. Em 1990, Mullis et al. ⁽⁴⁵⁾ excluíram grandes deleções no *GHRH* em 53 crianças com DGHI por meio de análise por *Southern blotting*. Um estudo de ligação genética, com 23 famílias com DGHI, utilizou três microssatélites e excluiu associação de DGH e alteração no *GHRH* em 19 famílias, com intervalo de confiança de 97-100% ⁽⁴⁶⁾. Nas demais famílias, foram também descartadas alterações no *GHRH*, por meio da análise do polimorfismo de conformação de fita simples (SSCA), pois não ocorreu alteração no padrão de mobilidade eletroforética. Vale ressaltar que estes estudos foram realizados numa fase inicial da biologia molecular e utilizaram uma metodologia mais limitada. Em nenhum desses trabalhos o *GHRH* foi sequenciado.

Alba e Salvatori ⁽⁴⁷⁾ desenvolveram o modelo animal de camundongos com nocaute do *Ghrh* e constataram que os camundongos *Ghrh* (-/-) apresentam significativo retardo do crescimento, comparado com os camundongos *Ghrh* (+/-) e (+/+), e têm 55-60% do tamanho dos camundongos (+/+) na 8ª semana de vida. Nos camundongos *Ghrh* (-/-), foi observado: redução dos valores de RNAm-GH pituitário, GH pituitário, IGF-1 sérico e RNAm-IGF-1 hepático, além de hipoplasia da adenoipófise; um fenótipo semelhante ao encontrado em camundongos com mutação no *Ghrhr* ⁽⁴⁷⁾. Desta forma, o modelo animal contribui para que o *GHRH* seja um importante candidato para a etiologia da DGHI.

O *GHRH* é um gene localizado no cromossomo 20, posição q11.23, abrange uma região de 5,76 kb, possui 4 exons e codifica uma proteína de 108 aminoácidos (Figura 6).

A análise do *GHRH* em pacientes com DGHI foi objeto do artigo ⁽⁴⁸⁾ no capítulo 1, em resultados.

Figura 6 - Modelo esquemático representativo da estrutura gênica e proteica do GHRH

2 OBJETIVOS

1. Analisar o gene *GHRH* em pacientes com deficiência de GH isolada;
2. Analisar o gene *GLI2* em pacientes com deficiência de GH (isolada ou combinada a outros hormônios hipofisários);
3. Descrever o fenótipo dos pacientes com eventuais mutações encontradas, especialmente com a caracterização clínica e hormonal e a descrição da morfologia da região hipotálamo-hipofisária.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, com nº 0810/07. Consentimentos, por escrito, foram obtidos de todos os pacientes ou pais/tutores antes do início do estudo genético.

3.2 Casuística

Foram selecionados 180 pacientes com deficiência de GH congênita (DGH ou DHHM) sem diagnóstico etiológico estabelecido, acompanhados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) nos últimos 15 anos. O diagnóstico de DGH foi baseado em dados clínicos, auxológicos e exames complementares laboratoriais e de imagem. Foram excluídos pacientes com tumores na região hipotálamo-hipofisária. A descrição da casuística está na tabela 1.

A população controle estudada foi constituída de 155 indivíduos adultos saudáveis sem baixa estatura.

Tabela 1 - Características dos pacientes selecionados

n	180
Sexo (masculino : feminino)	114 : 66
DGHI : DHHM	42 : 138
Idade inicial (anos) mediana (intervalo)	10,5 (0,5 a 28,7)
Z da altura inicial mediana (intervalo)	-4,3 (-2,0 a -9,1)
Pico máximo de GH mediana (intervalo)	1,2 (0,1 a 5,1) IRMA 0,5 (0,08 a 5,0) IFMA
Localização da neuroipófise:	
tópica	24
ectópica	124
não visualizada	18
não disponível	14
Tipo de parto:	
cesáreo	51
vaginal (cefálico : pélvico)	99 (60:39)
fórceps	5
não disponível	25
Alterações no SNC associadas (n):	
displasia septo-ótica	7
holoprosencefalia	1
meningocele esfenoidal	3
outras	6

3.3 Avaliação clínica

A altura dos pacientes foi mensurada por meio de estadiômetro de precisão milimétrica, e o escore de desvio-padrão (Z) da altura foi calculado usando padrões britânicos de referência ⁽⁴⁹⁾. O peso foi mensurado em balança digital comum. O grau de desenvolvimento puberal foi avaliado de

acordo com a classificação de Marshall e Tanner. Foram incluídos no estudo os pacientes com Z da altura menor que -2.

3.4 Avaliação hormonal

A avaliação hormonal da DGH foi realizada, na maioria dos pacientes, por meio de dois testes de estímulo do GH: teste da clonidina e teste da hipoglicemia insulino-induzida. O teste da clonidina consistiu na coleta de sangue para dosagem do GH nos tempos 0, 60, 90 e 120 minutos, após administração da clonidina ($100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ de superfície corporal, VO). No teste da hipoglicemia insulino-induzida foi realizada administração de 0,05-0,1U/kg de peso de insulina regular (IV) e, concomitantemente foi realizado o teste combinado com administração de TRH ($200 \mu\text{g}/\text{IV}$) e de GnRH ($100 \mu\text{g}/\text{IV}$). Foram coletadas amostras de sangue periférico para dosagem da glicemia, GH, cortisol, TSH, PRL, LH e FSH, nos tempos -15, 0, 15, 30, 45, 60 e 90 minutos após a administração da insulina, do TRH e do GnRH. Nos pacientes com contra-indicação para o teste da hipoglicemia insulino-induzida, foi realizado o teste combinado modificado com administração adicional de ACTH sintético ($250 \text{ mcg}/\text{IV}$). Foi coletado sangue para avaliação de IGF-1, IGFBP-3, testosterona (sexo masculino) ou estradiol (sexo feminino), sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS), T3, T4 e T4 livre basais.

As dosagens laboratoriais hormonais foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42. A dosagem do GH foi determinada pelo método imunorradiométrico (IRMA) até 1993 e depois pelo método imunofluorimétrico (IFMA), com anticorpos monoclonais (AutoDELFIA, Wallac, Turku, Finland). As dosagens de estradiol, LH, FSH, T3, T4 total, T4 livre, TSH, prolactina, cortisol, testosterona e DHEAS foram realizados por diversos métodos. As concentrações de IGF-1 e IGFBP-3 foram determinadas por RIA (DSL. Webster, TX, USA) ou ensaio de quimioluminescência (IMMULITE, Diagnostic Products Corporation - DPC, Los Angeles, CA). Os valores de IGF-1 e IGFBP-3 foram expressos como escore de desvio-padrão (Z), em relação ao padrão de normalidade para sexo e idade, de acordo com os respectivos ensaios comerciais.

Deficiência de GH foi definida pelos valores máximos de GH abaixo de 7,0 ng/mL (IRMA) e 5,0 ng/mL (IFMA) após hipoglicemia e/ou administração de clonidina. Resposta de cortisol, após hipoglicemia ou ACTH sintético, foi considerada normal quando ocorreu incremento ≥ 8 µg/dL e um pico de cortisol ≥ 18 µg/dL e como deficiência parcial de ACTH quando ocorreu um incremento no valor de cortisol sem atingir o pico de 18 µg/dL. Deficiência de TSH foi determinada por baixas concentrações de T4 livre e/ou T4 total com concentração de TSH baixa ou normal. Hipogonadismo hipogonadotrófico foi definido pela ausência de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, após 13 anos nas meninas e 14 anos nos meninos, e concentrações de LH e FSH indetectáveis ou normais. Deficiência de prolactina foi determinada pelo valor de máximo de prolactina < 20 µg/L.

(RIA), após estímulo com TRH. Deficiência de ADH foi definida pela densidade urinária <1010 e volume urinário > 50 ml/kg em 24h e/ou naqueles pacientes com prova de privação hídrica compatível com diabetes insipidus neurogênico.

De acordo com a avaliação hormonal hipofisária realizada, os pacientes foram divididos em dois grupos: deficiência de GH isolada (DGHI) e deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM).

3.5 Avaliação por imagem

Rx de mão e punho foram obtidos para determinação da idade óssea e avaliados pelo método de Greulich & Pyle ⁽⁵⁰⁾.

A avaliação da região hipotálamo-hipofisária foi realizada por ressonância magnética (RM) com um aparelho de 1,5 tesla (Sigma GE, Milwaukee, Wisconsin, USA). Foram obtidos cortes coronais e sagitais em T1 e T2 com TR: 350 ms e TE: 20 ms. Para as imagens coronais foram utilizados cortes de 3 mm, com 10% de intervalo antes e após a administração intravenosa de gadolínio. Também foi realizada RM de encéfalo para avaliar a presença de possíveis malformações cerebrais associadas, como holoprosencefalia.

3.6 Análise molecular do *GHRH* e *GLI2*

A pesquisa molecular do *GHRH* foi realizada nos pacientes com DGHI e do *GLI2* nos pacientes com DGHI e com DHHM. Os detalhes técnicos do estudo molecular dos genes *GHRH* e *GLI2* estão descritos nos capítulos relacionados da seção resultados, capítulos 1 ⁽⁴⁸⁾ e 2 ⁽⁴⁰⁾, respectivamente.

3.7 Análise *in silico* das variantes encontradas

Todas as variantes alélicas encontradas foram estudadas *in silico* para avaliar seu potencial impacto biológico. Foi realizada pesquisa pelo PubMed e OMIM para verificar se as variantes estavam descritas na literatura e, também, a pesquisa nos bancos de dados Ensembl, dbSNP, HapMap e 1000 Genomes, que são repositórios de informação sobre variabilidade genética.

No caso das variantes não-sinônimas, foi realizada a análise do grau de conservação do aminoácido em diferentes espécies e a comparação das características físico-químicos dos aminoácidos selvagem e mutado. Também foi feita a predição *in silico* do impacto da troca de aminoácido na estrutura e função da proteína, por meio dos programas computacionais PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), MutationTaster (<http://www.mutationtaster.org>) e SNAP (<http://rostlab.org/services/snap>).

A avaliação quanto à mudança na previsão do sítio de clivagem (*splicing*) foi feita pelos programas de computador GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) e BDGP Splice Site Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), para as variantes silenciosas e intrônicas.

4 RESULTADOS

Capítulo 1: "Absence of GH releasing-hormone (GHRH) mutations in selected patients with isolated GH deficiency"

Marcela M. França, Alexander A. L. Jorge, Kyriaki S. Alatzoglou, Luciani R. S. Carvalho, Berenice B. Mendonca, Laura Audi, Antonio Carrascosa, Mehul T. Dattani, and Ivo J. P. Arnhold.

J Clin Endocrinol Metab 96: E1457–E1460, 2011.

Absence of GH-Releasing Hormone (GHRH) Mutations in Selected Patients with Isolated GH Deficiency

Marcela M. França, Alexander A. L. Jorge, Kyriaki S. Alatzoglou, Luciani R. S. Carvalho, Berenice B. Mendonca, Laura Audi, Antonio Carrascosa, Mehul T. Dattani, and Ivo J. P. Arnhold

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (M.M.F., A.A.L.J., L.R.S.C., B.B.M., I.J.P.A.), Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, LIM/42, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-900, Brazil; Developmental Endocrinology Research Group (K.S.A., M.T.D.), Clinical and Molecular Genetics Unit, UCL Institute of Child Health, London WC1N 1EH, United Kingdom; and Department of Paediatrics (L.A., A.C.), Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Raras), Autonomous University, 08035 Barcelona, Spain

Context: Although numerous reports of mutations in *GH1* and *GHRHR* (GHRH receptor) causing isolated GH deficiency (IGHD) have been published, mutations in *GHRH* itself have not been hitherto reported but are obvious candidates for GH deficiency.

Objective: The aim of this study was to identify mutations in *GHRH* in a large cohort of patients with IGHD.

Patients and Methods: DNA was isolated from 151 patients diagnosed with IGHD at national and international centers. Seventy-two patients fulfilled all the following criteria: severe short stature (height SD score ≤ -2.5), low peak GH after stimulation (peak ≤ 5 ng/ml), eutopic posterior pituitary lobe, and absence of mutations in *GH1* and *GHRHR* and therefore were strong candidates for *GHRH* mutations. The coding sequence and splice sites of *GHRH* were amplified by PCR with intronic primers and sequenced.

Results: In five of 151 patients (four of 42 from Brazil), the GHRH c.223 C>T, p.L75F change was identified in heterozygosity. This variant has been previously reported as a polymorphism and is more frequent in African than European and Asian populations. Six allelic variants (five novel) that do not predict change of amino acids or splice sites were identified in five patients: c.147 C>T, p.S49S, IVS1 -70 G>A, IVS1 -74 T>C, IVS3 -47 del1, and IVS3 +7 G>A/IVS3+41 G>A. No functional mutations were found in this cohort.

Conclusions: *GHRH* mutations were not identified in a selected cohort of patients with IGHD, suggesting that, if they exist, they may be an extremely rare cause of IGHD. Other, as-yet-unidentified genetic factors may be implicated in the genetic etiology of IGHD in our cohort. (*J Clin Endocrinol Metab* 96: E1457–E1460, 2011)

The biosynthesis and secretion of GH by the pituitary gland are under control of a variety of hormonal agents, predominantly GHRH and somatotropin release-inhibiting factor (1). GHRH selectively induces GH transcription and hormone release by acting on GHRH receptors (GHRHR) expressed on the somatotroph cell surface.

The incidence of isolated GH deficiency (IGHD) has been estimated to be between 1:3,000 and 1:10,000 births (2). Although most cases are sporadic, some patients have an affected relative, suggesting a genetic etiology. Familial GH deficiency has been classified according to the inheritance pattern as autosomal recessive (type I), autosomal

dominant (type II), and X linked (type III). With the advances in the genetic etiology of GH deficiency, the types of GH deficiency may be reclassified according to the underlying gene defect (3).

Alterations in *GH1* have been reported in families with autosomal recessive or dominant GH deficiencies (4). Autosomal recessive GH deficiency can also be caused by mutations in *GHRHR* (4). Recessive and dominant mutations in the GH secretagogue (ghrelin) receptor have been reported in patients with partial GH deficiency (5, 6). The cholinergic muscarinic receptor gene has been screened in patients with isolated GH deficiency, but no functional mutations have been identified (7).

Mutations of the *GHRH* gene itself are obvious candidates for GH deficiency but have not yet been reported. *GHRH* is located on chromosome 20q11.23. In an early study, Mullis *et al.* (8) did not identify deletions in *GHRH* in 53 children with isolated GH deficiency, who have been screened by Southern blotting. Subsequently Perez Jurado *et al.* (9) studied polymorphic microsatellite markers located up to three centiMorgan from *GHRH* in 23 families with isolated GH deficiency; linkage of the IGHD phenotype to *GHRH* was excluded in 19 families with a confidence limit of 97–100%. In the four remaining families, most of the coding and the promoter region were amplified by PCR and submitted to single-strand conformation analysis, but no difference in electrophoretic patterns of migration were observed (9). Although these techniques were reasonable at that time, their sensitivity is far from ideal.

In the present study, we sequenced the coding region and splice sites of the *GHRH* gene in a large international cohort of patients diagnosed with isolated GH deficiency by the referring centers. In a selected subgroup, all patients had severe short stature, low peak GH after stimulation, posterior pituitary lobe in the normal position on magnetic resonance imaging, and absence of mutations in both *GH1* and *GHRH* receptor genes and were considered strong candidates.

