

Karina Berger

Hipogonadismo hipogonadotrófico : diagnóstico pré-puberal e papel das isoformas e variantes gênicas do hormônio luteinizante no fenótipo da doença

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

Área de concentração: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça

São Paulo

2006

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Berger, Karina

Hipogonadismo hipogonadotrófico : diagnóstico pré-puberal e papel das isoformas e variantes gênicas do hormônio luteinizante no fenótipo da doença /
Karina Berger. -- São Paulo, 2006.

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

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Berenice Bilharinho de Mendonça.

Descritores: 1.HIPOGONADISMO/diagnóstico 2.HIPOPITUITARISMO
3.FLUOROIMUNOENSAIO 4.HORMÔNIO LUTEINIZANTE SUBUNIDADE
BETA/genética 5.FREQÜÊNCIA DO GENE 6.GLICOPROTEÍNAS
7.CROMATOGRAFIA

USP/FM/SBD-097/06

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dedico este trabalho a todos aqueles que lutaram pelos seus sonhos e os tornaram realidade.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho representa um pedacinho muito valioso da minha vida. Com ele aprendi muito e agradeço a todas as pessoas que contribuíram para que ele desse certo. Algumas menções especiais:

À minha orientadora, Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, uma pessoa muito especial, que confiou em mim e me recebeu de portas abertas em seu laboratório. Ensinou-me a viver bem e fazer do trabalho e do estudo atividades prazerosas. Mostrou-me que nada é impossível quando realizamos nosso trabalho com dedicação e responsabilidade.

Aos pacientes e seus familiares. Sem eles nada disso seria possível.

À amiga Luciani, admirável pela simplicidade, companheirismo, dinamismo e competência. Com ela aprendi que a vida tem muitas coisas boas e que não devemos desistir quando as coisas não acontecem do jeito que planejamos.

Aos amigos: Maria Edna, Frederico, Maria Estela, Márcia Helena, Catarina, Rocio, Milena Teles, Rafaela, Lize, Milena Abrão, Rogério, Regina, Emília, Miriam, Tânia, Mirta, Alzira, Aide e Bárbara pelo carinho e pela torcida.

À Nilda pelo pelos cuidados e ajuda constante.

Aos colegas que estiveram ao meu lado durante a minha formação, nos trabalhos de bancada, nos trabalhos para publicação, nas aulas, nos congressos, no exame de qualificação:

Ao Prof. Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold pelas sugestões, orientação, paciência e disponibilidade em ensinar.

À Dra. Ana Elisa Correia Billerbeck pela dedicação, persistência nos experimentos de bancada e principalmente pelo carinho e apoio.

Ao Dr. Vinícius Nahime Brito pelas sugestões e valiosas discussões científicas e principalmente pelo carinho e amizade.

À Dra. Elaine Maria Frade Costa pelas sugestões e apoio.

Ao Dr. Antônio Carlos Magnanelli e à Dra Valéria Sutti Nunes pela disponibilidade em me ensinar e me auxiliar nos experimentos com a cromatografia. Juntos, aprendemos um pouco sobre a cromatofocalização

Ao Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge pelas sugestões, orientação e constante disponibilidade em ensinar.

Ao Dr. Chin Jia Lin pelas sugestões nos experimentos de bancada.

Ao Dr. José Gilberto H Vieira pela gentileza em nos ceder o material necessário para dosagem da subunidade alfa livre.

Ao Prof. Dr. Walter Bloise, à Profa. Dra. Ana Cláudia Latrônico e à Profa. Dra. Ieda Theresinha do Nascimento Verreshi, que constituíram a banca do exame de qualificação, pelas críticas, elogios e sugestões.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular e do Ambulatório da Endocrinologia do Desenvolvimento, que me receberam com muito carinho e me propiciaram um ambiente de trabalho saudável.

Aos meus pais Hildegardt e Waldemiro pelo amor e pela educação.

Aos meus irmãos Volkmar, Jaqueline, Alessandra e Florencio pelo amor e apoio incondicional.

À minha irmã do coração, Ana Patricia, pelo carinho, pelos cuidados e principalmente pela presença, mesmo quando eu fazia tudo errado.

Aos meus sobrinhos Volkmar Junior, Lorenzo, Gustavo e Christian pelo enorme carinho e pela chance de voltar a ser criança.

À Liliana, a pessoa que me ensinou a ser autora da minha própria história.

Por fim, agradeço à FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - pelo apoio financeiro para a realização dos experimentos.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Resumo

Summary

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - OBJETIVOS.....	16
3 - MÉTODOS.....	18
Casuística.....	19
Avaliação clínica.....	23
Avaliação hormonal.....	26
Avaliação radiológica.....	28
Extração de DNA a partir de sangue periférico.....	29
Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	30
Seqüenciamento automático.....	31
Digestão enzimática.....	32
Cromatografia.....	34
Análise estatística.....	36

3 - RESULTADOS	38
Avaliação hormonal dos pacientes portadores de hipopituitarismo	39
Propriedades da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH no diagnóstico do hipogonadismo hipogonadotrófico	39
Imunoreatividade do LH em 2 diferentes ensaios imunofluorométricos e dosagem da subunidade α	40
Análise da influência das isoformas e das variantes alélicas do LH sobre a concentração de LH em pacientes hipogonádicos	40
5 - DISCUSSÃO.....	45
6 - CONCLUSÕES.....	51
7 - ANEXOS	53
8 - REFERÊNCIAS	73

LISTAS

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio antidiurético
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
B/I	bioatividade/imunorreatividade
C	Citosina
CG	Gonadotrofina coriônica
<i>DAX1</i>	<i>Dosage-sensitive, sex reversal, adrenal hypoplasia congenita, X chromosome gene 1</i>
DGH	Deficiência do hormônio de crescimento
DGHI	Deficiência isolada do hormônio de crescimento
DHHM	Deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
E2	Estradiol
F	Cortisol
FIE	Fluoroimunoensaio
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
<i>FSHβ</i>	Subunidade beta do hormônio folículo-estimulante
G	Guanina
GH	Hormônio do crescimento
Gly	Glicina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GnRHR</i>	Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas
<i>GPR54</i>	<i>G protein-coupled receptor-54</i>
<i>HESX1</i>	<i>Homeobox embryonic stem cell</i>
HH	Hipogonadismo hipogonadotrófico
HHI	Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
IC	Idade cronológica
IFME	Ensaio imunofluorométrico

IGF-1	Fator de crescimento semelhante a insulina - 1
Ile	Isoleucina
IO	Idade óssea
IRME	Ensaio imunorradiométrico
<i>KAL1</i>	<i>Kallmann Syndrome 1</i>
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHβ</i>	Subunidade beta do hormônio luteinizante
<i>LHX3</i>	<i>Lim homeobox gene 3</i>
LIM	Laboratório de investigação médica
nt	Nucleotídeo
NL	Normal
pb	Pares de base
<i>PC-1</i>	Pró-hormônio convertase 1
PCR	Reação de polimerização em cadeia
<i>PHF6</i>	<i>Plant homeo domain-like finger gene</i>
pl	Ponto isoelétrico
PIF	Fator inibitório da prolactina
Pro	Prolina
PRL	Prolactina
<i>PROP1</i>	<i>Prophet of Pit-1</i>
RM	Ressonância magnética
RIE	Radioimunoensaio
T	Timina
Thr	Treonina
TRH	Hormônio liberador de tirotrofinas
TSH	Hormônio estimulador da tireóide ou tireotrófico
Val	Valina
vo	Via oral
SK	Síndrome de Kallmann
<i>SNRPN</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide SmN</i>
SNC	Sistema nervoso central

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resposta hormonal ao teste combinado (Insulina +TRH + GnRH) realizado pré e pós-tratamento com GH e imagem por RM da região hipotálamo-hipofisária dos pacientes com hipopituitarismo.....54
- Tabela 2** – Dados clínicos, radiológicos e avaliação do eixo gonadotrófico dos pacientes com hipopituitarismo em estágio pré-puberal e puberal56
- Tabela 3** – Dados clínicos e radiológicos dos pacientes com hipopituitarismo avaliados em idade puberal58
- Tabela 4** – Dados clínicos, radiológicos e hormonais dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH basal, em idade puberal59
- Tabela 5** – Dados clínicos e desenvolvimento puberal das pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH60
- Tabela 6** – Dados clínicos e desenvolvimento puberal dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH61
- Tabela 7** – Valores hormonais no teste combinado (Insulina + TRH + GnRH) dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH.....62
- Tabela 8** – Dados clínicos, radiológicos e avaliação do eixo gonadotrófico dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH.....63
- Tabela 9** – Propriedades dos testes laboratoriais.....65
- Tabela 10** – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio pré-puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo masculino (n= 19) com seguimento clínico até a idade puberal66

Tabela 11 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio pré-puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo feminino (n= 10) com seguimento clínico até a idade puberal	66
Tabela 12 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo masculino (n= 13).....	67
Tabela 13 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo feminino (n= 9)	67
Tabela 14 – Propriedades da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH, realizado em estágio pré-puberal e puberal, no diagnóstico do hipogonadismo hipogonadotrófico em pacientes com hipopituitarismo	68
Tabela 15 – Valores basais da subunidade α e do LH, dosado por dois diferentes ensaios imunofluorométricos, dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH	69
Tabela 16 – Genótipo das variantes alélicas do gene <i>LHβ</i> nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH	70
Tabela 17 – Frequência alélica das variantes Trp8Arg e Ile15Thr do gene <i>LHβ</i> em uma amostra da população de brasileiros normais e em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico	71
Tabela 18 – Valores médios de LH, FSH e estradiol ou testosterona, dosados pelo IFME, e as variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr do gene <i>LHβ</i> em indivíduos normais e pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico	72

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Causas de hipogonadismo hipogonadotrófico	12
Quadro 2 - Mutações nos genes que atuam no desenvolvimento e na função gonadal e causam hipogonadismo hipogonadotrófico .	13
Quadro 3 - Estádios da puberdade feminina	24
Quadro 4 - Estádios da puberdade masculina	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Representação esquemática do gene <i>LHβ</i>	4
Figura 2 -	Representação esquemática do gene <i>LHβ</i> e a localização das suas variantes alélicas (em cinza) e suas mutações (em preto)	5
Figura 3 -	Representação esquemática da estrutura dos oligossacarídeos dos hormônios glicoprotéicos.....	9
Figura 4 -	Digestão enzimática para estudo das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr em indivíduos normais	33
Figura 5 -	Variante alélicas 983T>C (Trp8Arg) e 1008T>C (Ile15Thr) em heterozigose, localizadas no éxon 2 do gene <i>LHβ</i>	42
Figura 6 -	Variante alélica 1018G>C (Val18) em heterozigose, localizada no éxon 2 do gene <i>LHβ</i>	42
Figura 7 -	Variante alélica 1036C>A (Pro24) em heterozigose, localizada no éxon 2 do gene <i>LHβ</i>	42
Figura 8 -	Variante alélica 1423C>T (Gly75) em heterozigose, localizada no éxon 3 do gene <i>LHβ</i>	42
Figura 9 -	Padrão de distribuição das isoformas das gonadotrofinas nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH e nos controles LH e FSH %: porcentagem de recuperação das gonadotrofinas nos intervalos de pH básico e ácido	43
Figura 10 -	Padrão de distribuição das isoformas do FSH nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH e nos controles	44
Figura 11 -	Padrão de distribuição das isoformas do LH nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH e nos controles	44

RESUMO

BERGER K. *Hipogonadismo hipogonadotrófico: diagnóstico pré-puberal e papel das isoformas e variantes gênicas do hormônio luteinizante no fenótipo da doença* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2006. 86p.

O hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) resulta da ausência ou diminuição da capacidade do hipotálamo de secretar GnRH ou da glândula pituitária de secretar gonadotrofinas. Seu diagnóstico na infância é questionável e habitualmente postergado até a idade adulta, período no qual o diagnóstico se baseia nas concentrações baixas ou normais das gonadotrofinas. Na nossa casuística, 13% dos pacientes com HH apresentam concentrações normais de gonadotrofinas no basal e após estímulo com GnRH. O hormônio luteinizante (LH) é composto de duas subunidades, α e β , que contêm estruturas de oligossacarídeos altamente variáveis, as quais conferem diferentes cargas às isoformas das gonadotrofinas e interferem na sua meia-vida, biossíntese e bioatividade. Mutações ou polimorfismos no gene $LH\beta$ podem alterar a imunorreatividade ou bioatividade do LH. Neste estudo, determinamos o valor preditivo da resposta das gonadotrofinas (LH e FSH) ao estímulo agudo com GnRH para o diagnóstico da deficiência de gonadotrofinas em estágio pré-puberal em pacientes com hipopituitarismo e investigamos a origem da concentração sérica normal de LH encontrada em pacientes com HH através do estudo da região codificadora do gene $LH\beta$ e da análise das isoformas das gonadotrofinas. Foram selecionados 29 pacientes com história de baixa estatura, submetidos ao teste combinado em estágio pré-puberal. Após um período de $11,2 \pm 3,7$ anos de acompanhamento ambulatorial, 6 pacientes evoluíram com desenvolvimento puberal espontâneo, enquanto que 23 pacientes necessitaram de reposição de esteróides sexuais. A avaliação das respostas das gonadotrofinas ao GnRH mostrou que a resposta diminuída do LH apresentou sensibilidade de 66,6% no sexo feminino e 50% no sexo masculino, enquanto que a resposta diminuída do FSH apresentou uma melhor sensibilidade no sexo feminino que no masculino (89% x 37,5%). O estudo do gene $LH\beta$, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida por seqüenciamento automático, foi realizado em 13 hipogonádicos com concentrações normais de LH. Para o estudo da freqüência das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr do gene $LH\beta$, utilizando a técnica de PCR seguida por digestão enzimática, foram selecionados 35 hipogonádicos com concentrações baixas de gonadotrofinas e 202 adultos normais. O seqüenciamento automático revelou 5 variantes alélicas: Trp8Arg e Ile15Thr, Val18Val, Pro24Pro e Gly75Gly. A freqüência gênica das variantes alélicas Arg8 e Thr15 foi similar nos adultos normais (7,6%) e hipogonádicos (8,3%) e não houve influência da presença das variantes nas concentrações séricas do LH em ambos os grupos. Para o estudo das isoformas das gonadotrofinas, utilizando a cromatofocalização, foram selecionados 8 hipogonádicos com níveis normais de LH e 9 indivíduos normais. Houve um predomínio das isoformas ácidas do LH ($pH \leq 6,9$) e do FSH ($pH \leq 6,9$) em ambos os grupos. Concluimos que a resposta das gonadotrofinas ao GnRH, principalmente a resposta diminuída do FSH nas meninas, é útil para

predizer em idade pré-puberal o diagnóstico do HH nos pacientes com hipopituitarismo. A frequência similar das variantes Arg8 e Thr15 nos hipogonádicos e nos indivíduos normais exclui o papel dessas variantes nas concentrações séricas do LH. Houve um predomínio das isoformas ácidas do LH nos hipogonádicos, porém o encontro de isoformas ácidas também nos indivíduos normais, não permitiu atribuir à sua presença a baixa atividade biológica do LH imunorreativo encontrado em 13% dos hipogonádicos.

Descritores: hipogonadismo/ diagnóstico, hipopituitarismo, fluoroimunoensaio, hormônio luteinizante subunidade beta/ genética, frequência do gene, glicoproteínas, cromatografia.

SUMMARY

BERGER K. *Hypogonadotropic hypogonadism: pre-pubertal diagnosis and the role of the isoforms and allelic variants of the luteinizing hormone in the disease phenotype* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2006. 86p.

Hypogonadotropic hypogonadism (HH) results from the absence or decrease of the hypothalamus capacity of secreting GnRH or the pituitary gland capacity of secreting gonadotropins. Its diagnosis in childhood is debatable and thus, it is usually delayed until adulthood, when the diagnosis is based on low or normal levels of gonadotropins. In our series, 13% of the HH patients presented normal gonadotropin levels at baseline and after GnRH stimulation. The luteinizing hormone (LH) consists of two subunits, α and β , which contain highly variable oligosaccharide structures that confer different charges to gonadotropin isoforms and interfere with their half-life, biosynthesis and bioactivity. Mutations or polymorphisms of the *LH β* gene can alter LH immunoreactivity or bioactivity. In this study, we determined the predictive value of gonadotropin (LH and FSH) responses to an acute GnRH stimulation for the diagnosis of gonadotropin deficiency at the pre-pubertal stage in patients with hypopituitarism and investigated the origin of the normal serum LH levels observed in HH patients through the study of the coding region of the *LH β* gene and the analysis of gonadotropin isoforms. The twenty-nine patients selected for the study had a history of short stature and underwent the combined test at the pre-pubertal stage. After a period of 11.2 ± 3.7 yrs of follow-up at outpatient clinic level, 6 patients evolved with spontaneous pubertal development, whereas the remaining 23 needed sexual steroid replacement therapy. The evaluation of gonadotropin responses to GnRH showed that the decreased LH response had a sensitivity of 66.6% and 50% in female and male patients, respectively, whereas the decreased FSH response showed a better sensitivity in the female sex compared to the male sex (89% vs. 37.5%). The study of the *LH β* gene, utilizing the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique followed by automatic sequencing was carried out in 13 hypogonadic individuals with normal LH levels. Thirty-five hypogonadic subjects with low gonadotropin levels and 202 normal adults were selected for the study of the allelic variants Trp8Arg and Ile15Thr of the *LH β* gene, which utilized PCR followed by enzymatic digestion. Automatic sequencing disclosed 5 allelic variants: Trp8Arg and Ile15Thr, Val18Val, Pro24Pro and Gly75Gly. The allelic frequencies of the allelic variants Arg8 and Thr15 were similar between normal adults (7.6%) and hypogonadic individuals (8.3%), with no influence ascribed to the presence of the variants on serum LH levels in both groups. For the study of gonadotropin isoforms, which utilized chromatofocusing, 8 hypogonadic subjects with normal LH levels and 9 normal individuals were selected. There was a predominance of acid LH (pH \leq 6.9) and FSH (pH \leq 6.9) isoforms in both groups. We conclude that gonadotropin response to GnRH, especially the decreased FSH response in girls, is a useful tool for predicting HH diagnosis at the pre-pubertal stage, in patients with hypopituitarism. The similar frequencies of the variants Arg8 and Thr15 in hypogonadic subjects and normal individuals exclude the role of these

variants on serum LH levels. There was a predominance of acid LH isoforms in hypogonadic subjects, which does not allow us to ascribe to their presence the low biological activity of the immunoreactive LH, found in 13% of the hypogonadic individuals.

