

CAROLINE SCHNOLL YASUDA

**NOVAS ABORDAGENS NA INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR NO
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO CONGENITO**

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

Orientador: Prof. Dr. Leticia Silveira Gontijo

São Paulo

2022

CAROLINE SCHNOLL YASUDA

**NOVAS ABORDAGENS NA INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR NO
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO CONGENITO**

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

Orientador: Prof. Dr. Leticia Silveira Gontijo

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Yasuda, Caroline Schnoll
Novas abordagens na investigação genético-
molecular no hipogonadismo hipogonadotrófico
congênito / Caroline Schnoll Yasuda. -- São Paulo,
2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Leticia Ferreira Gontijo Silveira.

Descritores: 1.Genes 2.Genótipo 3.Hipogonadismo
4.Hormônio liberador de gonadotrofina 5.Síndrome de
Kallmann 6.Técnicas de diagnóstico molecular

USP/FM/DBD-503/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

*Aos pacientes que são a principal inspiração para a busca incessante de respostas
por meio da ciência.*

Agradecimentos

Ao meu marido, companheiro, parceiro e maior incentivador, **Thomas Alexandre Yasuda**, muito obrigada por todo seu apoio, dedicação, compreensão e tanto amor.

Aos meus filhos amados, **Lucas e Noah Schnoll Yasuda** que são um pedaço de mim e maiores presentes que recebi durante essa jornada.

À minha querida orientadora, **Dra. Leticia Gontijo**, por tanto ensinamento, dedicação e compreensão ao longo desses últimos anos. Sem dúvida, a Leticia fez toda contribuição para meu crescimento profissional, pessoal e se tornou uma grande amiga. Sua dedicação e amor pela pesquisa e ao ensino é admirável. Obrigada por todos os puxões de orelha, conselhos e acolhidas!

Ao **Prof. Alexander Jorge** pela dedicação à genética, orientação, disponibilidade e colaboração para a realização deste trabalho.

À **Profa Ana Krepisch**i por toda sua prontidão e disponibilidade para me orientar, esclarecer e ensinar sobre *array*. Muito obrigada mesmo!

À **Profa Elaine Frade Costa** por todos seus ensinamentos e companhia maravilhosa no ambulatório.

Às **Dra. Ericka Barbosa Trarbach**, **Dra. Soraia Domenice** **Dra. Ana Pinheiro Machado Canton**, por participarem da qualificação com importantes sugestões e colaborações, que enriqueceram muito meu trabalho.

Às professoras titulares da Endocrinologia USP, **Dra Berenice** e **Dra Ana Claudia**, fonte de inspiração para busca de maior conhecimento. Como é admirável tanta dedicação ao ensino e à endocrinologia.

Às amigas que o doutorado meu deu: **Alessandra Renck** e **Lorena Amato** pelo carinho, amizade e apoio de sempre.

Aos amigos do LIM 42, em especial a **Mirian Nishi** e **Rosangele De Paula Zamboni**, por tanta gentileza em me ajudar nos obstáculos burocráticos para que eu pudesse desenvolver esse trabalho.

À minhas queridas irmãs **Susanne** e **Stephanie Schnoll** que apesar do abismo entre nossas profissões, me acompanharam nesse trajeto com muita torcida. Aos meus sobrinhos lindos, **Felipe** e **Arthur**, assim como meu cunhado irmão, **Yoakim Petrola** que fazem parte de tudo isso.

À família maravilhosa que ganhei quando me casei, em especial à minha sogra **Marli Yasuda**, sempre disposta a me ajudar, principalmente com os meus filhos; às minhas cunhadas queridas, **Andreia** e **Melina Yasuda**, irmãs que a vida me presenteou; à minha sobrinha amada, **Isabela** e meu cunhado querido **Ivan Brizuela**.

Em especial, aos meus pais e à minha irmã (*in memoriam*) que de onde estiverem estão torcendo e irradiando luz em cada passo que eu dou. Meu mais profundo amor por vocês.

A todos que me incentivaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

Normatização Adotada

Esta Tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:
Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).
Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação.
Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Documentação; 2011.
Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medic

Schnoll C. ***Novas abordagens na investigação genético-molecular no hipogonadismo hipogonadotrófico congênito***. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

RESUMO

Introdução: O Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado congênito (HHC) é causado por um defeito na produção ou secreção de GnRH pelo hipotálamo ou pela resistência hipofisária à ação do GnRH. O HHC é uma condição rara, clínica e geneticamente heterogênea; cerca de 50 a 60% dos indivíduos afetados apresentam anosmia associada, caracterizando a síndrome de Kallmann. Com o avanço das técnicas de biologia molecular na última década, um número cada vez maior de defeitos genéticos tem sido implicado na patogênese molecular do HHC congênito. No entanto, atualmente somente cerca de 40 a 50% dos casos de HHC apresentam diagnóstico molecular definido. O estudo das CNVs é indicado para investigação molecular de fenótipos sindrômicos complexos, porém até o presente momento, essa análise ainda não havia sido utilizada em uma grande coorte de pacientes com HHC. O *Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP-array)* é uma técnica de citogenômica que permite avaliar, com uma maior resolução a detecção de variação no número de cópias (*copy number variation - CNV*). Objetivos: Detectar deleções ou duplicações submicroscópicas em um grupo selecionado de pacientes de HHC com apresentação sindrômica sem causa definida. Identificar novas regiões cromossômicas e/ou novos genes possivelmente relacionados à etiologia da HHC. E estabelecer a correlação entre o genótipo mutante e o fenótipo observado nesses pacientes. Pacientes e Métodos: A coorte foi constituída por 50 indivíduos, dos quais: 35 homens e 15 mulheres; 21 com síndrome de Kallmann e 29 com HHC normossômico. Onze deles apresentavam alguma característica clínica adicional não relacionada ao quadro reprodutivo, como defeitos da linha da média, malformações renais, surdez, anormalidades esqueléticas, alterações neurológicas ou distúrbios psiquiátricos. Os achados foram comparados com CNVs descritas em bancos de dados de controles normais compilados pelo *Database of Genomic Variants*, e também pelos estudos de CNV em indivíduos com fenótipos alterados, depositados no banco de dados do DECIPHER (*Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources*). Resultados: Foram identificadas 21 CNVs em 19 pacientes e entre os resultados mais importantes, destacamos três CNVs identificadas em regiões

cromossômicas com genes codificantes e associados a síndromes conhecidas. Duas foram classificadas como patogênicas. Ambas deleções: uma de 515 kb, localizada no cromossomo 16 associada à síndrome de microdeleção 16p11.2 e a outra, de 598 kb localizada no cromossomo 15 abrangendo o gene *SIN3A* causador da síndrome Witteveen-Kolk. A terceira CNV foi uma VUS de destaque por ser uma duplicação de 40,6 kb do tipo intragênica envolvendo o gene *KMT2C*, causador da Síndrome de Kleefstra tipo 2 possivelmente associada ao HHC em alguns casos. Conclusão: Os resultados obtidos sugerem a associação de síndromes complexas ao HHC colocando principalmente os genes *SIN3A* e o *KMT2C* como possíveis genes candidatos nas próximas investigações de casos de HHC. Nossos resultados corroboram as evidências atuais da importância da análise global do número de cópias genômicas como um teste genético-clínico para elucidação diagnóstica em pacientes com HHC especialmente os casos sindrômicos.

Palavras-chave: Genes, Genótipo, Hipogonadismo, Hormônio liberador de gonadotrofina, Síndrome de Kallmann, Técnicas de diagnóstico molecular.

Schnoll C. *New approaches in molecular-genetic research in congenital hypogonadotropic hypogonadism*. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022

Abstract

Congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is a rare condition caused by GnRH deficiency, due to defective hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) production or secretion, or by pituitary resistance to the GnRH action. Congenital IHH is more prevalent in men and about 50% to 60% of affected individuals present with associated anosmia or hyposmia, characterizing Kallmann's syndrome. On the last years, with the advancing on the molecular biology field, a growing number of genetic defaults have been linked to the CHH molecular pathogenesis. On the other hand, nowadays, only 40% to 50% of the CHH have a defined molecular diagnostic. The copy number variation (CNV) study is used to search for complex syndromic phenotypes, but until the present moment, this analysis was not yet used in a large cohort of patients with CHH. The Single Nucleotide Polymorphism Array (SNP-array) is a cytogenomic technique that allows the evaluation, with better resolution, and the detections of CNV. Objective: The present project was developed with the objective of detect submicroscopic deletions or duplications in a selected group of CHH patients with syndromic presentation that have no defined cause. Identify new chromosomal regions and/or new genes possibly related to the CHH etiology. And to establish correlations with the genotypes and the phenotype observed in these patients. Patients and Method: The cohort has 50 individuals, been 35 men and 15 women; 21 with Kallman syndrome and 29 with normosmic CHH. Eleven of them present some additional clinical feature not related to the reproductive phenotypes, like defaults on the midline, kidney malformations, deafness, skeleton malformation, neurologic disorders or psychiatric disturbance. The findings were analyzed and compared to CNV founded from normal controls previously described and compiled by the Database of Genomic Variants, and also by the previous studies of CNV from individuals with some phenetical feature, from the DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensemble Resources). Results: Twenty-one CNVs were identified in 19 patients and, among the most

important results, three of them stand out, located in chromosomal regions with codifying genes and associated with already known syndromes. Two of them were deletions and classified as pathogenic: one with 515 kb on the 16o chromosome, linked to the 16p11.2 microdeletion syndrome, and other one, also a deletion, with 598 kb, sited on the 15o chromosome, compassing the *SIN3A* gene linked to the Witteveen-Kolk syndrome. The third CNV is a VUS (variant of unknown significance), highlighted by been a type intragenic duplication with 40.6 kb, compassing the *KMT2C* gene, responsible for the Kleefstra Syndrome 2, possibly associated to CHH in some cases. Conclusion: The results founded suggest an association between these complex syndromes and CHH, and emphasize specially the *SIN3A* and *KMT2C* genes as possible candidates in future assays for patients with CHH. Our results enhance the actual evidences that elevate the importance of the CNV analysis as a genetic-clinic test to diagnostic elucidation in CHH patients, specially the syndromic cases.