Patients and Methods

Patients

One hundred fifty-one patients (81 males) with congenital IGHD were recruited from several national and international centers: 74 Caucasian patients from the Iberian Peninsula from the Pediatric Endocrinology Unit of Hospital Vall d'Hebron in Barcelona, Spain; 42 Brazilian patients from the Developmental Endocrinology Unit of the Hospital das Clinicas in São Paulo, Brazil; and 35 familial cases referred to the Developmental Endocrinology Research Group at the University College London, Institute of Child Health in London, United Kingdom (18 Caucasian; 12 from the Indian subcontinent; two Israeli Jews; and

one each Danish, Turkish, and Arab patients). This study was approved by the Ethics Committee of the corresponding institution, and an informed written patient or parental consent was obtained before initiating the genetic studies. The retrospective clinical details included gestational age; birth length and weight; consanguinity and familial cases; target height; age, height, and weight at diagnosis; GH peak after stimulation tests; and magnetic resonance imaging of the hypothalamic-pituitary region. The diagnosis of GH deficiency in each center used established criteria. For patients recruited in São Paulo, the diagnosis of IGHD was made in patients with short stature (height SD score < −2) and failure to respond to two GH stimulation tests, usually clonidine and insulin-induced hypoglycemia (peak GH levels < 5 ng/ml by immunoradiometric assay and < 3.3 ng/ml by immunofluorometric assay) (10). The absence of deficiencies of the other pituitary hormones was established by the normal basal values of T₄, cortisol, prolactin, TSH, gonadotropins, and testosterone (postpubertal boys) or estradiol (postpubertal girls) as well as the TSH, prolactin, and cortisol response to combined insulin-TRH infusion (11).

To increase the likelihood of identifying patients with genetic GH deficiency due to *GHRH* mutations, 72 patients with IGHD (subgroup 1) were selected as strong candidates because all had a height SD score of −2.5 or less, peak GH concentrations after stimulation tests of 5 ng/ml or less, posterior pituitary lobe in the normal position (or not visualized) on magnetic resonance imaging, and mutations in both *GH1* and *GHRHR* genes had been excluded (4, 12) (Supplemental Table 1, published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>). Because the phenotype of *GHRH* mutations is not as yet known, *GHRH* was also analyzed in 79 patients with IGHD (subgroup 2) who did not fulfill all the above-mentioned criteria (Supplemental Table 2).

Genetic screening

DNA was extracted from peripheral lymphocytes and the four coding exons and exon-intron boundaries of *GHRH* (ENSEMBL accession no. ENST00000237527) were amplified using intronic primers (three fragments; Supplemental Table 3) and sequenced on an ABI PRISM 3100 automated sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Details of PCR amplifications and sequencing are provided in the Supplemental Data. Effects of the sequence variation on splicing were predicted by using the BDGP Splice Site Prediction software (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html).

Results

Seven different heterozygous allelic variants in *GHRH* were found in five patients from subgroup 1 and five patients from subgroup 2 (Table 1 and Supplemental Tables 1 and 2).

In five patients, a transition of cytosine to thymidine at nucleotide 223 in exon 3, coding for the replacement of leucine by phenylalanine at codon 75, previously described as polymorphism rs4988492, was found (13). This variant was present in four of 42 Brazilian patients and in one of 74 Caucasian patients from the Iberian Pen-

TABLE 1. Allelic variants in *GHRH* found in heterozygous state in patients with isolated GH deficiency

Number of patients and ethnicity	Nucleotide	Location	Protein	Variant
Four Brazilian, 1 Caucasian	c.223 C>T	Exon 3	p.L75F	rs4988492 ^a
One Brazilian	c.147 C>T	Exon 2	p.S49S	Novel
One Caucasian	IVS3 + 7G>A/ IVS3 + 41 G>A	Intron 3		Novel
One Caucasian	IVS1 – 70 G>A	Intron 1		rs41303817 ^a
One Indian	IVS1 – 74 T>C	Intron 1		Novel
One Caucasian	IVS3 – 47 del1	Intron 3		Novel

^a Previously reported as polymorphisms (13).

insula. The latter had a brother with IGHD who did not have this polymorphism. Leucine at codon 75 is conserved among nonhuman primates but not in several other mammals.

One patient had a novel silent heterozygous substitution (c.147 C>T, p.S49S). Three additional patients each had different heterozygous intronic changes, IVS1 – 70 G>A, IVS1 – 74 T>C, and IVS3 – 47 del1. One patient was compound heterozygous for IVS3 + 7 G>A/IVS3 + 41 G>A (Table 1). All of these variants were predicted not to affect splicing, based on splice site prediction models. Of note, the patients with IVS1 – 74 T>C and IVS3 – 47 del1 each had an affected sibling carrying only the wild-type allele.

Discussion

GHRH is an obvious candidate for mutations causing genetic IGHD. Anatomic and functional abnormalities of the connection between the hypothalamus and the anterior pituitary, which prevent interaction of *GHRH* with its receptor on the somatotroph, are the most frequent causes of clinical GH deficiency (14). In addition, in a study of 24 prepubertal children with IGHD (peak GH <10 ng/ml on stimulation test), the majority grew well when treated with different regimens of *GHRH* administration, showing normal function of the *GHRHR* and the somatotroph cells (15).

Since 1994, no attempts to search for mutations in *GHRH* in patients with IGHD were published. In comparison with the studies in the early 1990s, the present one included more up-to-date methodology and patient selection: all coding exons and splice sites of *GHRH* were sequenced and mutations in the known genes that cause IGHD, *GH1* and *GHRH* receptor, had been ruled out in all patients from subgroup 1 and most patients from subgroup 2.

In this study, no functional mutations in *GHRH* were identified, and given the size of the cohort (144 alleles in subgroup 1), the frequency of *GHRH* mutations is lower than 2.5% (95% confidence interval 0–0.0253). Variants were found in both subgroups and are analyzed together.

The previously described polymorphism c.223 C>T p.L75F was present in four of 42 Brazilian patients (10%) and one of 74 Caucasian patients from the Iberian Peninsula (1%). Interestingly, this polymorphism had been reported in 16% of alleles from a Nigerian population, 9% in an African-American population, none in a European population, and less than 1% from an Asian population (13). Brazilians constitute a trihybrid population with European, African, and Amerindian roots. These data suggest an African origin for the *GHRH* p.L75F polymorphism in the Brazilian patients. At an individual level, most of the Brazilian patients are unable to inform the origin of their far ancestors, and color and other physical traits are poor predictors of genomic African ancestry, as determined by molecular markers (16).

We also found a silent mutation in the coding region and five intronic changes that do not change splice predictions and apparently have no functional consequences.

One possible explanation for the lack of *GHRH* mutations is that it would have other functions, in addition to controlling GH secretion, and that lack of *GHRH* would cause a broader phenotype than the one observed in association with *GHRHR* mutations. To test this hypothesis, Alba and Salvatori created a mouse with targeted disruption (knockout) of the *Ghrh* gene (*GHRHKO*) (17). There was no lethality in the homozygous *GHRHKO* embryos, and *GHRHKO* mice appeared normal at birth but showed significant postnatal growth retardation. Growth retardation was due to IGHD, as shown by reduced pituitary GH mRNA and protein content, reduced serum IGF-I, and reduced liver IGF-I mRNA. The phenotype of the *GHRHKO* mice was similar to the one observed in the mouse with mutated *GHRH* receptor, including pituitary hypoplasia (17).

It is possible that functional mutations in genes encoding ligands arise less frequently than in genes encoding receptors because of differences in size between ligands and their cognate receptors (18). Approximately 20 mutations in GnRH receptor causing isolated hypogonadotropic hypogonadism have been reported since 1997, but only recently have two mutations in *GNRH1* been identified (18, 19). Encoding a peptide product of only 92

amino acids, *GNRH1* represents a smaller target for mutation than the 328 amino acids encoded by *GNRH* receptor (18). The precursor protein for GHRH contains 108 amino acids, which is then processed into the 40- or 44-amino acid GHRH and no mutations have hitherto been reported. In contrast, the GHRH receptor has 423 amino acids and at least 23 mutations have been reported in the gene encoding the receptor (3, 11). Indeed, for several other ligand-receptor pairs, fewer mutations have been reported in genes encoding ligands (*LH*, *FGF8*, and *PROK2*) than in genes encoding their respective receptors (*CGLHR*, *FGFR1*, and *PROKR2*) (18, 20).

To conclude, sequencing the coding region and splice sites of *GHRH* in a selected multicentric cohort of patients with IGHD revealed no functional mutations, suggesting that, if they exist, they may be an extremely rare cause of IGHD. Other, as-yet-unidentified genetic factors may be implicated in the genetic etiology of IGHD in our cohort.

Acknowledgments

The authors thank Suemi Marui, M.D., and Ericka Trarbach, Ph.D., for the study of the *GHRH* receptor; Margaret Boguszewski, Sonir Antonini, Miquel Gussinyé, Marian Albisu, Diego Yeste, María Clemente, Mónica Fernández-Cancio, and Núria Camats for referral of DNA samples and data from patients; and Professor Paulo A. Otto for statistical advice.

Address all correspondence and requests for reprints to: Ivo J. P. Arnhold, M.D., Hospital das Clínicas, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Avenida Dr Eneas de Carvalho Aguiar 155 PAMB, 2 Andar Bloco 6, 05403-900, São Paulo Brasil. E-mail: iarnhold@usp.br.

This work was supported by Grants 05/04726-0 and 07/56490-5 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP (to M.M.F.) and Grants 301477/2009-4 (to A.A.L.J.), 301339/2008-9 (to B.B.M.), and 300982/2009-7 (to I.J.P.A.) from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.

Disclosure Summary: The authors declare that they have no competing financial interests.

References

- Melmed S, Kleinberg D 2008. Anterior pituitary. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, eds. *Williams textbook of endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 155–261
- Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M 1994 Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr* 125:29–35
- Alatzoglou KS, Dattani MT 2010 Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency—an update. *Nat Rev Endocrinol* 6:562–576
- Alatzoglou KS, Turton JP, Kelberman D, Clayton PE, Mehta A, Buchanan C, Aylwin S, Crowne EC, Christesen HT, Hertel NT, Trainer PJ, Savage MO, Raza J, Banerjee K, Sinha SK, Ten S, Mushtaq T, Brauner R, Cheetham TD, Hindmarsh PC, Mullis PE, Dattani MT 2009 Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3191–3199
- Pantel J, Legendre M, Cabrol S, Hilal L, Hajaji Y, Morisset S, Nivot S, Vie-Luton MP, Grouselle D, de Kerdanet M, Kadiri A, Epelbaum J, Le Bouc Y, Amselem S 2006 Loss of constitutive activity of the growth hormone secretagogue receptor in familial short stature. *J Clin Invest* 116:760–768
- Pantel J, Legendre M, Nivot S, Morisset S, Vie-Luton MP, le Bouc Y, Epelbaum J, Amselem S 2009 Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 94:4334–4341
- Mohamadi A, Martari M, Holladay CD, Phillips 3rd JA, Mullis PE, Salvatori R 2009 Mutation analysis of the muscarinic cholinergic receptor genes in isolated growth hormone deficiency type IB. *J Clin Endocrinol Metab* 94:2565–2570
- Mullis P, Patel M, Brickell PM, Brook CG 1990 Isolated growth hormone deficiency: analysis of the growth hormone (GH)-releasing hormone gene and the GH gene cluster. *J Clin Endocrinol Metab* 70:187–191
- Perez Jurado LA, Phillips 3rd JA, Francke U 1994 Exclusion of growth hormone (GH)-releasing hormone gene mutations in familial isolated GH deficiency by linkage and single strand conformation analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 78:622–628
- Silva EG, Shlessarenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, Marui S, Mendonça BB 2003 GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res* 59:229–233
- Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, Estefan V, Mendonça BB, Arnhold IJ 2002 Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5076–5084
- Esteban C, Audi L, Carrascosa A, Fernandez-Cancio M, Perez-Arroyo A, Ulied A, Andaluz P, Arjona R, Albisu M, Clemente M, Gussinye M, Yeste D 2007 Human growth hormone (GH1) gene polymorphism map in a normal-statured adult population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 66:258–268
- 2003 The International HapMap Project. *Nature* 426:789–796
- Reiter EO RR 2008 Normal and aberrant growth. In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, eds. *Williams textbook of endocrinology*. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 849–968
- Thorner MO, Rogol AD, Blizzard RM, Klingensmith GJ, Najjar J, Misra R, Burr I, Chao G, Martha P, McDonald J 1988 Acceleration of growth rate in growth hormone-deficient children treated with human growth hormone-releasing hormone. *Pediatr Res* 24:145–151
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD 2003 Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:177–182
- Alba M, Salvatori R 2004 A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. *Endocrinology* 145:4134–4143
- Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiasas S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley Jr WF, Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB 2009 *GNRH1* mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11703–11708
- Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, Lombès M, Millar RP, Guiochon-Mantel A, Young J 2009 Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a *GNRH1* mutation. *N Engl J Med* 360:2742–2748
- Arnhold IJ, Lofrano-Porto A, Latronico AC 2009 Inactivating mutations of luteinizing hormone β -subunit or luteinizing hormone receptor cause oligo-amenorrhea and infertility in women. *Horm Res* 71:75–82

Supplemental Data

Patients:

Supplemental Table 1. Patients from subgroup 1: Chronological age, height, peak GH after stimulation, pituitary magnetic resonance imaging and molecular results of *GHI*, *GHRH* receptor and *GHRH* analyses.