Descriptors: hypogonadism/ diagnostic, hypopituitarism, fluoroimmunoassay, beta subunit luteinizing hormone/ genetic, gene frequency, glycoproteins, chromatography.

1 - INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a maturação do sistema reprodutivo são processos ativos que têm início na vida fetal e se estendem até os primeiros meses de vida. O sistema reprodutivo torna-se então inativo na infância até a sua reativação na adolescência, quando ocorre a maturação sexual. A reativação fisiológica do eixo hipotálamo-hipófise-gônadal ocorre normalmente entre os 8 e 13 anos de idade nas meninas e entre os 9 e 14 anos nos meninos^{1, 2}.

O início da puberdade é decorrente do aumento da secreção pulsátil do decapeptídeo GnRH, por neurônios localizados no hipotálamo médio basal. O GnRH estimula a secreção hipofisária das gonadotrofinas essenciais para a maturação gonadal, caracterizada pela secreção dos esteróides sexuais e pela gametogênese².

Anormalidades no eixo hipotálamo-pituitário levam a um prejuízo da função gonadal com conseqüente diminuição nas concentrações das gonadotrofinas e hormônios sexuais, quadro este denominado de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH)^{1, 3, 4}.

O hormônio luteinizante (LH) é uma glicoproteína sintetizada e secretada pelas células gonadotróficas da hipófise anterior, com papel fundamental na regulação da função gonadal, na produção de estrógenos e andrógenos e na gametogênese^{3, 4}. No sexo masculino, o LH estimula a

produção de testosterona pelas células de Leydig. No sexo feminino, estimula a produção de estrógenos, andrógenos e progesterona pelos ovários e é responsável pela ovulação^{2, 3}.

A secreção do LH é regulada pela concentração plasmática dos produtos secretados pelas glândulas-alvo (esteróides sexuais e peptídeos gonadais) e pelos neuropeptídeos produzidos no hipotálamo^{2, 3}. Os padrões fisiológicos de secreção do LH são determinados pela frequência e amplitude de pulso do GnRH. O LH exerce sua atividade biológica através da interação com um receptor específico, o receptor de LH/CG, pertencente à família dos receptores de membrana ligados à proteína G^{3, 5}.

A estrutura química do LH é semelhante à dos outros membros da família dos hormônios glicoprotéicos: o hormônio folículo-estimulante (FSH), a gonadotrofina coriônica (CG) e o hormônio tireotrófico (TSH). Estes hormônios são heterodímeros constituídos por uma subunidade α comum e uma subunidade β específica, unidas por ligações não covalentes. Pontes dissulfídicas mantêm as ligações entre as subunidades α e β e determinam a estrutura da molécula madura^{3, 6, 7}.

A subunidade α , comum a todos os hormônios glicoprotéicos, é codificada por um gene de 13,5 kb. Este gene localiza-se no cromossomo 6q21.1-23, é constituído por quatro éxons e codifica uma proteína de 92 aminoácidos. A proteína madura contém 10 resíduos de cisteína que estão envolvidos nas ligações dissulfídicas intra-subunidade^{3, 7}.

A subunidade β do LH é codificada por um gene localizado no cromossomo 19q13.32, constituído de 1.662 pb três éxons e que codifica um

peptídeo sinalizador de 20 aminoácidos e uma proteína madura de 121 aminoácidos (Figura 1). A proteína madura contém 12 resíduos de cisteína^{3, 7, 8}. Embora a subunidade β confira especificidade funcional aos hormônios glicoprotéicos, existe uma grande homologia estrutural entre eles, principalmente entre o LH e o CG humanos. Apesar deste alto grau (83%) de homologia entre as porções codificadoras do $LH\beta$ e do $CG\beta$ humanos, o que permite a ligação de ambos os hormônios ao mesmo receptor, suas regiões promotoras são divergentes e suas regiões 5' não-traduzidas são distintas^{7, 9}.

Cromossomo 19q13.32

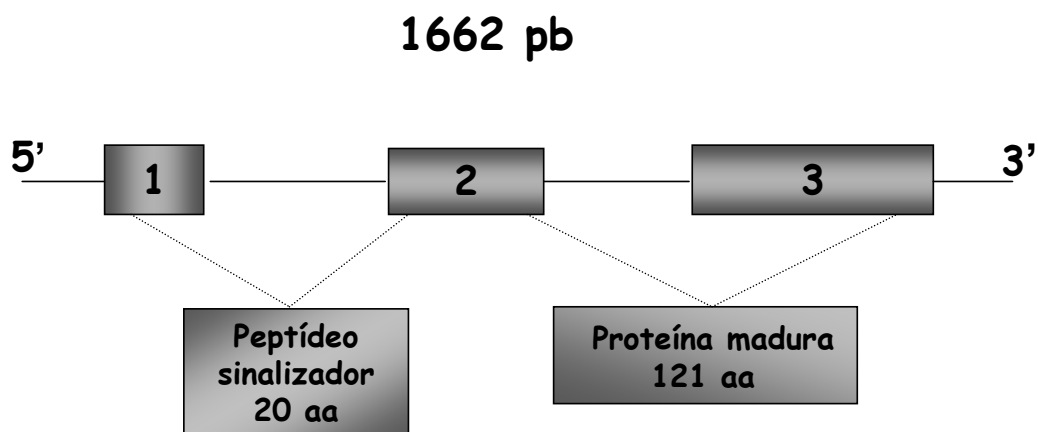


Figura 1 - Representação esquemática do gene $LH\beta$

A expressão completa da atividade biológica dos hormônios glicoprotéicos requer a presença de ambas as cadeias polipeptídicas íntegras^{3, 7}.

Uma única mutação no gene da subunidade α foi descrita em humanos num carcinoma indiferenciado da região femoral¹⁰. Trata-se de uma mutação *missense*, com troca de glutamato por alanina no códon 56 da subunidade α . A proteína mutada apresentava um peso molecular maior do que a proteína nativa e não era capaz de se dimerizar com a subunidade β . A ausência de mutações no gene da subunidade α em linhagem germinativa pode indicar que tais alterações sejam letais causando uma disfunção de todos os hormônios glicoprotéicos^{11, 12}.

Duas mutações *missense* causando inativação funcional do LH e 4 variantes alélicas foram descritas no gene *LH β* (Figura 2). A primeira mutação, (Glu54Arg) foi identificada em homozigose em um adolescente de 17 anos, filho de pais consangüíneos, com atraso puberal e com concentrações séricas elevadas de LH e baixas concentrações de testosterona¹³. A biópsia testicular revelou espermatogênese incompleta e ausência de células de Leydig. Essa mutação gerou um LH com imunorreatividade elevada, porém sem bioatividade *in vitro*¹³⁻¹⁵. A mãe e a irmã eram heterozigotas assintomáticas, enquanto que 3 tios maternos heterozigotos apresentavam infertilidade¹³.

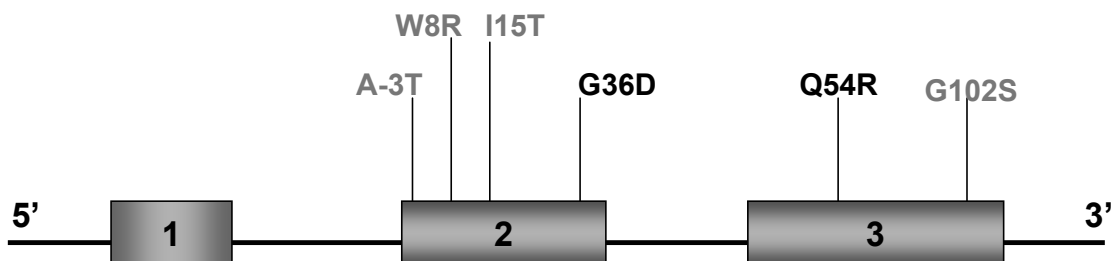


Figura 2 - Representação esquemática do gene *LH β* e a localização das suas variantes alélicas (em cinza) e suas mutações (em preto)

Outra mutação causando inativação funcional do LH é a Gly36Asp, encontrada em um homem de 30 anos com quadro de infantilismo sexual, infertilidade, concentrações séricas indetectáveis de LH, concentrações baixas de testosterona e concentrações elevadas de FSH¹⁶. Essa mutação desfaz um sítio vital, o CAGYC, da cisteína do *LH β* impedindo a sua dimerização com a subunidade α e a secreção do hormônio¹⁶.

Vários estudos analisaram a presença de variantes polimórficas no gene *LH β* associada a diferentes quadros clínicos. A variante alélica, Ala(-3)Thr, no peptídeo sinalizador da subunidade β do LH foi encontrada em heterozigose em 3 de 100 indivíduos de uma população da Ruanda¹⁷. Estudos *in vitro* demonstraram que essa variante alélica não compromete a dimerização das subunidades α e β , a ligação do hormônio no seu receptor e a clivagem do peptídeo sinalizador, porém causa um aumento na produção de fosfato inositol e uma pequena redução na resposta do AMP cíclico estimulado¹⁷.

A variante alélica Gly102Ser foi descrita em uma população chinesa de Cingapura e parece estar restrita a populações do leste asiático^{18, 19}, pois num rastreamento realizado em populações da Finlândia, Dinamarca, Bengala e Ruanda, ela não foi encontrada²⁰. Embora esta variante tenha sido associada a distúrbios menstruais e quadros de infertilidade em ambos os sexos²¹⁻²⁴, os estudos *in vitro* demonstraram que a bioatividade do LH mutado e do LH selvagem são semelhantes²⁰.

As variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr foram descritas pela primeira vez em três mulheres com distúrbios menstruais, infertilidade e LH imunologicamente anômalo^{25, 26}. Este fenômeno é explicado pelo fato de que

a mutação Ile15Thr introduz um sítio de glicosilação extra (Asn¹³-Ala¹⁴-Thr¹⁵) na cadeia β do LH e esse carboidrato extra é responsável pela imureatividade reduzida ou abolida aos anticorpos contra o dímero intacto²⁵⁻²⁷. As variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr estão em completo desequilíbrio de ligação e também foram descritas em indivíduos normais de diversas populações do mundo, com uma frequência relativamente alta em populações da Finlândia (41,9%) e Austrália (53,5%)^{19, 22, 23, 28-36}. O efeito fenotípico do LH variante ainda é discutível, devido à significância estatística marginal obtida em grandes estudos populacionais nos quais o efeito das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr foi relacionado à ação do LH em diversas situações clínicas tais como na síndrome dos ovários policísticos e na progressão da puberdade^{12, 34, 37}. Por outro lado, em outras populações foi demonstrada uma significativa associação entre essas variantes alélicas, em homo ou heterozigose, e infertilidade^{29, 30}. Estudos *in vitro* demonstraram que o LH variante forma dímero com a subunidade α , mantém sua capacidade de ligação ao receptor e apresenta uma elevada biopotência para a produção de progesterona pelas células MA-10 (*Leydig tumor cells*)^{27, 38}. *In vivo*, o LH variante é capaz de induzir ovulação e a sua taxa de depuração é mais rápida que a do LH selvagem²⁷.

Em humanos, após a tradução da proteína, ocorre um processo de transferência de complexos de oligossacarídeos com carga negativa ou neutra para resíduos específicos de asparagina (Asn), serina (Ser) ou treonina (Thr), chamado glicosilação. Existem dois sítios de glicosilação, um sítio ligado ao radical amina (NH₂) da asparagina, denominado N-ligado e

um sítio ligado ao radical hidroxila (OH) da serina e da treonina, denominado O-ligado⁷. O processo de localização dessas cadeias de carboidratos é essencial para a sinalização do hormônio, difere entre as gonadotrofinas e é espécie-específico^{3, 7, 39-42}.

Os hormônios glicoprotéicos contêm quantidade e estrutura variável de oligossacarídeos na sua molécula (15 a 45%). Os oligossacarídeos podem ser divididos em três categorias: sializados, sulfatados e híbridos sulfatados-sializados (Figura 3) e têm carga negativa ou neutra, de acordo com o número de resíduos de sulfato ou de ácido siálico presentes na sua estrutura^{7, 39-42}. O carboidrato tem como papel principal o de determinar a meia-vida circulante dos hormônios glicoprotéicos, além de influenciar a biossíntese, a secreção e a modulação de atividades específicas das glicoproteínas^{7, 41, 43}.

A subunidade α possui dois sítios de glicosilação localizados nos resíduos Asn⁵² e Asn⁷⁸. A subunidade β do LH humano (hLH) possui um sítio de glicosilação localizado na Asn³⁰. O hLH possui oligossacarídeos predominantemente sulfatados ou híbridos, enquanto que o CG e o FSH humanos possuem somente oligossacarídeos sializados^{7, 40, 44}.

Técnicas de separação das proteínas através da sua carga elétrica têm identificado mais de vinte isoformas distintas do LH, básicas e ácidas, que diferem pela complexidade e magnitude das modificações no processo de glicosilação pós-tradução^{45, 46}. Existem evidências crescentes de que a extensão e o padrão de glicosilação estão sob controle endócrino multifatorial, regulados pelo GnRH, estradiol e a testosterona⁴⁷⁻⁵².

Ensaio da cinética do LH *in vivo* mostraram que isoformas altamente sializadas (pH ácido) exibem uma meia-vida mais longa, ao contrário das isoformas alcalinas (pH básico) e dessializadas de meia-vida mais curta. Apesar da meia-vida mais curta, isoformas mais alcalinas apresentaram maior bioatividade *in vitro*^{45, 48, 53}.

Vários estudos avaliaram o papel das isoformas do LH e do FSH em diversas situações e períodos do desenvolvimento sexual. A fase inicial do desenvolvimento puberal (estádio II de Tanner) dos meninos é marcada por uma significativa mudança nas cargas das isoformas, com predomínio das isoformas das gonadotrofinas mais ácidas⁴⁹. No sexo feminino as mudanças são menos expressivas e há um predomínio das isoformas mais básicas em todos os estádios do desenvolvimento puberal⁴⁹. Um estudo avaliando o efeito agudo do GnRH exógeno sobre as isoformas das gonadotrofinas hipofisárias, em meninos e meninas em desenvolvimento puberal, demonstrou que as meninas tiveram menos isoformas ácidas do que os meninos⁵⁴.

Em homens normais foi demonstrado um predomínio das isoformas mais ácidas do LH que apresentaram correlação positiva com concentrações séricas normais de testosterona⁵⁵. Por outro lado, em pacientes urêmicos em hemodiálise que apresentavam elevada imunorreatividade do LH, porém uma relação de bioatividade/imunorreatividade (B/I) reduzida, e em homens obesos com história de diminuição da libido associada a concentrações diminuídas de testosterona e concentrações elevadas de estradiol foi observado um predomínio de isoformas do LH mais básicas^{51, 55, 56}.

Na mulher jovem, com secreção normal de estrogênio, há um predomínio das isoformas do LH mais alcalinas, caracterizado por uma elevada relação B/I *in vitro*. Num estudo detalhado da distribuição das isoformas do LH e do FSH nas diversas fases do ciclo menstrual foram observadas diferenças significativas na proporção de isoformas do FSH mais ácidas (pH < 4,5), 50% no meio do ciclo, 36% no início para o meio do ciclo, 37% na fase folicular tardia e 29% na fase lútea. Em relação ao LH, não houve diferença significativa na proporção das isoformas nas distintas fases do ciclo menstrual, embora todos os valores fossem superiores ao encontrado nas mulheres menopausadas⁵⁰.

Até o momento, os mecanismos básicos envolvidos na regulação das mudanças e distribuição das isoformas das gonadotrofinas são incertos e a relevância das isoformas no desenvolvimento puberal e maturação sexual ainda é desconhecida.

O hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) é definido como uma deficiência da secreção pituitária do hormônio luteinizante e do hormônio folículo-estimulante decorrente de lesões funcionais ou estruturais do eixo hipotálamo-pituitário² (Quadros 1 e 2). O diagnóstico do HH baseia-se nas manifestações clínicas e laboratoriais presentes nas diversas fases do período de maturação sexual^{1, 2}.

Quadro 1 - Causas de hipogonadismo hipogonadotrófico***Distúrbios no sistema nervoso central (SNC)***

Tumores
Histiocitose de Langerhans
Lesões pós-infecciosas do SNC
Anomalias vasculares do SNC
Radioterapia
Malformações congênitas especialmente associadas a anomalias craniofaciais
Trauma craniano
Hipofisite linfocítica

Deficiência isolada de gonadotrofinas

Síndrome de Kallmann
 Mutação no gene *KAL*
 Mutação no gene *FGFR1*
Mutação no receptor do *GnRH*
Hipoplasia adrenal congênita (mutação no *DAX1*)
Deficiência isolada de *LH*
Deficiência isolada de *FSH*
Deficiência de pró-hormônio convertase 1
Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático

Formas idiopáticas e genéticas de deficiência hormonal pituitária múltipla

Mutação no gene *PROP1*
Mutação no gene *HESX1*
Mutação no gene *LHX3*

Miscelâneas

Síndrome de Prader-Willi
Síndromes de Laurence-Moon e Bardet-Biedl
Deficiência funcional de gonadotrofinas
 Doenças sistêmicas crônicas
 Desnutrição
 Anorexia nervosa
 Bulimia
 Amenorréia psicogênica
 Puberdade atrasada de atletas e dançarinas
 Hipotireoidismo
 Diabetes mellitus
 Doença de Cushing
 Hiperprolactinemia
 Uso de maconha
 Doença de Gaucher

FONTE: Grumbach MM, et al.²

Quadro 2 - Mutações nos genes que atuam no desenvolvimento e na função gonadal e causam hipogonadismo hipogonadotrófico

Gene	Locus	Herança	Fenótipo predominante
<i>KAL</i>	Xp22.3	Ligada ao X	HH, anosmia/hiposmia, agenesia renal unilateral e sincinesia
<i>FGFR1</i>	8p11.2	AD	HH, anosmia/hiposmia, fenda palatina e lábio leporino
<i>DAX1</i>	Xp21.3	Ligada ao X	HH e hipoplasia adrenal congênita
Leptina	7q31.3	AR	HH e obesidade
Receptor da leptina	1p31	AR	HH e obesidade
<i>PC1</i>	5q15	AR	HH, hipocortisolismo e obesidade
<i>GnRHR</i>	4q21.2	AR	HH isolado
<i>HESX1</i>	3p21.2	AR/AD	Hipopituitarismo, neurohipófise ectópica e displasia septo-óptica
<i>LHX3</i>	9q34.3	AR	Hipopituitarismo, malformações esqueléticas cervicais
<i>PROP1</i>	5q35	AR	Hipopituitarismo
<i>LHβ</i>	19q13.32	AR	HH isolado
<i>FSHβ</i>	11p13	AR	HH isolado
<i>GPR54</i>	19p13.3	AR	HH isolado
<i>SNRPN</i>	15q12	*	Síndrome de Prader-Willi e obesidade
<i>PHF6</i>	Xq26.3	Ligada ao X	Síndrome de Borjeson-Lehmann e hipopituitarismo

AD: autossômica dominante; AR: autossômica recessiva, HH: hipogonadismo hipogonadotrófico
 * perda de função da região 15q11-q13 paterna ou dissomia uniparental materna

No período neonatal apenas no sexo masculino o diagnóstico pode ser aventado frente a um recém-nascido com micropênis, criptorquia e concentrações baixas de gonadotrofinas associadas a concentrações baixas de esteróides sexuais e inibina B^{1, 57}.