Keywords: Genes, Genotype, Hypogonadism, Gonadotropin-releasing hormone, Kallmann syndrome, Molecular genotype techniques.

SUMÁRIO

Lista de figuras
Lista de tabelas
Lista de abreviaturas
Resumo

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 - Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado congênito.....	18
1.2 - Genética no HHC.....	19
1.3 - Relação fenótipo genótipo no HHC.....	21
1.4 - HHC sindrômico.....	23
1.5 - Evolução da biologia molecular a no HHC.....	28
1.6 - Variações do número de cópias (<i>Copy number variation – CNV</i>)	29
1.7 - Interpretação das CNVs: relevância clínica.....	30
2. OBJETIVOS.....	32
2.1 - Objetivo principal.....	33
2.2 - Objetivos específicos.....	33
3 - MÉTODOS.....	34
3.1 Considerações éticas.....	35
3.2 - Pacientes.....	35
3.3 - Extração de DNA genômico.....	38
3.4 - Técnica de SNP <i>array</i>	38
3.5 - Análise de bioinformática.....	42
3.6 - Interpretação das CNV's.....	43
4- RESULTADOS.....	47
4.1- Caracterização da casuística.....	48
4.2 - Resultados de SNP array no grupo estudado.....	52
4.3 - Descrição clínica, SNP array e análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações.....	55
4.3.1 - CNVs patogênicas.....	55
4.3.4 - CNV de significado indeterminado (VUS).....	61
5- DISCUSSÃO.....	63
5.1 - Paciente P2	64
5.2 – Paciente P25.....	66
5.3 - Paciente P5	74
6- CONCLUSÕES.....	79
7- REFERÊNCIAS	81
ANEXO I –TCLE.....	90

LISTAS

Lista de figuras

Figura 1 – Representação esquemática dos principais genes causadores do HHC congênito	19
Figura 2 – Linha do tempo mostrando o histórico de identificação de genes causadores ou associados ao HHC.....	20
Figura 3 - Variação na expressão clínica no HHC.	22
Figura 4 – Algoritmo da seleção dos pacientes analisados.....	37
Figura 5. Técnica de <i>array</i> da plataforma Illumina®	40
Figura 6. Metodologia de <i>SNP-array</i>	41
Figura 7 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio da técnica de <i>array</i>	42
Figura 8 – Parâmetros utilizados no <i>software BlueFuse®</i> para análise das CNVs e das ROHs por meio da técnica de <i>array</i>	43
Figura 9: Fluxograma das CNVs obtidas a partir da avaliação dos participantes por <i>SNP-array</i>	53
Figura 10 - Ideograma ilustrando o cromossomo 16 com destaque na região p11.2.....	57
Figura 11 - Representação das CNV patogênica identificadas no paciente P2.....	57
Figura 12 - Ideograma ilustrando o cromossomo 15 com destaque na região 15q24.....	59
Figura 13 - Representação das CNV patogênica identificadas no paciente 25.....	59
Figura 14 - Ideograma ilustrando o cromossomo 16 com destaque na região 7q.....	62
Figura 15 - Representação das CNV de significado indeterminado identificada no paciente 5.....	62
Figura 16 – Esquema ilustrando o overlapping entre as características clínicas entre as Síndromes de Kallmann e Witteveen-Kolk.....	69

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Principais síndromes complexas hereditárias que incluem o hipogonadismo hipogonadotrófico parte do fenótipo e respectivos genes associados seguindo.....	26
Tabela 2: Genes relacionados ao HHC avaliados nos pacientes por meio do sequenciamento paralelo em larga escala.....	36
Tabela 3: Critérios utilizados para a interpretação clínica das CNVs.....	46
Tabela 4: Bancos de dados disponíveis na internet para análise de dados de CNVs.....	47
Tabela 5 – Apresentação clínica dos pacientes com HHC avaliados no estudo e os respectivos resultados encontrados no SNP array.....	49
Tabela 6 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) patogênicas e de significado indeterminado identificadas nos pacientes com HHC avaliados no presente estudo.....	54
Tabela 7 - Conteúdo gênico das CNVs patogênicas encontradas nos pacientes utilizando a técnica de SNP <i>array</i>	55
Tabela 8 - Características clínicas da síndrome de Witteveen-Kolk e em destaque as que estão presentes no paciente P25.....	70
Tabela 9 - Manifestações clínicas na Síndrome de Síndrome de Kleefstra-2.....	75

Abreviaturas, siglas e símbolos

- ACMG American College of Medical Genetics
- B Benigna
- CAPPesq Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
- cDNA DNA complementar
- CHARGE Síndrome CHARGE (OMIM 214800): coloboma, anormalidades cardíacas, atresia de coana, anormalidades genitais e auditivas
- CNV Copy number variation (variação do número de cópias)
- dL Decilitro
- DNA Ácido desoxirribonucleico
- Dx Diagnóstico
- EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetracético)
- F Feminino
- FAPESP Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FSH Hormônio folículo-estimulante
- GH Growth Hormone (Hormônio do crescimento)
- GnRH Gonadotropin-releasing Hormone (Hormônio liberador de gonadotrofinas)
- GRCh37 Genome Reference Consortium human genome 37
- HCFMUSP Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- HHC Hipogonadismo hipogonadotrófico congênito
- IGF Insulin-like growth factors (fator de crescimento semelhante à insulina)
- kb Kilo (quilo) pares de bases = 1.000 bp
- L Litro
- LH Hormônio luteinizante
- LIM42 Laboratório de Hormônios e Genética Molecular 42
- M Masculino
- Mg Miligrama
- mL Mililitro
- MLPA Multiplex Ligation-dependant Probe Amplification
- mM Milimolar
- NCBI National Center for Biotechnology and Information
- ng Nanograma
- NGS Next generation sequencing
- OMIN Online Mendelian Inheritance in Man
- P Patogênica
- pb Pares de bases
- PB Provavelmente benigna
- PCR Reação em cadeia da polimerase
- pmol Picomol
- PP Provavelmente patogênica
- RNA Ácido ribonucleico

- RNAm Ácido ribonucleico mensageiro
- RT-PCR Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
- SK Síndrome de Kallmann
- SNP Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de um único nucleotideo)
- SNV Single nucleotide variants (variante de um único nucleotideo)
- SPLE Sequenciamento paralelo em larga escala
- TAE Tampão TRIS-Acetato-EDTA
- TE Tampão TRIS-HCl EDTA
- TRIS-HCl Tampão Tris-ácido clorídrico
- UI Unidades Internacionais
- UPSIT Teste olfatório da Universidade da Pensilvânia
- UTR Untranslated region (região não traduzida)
- VCF Variant Call Format
- VUS Variant of Undetermined Significance (variante de significado incerto)
- μg Micrograma
- μL Microlitro
- μM Micromol

1-INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Hipogonadismo Hipogonadotrófico Isolado congênito

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado congênito (HHC) é caracterizado pela falência da função gonadal secundária à deficiência na secreção de gonadotrofinas que ocorre por uma falha na produção, secreção ou ação do GnRH. Tipicamente o diagnóstico do HHC congênito é realizado na segunda ou terceira década da vida, quando os pacientes se apresentam com queixas de ausência ou atraso de desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, amenorreia primária ou infertilidade. Os pacientes podem apresentar micropênis e testículos pré-púberes ou reduzidos para a faixa etária. Criptorquidia é observada em até 50% dos pacientes. O diagnóstico clínico do CHH é caracterizado por baixas concentrações de esteroides sexuais (testosterona ou estradiol) associados a valores baixos ou inapropriadamente normais de gonadotrofinas (LH e FSH), com o restante da função hipofisária normal, sem lesões anatômicas da região hipotalâmica hipofisária (1).