Patient	CA yr	Height SDS	Peak GH ng/ml	MRI		Familial	Consang	<i>GHI</i>	<i>GHRHR</i>	<i>GHRH</i>
				AP	PP					
1	11.6	-6.5	4.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
2	22.6	-6.5	0.1	APH	topic	no	yes	ok	ok	ok
3	2.3	-6.0	0.7	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
4	6.0	-5.7	4.7	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
5	10.7	-5.7	0.6	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
6	9.3	-5.6	4.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
7	2.3	-5.4	1.1	APH	topic	yes	no	ok	ok	ok
8	5.9	-5.3	3.2	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
9	6.3	-5.2	2.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
10	4.5	-5.2	0.8	APH	topic	yes	no	ok	ok	ok
11	1.6	-5.2	0.5	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
12	2.7	-4.9	4.0	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
13	16.2	-4.9	1.6	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
14	13.0	-4.7	0.3	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
15	10.6	-4.7	4.3	APH	NV	no	no	ok	ok	ok
16	10.8	-4.6	2.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
17	5.2	-4.6	4.8	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
18	3.3	-4.5	4.0	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
19	10.3	-4.5	0.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
20	6.3	-4.4	4.0	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
21	4.5	-4.4	1.2	APH	topic	yes	no	ok	ok	ok
22	15.8	-4.3	2.8	APH	topic	no	yes	ok	ok	ok
23	15.1	-4.1	3.6	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
24	4.8	-4.1	3.8	normal	topic	yes	no	ok	ok	IVS3 47 del1
25	2.5	-4.1	1.0	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
26	4.3	-4.1	4.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
27	4.0	-4.1	0.6	APH	topic	yes	no	ok	ok	IVS1 -74 T>C
28	2.8	-3.9	0.3	normal	topic	no	no	ok	ok	c.223 C>T, p.L75F
29	7.6	-3.8	0.6	normal	topic	no	yes	ok	ok	c.223 C>T, p.L75F
30	5.7	-3.8	4.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
31	12.5	-3.8	3.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
32	9.4	-3.8	1.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok

33	4.0	-3.7	3.2	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
34	3.8	-3.7	3.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
35	11.4	-3.7	3.6	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
36	4.1	-3.6	3.0	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
37	10.0	-3.6	3.5	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
38	12.8	-3.6	4.2	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
39	5.9	-3.6	3.5	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
40	14.8	-3.5	2.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
41	7.6	-3.5	4.6	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
42	2.3	-3.4	1.1	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
43	15.3	-3.4	3.8	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
44	13.1	-3.4	0.9	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
45	14.3	-3.3	2.7	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
46	6.3	-3.2	4.8	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
47	5.5	-3.2	1.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
48	8.5	-3.2	1.6	APH	topic	yes	no	ok	ok	ok
49	12.7	-3.1	4.2	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
50	6.0	-3.1	0.1	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
51	6.8	-3.1	1.2	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
52	8.1	-3.0	4.1	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
53	14.3	-3.0	4.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
54	12.9	-3.0	4.2	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
55	12.5	-3.0	3.3	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
56	4.0	-3.0	0.1		topic	yes	no	ok	ok	ok
57	11.5	-3.0	3.5	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
58	11.0	-3.0	3.2	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
59	10.3	-2.9	4.5	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
60	10.1	-2.9	0.2	APH	NV	no	no	ok	ok	ok
61	9.7	-2.9	4.9	normal	topic	no	no	ok	ok	IVS1 -70 G>A
62	14.3	-2.8	3.5	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
63	4.5	-2.8	3.0	APH	topic	yes	no	ok	ok	ok
64	12.4	-2.8	4.7	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
65	11.3	-2.8	4.0	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
66	10.5	-2.7	4.4	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
67	10.7	-2.6	0.3	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
68	11.2	-2.6	4.4	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
69	5.7	-2.6	3.0	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
70	10.1	-2.5	3.3	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
71	13.0	-2.5	3.4	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
72	9.7	-2.5	3.4	normal	topic	no	no	ok	ok	ok

CA: chronological age; MRI: magnetic resonance imaging; AP: anterior pituitary; PP: posterior pituitary; APH: anterior pituitary hypoplasia; NV: not visualized; Familial: familial cases; Consag: consanguineous parents

Supplemental Table 2. Patients from subgroup 2: Chronological age, height, peak GH after stimulation, pituitary magnetic resonance imaging and molecular results of *GH1*, *GHRH* receptor and *GHRH* analyses.

Patient	CA yr	Height SDS	Peak GH ng/ml	MRI AP PP	Familial	Consang	<i>GH1</i>	<i>GHRH</i>	<i>GHRH</i>
73	11.4	-8.0	2.3	APH EPP	no	no	ok		ok
74	12.3	-5.8	1.0	APH EPP	no	yes	ok	ok	c.223 C>T, p.L75F
75	8.8	-5.3	1.1	APH EPP	yes	no			ok
76	11.5	-5.1	0.5	APH EPP	no	no			ok
77	10.1	-5.1	1.8	APH EPP	no	no	ok	ok	ok
78	11.3	-4.9	7.9	APH EPP	no	no	ok		ok
79	6.6	-4.5	1.2	APH EPP	no	no	ok		c.147 C>T, p.S49S
80	10.3	-4.3	1.2	APH EPP	no	no	ok	ok	ok
81	6.1	-4.1	2.9	APH EPP	no	no	ok	ok	ok
82	14.5	-4.1	1.6	APH NV	no	no	ok		ok
83	8.1	-4.1	2.3	APH EPP	no	no	ok		ok
84	3.8	-4.0	3.7	normal topic	no	no	ok		ok
85	3.2	-4.0	0.5	normal EPP	no	no	ok		ok
86	10.6	-3.8	2.6	normal EPP	yes	no		ok	ok
87	7.0	-3.7	5.4	normal topic	yes	no	ok	ok	ok
88	10.7	-3.7	0.8	APH EPP	no	no			ok
89	5.1	-3.7	1.9	normal EPP	no	no	ok	ok	ok
90	4.0	-3.4	2.4	normal topic	no	no	ok		ok
91	4.6	-3.3	1.3	normal topic	no	no	ok		ok
92	6.2	-3.3	1.3	APH EPP	no	no			ok
93	14.1	-3.2	3.5	normal topic	no	no	ok		ok
94	11.7	-3.2	0.3	APH EPP	no	yes			ok
95	9.3	-3.2	1.8	normal topic	no	no	ok		ok
96	7.3	-3.1	5.0	APH EPP	yes	yes	ok	ok	ok
97	11.5	-3.1	4.1	normal topic	no	no	ok		ok
98	13.9	-3.0	9.3	normal topic	yes	no	ok		ok
99	10.7	-3.0	2.5	APH EPP	yes	yes	ok	ok	c.223 C>T, p.L75F
100	13.2	-2.8	6.6	APH topic	yes	no	ok	ok	ok
101	11.7	-2.8	0.5	APH NV	no	no	ok		ok
102	10.0	-2.8	2.1	APH EPP	no	no	ok		ok
103	6.8	-2.7	1.4	APH EPP	no	no	ok		ok
104	11.7	-2.7	1.5	APH topic	no	no		ok	ok
105	4.0	-2.7	7.2	normal topic	yes	no	ok		ok
106	10.8	-2.6	6.2	normal topic	yes	no	ok		c.223 C>T, p.L75F
107	9.0	-2.5	9.7	normal topic	yes	no	ok	ok	ok
108	4.0	-2.5	3.5	normal topic	no	no	ok		ok
109	15.7	-2.4	4.6	normal topic	no	no	ok		ok

110	5.1	-2.4	2.3	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
111	5.6	-2.3	2.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
112	4.5	-2.3	2.6	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
113	6.2	-2.3	4.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
114	10.8	-2.3	4.6	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
115	14.6	-2.2	3.6	APH	topic	no	no	ok		ok
116	7.2	-2.2	0.7	APH	EPP	yes	no	ok	ok	ok
117	12.3	-2.2	3.6	normal	topic	no	no	ok		ok
118	9.8	-2.1	2.2	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
119	12.2	-2.1	2.3	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
120	12.5	-2.1	4.1	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
121	10.4	-2.1	1.8	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
122	11.8	-2.1	2.6	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
123	11.9	-2.1	8.0	normal	topic	yes	no	ok		ok
124	9.6	-2.1	2.6	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
125	14.0	-2.1	4.9	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
126	10.6	-2.1	5.0	normal	topic	no	no	ok		ok
127	7.1	-2.0	1.7	APH	topic	no	no	ok	ok	ok
128	11.8	-2.0	4.5	normal	topic	no	no	ok	ok	ok
129	11.0	-2.0	4.0	normal	topic	no	no	ok		ok
130	11.8	-2.0	4.3	normal	topic	no	no	ok		IVS3 +7 G>A/ IVS3 +41 G>A
131	§	§	0.1	APH	topic	yes	no	ok	ok	ok
132	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
133	§	§	0.1	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
134	§	§	0.3	normal	topic	yes	no	ok	ok	ok
135	§	§	0.2	normal	topic	no	no	ok	no	ok
136	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
137	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
138	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
139	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
140	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
141	§	§	0.1	APH	topic	no	yes	ok	ok	ok
142	§	§	0.1		topic	no	yes	ok	ok	ok
143	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
144	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
145	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
146	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
147	§	§	§		topic	no	no	ok	ok	ok
148	§	§	§	APH	topic	no	no			ok
149	§	§	0.1		topic	no	no	ok		ok
150	§	§	0.1		topic	no	no	ok		ok
151	§	§	3.9	APH	topic	no	no	ok		ok

CA: chronological age; MRI: magnetic resonance imaging; AP: anterior pituitary; PP: posterior pituitary; APH: anterior pituitary hypoplasia; NV: not visualized; EPP: ectopic posterior pituitary;

Familial: familial cases; Consag: consanguineous parents; §: severe GH deficiency according to the referring center.

Methods.

PCR amplification of the coding region of *GHRH* (exons 1 - 4) was performed using the following 3 pairs of primers:

Supplemental Table 3: Primers used for amplification of *GHRH*

Exon	Forward primer		Reverse primer
1-2F	5'- gctgtggctgtacctgacct -3'	1-2R	5'-atgacacttgctgtgccaag-3'
3F	5'-cctccctaagtgtggctgaa-3'	3R	5'- tgtcaggagggtccttcttc -3'
4F	5' - tccatgcacccactctagc -3'	4R	5' - tcgtaataccactttgggaaatg -3'

PCR amplifications were performed in 25µl reaction mixtures containing 200–500 ng genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol each primer, 5x PCR buffer, and 1.25 U *Go Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI); The reaction mixtures were denatured at 94°C for 5min, and then subjected to 30 cycles consisting of 30s denaturation period at 94°C, 30s of annealing period at 58°C and 45s of extension period at 72°C, subsequently 1 cycle of 72°C for 10min. The PCR products were electrophoresed on 1.0% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed. The PCR products of *GHRH* (4.5µl) were pretreated with 1.5 µl of enzymatic combination of exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH) and directly sequenced using the BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI PRISM 3100 automatic sequencer (PerkinElmer Cetus, Shelton, CT).

Capítulo 2: "Novel Heterozygous Nonsense *GLI2* Mutations in Patients with Hypopituitarism and Ectopic Posterior Pituitary Lobe without Holoprosencephaly"

Marcela M. França, Alexander A. L. Jorge, Luciani R. S. Carvalho, Everlayny F. Costalonga, Gabriela A. Vasques, Claudia C. Leite, Berenice B. Mendonca, and Ivo J. P. Arnhold.

J Clin Endocrinol Metab 95: E384–391, 2010.

Novel Heterozygous Nonsense *GLI2* Mutations in Patients with Hypopituitarism and Ectopic Posterior Pituitary Lobe without Holoprosencephaly

Marcela M. França, Alexander A. L. Jorge, Luciani R. S. Carvalho, Everlayny F. Costalonga, Gabriela A. Vasques, Claudia C. Leite, Berenice B. Mendonça, and Ivo J. P. Arnhold

Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Disciplina de Endocrinologia (M.M.F., A.A.L.J., L.R.S.C., E.F.C., G.A.V., B.B.M., I.J.P.A.), and Departamento de Radiologia (C.C.L.), Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 05403-900 São Paulo, Brazil

Context: *GLI2* is a transcription factor downstream in Sonic Hedgehog signaling, acting early in ventral forebrain and pituitary development. *GLI2* mutations were reported in patients with holoprosencephaly (HPE) and pituitary abnormalities.

Objective: The aim was to report three novel frameshift/nonsense *GLI2* mutations and the phenotypic variability in the three families.

Setting: The study was conducted at a university hospital.

Patients and Methods: The *GLI2* coding region of patients with isolated GH deficiency (IGHD) or combined pituitary hormone deficiency was amplified by PCR using intronic primers and sequenced.

Results: Three novel heterozygous *GLI2* mutations were identified: c.2362_2368del p.L788fsX794 (family 1), c.2081_2084del p.L694fsX722 (family 2), and c.1138 G>T p.E380X (family 3). All predict a truncated protein with loss of the C-terminal activator domain. The index case of family 1 had polydactyly, hypoglycemia, and seizures, and GH, TSH, prolactin, ACTH, LH, and FSH deficiencies. Her mother and seven relatives harboring the same mutation had polydactyly, including two uncles with IGHD and one cousin with GH, TSH, LH, and FSH deficiencies. In family 2, a boy had cryptorchidism, cleft lip and palate, and GH deficiency. In family 3, a girl had hypoglycemia, seizures, excessive thirst and polyuria, and GH, ACTH, TSH, and antidiuretic hormone deficiencies. Magnetic resonance imaging of four patients with *GLI2* mutations and hypopituitarism showed a hypoplastic anterior pituitary and an ectopic posterior pituitary lobe without HPE.

Conclusion: We describe three novel heterozygous frameshift or nonsense *GLI2* mutations, predicting truncated proteins lacking the activator domain, associated with IGHD or combined pituitary hormone deficiency and ectopic posterior pituitary lobe without HPE. These phenotypes support partial penetrance, variable polydactyly, midline facial defects, and pituitary hormone deficiencies, including diabetes insipidus, conferred by heterozygous frameshift or nonsense *GLI2* mutations. (*J Clin Endocrinol Metab* 95: E384–E391, 2010)

Congenital GH deficiency (GHD) may be isolated (IGHD) or combined with other pituitary hormone deficiencies (CPHD), and it can be sporadic or familial.

The etiology of GHD is still unknown in most cases (1). The presence of familial cases suggests a genetic origin instead of a traumatic/ischemic origin secondary to peri-

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.

Copyright © 2010 by The Endocrine Society
doi: 10.1210/jc.2010-1050 Received May 7, 2010. Accepted July 1, 2010.
First Published Online August 4, 2010

Abbreviations: ADH, Antidiuretic hormone; CPHD, combined pituitary hormone deficiency; GHD, GH deficiency; HPE, holoprosencephaly; IGFBP3, IGF binding protein 3; IGHD, isolated GHD; MRI, magnetic resonance imaging; PRL, prolactin; SDS, *SD* score; Shh, Sonic Hedgehog.

natal insults (2, 3). Mutations in PROP1 are the commonest genetic cause of CPHD, and all patients had a posterior pituitary lobe in the normal position on magnetic resonance imaging (MRI) (4, 5). In some patients, hypopituitarism may present as part of a syndrome with patients manifesting abnormalities in extrapituitary structures that share a common embryological origin with the pituitary gland, such as the eye and forebrain, caused by gene defects during early embryogenesis (5–7).

Advances in molecular biology, especially the knowledge acquired with animal models, improved our understanding of pituitary embryogenesis and gene defects associated with GHD. The formation of the pituitary gland involves a complex interaction of transcription factors and signaling molecules, acting as activators or repressors, which play a crucial role in cell proliferation, cell patterning, and terminal differentiation. In early stages of pituitary organogenesis, the close interaction between the invagination of the oral ectoderm to form the rudimentary Rathke's pouch and the evagination of the ventral diencephalon neuroectoderm to form the posterior pituitary lobe is critical for pituitary gland formation. Extrinsic signals from the ventral diencephalon and surrounding structures (WNT, BMP, FGF, Notch, and Hedgehog pathways) also play an important role in the early stage of pituitary embryogenesis (5, 8).

During early vertebrate embryogenesis, Sonic Hedgehog (Shh; OMIM *600725) is expressed in midline tissues, such as notochord, floor plate of the neural tube and is critical for distal elements of the developing limbs. *Shh* is expressed in the ventral diencephalon and in the adjacent oral ectoderm, but not in the primordial Rathke's pouch (9). Shh signaling is mediated by three related zinc-finger transcription factors, Gli1, Gli2, and Gli3, expressed in the ventral diencephalon and in developing Rathke's pouch, which lead to activation of target genes (10). In mice, inactivation of *Gli2* caused variable absence of the pituitary and an abnormal midline central diencephalon; homozygous deletion of both *Gli1* and *Gli2* resulted in complete absence of the pituitary (11).