Na infância, em ambos os sexos, o diagnóstico do HH não pode ser realizado pelos achados clínicos e a dosagem das gonadotrofinas, tanto em condição basal quanto após estímulo com GnRH, usando o radioimunoensaio (RIE)^{58, 59} ou o ensaio imunorradiométrico (IRME)^{60, 61} não permite o diagnóstico preciso. Com o advento de técnicas mais sensíveis, como o ensaio imunofluorométrico (IFME), as limitações das dosagens das gonadotrofinas foram parcialmente superadas^{62, 63}. A incidência do HH associado a deficiência do hormônio de crescimento (DGH) é elevada, como demonstrado em diversos estudos⁶⁴⁻⁶⁷. Em nossa casuística, a deficiência do setor gonadotrófico está presente em 54% (35/64) dos pacientes portadores de DGH. Assim, o uso de testes diagnósticos em idade pré-puberal que pudessem antever a evolução para HH em uma criança com deficiência de GH associada ou não a outras deficiências hipofisárias seria de grande utilidade para a prática clínica.

Na idade adulta, o diagnóstico de HH baseia-se na história clínica de ausência ou parada do desenvolvimento puberal, caracterizada no sexo feminino por amenorréia primária ou secundária e infertilidade e no sexo masculino por impotência, infertilidade e diminuição da libido nos homens. Ao exame físico observa-se infantilismo sexual e proporções corporais eunucóides. As dosagens hormonais identificam concentrações baixas ou

normais de gonadotrofinas associadas a concentrações de esteróides gonadais baixas para a idade cronológica^{1, 3, 68}.

Em nossa casuística de 101 pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, observamos que em 13% deles as concentrações de LH basal e após estímulo com GnRH estavam dentro dos valores puberais normais, apesar do quadro clínico de hipogonadismo. Este achado sugere que a gonadotrofina embora com imunorreatividade normal apresente uma bioatividade reduzida. Considerando as alterações estruturais das diferentes isoformas do LH e as alterações moleculares do gene *LH β* , nossa proposta é investigar se um destes fatores é o responsável pelas concentrações normais de LH no HH.

2 - OBJETIVOS

- 1- Determinar em pacientes com hipopituitarismo em estágio pré-puberal o valor preditivo da resposta do LH e do FSH, medidos pelo ensaio imunofluorométrico, ao estímulo agudo com GnRH para o diagnóstico da deficiência de gonadotrofinas.

- 2- Investigar a origem da concentração sérica normal de LH encontrada em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico através do:
 - a) estudo da região codificadora do gene *LH β*
 - b) análise das isoformas do LH e do FSH

3 - MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP/ CAPPesq 578/03) e o consentimento esclarecido foi concedido pelos pacientes ou responsáveis.

Casuística

A) Casuística do objetivo 1

Pacientes:

Foram selecionados 29 pacientes (19 do sexo masculino) com história de baixa estatura, em idade cronológica (IC) de 13 anos (variação de 4,8 a 17,7 anos) e idade óssea (IO) de 9 anos (variação de 2 a 13 anos), submetidos ao teste combinado (Insulina, TRH e GnRH) em estágio pré-puberal para diagnóstico do hipopituitarismo (Tabelas 1 e 2).

Todos os pacientes foram acompanhados até a idade puberal ou adulta. A avaliação do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários foi realizada de acordo com os critérios de Marshall e Tanner^{69, 70} e o desenvolvimento gonadal no sexo masculino foi baseado nos critérios de Root⁷¹. Após um período médio de $11,2 \pm 3,7$ anos

(variação de 3,5 a 20,4 anos) de acompanhamento ambulatorial, 6 pacientes (5 do sexo masculino) evoluíram com desenvolvimento puberal espontâneo e foram classificados como normais (NL), enquanto que 23 pacientes (14 do sexo masculino) necessitaram de reposição de esteróides sexuais para desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e foram classificados como HH (Tabela 3). A reposição hormonal no sexo masculino foi iniciada aos 18,4 anos de idade cronológica (variação de 13,7 a 26,6 anos) e IO de 12,5 anos (variação de 8 a 17 anos) e no sexo feminino aos 15,5 anos (variação de 12,6 a 20,7 anos) e IO de 12 anos (variação de 10 a 13,6 anos).

Vinte e dois pacientes (13 do sexo masculino) aos 18,9 anos de IC (variação de 14,2 a 27,9 anos) e 14 anos de IO (variação de 11 anos a idade óssea adulta) realizaram um novo teste de estímulo agudo com GnRH em estágio puberal (Tabela 2).

A ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária de 28 pacientes mostrou adenohipófise hipoplásica em 24 (86%), neurohipófise ectópica em 21 (75%), transecção de haste em 17 (61%) e haste afilada em um paciente (Tabela 1).

A etiologia do hipopituitarismo não foi estabelecida em 26 pacientes enquanto que em duas pacientes foi identificada mutação no gene *PROP1*^{72, 73} e em uma paciente mutação no gene *HESX1*⁷⁴ (Tabela 1).

Ao final do tratamento com hormônio do crescimento, 23 pacientes foram resubmetidos ao teste combinado para reavaliar as deficiências hormonais (Tabela 1).

Controles:

A resposta das gonadotrofinas ao teste de estímulo agudo com GnRH dos pacientes com hipopituitarismo foi comparada a de um grupo controle normal constituído por 27 crianças (16 do sexo masculino) em estágio puberal Tanner I e 18 adultos (9 do sexo masculino) em estágio puberal Tanner V⁶².

B) Casuísticas do objetivo 2**Pacientes:**

a) 13 pacientes (7 do sexo feminino) portadores de HH congênito de diferentes etiologias (síndrome de Kallmann em 3 pacientes, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado em 3 pacientes e deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla em 7 pacientes) que apresentavam concentrações normais de LH em condição basal foram selecionados para estudo da região codificadora do gene *LHβ* (tabela 4). Todos os pacientes tinham história de ausência ou parada do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários ou infertilidade. Duas mulheres apresentavam amenorréia primária e 5 amenorréia secundária (Tabelas 5 e 6). Sete pacientes realizaram o teste combinado (Insulina, TRH e GnRH) em duas ocasiões, no momento do diagnóstico do hipopituitarismo e ao final do tratamento com GH. As deficiências hormonais encontradas foram de GH em 7 pacientes (100%), de ACTH em 4 pacientes (57%), de PIF em 3 pacientes (43%) e de TRH em 2 pacientes (28%) (Tabelas 7 e 8). Seis pacientes realizaram somente o teste de estímulo com GnRH (Tabela 8). Na idade puberal, todos os pacientes apresentavam concentrações séricas

normais de gonadotrofinas em condição basal. Após o estímulo agudo com GnRH, 3 mulheres e 1 homem apresentaram hiperresposta do LH (Tabela 4). Apesar de possuírem concentrações de LH normais para a idade puberal, todos os pacientes apresentavam quadro clínico sugestivo de deficiência das gonadotrofinas (Tabelas 5 e 6). Todos os pacientes receberam reposição dos esteróides sexuais, iniciada em diferentes idades cronológicas de acordo com o início do quadro clínico. Imagens da ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária dos 7 pacientes portadores de DHHM mostraram adenohipófise hipoplásica em 7 pacientes (100%), neurohipófise ectópica em 6 pacientes (86%), transecção de haste em 4 pacientes (57%) e haste afilada em 2 pacientes (28%). Nos 5 pacientes com deficiência isolada de gonadotrofinas a RM mostrou adenohipófise normal em todos os pacientes, ausência dos bulbos olfatórios com hipoplasia dos sulcos olfatórios em 1 paciente e ausência do sulco olfatório esquerdo em outro paciente.

- b) 35 pacientes com fenótipo clássico de HH foram incluídos, totalizando 48 pacientes com HH, no estudo das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr do gene *LH β* .
- c) 8 dos 13 pacientes portadores de HH e concentrações séricas normais de LH (6 do sexo feminino) foram incluídos no estudo das isoformas do LH e do FSH.

Controles:

- a) 202 brasileiros adultos (115 mulheres) com função sexual preservada e sem uso exógeno de esteróides sexuais foram selecionados para o estudo das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr do gene *LH β* .
- b) 9 indivíduos normais (4 do sexo feminino) com função sexual preservada e sem uso exógeno de esteróides sexuais foram selecionados para o estudo das isoformas do LH e do FSH.

Avaliação clínica

Todos os pacientes selecionados foram avaliados clinicamente no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. A altura foi medida através de um estadiômetro. O desvio-padrão da altura foi calculado usando padrões britânicos de referência⁷⁵. O grau de desenvolvimento puberal foi avaliado de acordo com a classificação de Marshall e Tanner^{69, 70} e o desenvolvimento genital no sexo masculino foi baseado nos critérios de Root⁷¹ (Quadros 3 e 4)

Quadro 3 - Estádios da puberdade feminina***Desenvolvimento mamário***

M1 – Pré-adolescente. Elevação apenas da papila.

M2 – Estádio de broto mamário: há elevação da mama e da papila, formando um pequeno broto subareolar, há aumento da aréola.

M3 – Aumento maior da mama e da aréola, sem separação dos contornos.

M4 – Aumento da mama com protusão da aréola e mamilo, formando um contorno secundário em relação ao restante da mama.

M5 – Estádio adulto. Projeção apenas do mamilo com recessão areolar, que passa a integrar o contorno da mama. Curvatura da porção superior da mama.

Pêlos pubianos

PP1 – Pré-adolescente. O velo sobre o púbis não é mais desenvolvido que o da parede abdominal.

PP2 – Crescimento esparsos de pêlos longos, pigmentados, lisos ou discretamente curvos, principalmente sobre os grandes lábios.

PP3 – Pêlos mais grossos, escuros e encaracolados que confluem sobre a junção do púbis

PP4 – O pêlo tem a característica do adulto, cobre a área pubiana, mas ainda não totalmente e não há pêlos sobre a raiz das coxas

PP5 – Os pêlos cobrem todo o púbis, formando um triângulo invertido do padrão feminino clássico e atingindo a face interna das coxas, mas não a linha alba.

FONTE: Grumbach MM, et al²

Quadro 4 - Estádios da puberdade masculina**Genitais**

G1 – Pré-adolescente. Testículos, bolsa escrotal e pênis apresentam aspecto infantil.

G2 – Os testículos* aumentam de volume (comprimento testicular >2 cm e <3,2 cm) e a pele escrotal muda de textura tornando-se avermelhada, fina e pregueada

G3 – Ocorre crescimento do pênis, principalmente em comprimento, mas também em largura. Maior crescimento testicular* (>3,3 cm e <4 cm) e da bolsa escrotal.

G4 – Maior crescimento do pênis tanto em comprimento como em largura, com desenvolvimento da glândula. Aumento do testículo* (>4,1 cm e < 4,9 cm) e da bolsa escrotal, que fica mais pigmentada.

G5 – Genitália de forma e tamanho de adulto. Comprimento testicular* >5 cm

Pêlos pubianos

PP1 – Pré-adolescente. O pelo sobre o púbis não é mais desenvolvido que o da parede abdominal.

PP2 – Crescimento esparsos de pêlos longos, levemente pigmentados, lisos ou discretamente curvos, principalmente na base do pênis.

PP3 – Pêlos mais grossos, escuros e encaracolados que confluem sobre a sínfise do púbis

PP4 – O pelo tem a característica do adulto, cobre a área pubiana.

PP5 – Pêlos com características e quantidades do homem adulto, formando um triângulo invertido atingindo ou não a linha alba. Os pêlos também atingem a face interna das coxas.

FONTE: Grumbach MM, et al²

*Root e col¹

Avaliação hormonal

Teste combinado clássico: após coleta de amostra basal, foram administrados por via venosa, *in bolus*, insulina (0,1 U/kg peso), TRH (200 mcg) e GnRH (100 mcg). Amostras de GH, PRL, TSH, LH, FSH, cortisol e glicemia foram colhidas a cada 15 minutos até o tempo 90 minutos.

Teste combinado alternativo: após coleta de amostra basal, foi administrado por via oral 0,100 mg/m² de cloridrato de clonidina e por via venosa 1 mcg de ACTH sintético, 200 mcg de TRH e 100 mcg de GnRH. Foram colhidas subsequentemente amostras sanguíneas nos tempos 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos.

Teste do GnRH: após coleta de amostra basal, foi administrado por via venosa, *in bolus*, 100 mcg de GnRH. Amostras de LH e FSH foram colhidas a cada 15 minutos até o tempo 60 minutos.

Em todos os pacientes foram realizadas dosagens basais de T4 livre, testosterona (T) no sexo masculino e estradiol (E₂) no sexo feminino. Todas as dosagens hormonais foram realizadas no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do HCFMUSP utilizando *kits* comerciais. Em 8 pacientes com HH (casuística 2) foi dosada a subunidade α livre e o LH, que foi gentilmente dosado pelo Laboratório Fleury.

O GH inicialmente foi medido por um ensaio imunorradiométrico (IRME) e TSH, T4, PRL, cortisol, LH, FSH, E2 e testosterona por radioimunoensaio (RIE). Subseqüentemente, o TSH foi medido por um ensaio imunoenzimático (EIE) e mais recentemente todos esses hormônios e o T4 livre passaram a ser

dosados pelo método imunofluorométrico (IFME), utilizando o kit comercial AutoDELFIA, Perkin ElmerTM (Wallac Oy, Turku, Finlândia).

O ensaio atual utilizado para a dosagem do LH, ensaio imunofluorométrico (IFME) utilizando o kit comercial AutoDELFIA[®] hLH Spec, Perkin Elmer[®] (Wallac Oy, Turku, Finlândia), se baseia na técnica de sanduíche, na qual 2 anticorpos monoclonais são dirigidos contra 2 diferentes determinantes antigênicos presentes na molécula da subunidade β do LH. Este ensaio difere do ensaio imunofluorométrico desenvolvido a partir de anticorpos monoclonais produzidos no Laboratório Fleury (São Paulo, SP, Brasil), no qual um anticorpo é dirigido contra um determinante antigênico presente na subunidade α do LH, enquanto que o outro anticorpo é dirigido contra um determinante antigênico presente na subunidade β do LH.

A subunidade α livre foi dosada por um ensaio imunofluorométrico desenvolvido a partir de anticorpos monoclonais produzidos no Laboratório Fleury (São Paulo, SP, Brasil)⁷⁶.

O IGF-I foi dosado por um ensaio imunorradiométrico (Active IGF-I with extraction, DSL 5600, Webster, Texas, USA).

Os coeficientes de variação intraensaio e interensaio foram menores que 8% e 10%, respectivamente, para todos os hormônios.

O diagnóstico laboratorial de DGH e das outras deficiências hipotálamo-hipofisárias foi baseado em critérios previamente estabelecidos⁷⁷⁻⁷⁹. Para a análise da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH, as concentrações séricas das gonadotrofinas foram comparadas com valores normais para o estágio puberal correspondente⁶².

No estágio puberal Tanner I, a resposta das gonadotrofinas ao estímulo com GnRH foi considerada reduzida quando estava abaixo do menor valor de normalidade estabelecido para crianças pré-púberes normais: para o sexo masculino um pico de LH < 0,7 U/L e de FSH < 1,0 U/L e para o sexo feminino um pico de LH < 1,0 U/L e de FSH < 6,7 U/L. Na idade adulta, a resposta foi considerada reduzida se: pico de LH < 9,6 U/L e de FSH < 2,9 U/L para o sexo masculino e pico de LH < 6,9 e de FSH < 4,6 U/L para o sexo feminino. Respostas abaixo desses pontos de corte foram consideradas como testes positivos para o diagnóstico de HH.

Avaliação radiológica

Todos os pacientes realizaram raio x simples de mão e punho para determinação da idade óssea de acordo com o método de Greulich & Pyle⁸⁰. Pacientes portadores de hipopituitarismo realizaram ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária, avaliada através de cortes coronais e sagitais em T1 com TR 350 ms e TE 20 ms. Nos pacientes portadores de deficiência isolada das gonadotrofinas também foi estudada a região dos bulbos e sulcos olfatórios. Para visualização completa dos bulbos e sulcos olfatórios foram realizados cortes coronais, desde o centro da órbita até a região selar, com 3 mm de espessura e intervalo de 5 mm entre eles; e cortes transversos em T1 (600/30/1-2 TR/TE/excitação) do lobo frontal anterior até a região do hipotálamo, sem uso de contraste. O aparelho utilizado foi um Tesla 1,5 (Sigma, GE, Milwaukee, Wisconsin, USA).