O HHC é dividido em dois grandes grupos baseado na presença ou ausência de disfunção olfatória. Cerca de 50–60% dos indivíduos afetados apresentam anosmia ou hiposmia em associação com o CHH definindo a síndrome de Kallmann (SK). O HHC sem alterações olfatórias é conhecido como hipogonadismo hipogonadotrófico congênito normósmico (HHCn) (2, 3). Durante o desenvolvimento embrionário, os neurônios produtores de GnRH se originam fora do sistema nervoso central, na placa olfatória e migram juntamente com os neurônios olfatórios através da placa cribiforme em direção ao bulbo olfatório em formação, para em seguida migrarem para o hipotálamo. A associação do HHC com anormalidades olfatórias na síndrome de Kallmann decorre de defeitos nesse processo migratório (4). A maioria dos portadores de síndrome de Kallmann apresenta hipoplasia ou agenesia dos sulcos e bulbos olfatórios, uni ou bilateralmente (5). Outras alterações fenotípicas poder estar presentes na síndrome de Kallmann, como a surdez neurosensorial, defeitos de linha média como a fenda labial e/ou palatina, palato ogival, hipertelorismo ocular, agenesia dentária, sincinesia bimanual (movimentos em espelho), malformações renais (hipoplasia ou agenesia renal unilateral, rim em ferradura), anomalias digitais esqueléticas como a clinodactilia, sindactilia, campilodactilia, além de alterações neurológicas como ataxia (6).

O HHC é uma condição geneticamente heterogênea, que pode ser herdada de forma autossômica dominante, autossômica recessiva ou ligada ao X. A prevalência do HHC é estimada em 1:4.000 a 1:10.000 homens e 1:50.000 mulheres. A razão para essa discrepância entre os gêneros é desconhecida, provavelmente sendo subestimada em mulheres. A

preponderância masculina é explicada apenas parcialmente pela contribuição das formas ligadas ao X. Outros fatores, como penetrância incompleta e a tendência do sexo feminino ser avaliado principalmente por médicos ginecologistas devido à apresentação clínica de amenorreia primária, também devem ser considerado (4, 7).

1.2 - Genética no HHC

Classicamente, os defeitos moleculares relacionados ao HHC estão relacionados a diferentes momentos de atuação do hormônio liberador de gonadotrofinas. Os genes relacionados ao desenvolvimento e migração dos neurônios GnRH e olfatórios estão associados principalmente à síndrome de Kallmann e defeitos de linha média, mas alguns deles estão associados também ao HHC normósmico. Já os genes envolvidos na cascata de ação, síntese e secreção do GnRH causam essencialmente HHC normósmico (**Figura 1**) (8, 9).

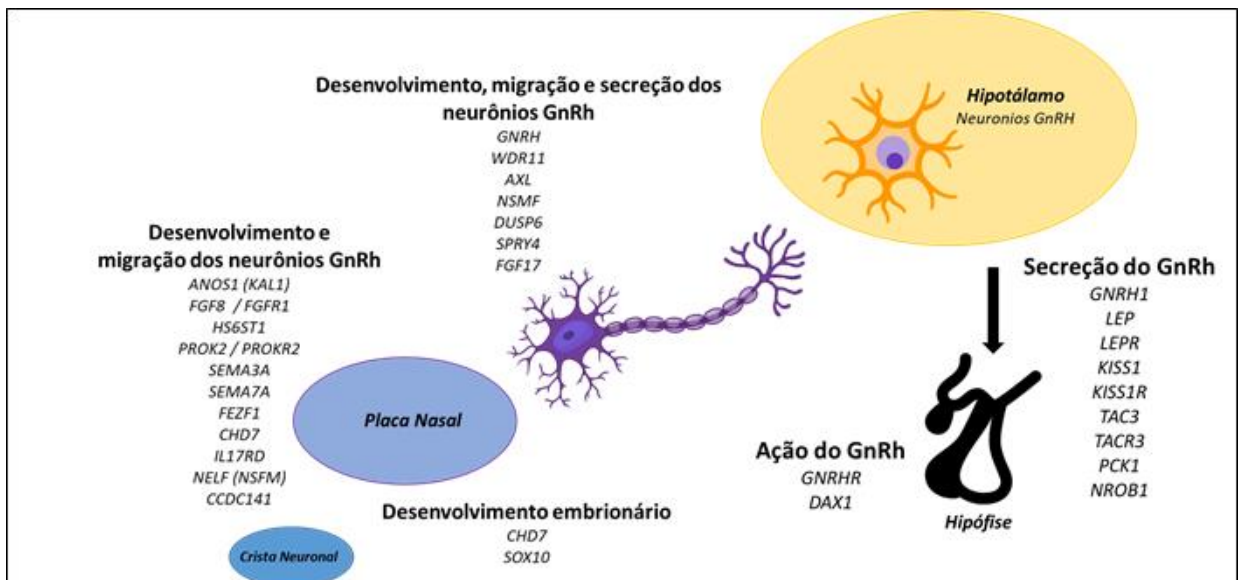


Figura 1 – Representação esquemática dos principais genes causadores do HHC congênito. Os genes podem ser classificados entre os que participam no desenvolvimento e migração dos neurônios produtores de GnRH, e os envolvidos na síntese, secreção e ação do GnRH no eixo reprodutivo. (Adaptado de Bianco & Kaiser. 2009) (10)

Com o avanço das técnicas de biologia molecular na última década, um número cada vez maior de defeitos genéticos tem sido implicado na patogênese molecular do HHC. Genes candidatos foram identificados por abordagens diversas, como caracterização de deleções e translocações equilibradas, analogia com fenótipos de modelos animais, clonagem posicional de grandes famílias consanguíneas com HHC e genes pertencentes a vias de sinalização relacionadas ao eixo gonadotrófico (11). A identificação de anormalidades genéticas relacionadas com ao HHC tem proporcionado grandes esclarecimentos sobre os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento, maturação e função do eixo gonadal.

Atualmente mais de 30 genes já foram descritos ao longo dos últimos anos e implicados na patogênese do HHC, explicando aproximadamente 40 a 50% dos casos totais (3, 6) (**Figura 2**). Estes genes codificam uma rede complexa de fatores de transcrição, proteínas de matriz, neurotransmissores, enzimas e receptores hormonais cujas ações são fundamentais para a aquisição e manutenção de uma função reprodutiva normal (12).

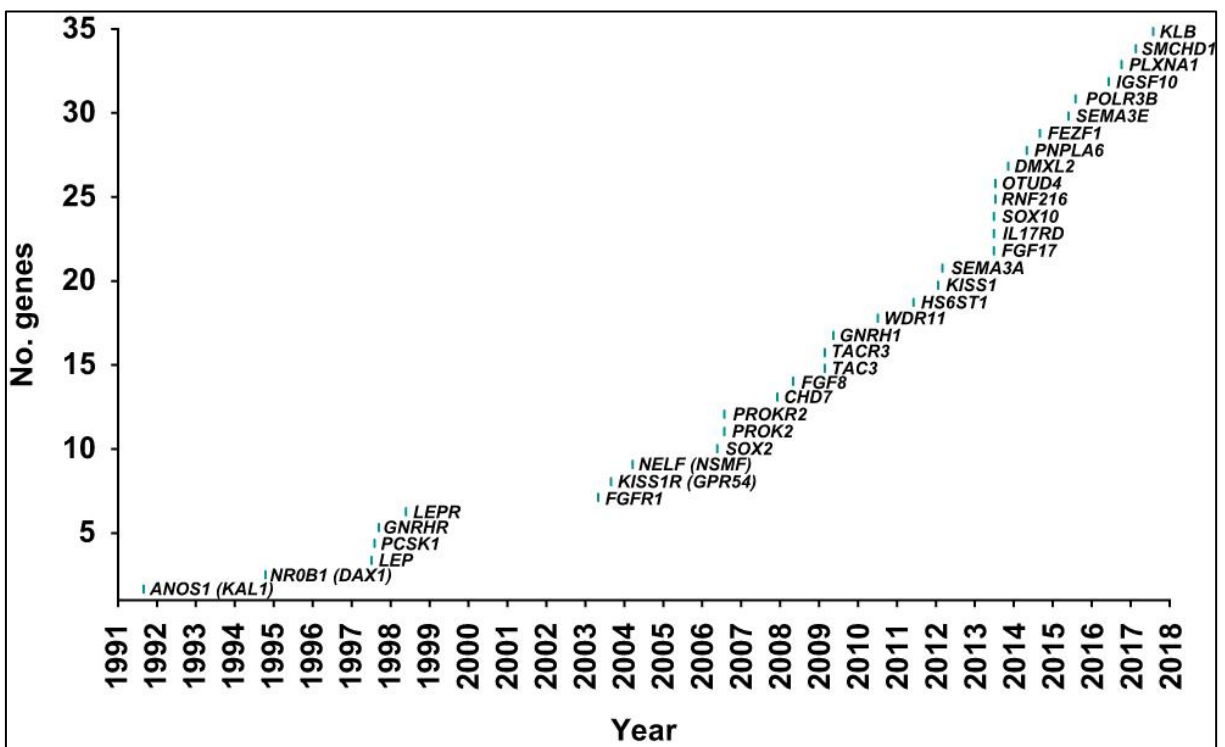


Figura 2 – Linha do tempo mostrando o histórico de identificação de genes causadores ou associados ao HHC. Adaptado de Maione et al, 2018 (13)