Holoprosencephaly (HPE; OMIM %236100) is a brain malformation resulting from an incomplete cleavage of the prosencephalon between the 18th and 28th d of the human embryo. The HPE phenotype can be manifested by a variable spectrum of severity, from a severe form of alobar HPE, presenting a single ventricle without separation of hemispheres to a milder subtype of HPE, middle interhemispheric form (12). Facial midline anomalies with a normal brain were described within the same family with severe forms of HPE and referred to as microforms (13). Forebrain malformations are generally associated with facial anomalies, ranging from anophthalmia or cyclopia in

the most severe cases to midline cleft lip, a simple hypotelorism, or even no anomalies in the less severe HPE forms. This wide spectrum can be observed within the same family and can be associated with endocrine disorders secondary to midline malformation affecting the development of the hypothalamus and the pituitary gland (14). The etiology of HPE is diverse and can be caused by environmental or genetic factors, in particular chromosomal abnormalities. Mutations in genes related to the SHH signaling pathway have been implicated in the etiology of HPE (15–17).

Roessler *et al.* (18, 19) described heterozygous *GLI2* loss-of-function mutations in a cohort of patients with HPE and/or HPE-like phenotype and pituitary abnormalities. Hormonal data and pituitary MRI of these patients have not been published. Missense mutations in *GLI2* were also identified in patients with cranial and midline facial abnormalities but without pituitary abnormalities (20, 21). We report here the clinical, hormonal, and pituitary imaging features of affected subjects from three families with three novel frameshift/nonsense *GLI2* mutations.

Patients and Methods

Patients

Brazilian patients with IGHD or CPHD were selected from the Hospital das Clinicas of the University of Sao Paulo School of Medicine. This study was approved by the Ethics Committee of the institution, and an informed written patient or parental consent was obtained before initiating the genetic studies. The patients were selected if they had short stature [height SD scores (SDS) below -2], and the diagnosis of GHD was based on low IGF-I and IGF binding protein 3 (IGFBP3) levels and failure to have a normal response to GH stimulation tests. Height was measured with a stadiometer, and height SDS was calculated using British references (22). Glucose, cortisol, GH, TSH, prolactin (PRL), LH, FSH, T₃, T₄, free T₄, dehydroepiandrosterone sulfate, estradiol, and testosterone were measured in the basal state. Clonidine and combined pituitary stimulation tests (0.05–0.1 U/kg insulin, 200 μ g TRH, and 100 μ g GnRH, iv) were performed. GHD was diagnosed when peak GH after clonidine and hypoglycemia tests was less than 7 ng/ml measured by immunoradiometric assay or less than 3.2 ng/ml measured by fluoroimmunoassay (23). Cortisol response to hypoglycemia was considered normal when the peak was at least 18 μ g/dl (497 nmol/liter). Antidiuretic hormone (ADH) deficiency was diagnosed in patients who had urinary specific gravity of less than 1010 and urinary volume above 50 ml/kg in 24 h (24).

MRI scans were performed in a 1.5 Tesla unit (Signa; GE, Milwaukee, WI) using T1- and T2-weighted sagittal and coronal scans. Three of the patients also had coronal and sagittal T1-weighted images after gadolinium administration. Brain structures were evaluated for the presence of HPE.

The control group consisted of 155 healthy adult individuals without personal or familial history of pituitary hormone deficiencies.

FIG. 1. Pedigree of family 1 with the *GLI2* c.2362_2368del p.L788fsX794 mutation.

DNA analysis

Genomic DNA from all patients and controls was extracted from peripheral-blood leukocytes or oral swab using standard procedures. The entire coding region of *GLI2*, 13 exons, and the exon–intron boundaries (ENSEMBL accession no. ENST00000361492) were amplified by PCR, using intronic primers (17 fragments), and sequenced on an automated sequencer. Details of PCR amplifications and sequencing are provided in the Supplemental Data (published on The Endocrine Society's Journals Online web site at <http://jcem.endojournals.org>).

Results

Sequencing identified three novel heterozygous *GLI2* mutations: c.2362_2368del p.L788fsX794 (family 1), c.2081_2084del p.L694fsX722 (family 2), and c.1138 G>T p.E380X (family 3) (Supplemental Fig. 1).

Family 1—*GLI2* mutation p.L788fsX794

The index patient (Fig. 1, III.8, and Table 1) was a 7-yr, 1-month-old girl referred for evaluation of growth failure

since 1 yr of age. She was born from nonconsanguineous parents at full term by cesarean section with a birth weight of 3100 g. At 16 months, she started having tonic-clonic seizures difficult to control, followed by severe delay of neuropsychomotor development. She had vesicoureteral reflux and multiple episodes of urinary tract infection, associated with frequent episodes of hypoglycemia and uncontrolled daily seizures. Examination at 7.1 yr revealed a height of 91.8 cm (SDS, -5.4) and weight of 12.7 kg (SDS, -2.5), accentuated abdominal fat, high-pitched voice, bilateral postaxial polydactyly,

and absence of midline facial defects. Her bone age (1.5 yr) was markedly delayed. GH peak after clonidine stimulation was less than 0.25 ng/ml. During hypoglycemia, she had an inadequate response of GH (peak, <0.25 ng/ml) and cortisol (peak, 9.6 μ g/dl), presumably due to ACTH deficiency. Hormonal response to TRH stimulation demonstrated severe pituitary PRL (peak, 3.9 ng/ml) and TSH (peak, <2.2 μ U/ml) deficiencies. Brain and pituitary MRI showed diminished brain size with asymmetry of cerebral hemispheres, an extremely hypoplastic anterior pituitary, and an ectopic posterior pituitary lobe at the median eminence, but no HPE-like abnormalities. At the age of 16 yr, she had no signs of puberty and undetectable levels of LH and FSH, characterizing the diagnosis of hypogonadotropic hypogonadism.

The heterozygous 7-bp deletion in exon 13 (c.2362_2368del) resulted in a frameshift causing a premature stop codon (p.L788fsX794) that predicts a truncated protein lacking 792 amino acids of the C-terminal

TABLE 1. Clinical features, hormone deficiencies, and MRI findings in the index patients of families with *GLI2* mutations

Index patient	Family 1	Family 2	Family 3
Mutation cDNA	c.2362_2368del	c. 2081_2084del	c.1138 G>T
Protein	p.L788fsX794	p.L694fsX722	p.E380X
Sex	Female	Male	Female
Age at presentation	7 yr	4.5 yr	8 months
Height (cm)	91.8 (-5.4)	83.4 (-4.5)	61 (-2.9)
Weight (kg)	12.7 (-2.5)	9.4 (-3.3)	5.9 (-2.5)
Maternal height (cm)	156 (-1.0) ^a	165 ($+0.4$)	159 (-0.5) ^a
Paternal height (cm)	153 (-3.2)	167 (-1.2) ^a	172 (-0.4)
Pituitary hormone deficiencies	GH, TSH, ACTH, PRL, FSH/LH	GH, pACTH	GH, TSH, ACTH, ADH
Pituitary MRI findings	APH, EPP	APH, EPP	APH
Other MRI findings	Asymmetric brain hemispheres	No	No
Midline facial defects	No	Cleft and lip palate	No
Polydactyly	Yes	No	No
HPE	No	No	No

Data in parentheses represent SDS. APH, Anterior pituitary hypoplasia; EPP, ectopic posterior pituitary.

^a Parent that carries mutation.

FIG. 2. Schematic representation of the GLI2 protein; arrows indicate the location of p.E380X (family 3), p.L694fsX722 (family 2), and p.L788fsX794 (family 1) mutations.

activator domain of the GLI2 protein (Fig. 2). This mutation was not found in the sequence of 184 alleles from normal individuals.

Familial screening included 11 relatives of the index case; the *GLI2* p.L788fsX794 mutation was present in eight relatives on the maternal side, all with postaxial polydactyly, and three relatives described below also had severe short stature and/or primary amenorrhea indicating hypopituitarism (Table 2). The mutation was absent in three normal relatives, including the father.

The mother of the index case (Fig. 1, II.7), with the same mutation, has unilateral postaxial polydactyly but is otherwise healthy, with a height SDS of -1.0 and hormonal assays without evidence of pituitary hormone deficiencies.

A 54-yr-old uncle of the index patient (Fig. 1, II.2, and Supplemental Fig. 2A) has the same mutation, postaxial polydactyly in the left hand, normal cognition, and severe short stature with a height of 146.5 cm (SDS, -4.2). Low levels of IGF-I (<25 ng/ml; SDS < -4.5) and IGFBP3 (0.8 mg/liter; SDS < -5.6) and no alteration in other hormones indicated IGHD. MRI showed a hypoplastic anterior pituitary, an ectopic posterior lobe near to the infundibulum, and dilated vessels but no HPE-like features.

A 52-yr-old maternal uncle of the index case (Fig. 1, II.4) carries the same mutation and has postaxial bilateral polydactyly in both hands, normal cognition, and short stature with a height of 155 cm (SDS, -3.0). IGF-I (54 ng/ml; SDS, -3.3) and IGFBP3 (2.3 mg/liter; SDS, -3.4)

levels were low, characterizing GHD. He fathered four children and 10 yr ago suffered a severe head trauma in a car accident. Presently, his serum testosterone level is low (145 ng/dl), with normal LH and FSH levels. MRI disclosed a hypoplastic anterior pituitary, a thin pituitary stalk, an ectopic posterior pituitary at the infundibulum, ventricular dilation, and several sequelae of head trauma, but no signs of HPE.

A 23-yr-old first-degree cousin of the index patient (Fig. 1, III.3, and Supplemental Fig. 2B) and daughter of patient II.4 has the L788fsX794 mutation, postaxial polydactyly in both hands and feet, severe short stature with a height of 133 cm (SDS, -4.9), lack of pubertal development, primary amenorrhea, and no clinical signs of hypocortisolism. She has no cognitive impairment. Very low levels of IGF-I (27 ng/ml; SDS, -4.4), IGFBP3 (0.9 mg/liter; SDS, -5.3), free T_4 (0.72 ng/dl), LH (<1.0 IU/liter), FSH (0.3 IU/liter), and estradiol (13 pg/ml) indicate deficiency of GH, TSH, and gonadotropins.

Three family members—the father (Fig. 1, II.6), the brother (Fig. 1, III.11), and a maternal uncle of the index case (Fig. 1, II.14)—do not have polydactyly and do not carry the mutation. A concordant segregation of the p.L788fsX794 mutation with polydactyly (complete penetrance) and hypopituitarism with variable hormone deficiencies (incomplete penetrance) in this family was established. All relatives carrying *GLI2* mutation p.L788fsX794 also had the allelic variants c.4332 G>C p.M144I and c.4333 C>T p.L1445F in heterozygous state. Because these *GLI2* allelic variants are located on the same allele and distal to the frameshift mutation that predicts a stop codon at position 794, they probably do not play a role in these patients. Furthermore, these variants (c.4332 G>C p.M144I and c.4333 C>T p.L1445F) were also present in three of 155 normal individuals studied.

TABLE 2. Phenotype and genotype of subjects of family 1

Subject	Age (yr)	Height (cm) (SDS)	Mutation	Polydactyly	Pituitary hormone deficiencies	MRI findings
III.8 (index)	7	91.8 (-5.4)	Yes	Yes	GH, TSH, FSH, LH, ACTH, PRL	APH, EPP
II.2	54	146.5 (-4.2)	Yes	Yes	GH	APH, EPP
II.4	52	155 (-3.0)	Yes	Yes	GH	APH, EPP
III.3	23	133 (-4.9)	Yes	Yes	GH, TSH, FSH, LH	N.A.
II.7	50	156 (-1.0)	Yes	Yes	No	N.A.
II.12	41	171 (-0.6)	Yes	Yes	No	N.A.
III.14	13	153.9 (-0.2)	Yes	Yes	No	N.A.
I.2	72	145 (-2.9)	Yes	Yes	N.A.	N.A.
III.9	25	149 (-2.2)	Yes	Yes	N.A.	N.A.
II.6	50	153 (-3.2)	No	No	No	N.A.
II.14	39	180 ($+0.8$)	No	No	No	N.A.
III.10	17	179 ($+0.7$)	No	No	No	N.A.

APH, Anterior pituitary hypoplasia; EPP, ectopic posterior pituitary; N.A., not available.

FIG. 3. MRI of the index patient of family 2 with *GLI2* p.L694fsX722 mutation. Coronal and sagittal T1-weighted images show anterior pituitary hypoplasia, ectopic posterior lobe at the median eminence, absence of the pituitary stalk, and no signs of HPE.

Family 2—*GLI2* mutation p.L694fsX722

The index case of family 2 is a boy with severe growth retardation (Table 1 and Supplemental Fig. 2C). He was born full term by vaginal delivery with a birth weight of 2630 g and length of 47 cm, cleft lip and palate, flat nasal bridge, and unilateral cryptorchidism. His parents were not related. He had an adequate neuropsychomotor development, but growth failure was noticed since 8 months of age. He was referred at age 4 yr, 6 months, due to short stature (height, 83.4 cm; SDS, -4.5). Low levels of IGF-I (<18 ng/ml; SDS < -3) and IGFBP3 (0.6 mg/liter; SDS, -5.7), a diminished GH response after clonidine stimulation (GH peak, 0.4 ng/ml), and the hormonal response to the combined pituitary stimulation test demonstrated severe GHD (peak, 0.4 ng/ml) and a subnormal cortisol response (peak, 13.6 μ g/dl), implying a partial ACTH deficiency. MRI revealed a hypoplastic anterior pituitary, an ectopic posterior pituitary lobe, and no signs of HPE (Fig. 3). GH replacement was started at 5 yr of age, and at present, the patient is 12 yr old, has a height of 144.5 cm (SDS, -0.38), is still prepubertal, and is without evidence of other pituitary hormone deficiencies.

The heterozygous 4-bp deletion of nucleotides 2081 to 2084 (c.2081_2084del) within exon 12 leads to a frameshift mutation and a premature stop codon TGA at position 722 (p.L694fsX722). This mutation predicts generation of a truncated protein lacking 864 amino acids at the C-terminal activator domain of the *GLI2* protein. Screening for this *GLI2* mutation in the parents revealed that the father carries the same mutation. He had a height of 167 cm (SDS, -1.2), normal hormonal levels as well as MRI images of the brain and hypothalamic-pituitary region. An additional heterozygous variant c.1760 C>T p.P608L within *GLI2* was also identified in the index case and his father. This variant

was not found in the sequence of 224 alleles from normal individuals.

Family 3—*GLI2* mutation p.E380X

The index patient of family 3 is a female infant who was referred to our institution at age 8 months with severe developmental delay and a previous diagnosis of hypothyroidism and hypocortisolism (Table 1 and Supplemental Fig. 2D). She was born to nonconsanguineous parents at full term by cesarean section with a birth weight of 2500 g and length of 45 cm. Since the first day of life, she had seizures almost always associated with severe hypoglycemia. Newborn screening revealed low levels of free T_4 (0.63 ng/dl) with

normal TSH (4.2 μ U/ml) consistent with central hypothyroidism. At 3 months of age, low levels of cortisol (2.17 μ g/dl) and ACTH (17 pg/ml) measured during hypoglycemia (43 mg/dl) confirmed ACTH deficiency. Cortisone acetate replacement was started, and episodes of hypoglycemia and seizures stopped. She progressed with severe growth failure with a height of 61 cm at 8 months (SDS, -2.9) and low levels of IGF-I (25 ng/ml; SDS, -3.0), and IGFBP3 (0.6 mg/ml) consistent with GHD. MRI showed a hypoplastic anterior pituitary, and the posterior pituitary lobe was not visible. Recombinant GH treatment was initiated in a dose of 33 μ g/kg $\cdot$ d (0.1 U/kg $\cdot$ d); after the first dose of GH she showed signs of intracranial hypertension with irritability, vomiting, and a bulging fontanel. GH replacement was discontinued and then reintroduced in a very low dose (4 μ g/kg $\cdot$ d–0.01 U/kg $\cdot$ d); it was gradually increased over the next 4 months and was well tolerated. Her mother observed an increased urine volume, excessive thirst, hyporexia, and irritability. A low urine specific gravity (<1005) and urine osmolality (143 mOsm/kg H_2O) established the diagnosis of ADH deficiency.