Extração de DNA a partir de sangue periférico

Amostras de DNA foram extraídas de leucócitos de sangue periférico pela técnica de proteinase-K-extração com sal (salting out)⁸¹. Quinze mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubos com 25 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). O botão leucocitário foi obtido a partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se para isso 2 volumes de solução de lise (NH_4Cl 114 mM, NaHCO_3 1 mM) com incubação a 4°C por 30 minutos. O material foi centrifugado a 4°C durante 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany), desprezando-se o sobrenadante. O procedimento da lise de glóbulos vermelhos foi repetido por mais uma vez. O botão de células brancas foi suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 10 mM, pH 8) com 180 μL de dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 150 μL de proteinase K (10 mg/mL) (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA), sendo o material incubado a 37°C por 18 horas. Após esse período, 3,6 mL de solução saturada de cloreto de sódio (6 M) foi adicionada agitando-se o conjunto vigorosamente durante 15 segundos. O material foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Germany). O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo e o DNA foi precipitado acrescentando-se 2 volumes de etanol absoluto gelado, homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida lavado em etanol 70%, repetindo-se a operação por mais 3 vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, sendo secado em

centrífuga a vácuo (Eppendorf, Concentrator 5301, Germany). Após tal procedimento, o DNA foi ressuspendido em tampão TE (10:0,1) (Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 0,1 mM, pH 8).

A concentração do DNA extraído foi obtida através de leitura em um espectrofotômetro (Amersham, Pharmacia, Upsala, Suécia) no comprimento de onda de 260 nm (1,0 unidade DO 260 = 50 µg/mL). Foi estabelecido que a relação de 1,8 entre as leituras de 260 e 280 nm seria ideal para a caracterização da pureza do material.

Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação do gene *LHβ* utilizando oligonucleotídeos específicos que flanqueiam as regiões 5' não-traduzida, LHF (ACCTGAACCACACCCACTTC), e 3' não-traduzida, LHR (GTATGTGTGGTTGCCCTGAG). Em um volume final de 50 µL foram utilizados 100 – 500 ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 30 pmol de cada oligonucleotídeo, 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Amersham, Pharmacia Biotech, Upsala, Suécia) e tampão da reação fornecido pelo fabricante. A amplificação foi realizada em um termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O programa de amplificação consistiu de: 95°C 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C 1 minuto, 61°C 30 segundos, 72°C 3 minutos e extensão final de 72°C 10 minutos. Os produtos

de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizados em um transiluminador com luz ultravioleta e fotografados para confirmar a amplificação do fragmento de interesse (1764 pb).

Seqüenciamento automático

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi determinada através da comparação da intensidade de sinal emitido pelo produto amplificado com os fragmentos de um marcador de peso molecular de concentração conhecida após eletroforese em gel de agarose 1%. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática, 2 µL da enzima, constituída pela combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão e exonuclease I, ExoSAP-IT (Amersham Life Science, Cleveland, OH, USA), para cada 5 µL de produto de PCR, por um período de 15 minutos a 37°C seguido por um período de 15 minutos a 80°C. A reação de seqüenciamento foi realizada utilizando o kit ABI Prism™ BigDye Terminator (Applied Biosystem, Foster City, CA). Os produtos dessa reação foram submetidos a eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 3100 automatic DNA sequencer (Applied Biosystem, Foster City, CA).

Digestão enzimática

Duas variantes alélicas no *LHβ*, Trp⁸ (TGG) por Arg⁸ (CGG) e Ile¹⁵ (ATC) por Thr¹⁵ (ACC), localizadas no éxon 2, foram rastreadas em pacientes hipogonádicos e em indivíduos normais pela técnica de digestão enzimática. A reação de digestão foi realizada utilizando 5 µL do produto de PCR do gene *LHβ*, 1,25 U da enzima *Nco I* ou 0,5 U da enzima *Fok I* e o tampão da reação fornecido pelo fabricante (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) por 2 horas a 37°C. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta.

O DNA contendo o nucleotídeo T da variante alélica Trp8Arg quando digerido pela enzima *Fok I* gera 10 fragmentos: 500, 392, 304, 195, 108, 100, 71, 43, 40 e 11 pb. Na presença do nucleotídeo C, o fragmento inicial de 1764 pb perde um sítio de restrição, gerando 9 fragmentos de DNA: 500, 435, 304, 195, 108, 100, 71, 40 e 11 pb. Indivíduos heterozigotos para esta variante alélica apresentam 11 fragmentos de DNA: 500, 435, 392, 304, 195, 108, 100, 71, 43, 40 e 11 pb.

O DNA contendo o nucleotídeo T da variante alélica Ile15Thr quando digerido pela enzima *Nco I* gera 3 fragmentos: 1050, 614 e 100 pb. Na presença do nucleotídeo C, o fragmento inicial de 1764 pb perde um sítio de restrição, gerando 2 fragmentos de DNA: 1150 e 614 pb. Indivíduos heterozigotos para esta variante alélica apresentam 4 fragmentos de DNA: 1150, 1050, 614 e 100 pb (Figura 4).

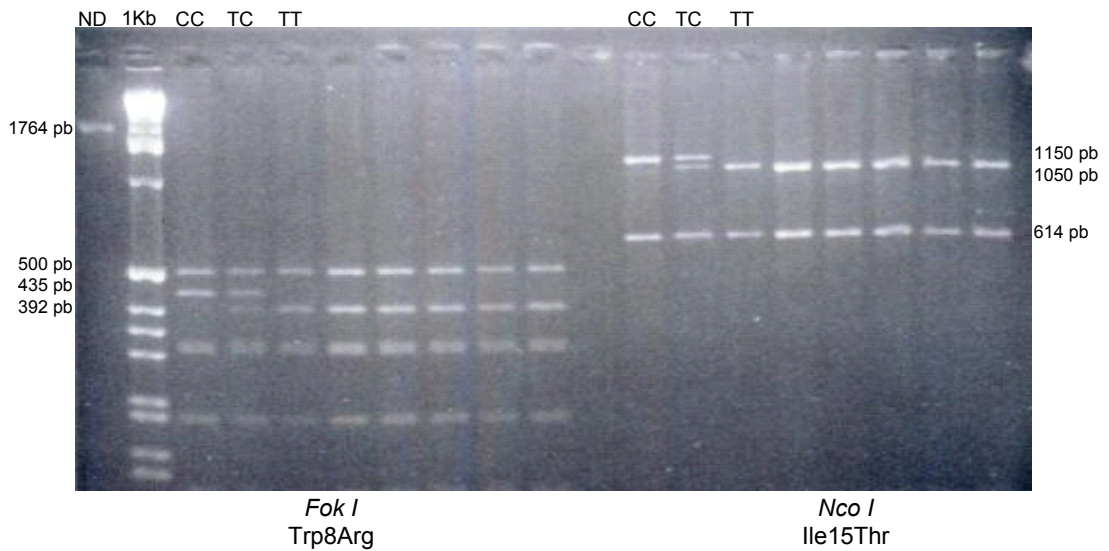


Figura 4 - Digestão enzimática para estudo das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr em indivíduos normais

Gel de agarose a 3% mostrando os produtos da digestão do fragmento de 1764 pb (gene *LHβ*).

A diferença entre o homocigoto CC e o TT está na presença dos fragmentos 435 pb (*Fok I*) e 1150 pb (*Nco I*) resultantes da perda de um sítio de restrição.

1Kb - marcador de peso molecular ND - fragmento não digerido

Cromatografia

Cromatografia é o processo pelo qual uma mistura química, arrastada por um líquido ou gás, é separada em seus componentes como resultado da distribuição diferencial dos solutos enquanto fluem entre uma fase móvel e outra fase estacionária, sólida ou líquida^{82, 83}.

As isoformas das gonadotrofinas (LH e FSH) foram separadas pelo método da cromatofocalização, um tipo de cromatografia que se baseia na separação das proteínas através do seu ponto isoelétrico (pI), como descrito previamente^{51, 83-86}.

a) Preparo das amostras

A distribuição das isoformas das gonadotrofinas de cada paciente foi determinada em uma amostra basal de soro (2 mL) concentrada por diálise. Cada amostra foi transferida para uma membrana de diálise com limite de exclusão de 12000 – 14000 PM (Spectrum Medical Industries, Los Angeles, CA), dialisada a 4°C por 24 horas contra água deionizada, com sucessivas trocas a cada 4 horas e depois contra carbonato de amônio 0,01 mol/L (pH 7,5). Ao término da diálise, a amostra foi transferida para um tubo de 15 mL, congelada a – 80° C, liofilizada e estocada. Cada amostra liofilizada foi redissolvida em 1,5 mL do tampão Pharmalyte 8,0 -10,5 - HCl (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

b) Preparo dos tampões

Todos os tampões foram preparados com água deionizada. O tampão inicial foi a Trietilamine-HCl 0,025 mol/L, pH 11,0 e os tampões eluentes foram o Pharmalyte 8,0 -10,5 - HCl (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) na diluição 1:45, pH 7,0 e o Polybuffer 74 - HCl (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) na diluição 1:8, pH 4,0. O pH do tampão inicial foi ajustado com uma solução de NaOH 1 M e o pH dos tampões eluentes com HCl. Todos os tampões foram filtrados utilizando um sistema de filtração a vácuo e uma membrana de ésteres de celulose de 0,45 micras (Millipore®, Billerica, MA, USA) e desgaseificados por 15 minutos.

c) Cromatofocalização

A cromatografia foi realizada em uma coluna de troca aniônica, Mono P 5/200 (Tricorn, Amersham Biosciences), em conjunto com um sistema FPLC (fast performance liquid chromatography - Pharmacia, Uppsala, Sweden). A coluna foi equilibrada com 70 mL de Trietilamine-HCl, numa taxa de fluxo de 1 mL / minuto até que o pH da coluna ficasse igual ao pH do tampão inicial. Em seguida, foi infundido o Pharmalyte 8,0 -10,5 - HCl (5 mL) e aplicada a amostra. Frações do eluato (2 mL) foram coletadas a uma taxa de fluxo de 1 mL / minuto. O pH de cada fração foi medido e quando o pH limite de 7,0 foi alcançado, o tampão Pharmalyte 8,0 -10,5 - HCl foi trocado pelo tampão Polybuffer 74 -HCl. As proteínas ligadas ao pH inferior a 4,0 foram recuperadas pela adição de NaCl 1 mol/L à coluna.

As frações foram agrupadas de acordo com seguintes os intervalos de pH: 11,9 – 11,0; 10,9 - 10,0; 9,9 - 9,0; 8,9 - 8,0; 7,9 – 7,0, 6,9 - 6,0; 5,9 - 5,0; 4,9 - 4,0 e < 4,0. Posteriormente, as amostras foram concentradas por diálise, liofilizadas e re-dissolvidas em 500 μ L de tampão fosfato-salina (pH 7,4) para dosagem do LH e do FSH, realizada pelo método imunofluorométrico (Auto-DELFIA, Perkin ElmerTM, Wallac Oy, Turku, Finlândia).

Análise estatística

As idades cronológica e óssea foram apresentadas em mediana e intervalo e os dados hormonais em média \pm desvio-padrão e intervalo.

A análise da capacidade da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH em distinguir pacientes portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) dos pacientes com desenvolvimento puberal normal foi baseada na determinação da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia diagnóstica de tais variáveis para o diagnóstico do HH^{87, 88}.

A sensibilidade (ou taxa de verdadeiro positivo) é definida como a proporção de testes positivos no total de pacientes com HH, especificidade (ou taxa de verdadeiro negativo) como a proporção de testes negativos no total de indivíduos sem HH, o valor preditivo positivo (ou a probabilidade de um resultado positivo representar o HH) como a proporção de testes

verdadeiro positivos no total de testes positivos obtidos, o valor preditivo negativo (ou probabilidade de um teste negativo excluir o HH) como a proporção de testes verdadeiro negativos no total de testes negativos obtidos e acurácia diagnóstica como a proporção de testes verdadeiramente positivos e verdadeiramente negativos, em relação à totalidade dos resultados (Tabela 9).

Para análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad InStat3 (GraphPad *software* , Inc., San Diego, CA). As frequências genotípica e alélica das variantes Trp8Arg e Ile15Thr entre pacientes com HH e indivíduos normais foram avaliadas em tabelas de contingência pelo teste qui-quadrado (χ^2). A correlação entre a presença das variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr e as concentrações séricas de LH e FSH em pacientes com HH e em indivíduos normais foi avaliada em tabelas de contingência pelo teste Mann-Whitney. A análise comparativa da recuperação das isoformas das gonadotrofinas nos diferentes intervalos de pH entre hipogonádicos e indivíduos normais foi determinada em tabelas de contingência pelo teste Mann-Whitney. Foram considerados significantes valores de $p < 0,05$.

3 - RESULTADOS

Avaliação hormonal dos pacientes portadores de hipopituitarismo

A análise retrospectiva e prospectiva de 29 pacientes (19 do sexo masculino) portadores de hipopituitarismo demonstrou que 2 pacientes (7%) tinham deficiência isolada do hormônio do crescimento (DGH) e os outros 27 pacientes (93%) tinham deficiências hipotálamo-hipofisárias múltiplas (100% deficiência de GH, 79% deficiência de gonadotrofinas, 72% deficiência de ACTH, 79% deficiência de TSH e 14% diabetes insipidus) (Tabela 1).

A resposta das gonadotrofinas ao teste de estímulo agudo com GnRH realizado em 29 pacientes em estágio pré-puberal e posteriormente em 22 pacientes em estágio puberal estão representadas nas Tabelas 10, 11, 12 e 13.

Propriedades da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH no diagnóstico do hipogonadismo hipogonadotrófico

No estágio pré-puberal, o pico do FSH após estímulo com GnRH apresentou uma sensibilidade de 89% com acurácia diagnóstica de 90% no sexo feminino, e uma sensibilidade de 36% com acurácia diagnóstica de

47% no sexo masculino. O pico do LH apresentou uma sensibilidade de 67% com acurácia diagnóstica de 70% no sexo feminino e uma sensibilidade de 50% com acurácia diagnóstica de 47% no sexo masculino (Tabela 14).

No estágio puberal, o pico do LH após estímulo com GnRH apresentou sensibilidade e acurácia diagnóstica de 100% em ambos os sexos. O pico de FSH apresentou sensibilidade e acurácia diagnóstica de 100% no sexo feminino e uma sensibilidade de 90% com acurácia diagnóstica de 92% no sexo masculino (Tabela 14).

Imunoreatividade do LH em 2 diferentes ensaios imunofluorométricos e dosagem da subunidade α

As concentrações séricas da subunidade α livre estavam normais em todos os pacientes. As concentrações séricas do LH dosadas por método imunofluorométrico utilizando anticorpos monoclonais contra cadeia intacta do LH foram surpreendentemente mais elevadas em 5 pacientes quando comparadas a dosagem realizada por método utilizando 2 anticorpos contra a subunidade β do LH (Tabela 15).

Análise da influência das isoformas e das variantes alélicas do LH sobre a concentração de LH em pacientes hipogonádicos

a) Amplificação e sequenciamento da região codificadora do *LHβ*

Todos os fragmentos exônicos do gene *LHβ* foram amplificados com sucesso nos 13 pacientes estudados. Nenhuma mutação funcional foi identificada.

Identificamos 5 variantes alélicas: 4 no exon 2, Trp8Arg (IGG→CGG) e Ile15Thr (ATC→ACC) em 3 pacientes (23%), Val18Val (GTG→GTC) em 6 pacientes (46%) e Pro24Pro (CCC→CCA) em 7 pacientes (54%); e uma no exon 3, Gly75Gly (GGC→GGT) em 6 pacientes (46%) (Tabela 16 e Figuras 5-8). Todas as variantes alélicas foram descritas anteriormente^{18, 25}.

b) Frequência das variantes alélicas Arg8 e Thr15

Identificamos nos códons 8 e 15 duas variantes alélicas em desequilíbrio de ligação descritas anteriormente²⁵. Estas variantes foram encontradas em 29/202 (14%) indivíduos normais e em 8/48 (16%) pacientes portadores de HH (3 pacientes com HH e concentração sérica normal de LH e 5 pacientes com HH e concentração sérica baixa de LH). A análise comparativa da frequência do alelo C não foi significativamente diferente ($p= 0,996$) entre o grupo de indivíduos normais e os portadores de HH (Tabela 17).

Não houve influência da presença das variantes Trp8Arg e Ile15Thr do *LHβ* nas concentrações séricas do LH e do FSH dos pacientes portadores de HH e dos indivíduos normais (Tabela 18).

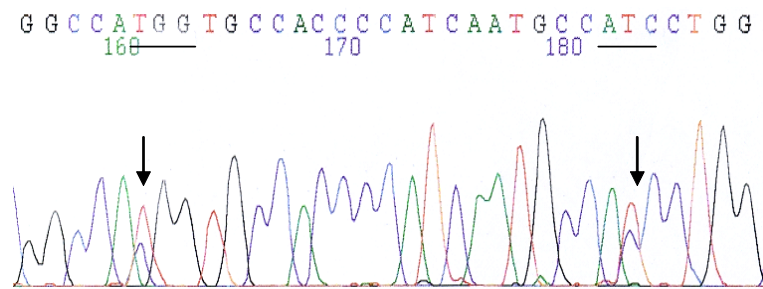


Figura 5 - Variantes alélicas 983T>C (Trp8Arg) e 1008T>C (Ile15Thr) em heterozigose, localizadas no éxon 2 do gene *LHβ*

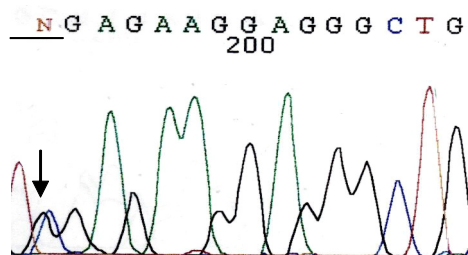


Figura 6 - Variante alélica 1018G>C (Val18) em heterozigose, localizada no éxon 2 do gene *LHβ*

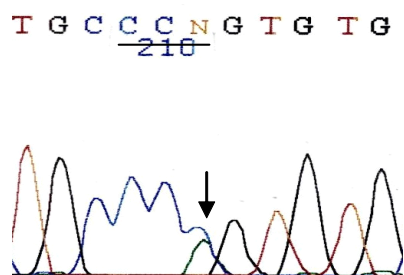
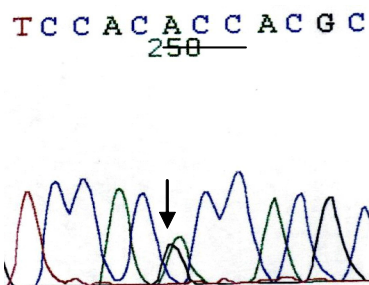


Figura 7 - Variante alélica 1036C>A (Pro24) em heterozigose, localizada no éxon 2 do gene *LHβ*



Primer anti-sense

Figura 8 - Variante alélica 1423C>T (Gly75) em heterozigose, localizada no éxon 3 do gene *LHβ*

c) Estudo das isoformas do LH

A cromatofocalização revelou um predomínio das isoformas ácidas do FSH com 100% do material eluído no $\text{pH} \leq 6,9$ em ambos os grupos (controle e pacientes com HH). Observamos também predomínio das isoformas ácidas do LH, com uma recuperação de 68% e 65% das isoformas no $\text{pH} \leq 6,9$ respectivamente nos grupos controle e de pacientes com HH (Figuras 9). A análise comparativa da distribuição das isoformas das gonadotrofinas nos diversos intervalos de pH entre o grupo de pacientes com HH e o grupo controle não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Figuras 10 e 11).