1.3 - Relação fenótipo genótipo no HHC

Uma relativa correlação genótipo-fenótipo pode ser observada nas diferentes formas de CHH. As formas de síndrome de Kallmann ligadas ao X, com ou sem mutações no gene *ANOS1* (anteriormente conhecido como *KAL1*), costumam apresentar fenótipo reprodutivo mais grave. O *ANOS1* foi o primeiro gene implicado na etiologia da síndrome de Kallmann. Está localizado no cromossomo X (Xp22.3) e codifica a anosmina-1, uma proteína de matriz extracelular envolvida nos processos de adesão celular e direcionamento da migração dos neurônios olfatórios e secretores de GnRH (14). Mutações no *ANOS1* em geral apresentam penetrância completa e estão associadas a um fenótipo reprodutivo mais grave, sempre com hipogonadismo completo, com menor volume testicular, maior frequência de criptorquidismo e muitas vezes associado a alterações fenotípicas não reprodutivas como sincinesia bimanual, agenesia renal unilateral e anormalidades visuais (15).

Mutações inativadoras de genes que afetam a síntese, secreção ou ação do GnRH não estão envolvidos no processo de migração neuronal, portanto o quadro clínico dos pacientes afetados é sempre de HHC sem alterações olfatórias ou outras malformações associadas. O gene mais comumente afetado é o *GNRHR*, que deve ser o primeiro a ser pesquisado em pacientes com HHC normósmico (7, 16).

Enquanto certos genes estão exclusivamente associados com HHC normósmico ou com a SK, alguns genes podem ser associados com ambas as condições, como é o caso de mutações no *FGFR1* e seu ligante *FGF8*, com padrão de herança autossômica dominante, entre outros. Mutações no *FGFR1* são uma das causas mais comuns tanto de SK quanto de HHC normósmico. Mutações no *FGFR1* também estão associadas a condições caracterizadas por anomalias distais de membros (polidactilia, sindactilia e camptodactilia) com diferentes graus de gravidade, recebendo o nome de síndrome de Hartsfield, que faz parte do grupo de síndromes de malformação de mão/pé fendidos (split hand/split foot malformation, ou SHFM, de código OMIM, Online Mendelian Inheritance in Man, 183600). Defeitos faciais da linha média, bem como agenesia dentária, também são mais prevalentes em indivíduos que abrigam variantes deletérias de *FGFR1* (3, 6, 17) .

Mutações no gene *FGFR1* também estão associadas a uma grande variabilidade fenotípica inter e intrafamiliar (**Figura 3**), com uma penetrância aparentemente incompleta (18). O espectro fenotípico dos pacientes afetados varia de hipogonadismo parcial a completo, com ou sem alterações olfatórias, inclusive com casos de reversibilidade do hipogonadismo, além de anosmia isolada (17). Essas observações sugerem a possibilidade de que a SK e o HHC normósmico possam fazer parte de um espectro amplo da mesma condição (19) .

Alguns genes estão relacionados com uma apresentação clínica específica no HHC como por exemplo, a presença de deficiência auditiva congênita associada ao hipogonadismo, é o caso dos genes: *CHD7*, *IL17RD* e *SOX10* (3). As anomalias de fenda palatina e esquelética são mais comuns nos casos de mutações em genes que codificam componentes da via de sinalização FGF8 (por exemplo, *FGFR1*, *FGF8*, *FGF17* e *HS60ST1*). Sincinesia bimanual ou agenesia renal são importantes sinais clínicos sugestivos de mutações no *ANOS1*, como falado anteriormente. Assim como a associação do HHC à hiperfagia e obesidade de início na infância sugere mutações em *LEP*, *LEPR* ou *PCSK1*. (6, 20)

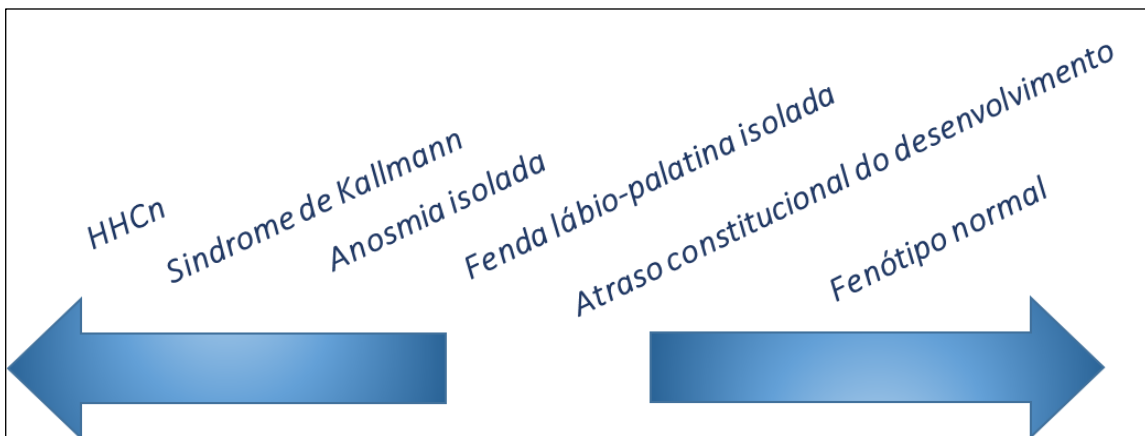


Figura 3 - Variação na expressão clínica no HHC.

Por outro lado, o HHC sempre foi classicamente descrito como um distúrbio monogênico, portanto o envolvimento de um único gene defeituoso seria o suficiente para explicar o fenótipo da doença. Porém, a enorme variabilidade de apresentação clínica torna difícil o modelo de defeito de um único gene no HHC (13). Uma hipótese atualmente aceita é de que o modelo de herança digênica ou oligogênica, bem como fatores epigenéticos ou ambientais possam contribuir para a variabilidade fenotípica e penetrância incompleta observadas em determinadas famílias.

Muito se discute sobre a prevalência da oligogenicidade no HHC. Estudos subsequentes que vem rastreando cada vez mais genes no HHC demonstraram graus ainda maiores de oligogenicidade, variando de 7-15% (7). No entanto, no contexto atual, em que estamos presenciando um aumento massivo do uso do sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE), que permite o sequenciamento simultâneo de dezenas, centenas ou milhares de genes ao mesmo tempo, o principal desafio seria diferenciar se realmente a oligogenicidade

é mais prevalente ou se essas diversas variantes raras que não apresentam um efeito fenotípico claro são identificadas ao acaso. Portanto, a avaliação da patogenicidade de uma única variante e os efeitos sinérgicos entre as variantes permanece um desafio.

1.4 HHC sindrômico

Muitos genes no HCC foram encontrados a partir do estudo de síndromes complexas previamente descritas, nas quais o hipogonadismo hipogonadotrófico poderia fazer parte da constelação de alterações fenotípicas. Um dos exemplos mais conhecidos é o HHC sindrômica é o HHC associado à hipoplasia adrenal congênita ligada ao X causada por defeitos no gene *DAX1 (NROB1)*(2, 21).

O *SOX10* é um gene amplamente estudado na síndrome de Waardenburg caracterizada pela associação da surdez com hipopigmentação na pele, cabelos ou olhos, doença de Hirschsprung e neuropatia desmielinizante. No seguimento desses pacientes, foi notado em suas ressonâncias de crânio a ausência de bulbos olfatórios e assim suposto a existência de alguma relação com HHC, por sua associação com alterações do trato olfatório na SK, o que mais tarde veio a se confirmar (22, 23). Depois disso foram descritos vários casos de defeitos no *SOX10* em casos de síndrome de Kallmann, em geral associado à surdez (3, 22, 24).

É o caso também do gene *CHD7 (chromodomain helicase dna-binding protein 7)* que codifica uma proteína ligadora ao cromodomínio helicase do DNA(25). Defeitos no *CHD7* causam a síndrome de CHARGE, acrônimo para coloboma da íris, cardiopatia congênita (*heart defects*), atresia de coanas, retardo no crescimento e desenvolvimento, hipoplasia genital e/ou de vias urinárias e anomalias dos pavilhões auriculares/surdez (*Ear abnormalities and deafness* (26). Essas características não são mais utilizadas na construção do diagnóstico de síndrome CHARGE, que inclui outras anomalias além das descritas, mas o nome permanece. Mutações no *CHD7* foram identificadas em cerca de 5% dos casos de HHC normósmico e síndrome de Kallmann, principalmente quando associado a alguma outra característica da síndrome, como surdez, levantando a hipótese de que o HHC possa ser uma forma frustra da síndrome (25, 27, 28).