The heterozygous substitution c.1138 G>T results in a codon change GAG>TAG that generates a stop codon at position 380 (p.E380X) within exon 7 of *GLI2*. This severe mutation predicts a lack of 1206 amino acids of the *GLI2* protein, including the zinc fingers responsible for DNA binding and the C-terminal activator domain. This mutation was also detected in her normal mother (height SDS, -0.5) and absent in 204 alleles from normal individuals.

Discussion

GLI2 is a zinc-finger transcription factor downstream in SHH signaling, which is implicated in brain and pitu-

itary embryogenesis. Heterozygous *GLI2* mutations p.W441X, IVS11 + 1G>A, p.Y1086fsX42, and p.Q1253X (previously reported as W113X, IVS5 + 1G>A, 2274del1, and 3768C>T, respectively) were first identified in patients with HPE or HPE-like features associated with pituitary abnormalities in four families (18, 19). However, specification of which pituitary hormone deficiency, hormonal levels, and the location of the posterior pituitary lobe were not reported. These mutations are located in the zinc-finger or carboxy-terminal domains and were also present in some normal relatives.

The present study reports two heterozygous frameshift mutations within *GLI2* in family 1 (p.L788fsX794) and family 2 (p.L694fsX722), and one nonsense mutation in family 3 (p.E380X). These mutations predict generation of truncated proteins lacking 792, 864, and 1206 amino acids, respectively, of the *GLI2* protein at the C-terminal domain. The p.E380X mutation, if translated, also predicts lack of zinc fingers and the DNA binding domain. Luciferase-based reporter assays in cultured cells demonstrated that the human *GLI2* carboxy-terminal domain had transcriptional activity, whereas the amino-terminus had transcriptional repressor activity, similar to reported findings in mice *Gli2* (19, 25). Roessler *et al.* (19) also showed that constructs representing pathogenic human *GLI2* mutants with C-terminal deletions had undetectable transcriptional activity. Furthermore, the cotransfection of these mutants together with equal amounts of wild-type *GLI2* resulted in strong dominant-negative inhibition of *GLI2* activity compared with wild-type *GLI2* alone (19).

Interestingly, postaxial polydactyly was observed in all members of family 1 who carry the *GLI2* L788fsX794 mutation, suggesting an autosomal dominant pattern of inheritance. This finding is concordant with the critical involvement of *SHH* signaling in anteroposterior patterning of the distal elements of the limbs, characterized by one anterior biphalangeal digit and four posterior triphalangeal digits (26). Polydactyly had been previously described as associated with *GLI2* mutations (18, 19). *GLI3* defects also lead to polydactyly in mice and humans (27–29). Therefore, the presence of polydactyly in patients with congenital hypopituitarism or in their relatives is an additional indication to study *GLI2*.

The female infant of family 3 with *GLI2* p.E380X mutation had ADH deficiency in addition to severe GH, TSH, and ACTH deficiencies. To our knowledge, this is the first defect in a gene involved in pituitary gland embryogenesis presenting as a combined anterior and posterior pituitary hormone deficiency. Diabetes insipidus has been described in patients with the severe forms of HPE (14). ADH deficiency might be explained because *GLI2* is

expressed in the ventral diencephalon, important for hypothalamus, infundibulum, and posterior pituitary lobe formation.

We observed a wide phenotypic spectrum of pituitary hormone deficiencies in subjects with *GLI2* mutations, from normal function to CPHD with diabetes insipidus, with GHD as the most prevalent pituitary hormone deficiency.

The incomplete penetrance and variable phenotype observed in patients with *GLI2* mutations are similar to those previously reported in patients with HPE associated with abnormalities in *SHH* and *SIX3* genes, classically considered autosomal dominant conditions with incomplete penetrance and highly variable expressivity (15, 30, 31). Moreover, partial penetrance was also described in patients with heterozygous *OTX2*, *HESX1*, or *LHX4* mutations, with variable pituitary hormone deficiencies; additional features including ocular malformations, septooptic dysplasia, and cerebellar defects, respectively; and absence of genotype-phenotype correlation (32–35). Some possibilities to explain the incomplete penetrance and highly variable expressivity are a complex pattern of inheritance combining multiple interacting environmental and genetic factors, such as variants at other loci or a digenic inheritance. The abnormal phenotype may become manifest when *GLI2* expression is below a critical threshold level.

In most cases of GHD, the immediate family history is negative for similar cases, suggesting absence of a genetic etiology. However, a disease model of partial penetrance, as with *GLI2* mutations in the present study, underscores the importance of a complete and detailed investigation to identify the disease also in distant relatives.

MRI of our patients with *GLI2* mutations who also had hypopituitarism revealed an ectopic posterior pituitary lobe (it was not visible in one patient) and no signs of HPE. Many patients with GHD, especially when associated with other pituitary hormone deficiencies, have an ectopic posterior lobe on MRI; but mutations in *HESX1* (36, 37), *LHX4* (32, 37), *SOX3* (38, 39), and *OTX2* (34, 40) have only been identified in a minority of these patients. *GLI2* mutations might be a significant genetic cause of GHD with ectopic posterior pituitary lobe.

This study expands the spectrum of *GLI2* mutations describing three novel mutations in three families. The phenotype was characterized by variable pituitary hormone deficiencies, including ADH deficiency, and incomplete penetrance. All patients with hypopituitarism had at least GHD, an ectopic posterior pituitary lobe (when visualized), and absence of HPE. Other features in patients or family members with the mutation included polydactyly and midline facial defect.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Alexandre Medeiros do Carmo for his professional collaboration.

Address all correspondence and requests for reprints to: Ivo J. P. Arnhold, M.D., Hospital das Clínicas, Laboratório de Hormônios, Avenida Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155 PAMB, 2 andar Bloco 6, 05403-900 São Paulo, Brazil. E-mail: iarnhold@usp.br.

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (05/04726-0 and 07/56490-5 to M.M.F.) and from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico–CNPq (301477/2009-4 to A.A.L.J., 301339/2008-9 to B.B.M., and 300982/2009-7 to I.J.P.A.).

Disclosure Summary: The authors declare that they have no competing financial interests.

References

- Garel C, Léger J 2007 Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. *Horm Res* 67:194–202
- Phillips 3rd JA, Cogan JD 1994 Genetic basis of endocrine disease. 6. Molecular basis of familial human growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 78:11–16
- Triulzi F, Scotti G, di Natale B, Pellini C, Lukezic M, Scognamiglio M, Chiumello G 1994 Evidence of a congenital midline brain anomaly in pituitary dwarfs: a magnetic resonance imaging study in 101 patients. *Pediatrics* 93:409–416
- Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips 3rd JA, Rosenfeld MG 1998 Mutations in *PROP1* cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* 18:147–149
- Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT 2009 Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 30:790–829
- Wales JK, Quarrell OW 1996 Evidence for possible Mendelian inheritance of septo-optic dysplasia. *Acta Paediatr* 85:391–392
- Simon D, Hadjiathanasiou C, Garel C, Czernichow P, Léger J 2006 Phenotypic variability in children with growth hormone deficiency associated with posterior pituitary ectopia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 64:416–422
- Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG 2007 Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev* 87:933–963
- Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, Chuang PT, McMahon AP, Rosenfeld MG 2001 Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development (Cambridge, England)* 128:377–386
- Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL 1994 Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, *Gli*, *Gli-2*, and *Gli-3*, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol* 162:402–413
- Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL 2000 Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation. *Development (Cambridge, England)* 127:1593–1605
- Lewis AJ, Simon EM, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E, Hahn JS 2002 Middle interhemispheric variant of holoprosencephaly: a distinct cliniconoradiologic subtype. *Neurology* 59:1860–1865
- Dubourg C, Bendavid C, Pasquier L, Henry C, Odent S, David V 2007 Holoprosencephaly. *Orphanet J Rare Dis* 2:8
- Hahn JS, Hahn SM, Kammann H, Barkovich AJ, Clegg NJ, Delgado MR, Levey E 2005 Endocrine disorders associated with holoprosencephaly. *J Pediatr Endocrinol Metab* 18:935–941
- Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, Gillesen-Kaesbach G, Zackai EH, Rommens J, Muenke M 1999 Mutations in the homeodomain of the human *SIX3* gene cause . *Nat Genet* 22:196–198
- Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M 1996 Mutations in the human sonic hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 14:357–360
- Brown SA, Warburton D, Brown LY, Yu CY, Roeder ER, Stengel-Rutkowski S, Hennekam RC, Muenke M 1998 Holoprosencephaly due to mutations in *ZIC2*, a homologue of *Drosophila* odd-paired. *Nat Genet* 20:180–183
- Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillesen-Kaesbach G, Roeder ER, Ming JE, Ruiz i Altaba A, Muenke M 2003 Loss-of-function mutations in the human *GLI2* gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:13424–13429
- Roessler E, Ermilov AN, Grange DK, Wang A, Grachtchouk M, Dlugosz AA, Muenke M 2005 A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human *GLI2*. *Hum Mol Genet* 14:2181–2188
- Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, Harrington J, Schultz RR, Watanabe Y, Johnson M, Fang J, O'Brien SE, Orioli IM, Castilla EE, Fitzpatrick DR, Jiang R, Marazita ML, Murray JC 2005 Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet* 1:e64
- Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC 2006 *GLI2* mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A* 140:2571–2576
- Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M 1966 Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. II. *Arch Dis Child* 41:613–635
- Silva EG, Shesharenko N, Arnhold IJ, Batista MC, Estefan V, Osorio MG, Marui S, Mendonça BB 2003 GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res* 59:229–233
- Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, Estefan V, Mendonça BB, Arnhold IJ 2002 Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in *GHRH-R*, *GH-1*, or *PROP-1* genes. *J Clin Endocrinol Metab* 87:5076–5084
- Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H 1999 Regulation of *Gli2* and *Gli3* activities by an amino-terminal repression domain: implication of *Gli2* and *Gli3* as primary mediators of Shh signaling. *Development (Cambridge, England)* 126:3915–3924
- Crick AP, Babbs C, Brown JM, Morriss-Kay GM 2003 Developmental mechanisms underlying polydactyly in the mouse mutant Doublefoot. *J Anat* 202:21–26
- Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH 1991 *GLI3* zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 352:539–540
- Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C 2002 Shh and *Gli3* are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 418:979–983
- Schimmang T, Lemaistre M, Vortkamp A, Rüther U 1992 Expression of the zinc finger gene *Gli3* is affected in the morphogenetic mouse mutant extra-toes (Xt). *Development (Cambridge, England)* 116:799–804
- Solomon BD, Mercier S, Vélez JI, Pineda-Alvarez DE, Wyllie A, Zhou N, Dubourg C, David V, Odent S, Roessler E, Muenke M 2010 Analysis of genotype-phenotype correlations in human holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 154C:133–141
- Nanni L, Ming JE, Bocian M, Steinhaus K, Bianchi DW, Die-Smulders C, Giannotti A, Imaizumi K, Jones KL, Campo MD, Martin RA, Meinecke P, Pierpont ME, Robin NH, Young ID, Roessler E, Muenke M 1999 The mutational spectrum of the sonic hedgehog

- gene in holoprosencephaly: SHH mutations cause a significant proportion of autosomal dominant holoprosencephaly. *Hum Mol Genet* 8:2479–2488
32. Machinis K, Pantel J, Netchine I, Léger J, Camand OJ, Sobrier ML, Dastot-Le Moal F, Duquesnoy P, Abitbol M, Czernichow P, Amselem S 2001 Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *Am J Hum Genet* 69:961–968
 33. Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, Cameron F, Hurst J, Woods K, Dunger D, Stanhope R, Forrest S, Robinson IC, Beddington RS 2001 Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Hum Mol Genet* 10:39–45
 34. Dateki S, Kosaka K, Hasegawa K, Tanaka H, Azuma N, Yokoya S, Muroya K, Adachi M, Tajima T, Motomura K, Kinoshita E, Moriuchi H, Sato N, Fukami M, Ogata T 2010 Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 95:756–764
 35. Dateki S, Fukami M, Sato N, Muroya K, Adachi M, Ogata T 2008 OTX2 mutation in a patient with anophthalmia, short stature, and partial growth hormone deficiency: functional studies using the IRBP, HESX1, and POU1F1 promoters. *J Clin Endocrinol Metab* 93:3697–3702
 36. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IL, Toresson H, Fox M, Wales JK, Hindmarsh PC, Krauss S, Beddington RS, Robinson IC 1998 Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet* 19:125–133
 37. Alatzoglou KS, Dattani MT 2009 Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. *Early Hum Dev* 85:705–712
 38. Solomon NM, Ross SA, Forrest SM, Thomas PQ, Morgan T, Belsky JL, Hol FA, Karnes PS, Hopwood NJ, Myers SE, Tan AS, Warne GL 2007 Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X-linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. *J Med Genet* 44:e75
 39. Woods KS, Cundall M, Turton J, Rizotti K, Mehta A, Palmer R, Wong J, Chong WK, Al-Zyoud M, El-Ali M, Otonkoski T, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Robinson IC, Lovell-Badge R, Woodward KJ, Dattani MT 2005 Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet* 76:833–849
 40. Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S 2008 A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4351–4359

Renew Your Subscription Now!
 Don't miss a single issue of our highly-cited,
 high-impact factor journals.

www.endo-society.org

1

1 Supplemental Data

2 PCR amplification of the 13 exons of *GLI2* was performed using the following 17 pairs
3 of primers:

EXON 1F	5'-tgggtttgggctcagtgt-3'	EXON 1R	5'-aattaaatcctaacgggctaagt-3'
EXON 2F	5'-tggctgctcttctatgaaa-3'	EXON 2R	5'-gcaggagatgtggctgagg-3'
EXON 3F	5'-catgttgggtttgggctctt-3'	EXON 3R	5'-gaccaaggctgaggagtga-3'
EXON 4F	5'-tgtgcatttctctctgccttt-3'	EXON 4R	5'-ccttgcctcccaaaagaaaca-3'
EXON 5F	5'-ccttgcaggctcttctctatc-3'	EXON 5R	5'-tcttctctctcgggtcaaaa-3'
EXON 6F	5'-tgggcaaggttctctctgtc-3'	EXON 6R	5'-cttagcatgagctggcagtg-3'
EXON 7F	5'-tgtgcggagagatcctagag-3'	EXON 7R	5'-ttcaccaccaagggtacagc-3'
EXON 8F	5'-cacacacactgcacccaca-3'	EXON 8R	5'-tccagcccttctgtctagt-3'
EXON 9F	5'-gacagcag ggggtgtgtc-3'	EXON 9R	5'-ccacctccaaacatgatcc-3'
EXON 10F	5'-ggttggagcagagcagagaa-3'	EXON 10R	5'-ggcacctgtctatctactgg-3'
EXON 11F	5'-gccccctcagagttgatcct-3'	EXON 11R	5'-gggcacggctatggagtc-3'
EXON 12F	5'-gcctgtgcagcctagag-3'	EXON 12R	5'-gtgggtgccagcctagtgtg-3'
EXON 13.1F	5'-atgactgagcacggtcaaaag-3'	EXON 13.1R	5'-agtggctgccgcgtactt-3'
EXON 13.2F	5'-cttcacagcacccacaac-3'	EXON 13.2R	5'-acgttctcgtctatgctag-3'
EXON 13.3F	5'-cttcacagcacccacaac-3'	EXON 13.3R	5'-tggggctcatagtggtagt-3'
EXON 13.4F	5'-gacagcacgcagccacac-3'	EXON 13.4R	5'-gaccccatgttgcctatc-3'
EXON 13.5F	5'-gtgggtacgtgctgtgc-3'	EXON 13.5R	5'-ggaaaaagacaagacagctgga-3'

4 PCR amplifications were performed in 25µl reaction mixtures containing 200–500 ng
5 genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 20 pmol each primer, 5x PCR buffer, and 1.25
6 U *Go Taq* DNA polymerase (Promega, Madison, WI); 2 ml Betaine was used in amplifications
7 of exons 13B, 13C and 13D. Exons 13B and 13C were GC-rich regions that were amplified
8 with the use of Enhancer Solution (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 0.125U *Platinum Taq* DNA
9 polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA). The reaction mixtures were denatured at 95°C for
10 10min, and then subjected to 35 cycles consisting of 45s denaturation period at 95°C, 30s of
11 annealing period at (57°C- exon 8; 58°C- exons 1-7 and 13C; 59°C- exons 10 and 11; 60.5°C-
12 exons 9 and 12; 61°C- exon 13B; 62°C exons 13A and 13E and 63°C- exon 13D) and 1min of
13 extension period at 72°C, subsequently 1 cycle of 72°C for 10min. The PCR products were
14 electrophoresed on 1.0% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed. The
15 PCR products of *GLI2* (4.5µl) were pretreated with 1.5 µl of enzymatic combination of

2

1 exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (U.S. Biochemical Corp., Cleveland, OH) and
2 directly sequenced using the BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (PE
3 Applied Biosystems, Foster City, CA) in an ABI PRISM 3100 automatic sequencer
4 (PerkinElmer Cetus, Shelton, CT). All mutations identified were confirmed in three independent
5 PCR products and by sequencing both DNA strands.