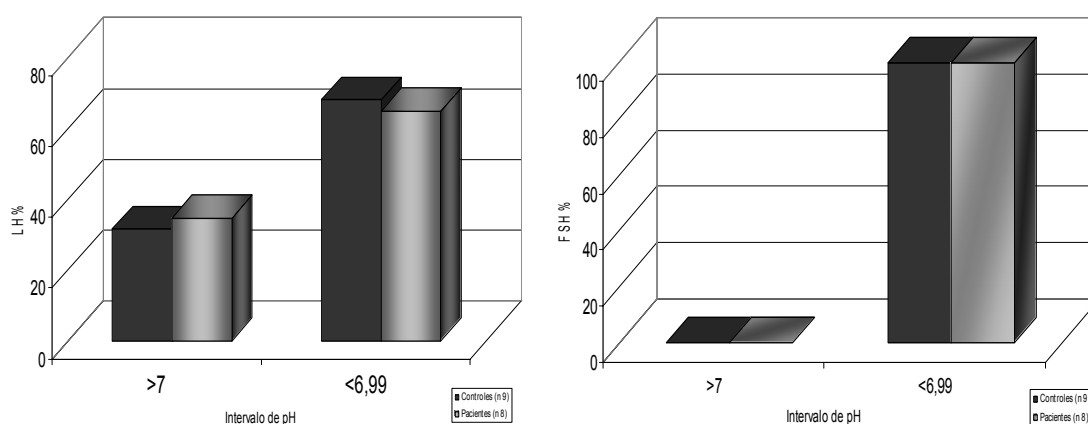


Figura 9 - Padrão de distribuição das isoformas das gonadotrofinas nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH, e nos controles

LH e FSH %: porcentagem de recuperação das gonadotrofinas nos intervalos de pH básico e ácido

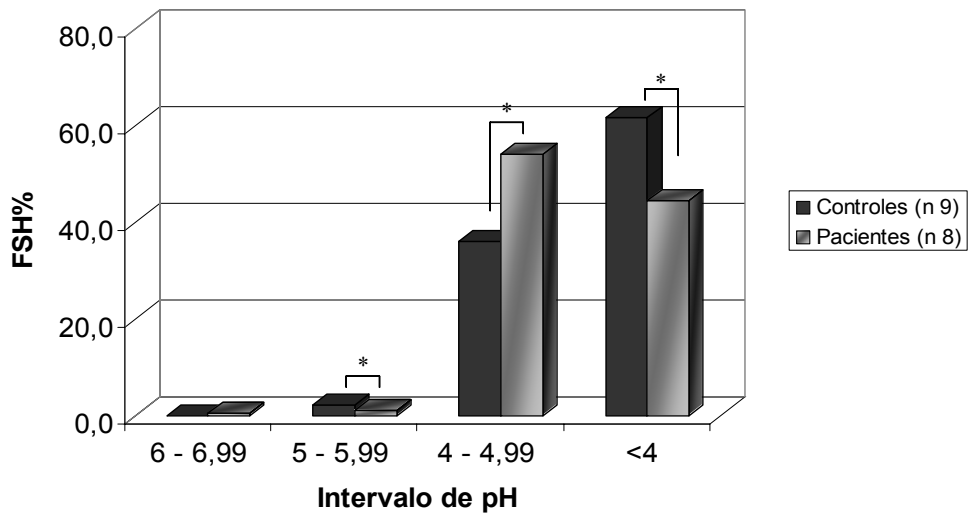


Figura 10 - Padrão de distribuição das isoformas do FSH nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH, e nos controles FSH%: porcentagem de recuperação do FSH em diferentes intervalos de pH
*p > 0,05 (Mann-Whitney)

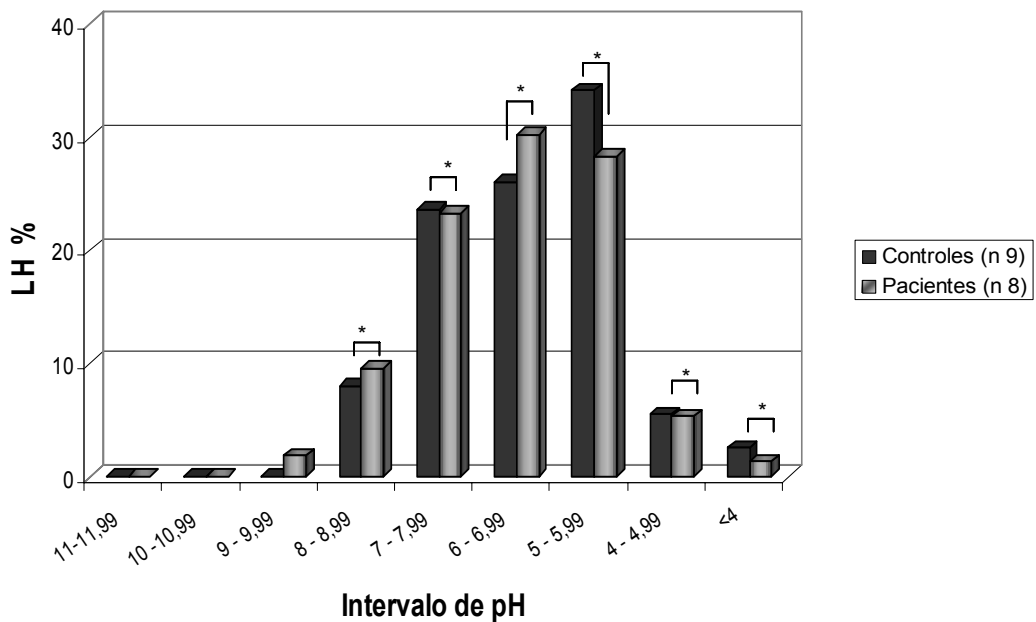


Figura 11 - Padrão de distribuição das isoformas do LH nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH, e nos controles LH%: porcentagem de recuperação do LH em diferentes intervalos de pH
*p > 0,05 (Mann-Whitney)

5 - DISCUSSÃO

O início e a manutenção da função reprodutiva em humanos depende principalmente da adequada secreção pulsátil de GnRH pelo hipotálamo estimulando a secreção das gonadotrofinas pela hipófise^{2, 4, 89}. Evidências indicam que o maior incremento nas concentrações das gonadotrofinas ocorre bem antes do aparecimento dos caracteres sexuais secundários⁹⁰, porém o diagnóstico preciso do HH em idade pré ou peripuberal baseado nas concentrações das gonadotrofinas, basais ou após estímulo com GnRH, dosadas pelo radioimunoensaio ou pelo ensaio imunorradiométrico, não é factível^{59, 91}. Durante a adolescência, as alterações da maturação sexual e os padrões de crescimento poderiam contribuir para o diagnóstico clínico, entretanto, o ideal seria a realização em idade pré-puberal de testes laboratoriais capazes de prever a deficiência das gonadotrofinas. O desenvolvimento de metodologias ultra-sensíveis para dosagem das gonadotrofinas, como o método imunofluorométrico, tem permitido a análise da concentração de LH e do FSH na população pré-puberal^{62, 63, 92}. No entanto, para determinar a acurácia diagnóstica da concentração das gonadotrofinas, dosadas por métodos mais sensíveis, no diagnóstico pré-puberal do HH é fundamental o acompanhamento até a idade adulta para a confirmação deste diagnóstico.

Nesse estudo, foram avaliadas as propriedades da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH (100 mcg, iv, *in bolus*), realizado no

estádio pré-puberal, para o diagnóstico precoce do HH em pacientes com hipopituitarismo que atingiram a idade puberal. O estudo mostrou que a resposta das gonadotrofinas ao estímulo com GnRH foi útil para o diagnóstico do HH no estágio pré-puberal em pacientes portadores de hipopituitarismo, principalmente no sexo feminino, no qual o pico do FSH apresentou uma sensibilidade de 89% com acurácia diagnóstica de 90% e o pico de LH uma sensibilidade de 67% com acurácia diagnóstica de 70%. No estágio puberal o pico do LH apresentou uma acurácia diagnóstica de 100% em ambos os sexos, enquanto que o pico do FSH apresentou melhor sensibilidade no sexo feminino (100% versus 92% no sexo masculino) com uma acurácia diagnóstica de 100%.

A vantagem de se estabelecer o diagnóstico precoce do HH seria a de possibilitar o início da reposição hormonal numa idade apropriada para o desenvolvimento sexual, evitando os problemas psicossociais e a redução da massa óssea nos pacientes hipogonádicos, e para selecionar os genes candidatos responsáveis pelo quadro de HH em pacientes com hipopituitarismo.

As concentrações da subunidade α foram normais em todos os pacientes excluindo uma possível interferência de concentrações elevadas da subunidade α nos ensaios para dosagem do LH.

Mutações no gene *LH β* causando alterações funcionais no LH, assim como suas variantes alélicas, têm sido consideradas responsáveis por distúrbios puberais e disfunções reprodutivas em ambos os sexos^{11, 12, 22, 23, 34, 93, 94}.

Como demonstrado nos estudos em diferentes grupos étnicos, as variantes alélicas Arg8 e Thr15 do gene do *LH β* têm uma grande variabilidade de freqüência nas diferentes populações, com freqüência de 0% em Kotas, no Sul da Índia, e de 28% em aborígenes australianos³². O presente estudo mostra que essas variantes alélicas também são comuns na população brasileira, com uma freqüência alélica de 7,6% numa população de indivíduos saudáveis.

O LH variante tem maior bioatividade quando avaliada *in vitro* em células MA-10 (*Leydig tumor cells*), porém menor meia-vida em estudos realizados em camundongos^{27, 38}. Entretanto, várias observações clínicas indicam que o LH variante em humanos representa uma forma funcionalmente menos ativa do hormônio^{25, 26, 29, 34, 37, 94}. Em nosso estudo a freqüência genotípica do LH variante no grupo dos pacientes com HH (16%) foi similar a do grupo controle (14%) e a presença das variantes alélicas não interferiu na dosagem das concentrações séricas do LH, excluindo a relação entre a presença destas variantes e as concentrações puberais de LH presentes em 13% dos hipogonádicos da nossa casuística.

As variantes alélicas Arg8 e Ile15 do LH não são detectáveis pelos ensaios imunorradiométricos que utilizam anticorpos monoclonais altamente específicos para a molécula intacta do hormônio⁹⁵. Esta possibilidade deve ser lembrada quando concentrações de gonadotrofinas inapropriadamente baixas forem detectadas nos testes diagnósticos de rotina com esse tipo de ensaio.

Há inúmeras evidências de que a estrutura dos oligossacarídeos dos hormônios glicoprotéicos influencia a meia-vida plasmática e a bioatividade

dos hormônios *in vivo*^{43, 45, 46, 48, 52, 96}. Mudanças nas propriedades físico-químicas das gonadotrofinas decorrentes da glicosilação alteram a atividade biológica e a relação imuno/bioatividade dos hormônios glicoprotéicos^{48, 52, 54}. As isoformas mais ácidas das gonadotrofinas, em estudos em animais, têm meia-vida mais longa e menor bioatividade do que as isoformas mais básicas^{45, 48, 97}, o que poderia justificar a presença de LH imunorreativo encontrado em pacientes hipogonádicos. A falta do *feedback* negativo exercido pelos estrógenos, também pode ser responsável pela secreção preferencial de isoformas das gonadotrofinas mais ácidas⁵⁰, pois foi demonstrado que na presença de estrógenos há um predomínio na liberação das isoformas mais básicas^{50, 52, 86, 98, 99} e que o RNAm da α -2,3-sialiltransferase, uma das enzimas que incorporam resíduos de ácido siálico na molécula da glicoproteína, é negativamente regulado pelos estrógenos¹⁰⁰.

O GnRH em condições fisiológicas induz a formação de isoformas mais básicas^{52, 101-105} e na ausência ou redução dos pulsos de GnRH, encontrada nos pacientes com HH, haveria maior secreção de isoformas ácidas do LH. Entretanto, no presente estudo o LH circulante tanto em pacientes hipogonádicos com concentrações normais do LH (mediana do LH = 4,7 U/L) como nos indivíduos controles (mediana do LH = 3,2 U/L) contém uma maior proporção de isoformas ácidas (pH \leq 6,9). Considerando que para realizar a cromatografia foi utilizada apenas uma amostra de soro é possível que não tenhamos identificado as isoformas básicas, mais ativas, porém de depuração mais rápida e por este motivo não tenha sido encontrada diferença significativa entre as isoformas nos grupos com HH e controles.

Contrário aos achados da literatura^{55, 106} neste estudo foi demonstrado um predomínio de isoformas ácidas do LH frente a concentrações baixas de testosterona. No entanto, considerando que a falta de GnRH e de estrógenos é um estímulo para a produção de isoformas ácidas do LH, é possível que neste balanço prevaleça a ação dos dois últimos.

Com base nessas considerações, nós sugerimos que a ausência ou frequência diminuída de pulsos do GnRH associada a baixas concentrações de estrógenos promoveu uma produção maior de isoformas mais ácidas nessa amostra de hipogonádicos, principalmente no sexo feminino.

6 - CONCLUSÕES

1. A resposta das gonadotrofinas ao estímulo com GnRH realizado em estágio pré-puberal, principalmente a resposta diminuída do FSH no sexo feminino, foi útil para predizer o diagnóstico do hipogonadismo hipogonadotrófico em pacientes com hipopituitarismo.
2. O *LH β* é um gene polimórfico, tendo sido identificadas em nossa casuística de hipogonadismo hipogonadotrófico cinco variantes alélicas previamente descritas. As variantes alélicas Arg8 e Thr15 são comuns também na população brasileira.
3. A distribuição genotípica e a frequência alélica das variantes Arg8 e Thr15 do gene *LH β* não diferiram significativamente entre os pacientes portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico e os indivíduos normais, excluindo o papel dessas variantes nas concentrações séricas do LH.
4. Houve um predomínio das isoformas mais ácidas do LH, portanto menos ativas, no grupo com HH e concentrações normais de LH, porém o encontro de isoformas mais ácidas também no grupo controle, não permitiu atribuir à presença das isoformas ácidas a baixa atividade biológica do LH imunorreativo encontrada em 13% dos pacientes hipogonádicos.

7 - ANEXOS

Tabela 1 – Resposta hormonal ao teste combinado (Insulina +TRH + GnRH) realizado pré e pós-tratamento com GH e imagem por RM da região hipotálamo-hipofisária dos pacientes com hipopituitarismo