Genes como *DMXL2* e *SMCHD1* causam síndromes específicas com HHC como parte de um fenótipo complexo e genes como *OTUD4*, *RNF216*, *PNPLA6*, *STUB1*, *POLR3A* e *POLR3B* que causam síndromes neurológicas combinadas com CHH que serão discutidos a seguir.

O HHC é descrito em associação com manifestações neurológicas, como na síndrome de Gordon Holmes caracterizada classicamente pela associação de ataxia cerebelar hereditária

autossômica recessiva de início precoce associada a hipogonadismo hipogonadotrófico. (29) A neurodegeneração possui caráter progressivo e inclui disartria, alterações do equilíbrio e coordenação motora, perda de memória e disfunção cognitiva. A base genética desta síndrome permaneceu desconhecida até a descrição recente de mutações de perda de função nos genes *RNF216* e *OTUD4*. No mesmo espectro fenotípico, quando associada à distrofia coriorretiniana, essa síndrome é denominada síndrome de Boucher-Neuhauser, em associação com outros genes como o *PNPLA6* (30).

Outro distúrbio neurológico em associação ao HHC é a leucodistrofia hipomielinizante com ou sem oligodontia e/ou hipogonadismo hipogonadotrófico, descrita primeiramente sem associação com alterações endocrinológicas, se manifesta com quadro de ataxia lentamente progressiva, atraso da dentição e hipomielinização (ADDH - *ataxia, delayed dentition and hypomyelination*) (31). Posteriormente descrita em associação com hipogonadismo hipogonadotrófico passando a ser conhecida pelo acrônimo de Síndrome 4H: hipomielinização, hipogonadismo hipogonadotrófico e hipodontia, causada por defeitos nos genes *POLR3A* E *POLR3B* (32-34).

Além disso, o HHC pode ocorrer também como parte de uma constelação de alterações em diversas síndromes raras como a síndrome de Oliver-McFarlane, doença congênita caracterizada por uma característica marcante que é o crescimento excessivo dos cílios culminando com um aumento no comprimento final dos mesmos, denominado de tricomegalia (35). O hipogonadismo ocorre em metade dos pacientes, e quase todos documentaram baixos valores de gonadotrofinas durante a puberdade, com subsequente disfunção reprodutiva. A atrofia coriorretiniana é tipicamente observada nos primeiros 5 anos de vida (36).

Outra síndrome rara é a de Woodhouse-Sakati, doença genética autossômica recessiva, caracterizada por um espectro fenotípico que inclui hipogonadismo, invariavelmente associada a redução do IGF1 e alopecia frontotemporal que começa na infância, com gravidade variável, surdez bilateral, distonia cervicofacial e dor nos membros (42% dos casos, aumentando para 89% depois de 25 anos) e diabetes (66%, subindo para 96% depois de 25 anos) (37). O gene responsável é o *DCAF17* e até hoje somente nove mutações foram relatadas na literatura (38).

Além dessa tríade, alguns pacientes apresentaram deficiência intelectual com fenótipo muito semelhante à síndrome de Woodhouse-Sakati, a chamada síndrome ANE (alopecia, neurologic defects, and endocrinopathy), relacionada ao gene *RBM28*, também associada a perda capilar de gravidade variável, variando de alopecia completa a cabelos quase normais, com ausência de pelos no corpo (39). Todos os pacientes apresentaram retardo mental

moderado a grave e deterioração motora progressiva durante a segunda década de vida associada ao HHC com relatos de puberdade atrasada ou ausente e em alguns casos, insuficiência adrenal central (40).

Outro exemplo raro é uma síndrome complexa descrita recentemente, que inclui HHC associado a hipotireoidismo central, polineuropatia desmielinizante periférica, retardo mental e hipoglicemia com progressão para diabetes mellitus insulino dependente, associado a uma mutação em homozigose no *DMXL2* (41).

O HHC também é uma característica de algumas síndromes associadas à obesidade, incluindo a síndromes de Bardet-*Biedl*, e de Prader-Willi. A síndrome de Prader-Willi é a mais frequente das síndromes que possui a obesidade como uma de suas características, com incidência de 1:25.000 nascimentos. É caracterizada pela associação com HHC além de uma constelação de manifestações, como hipotonia neonatal com dificuldade de sucção, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, hiperfagia, obesidade, baixa estatura em adolescentes, mãos e pés pequenos, distúrbios do sono, características faciais dismórficas, deficiência intelectual leve a moderada e comportamento obsessivo-compulsivo (42).

A síndrome de Prader-Willi pode ser considerada uma doença autossômica dominante e é causada pela exclusão ou interrupção de um gene ou de vários genes no braço longo proximal do cromossomo 15 paterno ou dissomia uniparental materna 15, porque o (s) gene (s) no cromossomo materno (s) 15 são virtualmente inativos por meio de *imprinting* (43).

E por fim, recentemente descrita (44) em associação com o HHC, uma família com síndrome de Gorlin, também conhecida como síndrome do carcinoma basocelular nevoide, causada por mutações no gene *PTCH1*, caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos queratocistos mandibulares e/ou carcinomas basocelulares (45, 46).

A **Tabela 1** mostra um resumo das síndromes com as suas principais características clínicas e seus respectivos genes relacionados.

Tabela 1 – Principais síndromes complexas hereditárias que incluem o hipogonadismo hipogonadotrófico parte do fenótipo e respectivos genes associados seguindo

Síndrome	Gene / região cromossômica	Principais características
Síndrome CHARGE	<i>CHD7</i>	HHC Coloboma da íris Cardiopatía congênita Atresia de coanas Retardo no crescimento e desenvolvimento Hipoplasia genital e/ou de vias urinárias Anomalias dos pavilhões auriculares/surdez
Síndrome de Waardenburg	<i>SOX10</i>	HHC Surdez neurosensorial Hipopigmentação na pele, cabelos ou olhos Doença de Hirschsprung Neuropatia desmielinizante periférica Leucodistrofia desmielinizante
Síndrome de Oliver-McFarlane	<i>PNPLA6</i>	HHC Tricomegalia Atrofia coriorretiniana grave Deficiências de hormônios GH e TSH
Síndrome de Boucher-Neuhäuser	<i>PNPLA6</i>	HHC Ataxia espinocerebelar Distrofia/degeneração retino-coroidiana
Síndrome de Gordon Holmes	<i>RNF216</i> <i>OTUD4</i>	HHC Distrofia coriorretina Ataxia espinocerebelar Atrofia cerebelar
Ataxia Espinocerebelar 16	<i>STUB1</i>	HHC Ataxia cerebelar
Síndrome 4H	<i>POLR3A</i> <i>POLR3B</i>	HHC Leucodistrofia hipomielinizante Oligodontia
Síndrome da poliendocrinopatia-polineuropatia	<i>DMXL2</i>	HHC Poli neuropatia desmielinizante periférica Retardo mental Hipotireoidismo central Hipoglicemia com progressão para diabetes mellitus insulínodépendente
Síndrome de Warburg Micro Síndrome de Martsolf	<i>RAB3GAP1</i> <i>RAB3GAP2</i> <i>RAB18</i> <i>TBC1D20</i>	HHC Microcefalia Displasia cortical Alterações oculares
Síndrome de Woodhouse-Sakati	<i>DCAF17</i>	Alopecia HHC Distúrbios neurológicos
Síndrome ANES	<i>RBM28</i>	HHC Alopecia Defeitos neurológicos Endocrinopatias

Hipoplasia adrenal congênita ligada ao X	<i>NR0B1</i>	HHC Insuficiência adrenal primária
Síndrome de Bardet-Biedl	<i>BBS1-18</i>	HHC Obesidade Distrofia retiniana Polidactilia Malformações renais Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
Síndrome de Prader-Willi	<i>15q11.2</i>	HHC Obesidade, polifagia, hipotonia Mãos e pés pequenos Características faciais dismórficas, Atraso do desenvolvimento neuropsicomotor
Síndrome de Gorlin-Goltz	<i>PTCH1, PTCH2, SUFU</i>	HHC Carcinomas basocelulares múltiplos, cistos epidermóides da pele, foice do cérebro calcificada, circunferência craniana aumentada, anomalias das costelas (bífidas, fusionadas, chanfradas, parcialmente ausentes), hipertelorismo ocular leve, espinha bífida oculta das vértebras cervicais ou torácica, fibroma ovariano

Tabela elaborada pelo autor.