6

Supplemental
Fig. 1

Supplemental Fig. 2

1

1 Captions

2 **Supplemental Fig. 1:** Nucleotide sequence of mutated *GLI2* and controls. (A): index patient of
3 family 1- heterozygous c.2362_2368del p.L788fsX794. (B): index patient of family 2 -
4 heterozygous c.2081_2084del p.L694fsX722. (C): index patient of family 3 - heterozygous
5 c.1138 G>T p.E380X.

6 **Supplemental Fig. 2:** Patients with *GLI2* mutations. Patients II.2 (A) and III.3 (B), both from
7 family 1 with p.L788fsX794 mutation. (C): index patient of family 2 with p.L694fsX722
8 mutation after repair of cleft lip and palate. (D): index patient of family 3 with E380X mutation.

9

10

**Capítulo 3: "Considerável Frequência de Variantes Alélicas
no Gene *GLI2* Identificadas nos Pacientes com Deficiência de
GH Congênita"**

Além das três mutações com códon de parada prematuro descritas no capítulo 2 (Resultados), o sequenciamento do gene *GLI2* detectou: 18 variantes não-sinônimas, nove variantes sinônimas (silenciosas) e três variantes na região intrônica.

Variantes não-sinônimas

Dezoito variantes com troca de aminoácido foram identificadas no *GLI2* em vinte e quatro pacientes (Tabela 2). Todas as variantes foram encontradas em estado de heterozigose, e dez delas são inéditas: p.A203T, p.P253S, p.R473H, p.A780V, p.F830L, p.R933H, p.G947D, p.V1117L, p.M1241I e p.P1485A. A maioria das variantes foi identificada isolada em cada paciente. Entretanto, a variante p.V1117L foi identificada nos pacientes 12 e 13 e as variantes p.[M1241I;P1485A] foram identificadas no paciente 15. A associação das variantes p.[M1444I;L1445F] foi identificada nos pacientes 17, 18, 19 e 20 e outra associação, p.[M1352V;D1520N], foi identificada nos pacientes 21, 22, 23 e 24; estas variantes foram detectadas sempre em associação.

Fenótipo dos pacientes

O fenótipo dos pacientes (Tabela 2) caracterizou-se por deficiência de GH grave, combinada à deficiência de outros hormônios hipofisários e presença de neuroipófise ectópica ou não visualizada nas imagens de RM. Com exceção da paciente 14, com a variante p.G1197D, que apresentava deficiência de GH isolada e hipófise normal na imagem de RM.

Na história familiar dos pacientes não houve relato de consanguinidade nas famílias. Casos familiares de baixa estatura foram relatados nas famílias dos pacientes 7, 10, 11 e 15. Alguns pacientes (1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 16, 21, 22, 23 e 24) apresentaram apresentações anômalas no parto e/ou cianose neonatal, o que pode ter contribuído diretamente para a DGH ou, ainda, pode ter sido um fator ambiental que associado ao genótipo, determinou o fenótipo de DGH.

Alguns pacientes apresentaram um fenótipo com algumas peculiaridades que serão descritas a seguir.

A paciente 8 apresentou-se com DHMM, com manifestações clínicas precoces e muito graves. Desenvolveu baixa estatura grave (Z da altura -3,3) com menos de 1 ano de vida e, desde o período perinatal, teve hipoglicemias graves com convulsões, inclusive indo à óbito antes do 2º ano de vida.

Tabela 2 - Características dos pacientes com variantes não-sinônimas no *GLI2*

Variantes	Paciente	Idade (a)	Sexo	Z da altura	Pico de GH (ng/ml)	Deficiências hormonais	RM - Hipófise Neuro Adeno		Antecedente perinatal
p.A203T	1	8,2	M	-5,5	2,0	GH TSH ACTH FSH LH PRL ADH	NE	AH	parto forceps, cianose
p.P253S	2	16,8	F	-3,5	2,1	GH TSH ACTHp	NE	AH	parto pélvico
p.A268V	3	7,3	M	-3,2	1,4	GH TSH ACTHp FSH LH	NE	AH	parto vaginal cefálico
p.V432M	4	9,5	M	-6,1	3,0*	GH TSH ACTH FSH LH	NT	AH	parto cesáreo
	5	10,7	M	-4,1	0,4*	GH TSH ACTH FSH LH	NE	AH	parto pélvico, cianose
	6	11,8	F	-3,2	2,1*	GH TSH ACTH FSH LH	ND	ND	parto forceps, cianose
p.R473H	7	19,9	F	-7,7	0,4	GH TSH ACTHp FSH LH	NE	AH	parto vaginal cefálico
p.A780V	8	0,7	M	-3,3	0,2	GH TSH ACTH	ND	ND	parto cesáreo
p.F830L	9	12,8	M	-4,3	0,4	GH TSH ACTHp FSH LH	NE	AH	parto forceps
p.R933H	10	7,6	F	-4,8	4,2	GH TSH ACTHp	NE	AH	parto pélvico, prematuridade
p.G947D	11	6,1	M	-5,5	0,2	GH TSH ACTH ADH	NV	AH	parto pélvico, prematuridade
p.V1117L	12	16,8	M	-7,4	1,0	GH TSH FSH LH	NE	AH	parto vaginal cefálico
	13	4,0	M	-5,5	3,5*	GH TSH ACTH FSH LH ADH	NV	AH	parto vaginal cefálico
p.G1197D	14	9,5	F	-2,0	2,6	GH	NL	NL	parto vaginal cefálico
p.[M1241I; P1485A]	15	15,6	M	-5,5	0,2	GH ACTHp	NE	AH	parto cesáreo
p.P1315S	16	18	F	-4,1	0,2*	GH TSH ACTH FSH LH PRL	NV	AH	parto pélvico
p.[M1352V; D1520N]	17	5,9	M	-4,4	1,3	GH TSH ACTH FSH LH	NE	AH	não disponível
	18	3,0	F	-4,0	0,1	GH FSH LH	NE	AH	parto cesáreo
	19	14,7	F	-8,4	0,6	GH TSH FSH LH	NE	AH	parto vaginal cefálico
	20	3,9	M	-2,3	0,8	GH TSH	NE	AH	parto cesáreo
p.[M1444I; L1445F]	21	13,2	F	-5,3	-	GH TSH ACTH FSH LH	NE	AH	parto pélvico, clavícula fraturada
	22	15,3	M	5,7	-	GH TSH ACTH FSH LH	NV	AH	parto pélvico
	23	19,4	M	6,3	-	GH TSH ACTHp FSH LH	NE	AH	parto pélvico
	24	8,9	M	3,0	-	GH TSH ACTH FSH LH	NE	AH	parto pélvico

*IRMA; ACTHp: deficiência parcial de ACTH; NE: neuroipófise ectópica; NT; neuroipófise tópica; AH: adenoipófise hipoplásica; NL: normal; ND: não disponível .

A paciente 10 nasceu prematura com 24 semanas de gestação, apresentou desconforto respiratório ao nascimento e necessidade de internação em unidade de terapia intensiva por 3 meses. Aos 7,6 anos apresentava baixa estatura grave (Z de altura -4,8), quando foram diagnosticadas as deficiências de GH, TSH e parcial de ACTH. No estudo de segregação familiar também foi detectado a presença da variante p.G947D na mãe, que apresentava baixa estatura (Z da altura -3,0), mas os valores de IGF-1 (Z do IGF-1 0,8) e IGFBP3 (Z do IGFBP-3 -1,1) na vida adulta foram normais.

O fenótipo do paciente 11 caracterizou-se por DHHM, inclusive com diabetes insipidus. Além disso, outras características sindrômicas se destacaram: prematuridade (32 semanas de gestação), genitália ambígua (cariótipo 46, XY), epicanto, ptose palpebral, micrognatia, clinodactilia, retardo no desenvolvimento neuro-psicomotor, anormalidades no sistema venoso cerebral periventricular, hipertensão arterial sistêmica e insuficiência renal crônica. No estudo de segregação familiar, foi identificado que a mãe também carregava a variante p.G947D e, embora a mesma tivesse baixa estatura (Z da altura -3,7), os valores de IGF-1 (Z do IGF-1 0,5) e IGFBP3 (Z do IGFBP-3 1,2), na vida adulta, foram normais. Recentemente, foi demonstrado que a sinalização Shh-Gli2 também tem importante papel na formação da genitália externa masculina ⁽⁵¹⁾. O Shh é expresso na placa do epitélio uretral e regula a diferenciação mesenquimal do tubérculo genital por intermédio do Gli2. Camundongos com mutação condicional do Gli2

apresentam hipoplasia do tubérculo genital e defeito na masculinização que não é ocasionado por deficiência androgênica ⁽⁴¹⁾.

No paciente 15, que apresentava um quadro de deficiência de GH e parcial de ACTH, foram identificadas as variante p.[M1241I;P1485A]. No estudo de segregação familiar, foi identificado que o pai, que tem baixa estatura (Z da altura -2,2), também apresentava as mesmas variantes.

A localização das variantes ocorreu ao longo de todos os domínios da proteína (Figura 7), quatro variantes na região amino-terminal (domínio repressor), uma variante na região de dedo de zinco (ligação ao DNA) e as demais variantes na região carboxi-terminal (domínio ativador).

Figura 7 - Modelo esquemático da proteína GLI2 com a localização das variantes com troca de aminoácido identificadas

Uma vez feita a identificação dessas variantes não-sinônimas, foi realizada a investigação para tentar interpretar o seu impacto biológico e possível relação com o fenótipo (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação dos efeitos biológico das variantes não-sinônimas no GLI2: características físico-químicas e conservação dos aminoácidos, análise *in silico* e estudo em população controle

Variantes	Característica do aa selvage	Característica do aa mutado	Região da proteína	Conservação entre espécies	Previsões deletérias pelos estudos <i>in silico</i>	Estudo em controles n alelos (freq %)
p.A203T	apolar alifático	polar neutro	repressora	mamíferos	C	0/100
p.P253S	apolar	polar neutro	repressora	vertebrados	A C D	0/274
p.A268V	apolar alifático	apolar alifático	repressora	vertebrados	A B C	2/274 (0,7)
p.V432M	apolar alifático	apolar	repressora	alguns mamíferos	A B	-
p.R473H	básico hidrofílico	básico hidrofílico	ligação ao DNA	vertebrados	A C	0/104
p.A780V	apolar alifático	apolar alifático	ativadora	mamíferos	†	0/200
p.F830L	apolar aromático	apolar alifático	ativadora	vertebrados, exceto peixes	A	0/200
p.R933H	básico hidrofílico	básico hidrofílico	ativadora	não, no rato (H)	B	0/104
p.G947D	polar neutro alifático	ácido hidrofílico	ativadora	chimpanzé, camundongo, peixe	B C D	0/104
p.V1117L	apolar alifático	apolar alifático	ativadora	alguns mamíferos	†	0/106
p.G1197D	polar neutro alifático	ácido hidrofílico	ativadora	não	B D	1/106 (0,9)
p. [M1241I; P1485A]	apolar	apolar alifático	ativadora	não	B D	0/104
	apolar	apolar alifático	ativadora	sim, exceto anfíbios	A D	0/310
p.P1315S	apolar	polar neutro	ativadora	alguns mamíferos	D	1/104 (0,9)
p.[M1352V; D1520N]	apolar	apolar alifático	ativadora	alguns mamíferos	D	0/104
	ácido hidrofílico	polar neutro	ativadora	mamíferos, peixes	A D	1/310 (0,3)
p.[M1444I; L1445F]	apolar	apolar alifático	ativadora	primatas	A D	2/310 (0,6)
	apolar alifático	apolar aromático	ativadora	alguns mamíferos	A D	2/310 (0,6)

Predição deletéria pelo Polyphen (A), SIFT (B), Mutationstaster (C) e SNAP (D); †: predição benigna pelo Polyphen , SIFT, Mutationstaster e SNAP.

As variantes p.A268V, p.G1197D, p.M1352V, p.M1444I e p.D1520N foram previamente descritas em pacientes brasileiros com anormalidades faciais, incluindo fenda palatina, aplasia heminasal e anormalidades orbitais. Não foi realizada análise funcional, mas estas mutações estavam ausentes em mais de 100 indivíduos controles^(38, 39).

Pesquisa das variantes em população controle

Onze variantes não-sinônimas foram pesquisadas na nossa população controle (n= 100 a 300 alelos), mas não foram identificadas, e não estão descritas como polimorfismos (Tabela 3). A variante p.V432M foi pesquisada em 200 indivíduos controles por Roessler et al⁽³⁶⁾, mas não foi detectada.

Seis variantes foram encontradas em indivíduos normais, porém numa baixa frequência (0,3 a 0,9%). Três destas variantes (p.G1197D, p.D1520N e p.P1315S) foram descritas no banco de dados do *1000 genomes*, com frequências entre 0,7 e 1,7%. Todavia, uma vez que o modo de herança observado caracterizou-se por uma penetrância incompleta, a presença destas variantes em indivíduos normais não descarta seu potencial papel deletério.