PAC	Sexo	Teste	IC (anos)	GH (ng/mL) pico	IGF-1 ^d (ng/mL) basal	Cortisol (µg/dL) pico	PRL (ng/mL)		TSH (µU/mL)			T4 livre (ng/dL) basal	T4 (µg/dL) basal	DI	RNM		
							basal	pico	basal	pico	RP				AD	Haste	NH
1	F	1°	10	0,4 ^b	44	10 ^a	9,3 ^b	19,4	-	-	-	-	6,0 ^c	-	R	T	E
		2°	18	2,4 ^b	-	17,4 ^b	12,3 ^b	73,4	1,5 ^b	9,7	-	1,0 ^b	6,3 ^b	-			
2 [†]	F	1°	5,1	1,6 ^d	49	41 ^a	6,7 ^b	11	2,4 ^c	4,4	-	-	6,5 ^c	-	R	I	T
		2°	17,7	0,1 ^b	69	20 ^b	11 ^b	12,3	2,4 ^b	2,5	-	0,2 ^b	0,8 ^b	-			
3	F	1°	10,7	0,1 ^b	90	13 ^b	14 ^b	35	2,5 ^c	12	-	-	<2 ^c	-	R	T	E
		2°	19	<0,1 ^b	<18	11 ^b	12,6 ^b	38,7	4,4 ^b	40,7	+	0,6 ^b	5,3 ^b	-			
4	F	1°	11,2	0,2 ^b	<18	23 ^b	6,8 ^b	18	1,8 ^c	5,5	-	-	8,0 ^c	+	R	NV	NV
		2°	17,8	0,2 ^b	52	12,8 ^b	6,5 ^b	13,7	2,1 ^b	7,3	-	0,7 ^b	4,9 ^b	-			
5 [†]	F	1°	6,8	0,48 ^d	-	44 ^a	4,2 ^a	5,7	1,7 ^a	2,1	-	-	3,0 ^a	-	R	A	NV
		2°	15,4	0,1 ^b	-	12 ^b	4,0 ^b	6,1	1,8 ^b	3,4	-	0,4 ^b	2,8 ^b	-			
6	F	1°	13,4	0,5 ^b	18	15 ^b	11 ^b	83	3,1 ^c	22	-	-	3,0 ^c	+	R	T	E
		2°	20	0,2 ^b	<18	13 ^b	7,5 ^b	115	3,0 ^b	23	+	0,7 ^b	5,3 ^b	-			
7 ^{††}	F	1°	5,1	<0,25 ^d	-	27 ^a	6,6 ^a	13,7	7,2 ^a	8,4	-	-	8,0 ^a	-	R	I	E
		2°	21,5	<0,1 ^b	19	5,5 ^b	5,7 ^b	13	0,7 ^b	5,6	-	0,4 ^b	4,9 ^b	-			
8	F	1°	16,9	<0,1 ^b	42	18,6 ^b	2,7 ^b	5,4	5,2 ^b	9,5	-	0,8 ^b	7,2 ^b	-	R	I	T
		2°	22,3	<0,1 ^b	152	16,3 ^b	2,5 ^b	2,5	6,0 ^b	7,0	-	0,9 ^b	7,0 ^b	-			
9	F	1°	17	1,8 ^b	47	7,6 ^a	-	-	2,7 ^c	21	+	-	6,0 ^c	-	R	T	E
		2°	25,3	0,2 ^b	-	3,0 ^b	10,3 ^b	21,2	7,6 ^b	25	+	0,5 ^b	4,9 ^b	-			
10	F	1°	5,9	2,1 ^d	-	33 ^a	51,6 ^a	-	3,0 ^c	12,4	-	-	9,0 ^c	-	N	T	E
		2°	18	2,4 ^b	-	17,4 ^b	12,3 ^b	73,4	1,5 ^b	9,7	-	1,0 ^b	6,3 ^b	-			
11	M	1°	9,8	0,1 ^b	-	17 ^b	20 ^b	29	3,1 ^c	18,3	-	0,3 ^c	5,0 ^c	-	R	T	E
		2°	19,1	<0,1 ^b	-	12,4 ^b	8,2 ^b	17,4	4,9 ^b	28,6	+	0,7 ^b	5,3 ^b	-			
12	M	1°	10	0,2 ^b	-	25 ^b	1,8 ^b	20	1,8 ^c	11,8	-	-	7,0 ^c	-	R	I	E
		2°	18,1	0,4 ^b	112	19 ^b	1,5 ^b	5,0	2,5 ^b	13,7	-	1,0 ^b	8,2 ^b	-			
13	M	1°	12,6	<0,1 ^b	-	6,7 ^b	13 ^b	25	2,4 ^c	19	+	-	5,0 ^c	-	R	T	E
		2°*	20,2	0,1 ^b	-	2,5 ^b	11,3 ^b	26,5	6,7 ^b	28	+	0,5 ^b	3,6 ^b	-			
14	M	1°	12,7	<0,1 ^b	<18	6,4 ^b	6,9 ^b	20	5,0 ^c	33	+	-	5,0 ^c	-	R	T	E
		2°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
15	M	1°	8	0,2 ^b	-	17 ^a	26,7 ^b	48,1	0,7 ^c	17,8	+	-	5,0 ^c	-	N	T	E
		2°	17,5	<0,1 ^b	19	10 ^b	36,3 ^b	69,4	10,4 ^b	50	+	0,6 ^b	4,6 ^b	-			
16	M	1°	5,9	0,9 ^d	-	28 ^a	24,7 ^a	50	1,3 ^c	5,7	-	-	10,5 ^c	+	R	NV	NV
		2°	16,1	<1 ^b	39	17,3 ^b	8,6 ^b	21,3	0,6 ^b	4,5	-	0,9 ^b	8,5 ^b	-			
17	M	1°	6,0	0,8 ^d	-	60 ^a	5,7 ^a	17,8	0,9 ^c	9	-	-	6,0 ^c	-	R	T	E
		2°	20,5	<0,1 ^b	<18	10 ^b	11,8 ^b	34,4	2,9 ^b	12,3	-	0,5 ^b	5,1 ^b	-			

continua

conclusão

Tabela 1 – Resposta hormonal ao teste combinado (Insulina + TRH + GnRH) realizado pré e pós-tratamento com GH e imagem por RNM da região hipotálamo-hipofisária dos pacientes com hipopituitarismo

PAC	Sexo	Teste	IC (anos)	GH (ng/mL) pico	IGF-1 ^d (ng/mL) basal	Cortisol (µg/dL) pico	PRL (ng/mL)		TSH (µU/mL)			T4 livre (ng/dL) basal	T4 (µg/dL) basal	DI	RNM		
							basal	pico	basal	pico	RP				AD	Haste	NH
18	M	1°	15	0,2 ^b	-	15 ^b	22 ^b	71	3,6 ^b	19,6	-	-	5,0 ^b	-	-	-	-
		2°	24	-	-	-	7,7 ^b	18,9	4,5 ^b	15,1	-	1,2 ^b	4,5 ^b	-	-	-	-
19	M	1°	15,5	2,1 ^b	31	-	6,1 ^b	11,8	3,5 ^c	50	+	-	-	-	R	T	E
		2°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	M	1°	7,4	<0,1 ^d	-	33 ^a	2,3 ^a	8,2	2,8 ^c	18	-	-	6,3 ^c	+	R	T	E
		2°	22,1	<0,1 ^b	27	7,6 ^b	3,1 ^b	9,3	13,3 ^b	30,6	+	0,8 ^b	7,4 ^b	-	-	-	-
21	M	1° [#]	16,5	<0,1 ^b	26	22 ^a	1,8 ^b	3,2	-	-	-	-	-	-	N	T	E
		2°	23,1	-	-	-	5,0 ^b	9,9	2,0 ^b	39	+	0,3 ^b	2,7 ^b	-	-	-	-
22	M	1°	14,7	0,7 ^b	-	8,4 ^b	20,2 ^b	70	2,8 ^c	38,7	+	-	0,2 ^c	-	R	NV	NV
		2°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	M	1°	16,9	<0,1 ^b	<18	3,6 ^b	30 ^b	43	2,5 ^b	13	+	0,5 ^b	3,7 ^b	-	R	T	E
		2°	22,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	M	1°	10,5	2,2 ^d	-	15 ^a	54,5 ^a	98,5	3,5 ^c	30	+	-	4,0 ^c	-	R	T	E
		2°	23,2	0,2 ^b	144	17,2 ^b	17,2 ^b	29,5	6,3 ^b	32	+	0,5 ^b	4,2 ^b	-	-	-	-
25	M	1°	4,8	0,5 ^b	44	33 ^a	4,3 ^b	8,2	3,5 ^c	12,7	+	-	10 ^c	-	R	T	E
		2°	16,5	0,7 ^b	131	19 ^b	6,4 ^b	11,3	1,7 ^b	8,9	-	1,1 ^b	7,0 ^b	-	-	-	-
26	M	1°	7,9	0,4 ^b	<18	33 ^a	4,8 ^b	9,5	3,2 ^c	19,8	-	-	8,0 ^c	-	R	I	E
		2°	15,9	0,4 ^b	144	25,2 ^b	6,5 ^b	10,9	8,0 ^b	30	+	1,5 ^b	10 ^b	-	-	-	-
27	M	1°	8,1	2 ^d	-	23,2 ^a	6,4 ^b	27,4	1,3 ^c	8,3	-	-	6,0 ^c	-	N	I	T
		2°	17,8	2,7 ^b	-	15,9 ^b	3,8 ^b	58,6	1,2 ^b	10,7	-	1,1 ^b	6,9 ^b	-	-	-	-
28	M	1°	7,2	<0,4 ^d	-	26 ^a	8,5 ^a	17,7	1,5 ^c	6,2	-	-	9,0 ^c	-	R	I	E
		2°	16,6	<0,1 ^b	119	20 ^b	7,1 ^b	18,5	2,2 ^b	11	-	1,0 ^b	8,0 ^b	-	-	-	-
29	M	1°	12,6	0,1 ^b	24	18 ^b	8,0 ^b	13	2,8 ^c	15	-	-	5,0 ^c	-	R	T	E
		2°	18,5	0,5 ^b	156	20 ^b	8,8 ^b	15	0,7 ^b	6,0	-	0,8 ^b	8,4 ^b	-	-	-	-

Os valores de LH e FSH encontram-se na Tabela 2

PAC: paciente, IC: idade cronológica, † mutação no gene *PROP1*, †† mutação no gene *HESX1*

1° teste realizado no momento do diagnóstico da deficiência de GH, 2° teste realizado ao final do tratamento com GH, * teste combinado alternativo, # Paciente em uso de LT4

RP: resposta prolongada do TSH após estímulo com TRH até o tempo 60 minutos; DI: diabetes insípidus

^a RIE; ^b IFME; ^c EIE; ^d IRME

AD: adenohipófise (N: normal, R: reduzida, NV: não visualizada), Haste (I: íntegra, T: transecção, A: afilada, NV: não visualizada)

NH: neurohipófise (T: tópica, E: ectópica)

Tabela 2 – Dados clínicos, radiológicos e avaliação do eixo gonadotrófico dos pacientes com hipopituitarismo em estágio pré-puberal e puberal

PAC	Sexo	Estádio pré-puberal									Estádio puberal								
		IC (anos)	IO (anos)	Tanner	LH		FSH		E2	T	IC (anos)	IO (anos)	Tanner	LH		FSH		E2	T
					(U/L)		(U/L)		(pg/mL)	(ng/dL)				(U/L)		(U/L)		(pg/mL)	(ng/dL)
					basal	pico	basal	pico	basal	basal				basal	pico	basal	pico	basal	basal
1	F	10,0	6,5	M1PP1	<0,6	<0,6	<1	<1	14,3	-	15,3	15	M3PP2	<0,6	<0,6	<1	<1	13	-
2	F	10,8	10	M1PP1	<0,6	0,6	<1	<1	<13	-	14,2	12	M2PP3	<0,6	<0,6	<1	<1	13	-
3	F	10,8	4,1	M1PP1	<0,6	0,9	<1	6,7	<13	-	19,0	12,6	M3PP1	<0,6	0,9	<1	3,2	13	-
4	F	11,3	8	M1PP1	0,7	5,9	2,0	5,2	<13	-	17,1	13,5	M4PP4	<0,6	3	1,2	3,3	13	-
5	F	12,5	10,5	M1PP1	<0,6	<0,6	<1	<1	<13	-	15,3	13	M4PP3	<0,6	<0,6	<1	<1	-	-
6	F	13,4	9	M1PP1	<0,6	2,3	1,4	2,9	<13	-	20,1	13,5	M4PP1	<0,6	1	1,4	3,4	13	-
7	F	14,6	12	M1PP1	<0,6	<0,6	<1	<1	<13	-	21,3	13,5	M5PP2	<0,6	0,7	<1	<1	<13	-
8	F	16,9	13	M1PP2	0,7	1,9	1,3	1,7	<13	-	22,3	15	M4PP4	0,7	2,2	1,9	2,4	<13	-
9	F	17	-	M1PP1	<0,6	<0,6	<1	1	<13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	F	13	11	M1PP2	<0,6	3,8	2,4	7,9	<13	-	15,4	12	M4PP5 [†]	2,3	18,1	6,4	11,4	29,6	-
11	M	9,8	2,6	G1PP1	<0,6	0,8	<1	1,8	-	<14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	M	10,3	6	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	<1	-	<14	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	M	12,6	3,5	G1PP1	<0,6	1,4	<1	1,1	-	<14	20,3	14	G1PP4	<0,6	<0,6	<1	<1	-	14
14	M	12,8	3,5	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	<1	-	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	M	13,1	9	G1PP1	<0,6	0,7	<1	<1	-	<14	17,6	15	G1PP1	<0,6	0,6	<1	<1	-	21

continua

conclusão

Tabela 2 – Dados clínicos, radiológicos e avaliação do eixo gonadotrófico dos pacientes com hipopituitarismo em estágio pré-puberal e puberal

PAC	Sexo	Estádio pré-puberal										Estádio puberal							
		IC (anos)	IO (anos)	Tanner	LH (U/L)		FSH (U/L)		E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	IC (anos)	IO (anos)	Tanner	LH (U/L)		FSH (U/L)		E2 (pg/mL)	T (ng/dL)
					basal	pico	basal	pico	basal	basal				basal	pico	basal	pico	basal	basal
16	M	13,1	13	G1PP3	<0,6	0,6	<1	1,9	-	<14	16,2	15	G1PP4	<0,6	0,9	<1	1	-	34
17	M	15,4	11,5	G1PP1	0,8	2,6	2,1	3,2	-	<14	20,6	-	G1PP1	0,7	2,3	2	2,9	-	<14
18	M	15,6	-	G1PP1	<0,6	1,3	<1	1,7	-	-	24,2	17	G2PP4	1,5	5,8	1,6	2,4	-	126
19	M	15,7	7	G1PP1	<0,6	0,9	<1	1,3	-	14	18,8	11	G1PP2	<0,6	<0,6	<1	<1	-	18
20	M	15,9	13	G1PP1	<0,6	0,7	<1	<1	-	<14	27,9	adulto	G1PP5	0,7	1,4	<1	1,3	-	<14
21	M	16,7	11	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	1,1	-	19	23,3	13	G2PP3	<0,6	<0,6	<1	1,4	-	<14
22	M	16,8	9	G1PP1	<0,6	0,6	<1	1,4	-	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	M	16,9	10,5	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	<1	-	<14	22,6	16	G1PP4	<0,6	<0,6	<1	<1	-	14
24	M	17,7	12	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	1,1	-	20	23,2	14	G2PP3	<0,6	0,6	<1	2	-	<14
25	M	4,8	2	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	1,6	-	<14	16,2	16	G4PP4 [†]	-	-	-	-	-	522
26	M	7,9	6,5	G1PP1	<0,6	1,1	<1	<1	-	16	16,9	15	G4PP4 [†]	-	-	-	-	-	431
27	M	8,3	5	G1PP1	<0,6	1,7	<1	3,2	-	<14	17,9	17,5	G4PP5 [†]	2,3	25,2	3,5	6,9	-	513
28	M	12	11,5	G1PP2	<0,6	<0,6	<1	2,3	-	<14	16,6	16	G3PP5 [†]	3,1	14,3	4,1	6,6	-	468
29	M	12,7	8	G1PP1	<0,6	<0,6	<1	1,3	-	<14	18,5	14	G4PP5 [†]	4,9	16,2	4,5	6,4	-	486

PAC: paciente, IC: idade cronológica, IO: idade óssea, M: mama, PP: pêlos pubianos, G: gônadas, [†] desenvolvimento testicular e mamário espontâneos,

T: testosterona, E2: estradiol

Tabela 3 – Dados clínicos e radiológicos dos pacientes com hipopituitarismo avaliados em idade puberal

Paciente	Sexo	IC (anos)	IO (anos)	Altura (DP)	Estádio puberal (Tanner)	Pênis (DP)	Diagnóstico
1	F	20,8	adulta	-0,3	M5PP2	-	HH
2	F	19,8	15	+0,1	M4PP4	-	HH
3	F	19,2	13,5	+0,1	M3PP1	-	HH
4	F	19,7	13,5	+0,2	M4PP4	-	HH
5	F	19,9	16	+0,7	M4PP3	-	HH
6	F	23,0	16	-2,2	M4PP1	-	HH
7	F	25,5	adulta	+0,5	M5PP2	-	HH
8	F	23,4	15	-1,8	M4PP4	-	HH
9	F	27,6	15	-1,4	M4PP1	-	HH
10	F	19,8	17	-0,3	M5PP5 [†]	-	NL
11	M	19,8	15,6	-1,2	G1PP4	-3,3	HH
12	M	20,0	17,5	-1,4	G4PP4	-3,9	HH
13	M	23,4	adulta	-1,1	G2PP5	-1,4	HH
14	M	21,3	13,6	-1,8	G2PP3	-2,3	HH
15	M	19,6	17	-0,4	G2PP5	-1,4	HH
16	M	19,5	-	-0,6	G2PP4	-0,8	HH
17	M	21,7	14	-1,7	G2PP1	-4,2	HH
18	M	24,4	17	-2,7	G3PP4	-3,3	HH
19	M	19,0	11	-3,9	G2PP2	-4,2	HH
20	M	27,4	adulta	-1,0	G2PP5	-2,6	HH
21	M	27,2	13,5	-2,9	G2PP3	-3,0	HH
22	M	24,8	adulta	-0,7	G2PP5	-2,3	HH
23	M	23,8	17	-0,2	G2PP4	-2,0	HH
24	M	26,9	14	-0,7	G1PP3	-2,3	HH
25	M	16,4	17	-0,7	G4PP4 [†]	-1,4	NL
26	M	15,6	15	-0,7	G4PP4 [†]	-2,6	NL
27	M	18,3	14	-0,9	G4PP4 [†]	-2,6	NL
28	M	20,4	adulta	+0,5	G3PP5 [†]	-3,9	NL
29	M	22,4	adulta	+0,04	G4PP5 [†]	-3,0	NL

DP: desvio-padrão, [†] desenvolvimento mamário e testicular espontâneos

Tabela 4 – Dados clínicos, radiológicos e hormonais dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH basal, em idade puberal

Paciente	Sexo	IC (anos)	IO (anos)	Diagnóstico	LH (U/L) ^a		FSH (U/L) ^a		E2 ^a (pg/mL)	T (ng/dl)
					Basal	Pico*	Basal	Pico*		
1	F	16,2	13,5	DHHM	4,8	17,8	5,0	7,6	23	-
2	F	16,4	13,5	DHHM	4,6	62	6,5	18	18	-
3	F	17,5	13,5	DHHM	4,6	14,3	5,0	6,4	29	-
4	F	17,1	13,5	DHHM	5,3	68	5,0	15	-	-
5	F	17,3	13,5	DHHM	6,6	29	5,7	9,0	29	-
6	F	29,9	adulta	DHHM	3,5	7,8	4,8	5,8	<13	-
7	F	33,8	adulta	HHI	4,7	63	5,5	16	<13	-
8	M	17,1	14	SK	0,8	15,4	2,0	7,4	-	<14 ^a
9	M	19,0	adulta	DHHM	3,5	18	4,6	8,0	-	63 ^a
10	M	29,0	adulta	HHI	2,3	44,5	3,5	11	-	74 ^a
11	M	30,3	adulta	SK	2,6	31	0,9	3,0	-	140 ^a
12	M	34,6	adulta	HHI	2,0	12,5	3,0	6,0	-	53 ^a
13	M	52,8	adulta	SK	1,6	32	2,8	11	-	110 ^b
Média ± DP		-	-	-	3,6 ± 1,7	31,9 ± 21	4,2 ± 1,6	9,6 ± 4,4	20,8 ± 7,3	75,7 ± 44,3
Mediana		19	18	-	3,5	29	4,8	8,0	20,5	68,5
(Intervalo)		(16,2-52,8)	(13,5 – 18)	-	(0,8 – 6,6)	(7,8 - 68)	(0,9 - 6,5)	(3,0 - 18)	(<13 – 29)	(<14 - 140)
Valores de referência [†]					LH pico (U/L)		FSH pico (U/L)			
					Tanner 4 -5	Adulto	Tanner 4 -5	Adulto		
				Sexo feminino	17 - 52	7,6 - 31,7	3,4 - 16	4,6 - 11,7		
				Sexo masculino	11 - 49	12 - 29,7	1,9 - 15	2,9 - 7,8		