1.5 - Evolução da biologia molecular a no HHC

Nos últimos anos, o Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 desenvolveu uma linha de pesquisa caracterizada pelo estudo dos genes potencialmente relacionados aos distúrbios do desenvolvimento, incluindo o HHC. Inicialmente, a identificação das causas genéticas dos pacientes com HHC era realizada por meio do rastreamento de genes candidatos, empregando a metodologia de sequenciamento genético conhecida como técnica de Sanger (47). Por meio dessa técnica, diversas variantes patogênicas foram descritas, porém a manutenção desta metodologia na rotina diagnóstica era difícil devido ao aumento expressivo do número de genes candidatos no HHC no decorrer dos anos e também pelo fato de haver grande variabilidade na apresentação clínica desses pacientes, podendo um mesmo gene ser responsável por fenótipos diferentes, como discutido anteriormente (8, 48-51).

Com a permanência da maior parte dos casos de HHC sem diagnósticos molecular, assim como o avanço das tecnologias moleculares e maior conhecimento das bases genéticas fisiopatológicas da doença, metodologias direcionadas a buscar alterações não detectáveis por meio de sequenciamento simples passaram a ser utilizadas. Dessa maneira, ampliou-se a direção da pesquisa molecular no LIM42 para alterações maiores como deleções e/ou duplicações de um ou mais exons nos genes já associados ao HHC.

Passou a ser empregado em alguns casos da casuística, a técnica de amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA – *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), considerada uma alternativa mais rápida e economicamente mais viável que outras técnicas moleculares (52). O MLPA permite a avaliação de aproximadamente 45 sequências do genoma em um único experimento, sendo capaz de detectar deleções e duplicações em diversos genes ou regiões cromossômicas (53). Por meio da MLPA, identificaram-se alterações maiores como a deleção completa de todos os exons do gene *FGFR1* em uma paciente do sexo feminino com HHC, bem como duas deleções de múltiplos exons (exons 1–2 e 3–14) no *ANOS1* em dois pacientes com síndrome de Kallmann (51, 54). Com essa técnica é possível avaliar diversas regiões genômicas, porém é necessário uma suspeita clínica para direcionar a pesquisa para um *kit* específico para direcionar a pesquisa na região genômica suspeita (55). Além disso, é importante destacar que a principal limitação da técnica de MLPA é que não é possível visualizar a localização cromossômica da alteração, assim como as translocações não são detectadas.

Ao longo dos anos, novas metodologias de sequenciamento foram desenvolvidas visando o sequenciamento simultâneo de diversas regiões do genoma, com maior velocidade e menor custo como o uso do sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE). Com essa

metodologia, tornou-se possível que vários genes fossem analisados em uma única reação com baixo custo relativo, viabilizando o uso dessas novas técnicas de sequenciamento na rotina diagnóstica de diversas doenças. Com as novas técnicas de sequenciamento genético o diagnóstico molecular vem aumentando para até 50% (3). Apesar do SPLE ser uma ferramenta muito útil para o rastreamento de genes já conhecidos no HHC, não é tão eficiente na identificação de novos genes associados ao HHC. A função mais adequada para o painel de genes seria a de fazer um rastreamento dentre genes já conhecida e associados a uma doença, que tipicamente tenha vários genes como causadores do fenótipo. Uma pesquisa da literatura, bem como do *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men; <http://HHCn.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)*, mostra que condições que combinam fenótipos sindrômicos e deficiência de gonadotrofinas são pouco frequentes. Porém, uma análise mais profunda do fenótipo clínico revela que a deficiência mental é frequentemente observada nessas síndromes, além de surdez, algumas manifestações neurológicas e oftalmológicas. Em alguns pacientes, a puberdade tardia é o primeiro sinal clínico de um distúrbio neurodegenerativo associado à demência em idade adulta (56).

Dessa maneira, o maior conhecimento do amplo espectro clínico possível no HHC é importante tanto para a identificação de novos genes ou regiões genômicas importantes que possibilitem maior conhecimento dos mecanismos biológicos dessa doença, assim como a identificação do hipogonadismo hipogonadotrófico pode ser a primeira manifestação de um complexo sindrômico, como discutido acima, que pode auxiliar não apenas no diagnóstico etiológico como no tratamento mais precoce que pode contribuir para menor morbidade e melhor qualidade de vida desses pacientes.

1.6 - Variações do número de cópias (*Copy number variation – CNV*)

As formas de variações genéticas envolvem desde mutações em ponto, que alteram um único par de bases, pequenas duplicações, inserções ou deleções (mutações indel) até grandes rearranjos cromossômicos que podem ser detectados citogeneticamente usando um microscópio. O termo variação do número de cópias ou *copy number variation (CNV)* se refere a uma mudança no número de cópias de um determinado segmento genômico de escala intermediária, muito grandes para ser identificados no sequenciamento gênico, mas submicroscópicos, ou seja, pequenas para serem identificadas com técnicas de hibridização *in situ* ou cariotipagem, englobando em geral segmentos maiores que 1Kb, mas tipicamente menores que 5 Mb. As CNVs incluem tanto cópias adicionais de sequência (duplicações) quanto perdas de material genético (deleções) (56). A pesquisa de CNVs é bastante utilizada na investigação molecular de fenótipos sindrômicos complexos como o atraso de desenvolvimento neuropsicomotor, transtornos do espectro do autismo, bem como o retardo

mental e deficiência intelectual (57-59).

As CNVs são geralmente herdadas e sua frequência varia dependendo do tamanho considerado na alteração, mas estimativas sugerem que mais de 12% do genoma de qualquer indivíduo pode envolver alterações em número de cópias, ou seja, indivíduos normais e saudáveis também são portadores de CNVs (52, 57, 58) Com o uso progressivo da citogenética molecular, as CNVs têm surgido como fonte significativa de variabilidade genética, sendo implicadas em aspectos da diversidade populacional, bem como em etiologia ou predisposição de doenças individuais (59).

A implicação das CNVs em manifestações clínicas relevantes depende da região envolvida, podendo representar desde variantes polimórficas benignas, até traços mendelianos ou esporádicos, ou estar associados a doenças complexas devido a diversos mecanismos moleculares como: dosagem gênica, ruptura de genes, fusão gênica ou ainda efeito posicional (60). Assim, uma caracterização clínica detalhada é de extrema importância.

1.7 - Interpretação das CNVs: relevância clínica

A patogenicidade das CNVs pode ser resultante de alteração no balanço da dosagem gênica ou por uma disfunção do gene. As CNVs intragênicas ou que envolvem um único gene podem ter efeitos semelhantes a mutações de ponto, apresentando características de uma herança mendeliana. De outra forma, CNVs maiores, compreendendo diversos genes, podem criar um grande espectro fenotípico, sendo denominadas “desordens genômicas” (61).

Ainda existem dificuldades na interpretação das CNVs para distingui-las entre aquelas que retratam a diversidade genética humana ou as que estão relacionadas a um quadro clínico específico. Na interpretação das CNVs, foca-se na relevância clínica dos achados, com a tentativa de classificar as CNVs encontradas em patogênicas ou clinicamente relevantes, provavelmente patogênicas, de significado incerto ou benignas. Diferentes ferramentas podem ser utilizadas para investigar as CNVs no genoma, determinando os pontos de quebra e avaliando o número de cópias presentes por indivíduo (62). Dessa forma, podemos classificar as CNVs relacionando-as com as características fenotípicas do paciente e com as informações reunidas em diversos bancos de dados, como por exemplo, o Database of Genomic Variants (DGV), no qual descreve variantes estruturais presentes em indivíduos saudáveis, e o Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER), que lista alterações genômicas associadas a um fenótipo clínico, dentre outros bancos de dados (58).

O SNP Array é a ferramenta mais indicada pela Academia Americana de Genética (*American College of Medical Genetics -ACMG*) para o estudo de síndromes genéticas causadas por alterações cromossômicas, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, autismo e anomalias congênitas de causa desconhecida. Trata-se de uma metodologia capaz de identificar CNVs como microdeleções e microduplicações, que não são detectáveis pelo exame de cariótipo com banda G, além de possibilitar a avaliação de grandes regiões de perda de heterozigose (LOH) e dissomia uniparental (63).

Recentemente identificamos uma deleção em heterozigose de toda a região codificadora do gene *SOX10* em uma paciente com síndrome de Kallmann e surdez associada que já havia sido submetida a pesquisa de mutações pelo painel dos genes de HHC por SPLE sem resultados. Esse diagnóstico somente foi possível, pois após a realização do sequenciamento, adotamos um protocolo de rastreio de possíveis pequenas CNVs realizado por meio da ferramenta CONTRA (*Copy Number Analysis for Targeted Resequencing*) (3).

A partir de então, vimos a importância da avaliação desses pacientes sem diagnóstico molecular definido por Sanger ou pelo SPLE, por uma técnica capaz de detectar grandes deleções ou duplicações haja vista que uma importante limitação destas metodologias se encontra na necessidade de escolha de uma região específica previamente identificada e a incapacidade de detectar grandes perdas ou ganhos, restringindo a abrangência destas análises no estudo do genoma humano.