Análise da estrutura terciária da proteína GLI2 mutada

Foi realizada a análise *in silico* da estrutura terciária da proteína GLI2 mutada em relação à proteína selvagem. Apenas a região de dedo de zinco do GLI2 tem a estrutura 3D conhecida, portanto somente a modelagem da proteína com a variante p.R473H pode ser obtida. Aparentemente, não houve comprometimento da estrutura 3D da proteína e da ligação ao DNA (Figura 8). Porém, é possível que alguma região do GLI2 não contemplada nessa modelagem, possa interferir com a região da proteína com a variante p.R473H, uma vez que cerca de 90% da estrutura da proteína não consta nessa modelagem.

Figura 8 - Modelagem da região de ligação ao DNA da proteína GLI2 com p.R473H.

Avaliação do potencial deletério das variantes por meio de programas de predição *in silico*

Dezesseis variantes foram apontadas como deletérias em pelo menos um dos programas de predição Polyphen, SIFT, Mutation taster ou SNAP (Tabela 3).

As variantes p.P253S, p.A268V e p.G947D tiveram previsão deletéria em três programas de predição. As variantes p.V432M, p.R473H, p.G1197D, p.M1241I, p.P1485A, p.M1444I, p.L1445F e p.D1520N foram consideradas deletérias em 2 programas de predição. As variantes p.A203T, p.F830L, p.R933H, p.P1315S e p.M1352V foram consideradas deletérias em um programa de predição. Foram designadas como benignas pelos três programas de predição, as variantes p.A780V e p.V1117L.

Dez das dezesseis variantes possivelmente deletérias não foram detectadas em indivíduos normais (Tabela 3).

As previsões *in silico* não foram inteiramente concordantes e estudos funcionais das proteínas mutadas poderão complementar a avaliação do seu efeito biológico.

Previamente, estudos funcionais foram realizados com as variantes p.V432M e p.P1315S ⁽³⁶⁾. Na ocasião, estas variantes foram denominadas como p.V104M e p.P987S, pois não era conhecida parte da região amino-terminal do GLI2, com 328 aminoácidos.

Um dos estudos funcionais foi baseado no fato que a injeção de mRNAGLI2 em girinos levava à formação de tumores de pele. A quantidade de girinos com tumores de pele em que foram injetados mRNAGLI2 selvagem e mutantes, foi semelhante ⁽³⁶⁾. Outro ensaio realizado foi a avaliação da produção de fosfatase alcalina em células C3H1071/2, com indução de linhagem osteogênica mediada pelo GLI2. Não houve diferença de produção de fosfatase alcalina pelas células C3H1071/2 que foram induzidas pelo GLI2 mutado ou selvagem. Assim, os estudos funcionais não mostraram diferença entre o GLI2 mutado e o selvagem ⁽³⁶⁾. Contudo, os resultados dos estudos funcionais são questionáveis, pois os ensaios foram realizados sem a região amino-terminal do GLI2, com atividade repressora.

Variantes silenciosas

Nove diferentes variantes silenciosas (sinônimas), ou seja, com troca de nucleotídeo, mas sem troca de aminoácido, foram identificadas no *GLI2* em 15 pacientes (Tabela 4). Em alguns pacientes, foram identificadas mais de uma variante silenciosa.

Todas essas variantes silenciosas não foram descritas previamente. Porém, na avaliação *in silico*, não foi observada alteração na previsão do sítio de clivagem. De fato, essas variantes silenciosas apresentam baixa probabilidade de justificar o fenótipo de DGH.

Tabela 4 - Variantes silenciosas identificadas no *GLI2*

Pacientes (n)	Variantes	
	Sequência Nucleotídica	Sequência proteica
1	c.1713 C>T	p.C571C
1	c. 2064 C>T	p.P688P
1	c.2088 G>A	p.A696A
2	c. 2262 G>T	p.R754R
1	c. 2302 C>T	p.L768L
5	c. 2940 C>T	p.S980S
1	c. 3018 C>T	p.G996G
6	c. 3048 C>T	p.D1016D
1	c.3516 G>A	p.A1172A

Variantes na região não codificada

Foram identificadas três variantes na região intrônica do *GLI2* (Tabela 5). Estas variantes intrônicas não constam nos bancos de dados como polimorfismos. O estudo *in silico* realizado não evidenciou mudança na previsão do sítio de clivagem, o que sugere não haver relação com o fenótipo dos pacientes.

Tabela 5 - Variantes identificadas na região intrônica do *GLI2*

Pacientes (n)	Variantes	Localização (intron)
1	c.845 +5G>A	5
1	c.1684 -20C>T	10
1	c.1956 -11G>C	11

Polimorfismos

Também foram identificadas sete variantes no *GLI2* que, previamente, foram descritas nos bancos de dados como polimorfismos (Tabela 6). A análise *in silico* destes polimorfismos também não demonstrou alteração na previsão do sítio de clivagem.

Tabela 6 - Polimorfismos no *GLI2* identificados nos pacientes com DGH

Variantes	Localização	Pacientes (n)	Frequência descrita	SNP (referência)
p.T587T	exon 11	5	-	rs1732852
p.G623G	exon 11	1	1,5-2,6%	rs61732850
p.T648T	exon 11	1	1,7%	rs13008360
p.S662S	exon 11	3	0,2%	rs114259687
c.-7G>A	região 5'	1	0,8%	rs112131051
c.1368+25C>T	intron 8	7	3,3%	rs116523674
c.1683 +37 G>A	intron 10	3	-	rs41279790

SNP: polimorfismo de base única

5 DISCUSSÃO

Análise do gene *GHRH* no pacientes com DGHI congênita

Mutações em genes envolvidos com a síntese e/ou secreção de GH estão associados com DGHI ⁽⁴³⁾. Na nossa casuística de pacientes com DGHI foram identificados oito pacientes com mutações no *GH1* e sete pacientes (cinco famílias) com mutações no *receptor de GHRH*. O *GHRH* tem um evidente papel no eixo hipotálamo-hipofisário, estimulando a secreção de GH ⁽⁴²⁾. Como descrito no artigo do capítulo 1, em resultados, a análise do *GHRH* detectou nos pacientes com DGHI: duas variantes previamente descritas como polimorfismos, uma variante silenciosa e outras cinco variantes intrônicas ⁽⁴⁸⁾. No entanto, não foram identificadas variantes no *GHRH* possivelmente funcionais, ou seja, com um efeito biológico que pudesse justificar o fenótipo dos pacientes.

Apesar dos dados negativos obtidos na análise do *GHRH*, esse estudo apresenta relevante contribuição para a literatura. Havia uma carência de trabalhos com enfoque no estudo deste gene, particularmente com o uso de uma metodologia atual, sensível e específica. No presente estudo, foi realizado o sequenciamento automático do *GHRH*.

Outro destaque do estudo foi a ampla e selecionada casuística. Inicialmente, foram estudados 42 pacientes brasileiros, acompanhados no ambulatório de endocrinologia do desenvolvimento do HC-FMUSP. Como não foram encontradas mutações nesses pacientes, ampliamos a casuística com 109 pacientes com DGHI encaminhados de centros internacionais. Foi estudado um número expressivo de crianças com DGHI de Barcelona e

casos familiares de DGHI encaminhados de diversos países para Londres, mesmo assim, não foram encontradas mutações no *GHRH* ⁽⁴⁸⁾.

A ausência de mutações no *GHRH*, principalmente nos casos familiares, indica que outros genes devem estar envolvidos na etiologia da DGHI.

Por fim, a inexistência de mutações identificadas no *GHRH*, até o momento, sugere que mutações neste gene como causa de DGH, se existem, devem ser eventos muito raros. Deste modo, o estudo de rotina deste gene não deve ser realizado em pacientes com DGHI congênita.

Análise do gene *GLI2* nos pacientes com DGH congênita

A análise do *GLI2* nos pacientes com DGH congênita identificou três mutações com código de parada prematuro (capítulo 2) e 18 variantes não-sinônimas (capítulo 3). O artigo do capítulo 2 ⁽⁴⁰⁾ trouxe importante contribuição para a literatura ao demonstrar um fenótipo mais brando associado com mutações no *GLI2*, e mostrar que pacientes com mutações nesse gene podem não apresentar holoprosencefalia.

Na descrição dos pacientes com HPE e mutações no *GLI2*, a localização da neuroipófise não foi reportada ⁽³⁶⁾. No presente estudo ⁽⁴⁰⁾, nos pacientes com DGH e mutações no *GLI2* com código de parada prematuro, a posição da neuroipófise foi ectópica em cinco pacientes (2

famílias) e não visualizada em uma paciente. A neuroipófise também foi ectópica em 16 dos 18 pacientes com variantes não-sinônimas e neuroipófise visualizada. Na nossa casuística, 18/124 (15%) casos de DGH com neuroipófise ectópica apresentaram alterações no *GLI2*. Previamente, foram estudados os genes *PROP1*, *HESX1*, *LHX3* e *LHX4* em nossa casuística, sendo identificadas: uma mutação em homozigose no *HESX1* em uma paciente com DHHM e neuroipófise ectópica, e mutações no *PROP1* em 9/19 (43%) casos de DHHM e neuroipófise tópica. Desta forma, mutações no *PROP1* são a causa genética mais comum de hipopituitarismo com neuroipófise tópica na nossa casuística ⁽⁵²⁾ e na literatura ^(11, 18), e a partir dos dados deste estudo, mutações no *GLI2* mostram-se como a mais frequente causa de DGH acompanhada de neuroipófise ectópica.

Previamente, não estavam bem caracterizadas as deficiências hormonais hipofisárias associadas com mutações no *GLI2*. Observamos uma variável deficiência hormonal associada a alterações no *GLI2*, desde uma função hipofisária normal até DHHM (capítulos 2 e 3, em resultados). Esta variabilidade foi observada inclusive entre as pessoas da mesma família com a mutação p.L788fsX794. Nos pacientes com variantes não-sinônimas foi observada DHHM, exceto por uma paciente com DGH.

Um dado interessante do fenótipo da paciente com mutação a p.E380X foi a presença de diabetes insipidus associada à deficiência de GH, TSH e ACTH ⁽⁴⁰⁾. Três pacientes com variantes não-sinônimas (p.A203T, p.G947D e p.V1117L) também apresentavam deficiência de ADH. Esta é primeira vez que um defeito em um gene envolvido na organogênese hipofisária é

descrito com a associação de deficiência combinada de hormônios da hipófise anterior e posterior ⁽⁵³⁾. A deficiência de ADH associada com defeito no *GLI2* justifica-se pela sua atuação durante a embriogênese, sendo expresso no diencéfalo ventral, que dá origem ao hipotálamo, ao infundíbulo e ao lobo posterior da hipófise ⁽²⁹⁾.

Características adicionais ao fenótipo associadas à DGH foram defeito de linha média facial e polidactilia ⁽⁴⁰⁾. O paciente com a mutação p.L694fsX722 apresentava fenda palatina e lábio leporino. Polidactilia pós-axial foi observada em todos os membros da família com a mutação p.L788fsX794, sugerindo um modo de herança autossômica dominante com penetrância completa. Assim, a presença de polidactilia, em pacientes com hipopituitarismo congênito ou em seus parentes, é um indicador para o estudo do *GLI2*. Defeitos de linha média facial e polidactilia não foram observados nos pacientes com variantes não-sinônimas.

Na maioria dos casos de DGH, na investigação familiar inicial, habitualmente, não há outros casos de DGH, sugerindo uma apresentação esporádica e ausência de etiologia genética. A família em que foi identificada a mutação p.L788fsX794 teve quatro gerações estudadas. Foi observado que quatro membros da família apresentavam DGH e o modo de herança foi autossômico dominante com penetrância incompleta ⁽⁴⁰⁾. A penetrância incompleta indica a importância de uma busca ativa de casos familiares, inclusive em parentes mais distantes.

Uma das hipóteses para explicar a penetrância incompleta e a expressão variável é que o modo de herança envolva a combinação da

interação de fatores ambientais e/ou outros fatores genéticos. A interação de fatores genéticos, como variantes em outros *loci* ou efeitos epigenéticos, pode modular o padrão de transmissão e modo de apresentação da doença.

As três mutações com código de parada prematuro em conjunto com as 18 variantes não-sinônimas totalizam a presença de 15% de variantes no *GLI2* em toda a casuística de pacientes com DGH congênita, indicando uma considerável frequência de mutações neste gene, em pacientes com DGH. Apesar de estudos adicionais serem importantes para melhor definir o papel das variantes não-sinônimas, os dados obtidos, a partir das mutações com código de parada prematuro, já indicam a importância do *GLI2* na gênese da deficiência de GH congênita.

6 CONCLUSÕES

GHRH

1. Não identificamos mutação no *GHRH* nos pacientes com DGHI e, se realmente existe mutação neste gene, como causa de DGH, deve ser muito rara.

GLI2

1. Identificamos três mutações com códon de parada prematura no *GLI2* e geração de proteínas truncadas, com perda da região responsável pela ativação da transcrição, em três famílias, permitindo concluir que em relação a mutações no *GLI2*:
 - a. podem se apresentar com hipopituitarismo na ausência de holoprosencefalia;
 - b. a neuroipófise tem localização ectópica na maioria dos pacientes com hipopituitarismo;
 - c. a deficiência hormonal hipofisária é variável, DGHI ou DHHM, inclusive com deficiência de hormônio anti-diurético;
 - d. outras características fenotípicas, como polidactilia e defeito de linha média facial, podem estar associadas nos pacientes e/ou parentes;
 - e. o padrão de herança é autossômico dominante, com penetrância incompleta e expressividade variável.

2. Variantes não-sinônimas no *GLI2* são frequentes e, em geral, são associadas à DHHM e à neuroipófise ectópica.
3. Pela primeira vez, foi descrita a combinação da deficiência de hormônios da hipófise anterior e posterior associada a um defeito genético na embriogênese hipofisária.
4. Mutações no *GLI2* têm um importante papel na etiologia da DGH congênita, principalmente com neuroipófise ectópica e ausência de holoprosencefalia.

Yearbook of Pediatric Endocrinology 2011

Endorsed by the European Society for Paediatric Endocrinology

Editors

Jean-Claude Carel
Ze'ev Hochberg

Associate Editors

Gary Butler
Evangelia Charmandari
Francesco Chiarelli
Stefano Cianfarani
Mehul Dattani
Nicolas De Roux
Outi Mäkitie
Ken Ong
Orit Pinhas-Hamiel
Michel Polak
Olle Söder
Martin Wabitsch

KARGER

Novel heterozygous nonsense *GLI2* mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly

Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, Mendonça BB, Arnhold JJ
Laboratório de Hormônios e Genética Molecular, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.
iarnhold@usp.br

J Clin Endocrinol Metab 2010;95:E384–91.

Background: *GLI2* is a transcription factor downstream in sonic hedgehog signaling, acting early in ventral forebrain and pituitary development. Previously, *GLI2* mutations were reported in patients with holoprosencephaly and pituitary abnormalities. This paper reports three novel frameshift/nonsense *GLI2* mutations and the phenotypic variability in the three families.

Methods: The *GLI2* coding region of patients with isolated GH deficiency (IGHD) or combined pituitary hormone deficiency was amplified by PCR using intronic primers and was sequenced.