DHHM: deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla; HHI: hipogonadismo hipogonadotrófico isolado, SK: síndrome de Kallmann

*após 100 mcg de gonadorelina, ^aIFME, ^bRIE, [†] Brito VN, et al.⁶²

Tabela 5 – Dados clínicos e desenvolvimento puberal das pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH

Paciente	Diagnóstico	Telarca (anos)	Desenvolvimento mamário (Tanner)	Menarca (anos)	Amenorréia	Proporções eunucóides
1	DHHM	12	Completo (M5)	14,9	Secundária	-
2	DHHM	12	Completo (M5)	-	Primária	-
3	DHHM	12	Completo (M5)	17	Secundária	-
4	DHHM	10	Completo (M5)	16	Secundária	-
5	DHHM	12,5	Completo (M5)	17	Secundária	-
6	DHHM	15	Parcial (M3)	17,5	Secundária	-
7	HHI	13	Parcial (M3)	-	Primária	+

DHHM: deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla; HHI: hipogonadismo hipogonadotrófico isolado

Tabela 6 – Dados clínicos e desenvolvimento puberal dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH

Paciente	Diagnóstico	IC (anos)	Desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários	Estádio puberal (Tanner)	Pênis (DP)	Anosmia	Proporções eunucóides
8	SK	17	Ausente	G1PP3	-5,2	+	+
9	DHHM	15	Ausente	G1PP2	-4,5	-	+
10*	HHI	29	Incompleto	G3PP5	-2,0	-	-
11**	SK	15	Ausente	G1PP2	-	+	-
12	HHI	16	Incompleto	G3PP3	-3,6	-	+
13	SK	38	Incompleto	G2PP4	-3,3	+	+

DHHM: deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla; HHI: hipogonadismo hipogonadotrófico isolado; SK: síndrome de Kallmann

*Paciente tratado por curto período com ésteres de testosterona, há 4 anos

** Paciente em uso contínuo de ésteres de testosterona há vários anos (IC de 24 anos: testículo direito T3 e testículo esquerdo inguinal, PP5, pênis -0,8 DP)

Tabela 7 – Valores hormonais no teste combinado (Insulina + TRH + GnRH) dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH

PAC	Sexo	Teste	IC (anos)	GH (ng/mL) P	IGF-1 ^d (ng/mL) B	Cortisol (μg/dL) P	PRL (ng/mL)		TSH (μU/mL)			T4 livre (ng/dL) B	T4 (μg/dL) B	DI
							B	P	B	P	RP			
1	F	1°	9,2	1,5 ^b	41	15 ^b	16 ^b	49	7,6 ^c	50	+	-	5,0 ^c	-
		2°	17,3	0,7 ^b	101	8,0 ^b	41,3 ^b	76,4	6,0 ^b	50	+	0,5 ^b	4,2 ^b	-
2	F	1°	12,1	0,3 ^b	< 35	22 ^b	15 ^b	26	2,2 ^c	9,3	-	-	8,0 ^c	-
		2°	16,4	1,1 ^b	-	15 ^b	24 ^b	44	3,0 ^b	15	-	0,9 ^b	8,8 ^b	-
3	F	1°	17,1	1,3 ^b	73	14 ^b	11 ^b	75	3,8 ^c	41	-	1,7 ^b	8,0 ^c	-
		2°	19,6	0,6 ^b	115	16 ^b	21 ^b	87	9,3 ^b	79	-	0,9 ^b	7,6 ^b	-
4	F	1°	10,7	0,3 ^b	42	17 ^b	4,0 ^b	14	2,4 ^c	12,4	-	-	9,0 ^c	-
		2°	16,9	2,2 ^b	-	16,3 ^b	3,4 ^b	15,7	3,2 ^b	14,7	-	1,1 ^b	8,7 ^b	-
5	F	1°	12,1	0,3 ^b	< 19	14 ^b	5,5 ^b	10	1,2 ^c	7,0	-	-	8,0 ^c	-
		2°	18,4	0,2 ^b	29	32,6 ^b	7,3 ^b	20	1,4 ^b	7,0	-	1,3 ^b	13,4 ^b	-
6	F	1°	10,0	2,0 ^d	-	48 ^a	<5 ^a	<5	3,0 ^a	11	-	-	7,0 ^a	-
		2°	30,9	1,4 ^b	-	30 ^b	5,3 ^b	29	2,0 ^b	9,4	-	1,1 ^b	8,0 ^b	-
9	M	1°	14,3	0,1 ^b	-	11,7 ^b	4,0 ^b	15,2	3,0 ^b	13,6	-	-	-	-
		2°*	19,1	<0,1 ^b	-	25,2 ^b	3,7 ^b	20	4,2 ^b	13,6	-	0,8 ^b	8,5 ^b	-

Os valores de LH e FSH estão na Tabela 8

PAC: paciente, IC: idade cronológica; B: basal, P: pico; RP: resposta prolongada do TSH após estímulo com TRH até o tempo 60'

DI: diabetes insípido, ^a RIE; ^b IFME; ^c EIE; ^d IRME;

1° teste realizado no momento do diagnóstico do DGH, 2° teste realizado ao final do tratamento com GH,* Teste combinado alternativo

Tabela 8 – Dados clínicos, radiológicos e avaliação do eixo gonadotrófico dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH

PAC	Sexo	Teste	IC (anos)	IO (anos)	Estádio puberal (Tanner)	Pênis (DP)	LH (U/L)		FSH (U/L)		E2 (pg/mL)	T (ng/dL)
							B	P*	B	P*		
1	F	1°	10,0	3,0	M1PP1	-	<0,6 ^b	1,7	<1,0 ^b	12	<13 ^b	-
		2°	16,2	13,5	M4PP4	-	4,8 ^b	17,8	5,0 ^b	7,6	23 ^b	-
2	F	1°	12,2	8,8	M2PP1	-	<1,0 ^b	5,5	2,7 ^b	9,6	<13 ^b	-
		2°	16,4	13,5	M5PP4	-	4,6 ^b	62	6,5 ^b	18	18 ^b	-
3	F	1°	12,2	8,8	M1PP1	-	<0,6 ^b	4,2	2,0 ^b	4,4	<13 ^b	-
		2°	17,5	13,5	M4PP5	-	4,6 ^b	14,3	5,0 ^b	6,4	29 ^b	-
4	F	1°	17,1	13,5	M4PP4	-	5,3 ^b	68	5,0 ^b	15	-	-
		2°	19,7	15,5	M5PP5	-	7,7 ^b	74,8	6,9 ^b	15,5	40 ^b	-
5	F	1°	10,7	8,8	M2PP1	-	1,1 ^b	7,2	3,4 ^b	5,0	<13 ^b	-
		2°	17,3	13,5	M5PP5	-	6,6 ^b	29	5,7 ^b	9,0	29 ^b	-
6	F	1°	11,1	7,5	M1PP1	-	<3,0 ^a	10,2	4,8 ^a	8,3	-	-
		2°	29,9	18	M5PP5	-	3,5 ^b	7,8	4,8 ^b	5,8	<13 ^b	-
7	F	1°	30,3	18	M5PP5	-	2,0 ^b	12,2	3,4 ^b	6,4	<13 ^a	-
		2°	33,8	18	M5PP5	-	4,7 ^b	63	5,5 ^b	16	<13 ^b	-

continua

Tabela 8 – Dados clínicos, radiológicos e avaliação do eixo gonadotrófico dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH conclusão

PAC	Sexo	Teste	IC (anos)	IO (anos)	Estádio puberal (Tanner)	Pênis (DP)	LH (U/L)		FSH (U/L)		E2 (pg/mL)	T (ng/dL)
							B	P*	B	P*		
8	M	1°	17,1	14	G1PP3	-5,2	0,8 ^b	15,4 ^b	2 ^b	7,4 ^b	-	<14 ^b
9	M	1°	14,3	13	G1PP2	-4,5	1,7 ^b	1,8	1,0 ^b	1,6	-	-
		2°	19,0	18	G2PP5	-4,5	3,5 ^b	18	4,6 ^b	8,0	-	63 ^b
10	M	1°	29,0	18	G3PP5	-2,0	2,3 ^b	44,5	3,5 ^b	11	-	74 ^b
11	M	1°	16,7	-	-	-	1,0 ^a	10	3,5 ^a	8	-	-
		2°	30,3	18	G3PP5	-1,4	2,6 ^b	31	0,9 ^b	3	-	140 ^b
12	M	1°	21,1	-	G2PP5	-2,3	9,7 ^a	22,4	5,9 ^a	12,8	-	-
		2°	34,6	18	G2PP5	-2,0	2,0 ^b	12,5	3,0 ^b	6,0	-	53 ^b
13	M	1°	52,8	18	G2PP5	-0,5	1,6 ^b	32	2,8 ^b	11	-	110 ^a

PAC: paciente, B: basal, P: pico, *após 100µg de GnRH, ^aRIE, ^bIFME

Tabela 9 – Propriedades dos testes laboratoriais

	Doença presente	Doença ausente	
Teste positivo	Verdadeiro Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	VP + FP
Teste negativo	Falso Negativo (FN)	Verdadeiro Negativo (VN)	FN + VN
Total	VP + FN	FP + VN	

FONTE: Griner PF, e at⁸⁷

$$\text{Sensibilidade} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FN}$$

$$\text{Especificidade} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FP}$$

$$\text{Valor preditivo positivo} = \text{VP} / \text{VP} + \text{FP}$$

$$\text{Valor preditivo negativo} = \text{VN} / \text{VN} + \text{FN}$$

$$\text{Acurácia diagnóstica} = \text{VP} + \text{VN} / \text{VP} + \text{FP} + \text{VN} + \text{FN}$$

Tabela 10 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio pré-puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo masculino (n= 19) com seguimento clínico até a idade puberal

Desenvolvimento puberal espontâneo	Pico de LH (U/L)		Pico de FSH (U/L)	
	normal	diminuído	normal	diminuído
	n intervalo	n intervalo	n intervalo	n intervalo
Ausente (HH)	7 (0,7-2,6)	7 (<0,6-0,6)	9 (1,1-3,2)	5 (<1)
Presente (NL)	2 (1,1-1,7)	3 (<0,6)	4 (1,3-3,2)	1 (<1)
Valores de referência*	0,7 – 9,6		1 – 9,7	

HH: hipogonadismo hipogonadotrófico, NL: normal, * Brito VN, et al⁶²

Tabela 11 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio pré-puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo feminino (n= 10) com seguimento clínico até a idade puberal

Desenvolvimento puberal espontâneo	Pico de LH (U/L)		Pico de FSH (U/L)	
	normal	diminuído	normal	diminuído
	n intervalo	n intervalo	n intervalo	n intervalo
Ausente (HH)	3 (1,9-5,9)	6 (<0,6-0,9)	1 (6,7)	8 (<1-5,2)
Presente (NL)	1 (3,8)	0 (-)	1 (7,9)	0 (-)
Valores de referência*	1 – 6,9		6,7-24,5	

HH: hipogonadismo hipogonadotrófico, NL: normal, * Brito VN, et al⁶²

Tabela 12 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo masculino (n= 13)

Desenvolvimento puberal espontâneo	Pico de LH (U/L)				Pico de FSH (U/L)			
	normal		diminuído		normal		diminuído	
	n	intervalo	n	intervalo	n	intervalo	n	intervalo
Ausente (HH)	0	(-)	10	(<0,6-5,8)	1	(2,9)	9	(<1-2,4)
Presente (NL)	3	(14,3-25,2)	0	(-)	3	(6,4-6,9)	0	(-)
Valores de referência*	12 - 29,7				2,9 - 7,8			

HH: hipogonadismo hipogonadotrófico, NL: normal, * Brito VN, et al⁶²

Tabela 13 – Resposta do LH e do FSH ao teste de estímulo com GnRH realizado em estágio puberal em pacientes com hipopituitarismo do sexo feminino (n= 9)

Desenvolvimento puberal espontâneo	Pico de LH (U/L)				Pico de FSH (U/L)			
	normal		diminuído		normal		diminuído	
	n	intervalo	n	intervalo	n	intervalo	n	intervalo
Ausente (HH)	0	(-)	8	(<0,6-3)	0	(-)	8	(<1-3,4)
Presente (NL)	1	(18,1)	0	(-)	1	(11,4)	0	(-)
Valores de referência*	7,6 - 31,7				4,6 - 11,7			

HH: hipogonadismo hipogonadotrófico, NL: normal, * Brito VN, et al⁶²

Tabela 14 – Propriedades da resposta do LH e do FSH ao estímulo agudo com GnRH, realizado em estágio pré-puberal e puberal, no diagnóstico do hipogonadismo hipogonadotrófico em pacientes com hipopituitarismo

Propriedades	Estádio pré-puberal				Estádio puberal			
	Sexo masculino		Sexo feminino		Sexo masculino		Sexo feminino	
	(n= 19)		(n= 10)		(n=13)		(n= 9)	
	LH	FSH	LH	FSH	LH	FSH	LH	FSH
	pico	pico	Pico	pico	pico	pico	pico	pico
Sensibilidade (%)	50	36	67	89	100	90	100	100
Especificidade (%)	40	80	100	100	100	100	100	100
Valor preditivo positivo (%)	70	83	100	100	100	100	100	100
Valor preditivo negativo (%)	22	31	25	50	100	75	100	100
Acurácia diagnóstica (%)	47	47	70	90	100	92	100	100

Tabela 15 – Valores basais da subunidade α e do LH, dosado por dois diferentes ensaios imunofluorométricos, dos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH

Paciente	Sexo	Subunidade α (ng/L)	LH ⁽¹⁾ (U/L)	LH ⁽²⁾ (U/L)
1	F	185	1,6	1,2
2	F	416	4,6	6,8
3	F	243	3,8	4,2
4	F	321	6,6	8,3
5	F	374	5,0	8
7	F	225	5,0	9,2
10	M	295	<0,6	-
13	M	142	<0,6	<0,1
Valores normais	Feminino	80 – 604 [#]	0,95 – 9,3*	até 12
	Masculino	120 - 790	1,4 – 9,2	até 14

(1) AutoDELFIA hLH Spec

(2) *kit in house* Laboratório Fleury

[#] pré-menopausa, * fase folicular

Tabela 16 – Genótipo das variantes alélicas do gene *LHβ* nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH

Paciente	Variantes alélicas				
	983T>C	1008T>C	1018G>C	1036C>A	1423C>T
	Trp8Arg	Ile15Thr	Val18Val	Pro24Pro	Gly75Gly
1	TT	TT	GC	CA	CT
2	TT	TT	GG	CC	CT
3	TT	TT	GC	CA	CC
4	TT	TT	GG	CC	TT
5	TT	TT	GG	CC	CC
6	TT	TT	GG	CC	CC
7	TC	TC	GC	AA	TT
8	TT	TT	GC	CA	CT
9	TT	TT	GC	CA	CC
10	TT	TT	GG	CC	CC
11	TT	TT	GC	CC	CC
12	TC	TC	GG	CA	TT
13	TC	TC	GG	CA	CC

Tabela 17 – Freqüência alélica das variantes Trp8Arg e Ile15Thr do gene *LHβ* em uma amostra da população de brasileiros normais e em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico

População	n	Genótipos do <i>LHβ</i>			Freqüência do alelo C
		TT	TC	CC	
NL	202	173	27	2	0,076*
HH	48	40	8	0	0,083*

NL: brasileiros normais, HH: pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico

T: alelo selvagem, C: alelo variante

* $P > 0,05$ (teste χ^2)

Tabela 18 – Valores médios de LH, FSH e estradiol ou testosterona, dosados pelo IFME, e as variantes alélicas Trp8Arg e Ile15Thr do gene *LHβ* em indivíduos normais e pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico

Grupo	Genótipo	Sexo masculino				Sexo feminino			
		n	LH (U/L)	FSH (U/L)	T (ng/dL)	n	LH (U/L)	FSH (U/L)	E2 (pg/mL)
	TT	15	3,5 ± 1,1*	3,6 ± 2,3	492 ± 168	18	5,2 ± 4,2	6,2 ± 1,8	52 ± 36
NL	TC	1	3,5	3,1	334	3	4,4 ± 2,0	5,9 ± 2,1	28 ± 4
HH	TT	12	0,6 ± 0,04	1,2 ± 0,35	19 ± 9	12	0,6 ± 0,02	1,2 ± 0,27	<13
(LH baixo)	TC	2	0,6 ± 0	1,0 ± 0,07	<14	1	0,6	1,0	<13
HH	TT	4	1,9 ± 0,8	2,4 ± 1,2	70,3 ± 52,7	6	4,9 ± 1,0	5,3 ± 0,7	22,4 ± 7
(LH normal)	TC	2	2,6 ± 1,3	3,7 ± 1,3	86,5 ± 33,2	1	4,7	5,5	<13

NL: indivíduos normais, HH e LH baixo: pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações baixas de LH basal, HH e LH normal: pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico e concentrações normais de LH basal

* média ± DP, P > 0,05 (Mann-Whitney) para todas as comparações intragrupo, em ambos os sexos

8 - REFERÊNCIAS

1. Hayes FJ. Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. Vol. 27, 1998:739 -763.
2. Grumbach MM, Styne DM. Puberty: Ontogeny, Neuroendocrinology, Physiology, and Disorders. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 2003:1115 -1286.
3. Melmed S, Kleinberg D. Anterior Pituitary. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: Saunders, 2003:177-279.
4. Styne D. Puberty. In: Greenspan FS, Gardner DG, eds. *Basic & Clinical Endocrinology*. San Francisco: Lange Medical Books/ McGraw-Hill Companies, 2001:556-561.
5. Gardner DG. Mechanisms of Hormone Action. In: Greenspan FS, Gardner DG, eds. *Basic & Clinical Endocrinology*. San Francisco: Lange Medical Books/ McGraw-Hill Companies, 2001:62-67.
6. Pierce JG, Parsons TF. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 1981; 50:465-95.
7. Bousfield GR, Perry WM, Ward DN. Gonadotropins: Chemistry and Biosynthesis. In: Knobil E. NJD, ed. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd., 1994:1749-1792.
8. Talmadge K, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature* 1984; 307:37-40.