Muitos estudos têm descrito a associação de CNVs com quadros clínicos específicos. No campo da Endocrinologia, a cariotipagem molecular tem sido usada como ferramenta na identificação de causas genéticas para diversas condições, incluindo falência ovariana prematura, obesidade severa de início precoce, hipotireoidismo congênito e disgenesia tireoideana, desordens da diferenciação sexual, defeitos esqueléticos com déficit de crescimento e síndrome de Silver-Russell (64).

No campo específico do HHC, há poucas descrições de alterações causadas por CNVs na literatura. Izumi *et al* (2014) pesquisaram 58 pacientes com HHC, incluindo HHC normósmico, SK, deficiência hipofisária múltipla e síndrome CHARGE e encontraram uma deleção de 5,1 Mb englobando todos os exons do *FGFR1*, além de exons de 29 outros genes e pseudogenes não associados ao HHC em um paciente com SK (65).

Até o presente momento, o estudo de CNVs ainda não foi utilizado em uma grande coorte de pacientes com HHC. Acreditamos que o uso dessas metodologias possibilitará o diagnóstico etiológico em parte desses paciente

2. OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Pesquisar a presença de deleções ou duplicações submicroscópicas em um grupo selecionado de pacientes com HHC sem diagnóstico molecular estabelecido.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de variações no número de cópias patogênicas em um grupo de pacientes HHC sem causa definida.
- Estabelecer a correlação entre o genótipo mutante e o fenótipo observado nesses pacientes e segregá-los entre os outros membros da família.
- Identificar novas regiões cromossômicas e/ou novos genes possivelmente relacionados à etiologia do HHC.

3- MÉTODOS

3- MÉTODOS

3.1 - Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde 466/2012. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os pacientes ou seus responsáveis legais (Anexo 1).

3.2 - Pacientes

Foram selecionados 50 pacientes não relacionados, portadores de HHC, atendidos no ambulatório da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP - São Paulo (HCFMUSP).

Os critérios clínicos para definição de HHC foram: falta de aparecimento ou desenvolvimento incompleto de caracteres sexuais secundários após os 16 anos nas meninas e 18 anos nos meninos, concentrações baixas de esteroides sexuais, associadas a concentrações baixas ou inapropriadamente normais de LH e FSH, ausência de deficiências hipofisárias combinadas e ressonância magnética da região hipotálamo-hipofisária sem evidências de anormalidades. A presença de anomalias olfatórias nos pacientes foi avaliada por meio do Teste Olfatórias desenvolvido pela Universidade da Pensilvânia (UPSIT - University of Pennsylvania Smell Identification Test), teste mundialmente utilizado e considerado por muitos como o padrão-ouro da avaliação olfatória.

Os pacientes foram selecionados a partir de uma grande coorte de 295 pacientes portadores de HHC estudados pelo laboratório LIM42. Todos os pacientes incluídos nesse estudo já haviam sido anteriormente submetidos ao estudo molecular por meio do sequenciamento dos genes classicamente associados ao HHC pelo método de Sanger, ou pelo sequenciamento paralelo em larga escala por meio de um painel de 36 genes selecionados relacionados ao HHC enumerados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Genes relacionados ao HHC avaliados nos pacientes por meio do sequenciamento paralelo em larga escala

Gene	GeneCards ID	Reference
<i>ANOS1</i>	GC0XM008528	Legouis <i>et al.</i> 1991 (66)
<i>FGFR1</i>	GC08M038411	Dodé <i>et al.</i> 2003 (67)
<i>FGF8</i>	GC10M101770	Falardeau <i>et al.</i> 2008 (68)
<i>GNRH1</i>	GC08M025419	Bouligand <i>et al.</i> 2009 (69)
<i>GNRHR</i>	GC04M067737	de Roux <i>et al.</i> 1997 (70)
<i>TAC3</i>	GC12M057009	Topaloglu <i>et al.</i> 2009 (9)
<i>TACR3</i>	GC04M103586	Topaloglu <i>et al.</i> 2009 (9)
<i>KISS1</i>	GC01M204190	Topaloglu <i>et al.</i> 2012 (71)
<i>KISS1R</i>	GC19P000917	de Roux <i>et al.</i> 2003/ Seminara <i>et al.</i> 2003 (72, 73)
<i>PROK2</i>	GC03M071820	Dodé <i>et al.</i> 2006 (74)
<i>PROKR2</i>	GC20M005301	Dodé <i>et al.</i> 2006 (74)
<i>CHD7</i>	GC08P060678	Kim <i>et al.</i> 2008 (25)
<i>FGF17</i>	GC08P022042	Miraoui <i>et al.</i> 2013 (75)
<i>SEMA3A</i>	GC07M083955	Young <i>et al.</i> 2012 (76)
<i>SEMA7A</i>	GC15M074409	Känsäkoski <i>et al.</i> 2014 (77)
<i>IL17RD</i>	GC03M057124	Miraoui <i>et al.</i> 2013 (75)
<i>HS6ST1</i>	GC02M128236	Tornberg <i>et al.</i> 2011 (78)
<i>RNF216</i>	GC07M005661	Margolin <i>et al.</i> 2013 (79)
<i>DUSP6</i>	GC12M089347	Miraoui <i>et al.</i> 2013 (75)
<i>WDR11</i>	GC10P120851	Kim <i>et al.</i> 2010 (80)
<i>POLR3A</i>	GC10M077969	Saitsu <i>et al.</i> 2011 (81)
<i>POLR3B</i>	GC12P106357	Saitsu <i>et al.</i> 2011 (81)
<i>FLRT3</i>	GC20M014322	Miraoui <i>et al.</i> 2013 (75)
<i>SPRY4</i>	GC05M142272	Miraoui <i>et al.</i> 2013 (75)
<i>SOX10</i>	GC22M039963	Pingault <i>et al.</i> 2013 (22)
<i>NSMF</i>	GC09M137447	Miura <i>et al.</i> 2004 (82)
<i>MKRN3</i>	GC15P024015	Abreu <i>et al.</i> 2013 (83)
<i>MSX1</i>	GC04P004861	Xie <i>et al.</i> 2013 (84)
<i>OTX2</i>	GC14M056799	Diaczok <i>et al.</i> 2008 (85)
<i>EBF2</i>	GC08M025841	Trarbach <i>et al.</i> 2005 (86)
<i>GHSR</i>	GC03M172443	Howard <i>et al.</i> 1996 (87)
<i>IGSF1</i>	GC0XM131273	Sun <i>et al.</i> 2012 (88)
<i>DMXL2</i>	GC15M051447	Tata <i>et al.</i> 2014 (89)
<i>IGSF10</i>	GC03M151425	Howard <i>et al.</i> 2016 (90)
<i>IGFALS</i>	GC16M001790	Domene <i>et al.</i> 2004 (91)
<i>PNPLA6</i>	GC19P007534	Topaloglu <i>et al.</i> 2014 (29)

Adaptado Amato *et al.*, 2019 (3)

Da coorte inicial de 295 pacientes, 200 foram excluídos inicialmente devido a definição prévia do diagnóstico molecular, falta de material biológico ou perda de seguimento ambulatorial. Entre os 95 pacientes restantes, 50 foram selecionados para serem avaliados no presente estudo, sendo, 35 homens e 15 mulheres; 21 com síndrome de Kallmann e 29 com HHC normósmico. Doze casos eram familiares ou provenientes de famílias consanguíneas, totalizando 24% dos pacientes (**Figura 4**). A média da idade de diagnóstico dos pacientes foi de 18 anos com idade máxima de diagnóstico aos 32 anos. As características clínicas dos pacientes estudados estão vão ser descritas na sessão de resultados.

Na seleção os pacientes foram priorizados aqueles com apresentação clínica mais variada com outros fenótipos associados, seja uma manifestação clínica sabidamente do próprio HHC ou não. Onze deles apresentavam alguma característica clínica adicional não relacionada ao quadro reprodutivo, como defeitos da linha da média, malformações renais, surdez, anormalidades esqueléticas, alterações neurológicas ou distúrbios psiquiátricos.