Results: Three novel heterozygous *GLI2* mutations were identified: c.2362_2368del p.L788fsX794 (family 1), c.2081_2084del p.L694fsX722 (family 2), and c.1138 G>T p.E380X (family 3). All predict a truncated protein with loss of the C-terminal activator domain. The index case of family 1 had polydactyly, hypoglycemia with seizures, developmental delay, short stature and absence of puberty with GH, TSH, prolactin, ACTH, LH, and FSH deficiencies. Her mother and 7 relatives harboring the same mutation had polydactyly, including 2 uncles with IGHD and 1 cousin with GH, TSH, LH, and FSH deficiencies. In family 2, a boy had cryptorchidism, cleft lip and palate, and GH deficiency. In family 3, a girl had hypoglycemia, seizures with developmental delay, poor growth, excessive thirst and polyuria, and GH, ACTH, TSH, and antidiuretic hormone deficiencies. Magnetic resonance imaging of 4 patients with *GLI2* mutations and hypopituitarism showed a hypoplastic anterior pituitary and an ectopic or undescended posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. In family 3, MRI showed anterior pituitary hypoplasia with a non-visualized posterior pituitary.

Conclusion: Three novel heterozygous frameshift or nonsense *GLI2* mutations, predicting truncated proteins lacking the activator domain, are partly penetrant and associated with IGHD or combined pituitary hormone deficiency and an ectopic/undescended posterior pituitary without holoprosencephaly.

Direct and indirect requirements of *Shh*/*Gli* signaling in early pituitary development

Wang Y, Martin JF, Bai CB
Department of Genetics, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.
brianbai01@gmail.com
Dev Biol 2010;348:199–209.

Background: Oral ectoderm-derived sonic hedgehog (*Shh*) is required for specification and/or proliferation of early pituitary progenitors. *Shh* signaling is mediated by the *Gli* transcription factors, *Gli1*, *Gli2*, and *Gli3*. *Gli2* is the major activator of *Shh* signaling, and previous studies have revealed a variable loss of the pituitary in *Gli2* mutants at E12.5 [7]. However, the mechanism of action whereby different *Gli* genes mediate *Shh* signaling to control pituitary progenitor development has not yet been determined.

Methods: Pituitary-specific *Gli* mutant embryos were generated, using either the *FoxG1Cre* or *Pitx2Cre*. *FoxG1* is expressed initially in the anterior neural ridge and in the early telencephalon, whereas *Pitx2* is largely expressed in the anterior pituitary. *Gli2* mosaic mutant embryos were also generated.

Results: *Gli2* is required for proliferation of specific groups of pituitary progenitors but not for initial dorsoventral patterning. Most *Gli2*^{−/−} embryos showed smaller pituitaries than the wild-type mice, with a reduction in corticotropes, somatotropes and lactotropes. Rathke's pouch and the infundibulum were morphologically normal but contained fewer cells, suggesting a requirement for *Gli2* for cell proliferation in both anterior and posterior pituitary. *Gli1* and *Gli3* mutants had no pituitary phenotype, suggesting that *Gli2* is the primary *Gli* transcription factor in the pituitary. *Gli2/Gli3* double mutants, in which there is also loss of expression of *Gli1*, completely lack a pituitary. Conditional transgenesis using an active form of *Smo* resulted in an increase in cell proliferation in the anterior dorsal region of Rathke's pouch, and at E14.5, the pituitaries were much bigger than in WT controls, confirming a role

for Shh in proliferation. Lastly, Shh/Gli2 signaling controlled the diencephalic expression of bone morphogenetic protein 4 (Bmp4) and fibroblast growth factor 8 (Fgf8), two genes known to play critical roles in patterning and growth of Rathke's pouch. In keeping with these data, all *Gli2* mutants had no posterior pituitary.

Conclusion: The results suggest both cell-autonomous and non-cell-autonomous requirements for Gli2 in regulation of pituitary progenitor specification, proliferation and differentiation.

These two papers by Franca et al. and Wang et al. shed novel insights on the role of GLI2 in normal hypothalamo-pituitary development in mouse and human. Wang et al. report a series of murine mutants and show that *Gli2* loss of function is associated with variable pituitary hypoplasia of the anterior pituitary with absence of the posterior pituitary. The patterning of the pituitary in the conditional mutants is normal, but there is a clear proliferation defect. Removal of *Gli2* function at an early stage using the *FoxG1Cre* leads to an abnormal pituitary phenotype whereas later removal using *Pitx2Cre* does not affect the pituitary, suggesting a critical window of Shh/Gli2 signaling in the control of pituitary progenitors. *Gli2* is also implicated in the development of the posterior pituitary and this effect is probably mediated via effects on Bmp4 and Fgf8 expression in the diencephalon, both of which are expressed at a markedly reduced level in *Gli2* mutants. These data therefore indicate a requirement for Shh/Gli2 at two levels of hypothalamo-pituitary development, namely within Rathke's pouch to promote proliferation of pituitary progenitors, and secondly within the ventral diencephalon to control early patterning of Rathke's pouch by regulating Bmp4 and Fgf8 expression.

How can one reconcile the human phenotypes associated with *GLI2* mutations with those observed in the mouse? Previous studies [8] have reported the association of hypopituitarism with complex midline abnormalities in the form of holoprosencephaly in patients with *GLI2* mutations. Five patients with variable hypopituitarism ranging from isolated GHD to panhypopituitarism were described; of the 3 with panhypopituitarism, all had an absent pituitary although it is unclear whether this included both the anterior and posterior lobes. The endocrine phenotypes were variably penetrant and were not described in detail, and indeed, 2 patients were deceased and no genetic confirmation was possible. Franca et al. describe three families that have variably penetrant hypopituitary phenotypes. Interestingly, apart from a cleft palate in the proband in family 2, none of the other patients had midline defects although polydactyly, previously also reported by Roessler et al. [8], was present in family 1. Four of the 5 patients in this second study had an undescended or ectopic posterior pituitary, and 1 patient had an absent posterior pituitary. None had a completely absent pituitary. This is the first description of a patient with both anterior and posterior pituitary hormone deficiencies in the absence of any midline defects, confirming the findings of Wang et al. that *Gli2/GLI2* is required for the formation of both the anterior and posterior pituitary. Interestingly, the parents of the probands in both family 2 and family 3 who transmitted the mutations were unaffected. The authors suggest that the variable penetrance may be due to the impact of environmental factors or possibly a digenic effect whereby mutations in other genes may be contributory to the phenotype.

These two papers add a new player to be considered when screening children with hypopituitarism for genetic mutations. The field of hypothalamo-pituitary development is becoming increasingly complex. Studies such as these help in putting together the jigsaw pieces.

8 REFERÊNCIAS

1. Vimpani GV, Vimpani AF, Lidgard GP, Cameron EH, Farquhar JW. Prevalence of severe growth hormone deficiency. *Br Med J* 1977 Aug 13;2(6084):427-30.
2. Lindsay R, Feldkamp M, Harris D, Robertson J, Rallison M. Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency. *J Pediatr* 1994 Jul;125(1):29-35.
3. Thomas M, Massa G, Craen M, de Zegher F, Bourguignon JP, Heinrichs C, et al. Prevalence and demographic features of childhood growth hormone deficiency in Belgium during the period 1986-2001. *Eur J Endocrinol* 2004 Jul;151(1):67-72.
4. Bierich JR. Aetiology and pathogenesis of growth hormone deficiency. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1990;370:155-63.
5. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev* 2009 Dec;30(7):790-829.
6. Craft WH, Underwood LE, Van Wyk JJ. High incidence of perinatal insult in children with idiopathic hypopituitarism. *J Pediatr* 1980 Mar;96(3 Pt 1):397-402.
7. Fujisawa I, Kikuchi K, Nishimura K, Togashi K, Itoh K, Noma S, et al. Transection of the pituitary stalk: development of an ectopic posterior lobe assessed with MR imaging. *Radiology* 1987 Nov;165(2):487-9.
8. Kelly WM, Kucharczyk W, Kucharczyk J, Kjos B, Peck WW, Norman D, et al. Posterior pituitary ectopia: an MR feature of pituitary dwarfism. *AJNR Am J Neuroradiol* 1988 May-Jun;9(3):453-60.

9. Triulzi F, Scotti G, di Natale B, Pellini C, Lukezic M, Scognamiglio M, et al. Evidence of a congenital midline brain anomaly in pituitary dwarfs: a magnetic resonance imaging study in 101 patients. *Pediatrics* 1994 Mar;93(3):409-16.
10. Hasegawa Y, Hasegawa T, Tanaka N, Ishizaka H, Aso T, Yamada M, et al. Hypopituitarism with invisible pituitary stalk: two case reports of males with micropenis suggesting fetal onset of hypopituitarism. *Endocr J* 1994 Oct;41(5):531-4.
11. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic forms of hypopituitarism and their manifestation in the neonatal period. *Early Hum Dev* 2009 Nov;85(11):705-12.
12. Phillips JA, 3rd, Cogan JD. Genetic basis of endocrine disease. 6. Molecular basis of familial human growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 Jan;78(1):11-6.
13. Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe K, Amino N, Mizuno Y, et al. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat Genet* 1992 Apr;1(1):56-8.
14. Phillips JA, 3rd, Hjelle BL, Seeburg PH, Zachmann M. Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Oct;78(10):6372-5.
15. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency-an update. *Nat Rev Endocrinol* 2010 Oct;6(10):562-76.
16. Dattani MT. Growth hormone deficiency and combined pituitary hormone deficiency: does the genotype matter? *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005 Aug;63(2):121-30.

17. Zhu X, Wang J, Ju BG, Rosenfeld MG. Signaling and epigenetic regulation of pituitary development. *Curr Opin Cell Biol*2007 Dec;19(6):605-11.
18. Vieira TC, Boldarine VT, Abucham J. Molecular analysis of PROP1, PIT1, HESX1, LHX3, and LHX4 shows high frequency of PROP1 mutations in patients with familial forms of combined pituitary hormone deficiency. *Arq Bras Endocrinol Metabol*2007 Oct;51(7):1097-103.
19. Wu W, Cogan JD, Pfaffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, et al. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet*1998 Feb;18(2):147-9.
20. Meszaros F, Vergesslich K, Riedl S, Hausler G, Frisch H. Posterior pituitary ectopy in children with idiopathic growth hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*2000 Jun;13(6):629-35.
21. Garel C, Leger J. Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. *Horm Res*2007;67(4):194-202.
22. Chen S, Leger J, Garel C, Hassan M, Czernichow P. Growth hormone deficiency with ectopic neurohypophysis: anatomical variations and relationship between the visibility of the pituitary stalk asserted by magnetic resonance imaging and anterior pituitary function. *J Clin Endocrinol Metab*1999 Jul;84(7):2408-13.
23. Kornreich L, Horev G, Lazar L, Schwarz M, Sulkes J, Pertzalan A. MR findings in growth hormone deficiency: correlation with severity of hypopituitarism. *AJNR Am J Neuroradiol*1998 Sep;19(8):1495-9.
24. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*2007 Jul;87(3):933-63.
25. Cohen LE, Radovick S. Molecular basis of combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr Rev*2002 Aug;23(4):431-42.

26. Villavicencio EH, Walterhouse DO, Iannaccone PM. The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease. *Am J Hum Genet* 2000 Nov;67(5):1047-54.
27. Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, et al. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development* 2001 Feb;128(3):377-86.
28. Park HL, Bai C, Platt KA, Matise MP, Beeghly A, Hui CC, et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development* 2000 Apr;127(8):1593-605.
29. Wang Y, Martin JF, Bai CB. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Dev Biol* 2010 Dec 15;348(2):199-209.
30. Crick AP, Babbs C, Brown JM, Morriss-Kay GM. Developmental mechanisms underlying polydactyly in the mouse mutant Doublefoot. *J Anat* 2003 Jan;202(1):21-6.
31. Vortkamp A, Gessler M, Grzeschik KH. GLI3 zinc-finger gene interrupted by translocations in Greig syndrome families. *Nature* 1991 Aug 8;352(6335):539-40.
32. Vortkamp A, Franz T, Gessler M, Grzeschik KH. Deletion of GLI3 supports the homology of the human Greig cephalopolysyndactyly syndrome (GCPS) and the mouse mutant extra toes (Xt). *Mamm Genome* 1992;3(8):461-3.
33. Litingtung Y, Dahn RD, Li Y, Fallon JF, Chiang C. Shh and Gli3 are dispensable for limb skeleton formation but regulate digit number and identity. *Nature* 2002 Aug 29;418(6901):979-83.

34. Biesecker LG, Abbott M, Allen J, Clericuzio C, Feuillan P, Graham JM, Jr., et al. Report from the workshop on Pallister-Hall syndrome and related phenotypes. *Am J Med Genet* 1996 Oct 2;65(1):76-81.
35. Roessler E, Muenke M. The molecular genetics of holoprosencephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* Feb 15;154C(1):52-61.
36. Roessler E, Du YZ, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillesen-Kaesbach G, et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 Nov 11;100(23):13424-9.
37. Roessler E, Ermilov AN, Grange DK, Wang A, Grachtchouk M, Dlugosz AA, et al. A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Hum Mol Genet* 2005 Aug 1;14(15):2181-8.
38. Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A* 2006 Dec 1;140(23):2571-6.
39. Bertolacini C, Ribeiro-Bicudo L, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray J. Clinical findings in patients with GLI2 mutations - phenotypic variability. *Clin Genet* 2010 Dec 6.
40. Franca MM, Jorge AA, Carvalho LR, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 Nov;95(11):E384-91.
41. Lin-Su K, Wajnrajch MP. Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) and the GHRH Receptor. *Rev Endocr Metab Disord* 2002 Dec;3(4):313-23.

42. Melmed S, Kleinberg D. Anterior pituitary In: Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, editors. Williams Textbook of Endocrinology. 11th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2008.
43. Alatzoglou KS, Turton JP, Kelberman D, Clayton PE, Mehta A, Buchanan C, et al. Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2009 Sep;94(9):3191-9.
44. Alatzoglou KS, Dattani MT. Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency-an update. Nat Rev Endocrinol Oct;6(10):562-76.
45. Mullis P, Patel M, Brickell PM, Brook CG. Isolated growth hormone deficiency: analysis of the growth hormone (GH)-releasing hormone gene and the GH gene cluster. J Clin Endocrinol Metab 1990 Jan;70(1):187-91.
46. Perez Jurado LA, Phillips JA, 3rd, Francke U. Exclusion of growth hormone (GH)-releasing hormone gene mutations in familial isolated GH deficiency by linkage and single strand conformation analysis. J Clin Endocrinol Metab 1994 Mar;78(3):622-8.
47. Alba M, Salvatori R. A mouse with targeted ablation of the growth hormone-releasing hormone gene: a new model of isolated growth hormone deficiency. Endocrinology 2004 Sep;145(9):4134-43.
48. Franca MM, Jorge AA, Alatzoglou KS, Carvalho LR, Mendonca BB, Audi L, et al. Absence of GH-releasing hormone (GHRH) mutations in selected patients with isolated GH deficiency. J Clin Endocrinol Metab 2011 Sep;96(9):E1457-60.

49. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. II. Arch Dis Child 1966 Dec;41(220):613-35.
50. Greulich WN, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. 2nd ed. Stanford, CA: Stanford University Press; 1959.
51. Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, et al. The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. Endocrinology 2011 Jul;152(7):2894-903.
52. Osorio MG, Marui S, Jorge AA, Latronico AC, Lo LS, Leite CC, et al. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes. J Clin Endocrinol Metab 2002 Nov;87(11):5076-84.
53. Gevers EF, Dattani MT. Pituitary. In: Carel JC, Hochberg Z, editors. Yearbook of Pediatric Endocrinology: Karger; 2011.