9. Hollenberg AN, Pestell RG, Albanese C, Boers ME, Jameson JL. Multiple promoter elements in the human chorionic gonadotropin beta subunit genes distinguish their expression from the luteinizing hormone beta gene. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 106:111-9.
10. Nishimura R, Shin J, Ji I, et al. A single amino acid substitution in an ectopic alpha subunit of a human carcinoma choriogonadotropin. *J Biol Chem* 1986; 261:10475-7.
11. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000; 21:551-83.
12. Huhtaniemi I. The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? *J Reprod Fertil* 2000; 119:173-86.
13. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992; 326:179-83.
14. Axelrod L, Neer RM, Kliman B. Hypogonadism in a male with immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: an exception to a venerable rule. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48:279-87.
15. Beitins IZ, Axelrod L, Ostrea T, Little R, Badger TM. Hypogonadism in a male with an immunologically active, biologically inactive luteinizing hormone: characterization of the abnormal hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1981; 52:1143-9.
16. Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, et al. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 2004; 351:2619-25.
17. Jiang M, Lamminen T, Pakarinen P, et al. A novel Ala(-3)Thr mutation in the signal peptide of human luteinizing hormone beta-subunit:

- potentiation of the inositol phosphate signalling pathway and attenuation of the adenylate cyclase pathway by recombinant variant hormone. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:201-12.
18. Roy AC, Liao WX, Chen Y, Arulkumaran S, Ratnam SS. Identification of seven novel mutations in LH beta-subunit gene by SSCP. *Mol Cell Biochem* 1996; 165:151-3.
 19. Ramanujam L, Liao WX, Roy AC, Ng SC, Ratnam SS. Molecular variants of luteinizing hormone in three populations of Southeast Asia. *Hum Hered* 1998; 48:232-4.
 20. Lamminen T, Jiang M, Manna PR, et al. Functional study of a recombinant form of human LHbeta-subunit variant carrying the Gly(102)Ser mutation found in Asian populations. *Mol Hum Reprod* 2002; 8:887-92.
 21. Liao WX, Roy AC, Chan C, Arulkumaran S, Ratnam SS. A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility. *Fertil Steril* 1998; 69:102-6.
 22. Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC, Loganath A, Goh HH, Ng SC. Association of molecular variants of luteinizing hormone with menstrual disorders. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999; 51:243-6.
 23. Ramanujam LN, Liao WX, Roy AC, Ng SC. Association of molecular variants of luteinizing hormone with male infertility. *Hum Reprod* 2000; 15:925-8.
 24. Kim NK, Nam YS, Ko JJ, Chung HM, Chung KW, Cha KY. The luteinizing hormone beta-subunit exon 3 (Gly102Ser) gene mutation is rare in Korean women with endometriosis and polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 2001; 75:1238-9.
 25. Furui K, Sukanuma N, Tsukahara S, et al. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH) beta-subunit,

- associated with immunologically anomalous LH variants. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:107-13.
26. Pettersson K, Mäkela MM, Dahlén P, Lamminen T, Huoponem K, Huhtaniemi I. Gene polymorfism found in the LH beta gene of an immunologically anomalous variant of human luteinizing hormone. *Eur J Endocrinol* 1994; 130.
 27. Suganuma N, Furui K, Kikkawa F, Tomoda Y, Furuhashi M. Effects of the mutations (Trp8 --> Arg and Ile15 --> Thr) in human luteinizing hormone (LH) beta-subunit on LH bioactivity in vitro and in vivo. *Endocrinology* 1996; 137:831-8.
 28. Suganuma N, Furui K, Furuhashi M, Asada Y, Kikkawa F, Tomoda Y. Screening of the mutations in luteinizing hormone beta-subunit in patients with menstrual disorders. *Fertil Steril* 1995; 63:989-95.
 29. Takahashi K, Kurioka H, Ozaki T, et al. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in Japanese infertility patients. *Hum Reprod* 1998; 13:3338-44.
 30. Takahashi K, Ozaki T, Okada M, Kurioka H, Kanasaki H, Miyazaki K. Increased prevalence of luteinizing hormone beta-subunit variant in patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 1999; 71:96-101.
 31. Takahashi K, Karino K, Kanasaki H, et al. Influence of missense mutation and silent mutation of LHbeta-subunit gene in Japanese patients with ovulatory disorders. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:402-8.
 32. Lamminen T, Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol* 2001; 414:1-7.
 33. Elter K, Erel CT, Cine N, Ozbek U, Hacıhanefioglu B, Ertungealp E. Role of the mutations Trp8 => Arg and Ile15 => Thr of the human

- luteinizing hormone beta-subunit in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1999; 71:425-30.
34. Rajkhowa M, Talbot JA, Jones PW, et al. Prevalence of an immunological LH beta-subunit variant in a UK population of healthy women and women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43:297-303.
 35. Nilsson C, Pettersson K, Millar RP, Coerver KA, Matzuk MM, Huhtaniemi IT. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group. *Fertil Steril* 1997; 67:998-1004.
 36. Starka L, Hill M, Hampl R, Huhtaniemi IT. Genetic variant of luteinizing hormone in Czech Republic. *Endocr Regul* 1999; 33:103-8.
 37. Raivio T, Huhtaniemi I, Anttila R, et al. The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3278-82.
 38. Manna PR, Joshi L, Reinhold VN, et al. Synthesis, purification and structural and functional characterization of recombinant form of a common genetic variant of human luteinizing hormone. *Hum Mol Genet* 2002; 11:301-15.
 39. Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. I. Structural elucidation of the sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1988; 263:25-35.
 40. Green ED, Baenziger JU. Asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin, and thyrotropin. II. Distributions of sulfated and sialylated oligosaccharides on bovine, ovine, and human pituitary glycoprotein hormones. *J Biol Chem* 1988; 263:36-44.

41. Baenziger JU, Green ED. Pituitary glycoprotein hormone oligosaccharides: structure, synthesis and function of the asparagine-linked oligosaccharides on lutropin, follitropin and thyrotropin. *Biochim Biophys Acta* 1988; 947:287-306.
42. Grotjan HEJ. Oligosaccharide structures in pituitary and placental glycoprotein hormones. In: Keel BA, Grotjan HEJ, eds. *Microheterogeneity of Glycoprotein Hormones*. Boca Raton: FL: CRC Press, 1989:23-52.
43. Bishop LA, Nguyen TV, Schofield PR. Both of the beta-subunit carbohydrate residues of follicle-stimulating hormone determine the metabolic clearance rate and in vivo potency. *Endocrinology* 1995; 136:2635-40.
44. Green ED, Boime I, Baenziger JU. Differential processing of Asn-linked oligosaccharides on pituitary glycoprotein hormones: implications for biologic function. *Mol Cell Biochem* 1986; 72:81-100.
45. Burgon PG, Stanton PG, Robertson DM. In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms. *Endocrinology* 1996; 137:4827-36.
46. Stanton PG, Burgon PG, Hearn MT, Robertson DM. Structural and functional characterisation of hFSH and hLH isoforms. *Mol Cell Endocrinol* 1996; 125:133-41.
47. Veldhuis JD, O'Dea LS, Johnson ML. The nature of the gonadotropin-releasing hormone stimulus-luteinizing hormone secretory response of human gonadotrophs in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:661-70.
48. Wilson CA, Leigh AJ, Chapman AJ. Gonadotrophin glycosylation and function. *J Endocrinol* 1990; 125:3-14.

49. Phillips DJ, Albertsson-Wikland K, Eriksson K, Wide L. Changes in the isoforms of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone during puberty in normal children. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:3103-6.
50. Anobile CJ, Talbot JA, McCann SJ, Padmanabhan V, Robertson WR. Glycoform composition of serum gonadotrophins through the normal menstrual cycle and in the post-menopausal state. *Mol Hum Reprod* 1998; 4:631-9.
51. Castro-Fernandez C, Olivares A, Soderlund D, et al. A preponderance of circulating basic isoforms is associated with decreased plasma half-life and biological to immunological ratio of gonadotropin-releasing hormone-releasable luteinizing hormone in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:4603-10.
52. Ulloa-Aguirre A, Maldonado A, Damian-Matsumura P, Timossi C. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation. *Arch Med Res* 2001; 32:520-32.
53. Morell AG, Gregoriadis G, Scheinberg IH, Hickman J, Ashwell G. The role of sialic acid in determining the survival of glycoproteins in the circulation. *J Biol Chem* 1971; 246:1461-7.
54. Phillips DJ, Wide L. Serum gonadotropin isoforms become more basic after an exogenous challenge of gonadotropin-releasing hormone in children undergoing pubertal development. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79:814-9.
55. Mitchell R, Bauerfeld C, Schaefer F, Scharer K, Robertson WR. Less acidic forms of luteinizing hormone are associated with lower testosterone secretion in men on haemodialysis treatment. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 41:65-73.

56. Talbot JA, Rodger RS, Robertson WR. Pulsatile bioactive luteinizing hormone secretion in men with chronic renal failure and following renal transplantation. *Nephron* 1990; 56:66-72.
57. Grumbach MM. A window of opportunity: the diagnosis of gonadotropin deficiency in the male infant. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:3122-7.
58. Partsch CJ, Hermanussen M, Sippell WG. Differentiation of male hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of puberty by pulsatile administration of gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60:1196-203.
59. Ghai K, Cara JF, Rosenfield RL. Gonadotropin releasing hormone agonist (nafarelin) test to differentiate gonadotropin deficiency from constitutionally delayed puberty in teen-age boys--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80:2980-6.
60. Wu FC, Butler GE, Kelnar CJ, Sellar RE. Patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion before and during the onset of puberty in boys: a study using an immunoradiometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70:629-37.
61. Smals AG, Hermus AR, Boers GH, Pieters GF, Benraad TJ, Kloppenborg PW. Predictive value of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) bolus testing before and after 36-hour pulsatile LHRH administration in the differential diagnosis of constitutional delay of puberty and male hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78:602-8.
62. Brito VN, Batista MC, Borges MF, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3539-44.

63. Sequera AM, Fideleff HL, Boquete HR, Pujol AB, Suarez MG, Ruibal GF. Basal ultrasensitive LH assay: a useful tool in the early diagnosis of male pubertal delay? *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15:589-96.
64. Barreca T, Perria C, Francaviglia N, Rolandi E. Evaluation of anterior pituitary function in adult patients with craniopharyngiomas. *Acta Neurochir (Wien)* 1984; 71:263-72.
65. Schmiegelow M, Lassen S, Poulsen HS, et al. Gonadal status in male survivors following childhood brain tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:2446-52.
66. Cannavo S, Curto L, Venturino M, et al. Abnormalities of hypothalamic-pituitary-thyroid axis in patients with primary empty sella. *J Endocrinol Invest* 2002; 25:236-9.
67. Islas Cruz G, Vite Vargas JA, Hernandez Marin I, Aguirre Ramirez A, Tovar Rodriguez JM, Ayala Ruiz AR. [Craniopharyngioma and its impact upon human reproduction: analysis of 15 cases at the Hospital Juarez de Mexico]. *Ginecol Obstet Mex* 2004; 72:345-8.
68. Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Hovarth E, Kovacs K. The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1998:249-340.
69. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 1969; 44:291-303.
70. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 1970; 45:13-23.
71. Root AW, Reiter EO. Evaluation and management of the child with delayed pubertal development. *Fertil Steril* 1976; 27:745-55.

72. Mendonca BB, Osorio MG, Latronico AC, Estefan V, Lo LS, Arnhold IJ. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:942-5.
73. Osorio MG, Kopp P, Marui S, Latronico AC, Mendonca BB, Arnhold IJ. Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85:2779-85.
74. Carvalho LR, Woods KS, Mendonca BB, et al. A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J Clin Invest* 2003; 112:1192-201.
75. Tanner JM, Whitehouse RH, Takaishi M. Standards from birth to maturity for height, weight, height velocity, and weight velocity: British children, 1965. I. *Arch Dis Child* 1966; 41:454-71.
76. Vieira JG, Nishida SK, Lombardi MT, Abucham JZ, Kasamatsu TS. Monoclonal antibodies specific for the free alpha subunit of glycoprotein hormones and their use in the development of a sensitive immunofluorometric assay. *Braz J Med Biol Res* 1995; 28:633-6.
77. Milner D, Heber S. Response to TRH in suspected hypopituitarism. *Arch Dis Child* 1983; 58:195-197.
78. Robertson G. Diabetes Insipidus. *Endocrinol Metab Clin North Am*. Vol. 24, 1995:549-572.
79. Silva EG, Shessarenko N, Arnhold IJ, et al. GH values after clonidine stimulation measured by immunofluorometric assay in normal prepubertal children and GH-deficient patients. *Horm Res* 2003; 59:229-33.
80. Greulich WW, Pyle SI. Radiographic atlas of skeletal development of the hand and wrist. Stanford: Stanford University Press, 1959.

81. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16:1215.
82. Rey L. Dicionário de termos técnicos de Medicina e Saúde. Rio de Janeiro: Ganabara Koogan S.A., 1999:191.
83. Lallan G. Purification Procedures: Chromatographic Methods - Chromatofocusing. *Methods in Enzymology*. Vol. 182, 1990:380-391.
84. Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing - Principles and Methods. Amersham Biosciences. Uppsala, Sweden. 2004: 129-175.
85. Chromatofocusing with Polybuffer and PBE. Pharmacia LBK Biotechnology. Uppsala, Sweden: Rahms i Lund, 1988: 2-38 .
86. Ropelato MG, Garcia-Rudaz MC, Castro-Fernandez C, et al. A preponderance of basic luteinizing hormone (LH) isoforms accompanies inappropriate hypersecretion of both basal and pulsatile LH in adolescents with polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:4629-36.
87. Griner PF, Mayewski RJ, Mushlin AI, Geenland P. Selection and interpretation of diagnostic tests and procedures. *Ann. Int. Med.* 1981; 94 (part 2):559-63.
88. Barry HC, Ebell MH. Test characteristics and decision rules. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997; 26:45-65.
89. Wu FC, Butler GE, Kelnar CJ, Huhtaniemi I, Veldhuis JD. Ontogeny of pulsatile gonadotropin releasing hormone secretion from midchildhood, through puberty, to adulthood in the human male: a study using deconvolution analysis and an ultrasensitive immunofluorometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1798-805.
90. Kulin HE. Delayed puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:3460-4.

91. Lanes R, Gunczler P, Osuna JA, et al. Effectiveness and limitations of the use of the gonadotropin-releasing hormone agonist leuprolide acetate in the diagnosis of delayed puberty in males. *Horm Res* 1997; 48:1-4.
92. Apter D, Cacciatore B, Alfthan H, Stenman UH. Serum luteinizing hormone concentrations increase 100-fold in females from 7 years to adulthood, as measured by time-resolved immunofluorometric assay. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 68:53-7.
93. Tapanainen JS, Koivunen R, Fauser BC, et al. A new contributing factor to polycystic ovary syndrome: the genetic variant of luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:1711-5.
94. Kalantaridou SN, Chrousos GP. Clinical review 148: Monogenic disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:2481-94.
95. Pettersson K, Ding YQ, Huhtaniemi I. An immunologically anomalous luteinizing hormone variant in a healthy woman. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 74:164-71.
96. Ulloa-Aguirre A, Timossi C, Damian-Matsumura P, Dias JA. Role of glycosylation in function of follicle-stimulating hormone. *Endocrine* 1999; 11:205-15.
97. Baenziger JU, Kumar S, Brodbeck RM, Smith PL, Beranek MC. Circulatory half-life but not interaction with the lutropin/chorionic gonadotropin receptor is modulated by sulfation of bovine lutropin oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89:334-8.
98. Wide L, Naessen T. 17 beta-oestradiol counteracts the formation of the more acidic isoforms of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after menopause. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40:783-9.
99. Wide L, Naessen T, Phillips DJ. Effect of chronic daily oral administration of 17 beta-oestradiol and norethisterone on the isoforms of serum gonadotrophins in post-menopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 42:59-64.

100. Damian-Matsumura P, Zaga V, Maldonado A, Sanchez-Hernandez C, Timossi C, Ulloa-Aguirre A. Oestrogens regulate pituitary alpha_{2,3}-sialyltransferase messenger ribonucleic acid levels in the female rat. *J Mol Endocrinol* 1999; 23:153-65.
101. Liu TC, Jackson GL, Gorski J. Effects of synthetic gonadotropin-releasing hormone on incorporation of radioactive glucosamine and amino acids into luteinizing hormone and total protein by rat pituitaries in vitro. *Endocrinology* 1976; 98:151-63.
102. Evans RM, Doelle GC, Lindner J, Bradley V, Rabin D. A luteinizing hormone-releasing hormone agonist decreases biological activity and modifies chromatographic behavior of luteinizing hormone in man. *J Clin Invest* 1984; 73:262-6.
103. Vogel DL, Magner JA, Sherins RJ, Weintraub BD. Biosynthesis, glycosylation, and secretion of rat luteinizing hormone alpha- and beta-subunits: differential effects of orchietomy and gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 1986; 119:202-13.
104. Suginami H, Yano M, Hamada K, Ito T, Yano K, Matsuura S. Qualitative and quantitative differences in hLH species in the first and second LH release induced by continuous stimulation with synthetic LHRH in normal menstrual cycle as assessed by isoelectrofocusing. *Endocrinol Jpn* 1985; 32:583-93.
105. Veldhuis JD, Johnson ML, Dufau ML. Preferential release of bioactive luteinizing hormone in response to endogenous and low dose exogenous gonadotropin-releasing hormone pulses in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1987; 64:1275-82.
106. Christianson SL, Zalesky DD, Grotjan HE. Ovine luteinizing hormone heterogeneity: androgens increase the percentage of less basic isohormones. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15:87-92.