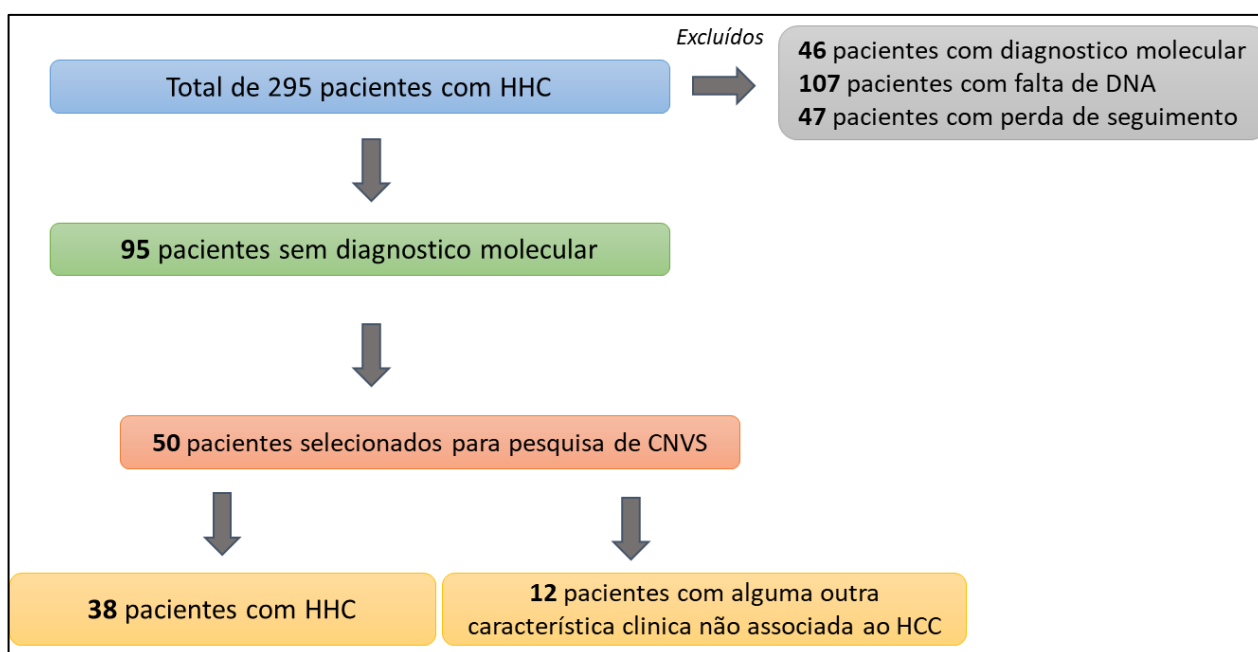


Figura 4 – Algoritmo da seleção dos pacientes analisados

3.3 - Extração de DNA genômico

As amostras de DNA foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico dos indivíduos incluídos na pesquisa. O DNA foi extraído e armazenado de acordo com procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM42 da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, baseado no método de Miller e colaboradores (92).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria (Biophotometer, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). O grau de pureza foi avaliado pela relação A260/280, sendo superior a 1,75. A integridade do material foi verificada com eletroforese em gel de agarose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a 1% em TAE (Tris 0,004 M; Ácido Acético Glacial; EDTA 0,001 M pH 8,0) contendo SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração de 0,1 µL/mL de gel com posterior visualização por transiluminação com luz ultravioleta para verificar sua integridade. Foram utilizados 500 ng do marcador de peso molecular λ DNA-HindIII digest (250 ng/WL) e 20 ng do λ DNA (10 ng/WL) (ambos Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) como padrão de massa. Em seguida, as amostras foram mantidas congeladas a menos 20° C até seu uso. A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 µg/mL). A relação ideal entre as leituras em 260 e 280 nm para a caracterização da pureza do material é superior a 1,75. As amostras serão mantidas congeladas a – 20 °C até seu uso.

3.4 - Técnica de SNP array

A técnica de *bead array* foi realizada utilizando o *Infinium CytoSNP-850K BeadChip*[®] da plataforma Illumina[®] (<https://HHCn.illumina.com>). Esse *BeadChip* compreende um painel de triagem do genoma contendo aproximadamente 850.000 sondas de oligonucleotídeos de 50 pb, com um espaçamento médio de 1,8 kb entre elas, abrangendo todo o genoma. As sondas são estrategicamente localizadas em todas as regiões de importância citogenética conhecidas, incluindo regiões subteloméricas, pericentroméricas e dos cromossomos sexuais. Segundo informações do fabricante a média da resolução mínima de detecção de CNVs para este *array* utilizando o *BeadChip CytoSNP-850K*[®] é de cerca de 18 kb.

Os experimentos foram realizados de acordo com instruções do fabricante (**Figura 5**), utilizando-se 4 µL de DNA em uma concentração final de 200 ng. As amostras extraídas foram transferidas para uma placa MSA3 específica para que o DNA pudesse ser desnaturado quimicamente e em seguida neutralizado por reagentes específicos fornecidos no *kit*. Em

seguida, foi realizada a etapa de amplificação genômica, na qual as amostras foram incubadas a 37 °C por 20-24 horas. Na etapa seguinte, pós-PCR, o DNA foi fragmentado por ação de uma enzima (reagente FMS) e em seguida precipitado utilizando-se os reagentes 2-propanol e PM1. A placa com as amostras foi mantida invertida por pelo menos uma hora em temperatura ambiente para que o *pellet* pudesse secar. Em seguida, o DNA precipitado foi ressuspenso com um reagente denominado RA1 e aplicado no *BeadChip*. Este foi incubado a 48°C por aproximadamente 16 horas para que ocorresse a hibridação das amostras nas sondas específicas. Terminada a etapa da hibridação, o *BeadChip* foi lavado e preparado para o processo de coloração. Nesta etapa o DNA não hibridado foi removido e os nucleotídeos (A, T, C e G) foram adicionados, seguindo para a etapa de coloração dos nucleotídeos hibridados com fluorocromos específicos (A e T – marcação em vermelho; C e G – marcação em verde) (**Figura 6**). Após a lavagem, a intensidade dos sinais foi medida por um *laser scanner* por meio do equipamento *iScan System*[®] (Illumina[®]), e os arquivos GTC gerados foram analisados com o auxílio do *software* específico disponibilizado, *BlueFuse Multi 4.3*[®] (BlueGnome[®])

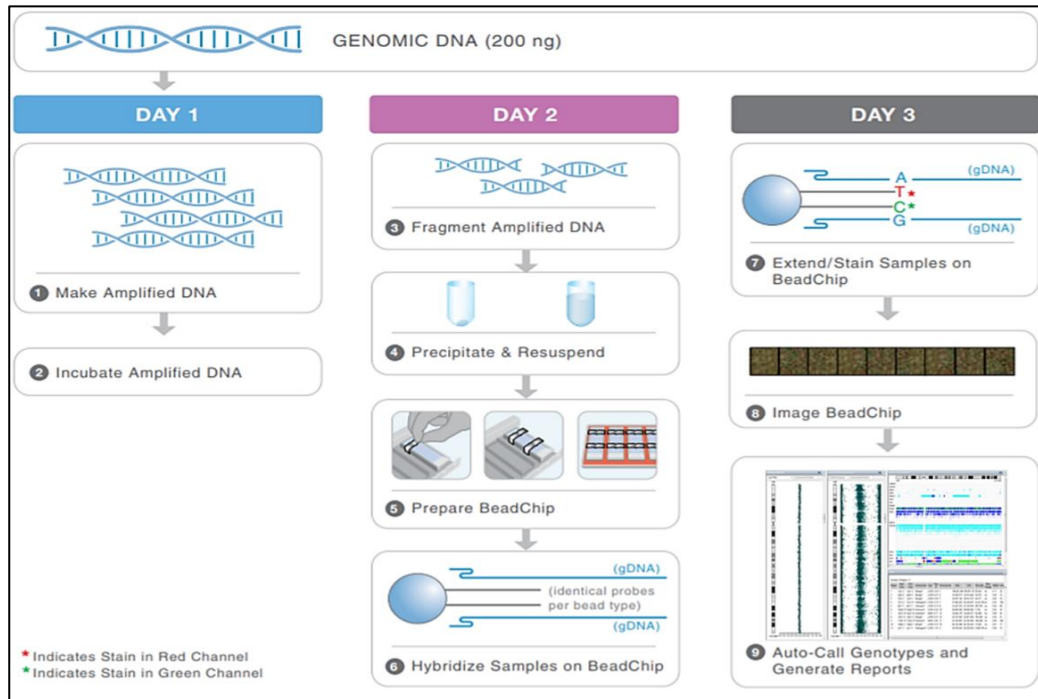


Figura 5. Técnica de *array* da plataforma Illumina®: A amostra de DNA é isotermicamente amplificada *overnight* (passos 1 e 2). O produto amplificado é então fragmentado por um processo enzimático controlado (passo 3), seguindo para os passos de precipitação alcoólica e ressuspensão do DNA (passo 4). Após, o *BeadChip* é preparado para a hibridação (passo 5), as amostras são aplicadas e incubadas *overnight*. Estas, durante o passo de hibridação, se anelam às sondas específicas de 50-*mers* presentes na superfície das *beads* de sílica (passo 6). Cada *bead* apresenta em sua superfície várias sondas iguais correspondentes a uma região genômica específica. Após a hibridação, o alelo específico é determinado por extensão de base com subsequente coloração fluorescente (passo 7). As intensidades da fluorescência das *beads* são detectadas pelo *scanner* (passo 8) e os dados são analisados por *softwares* específicos (passo 9)

Referência: https://support.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/workflows/workflow_infinium.pdf.

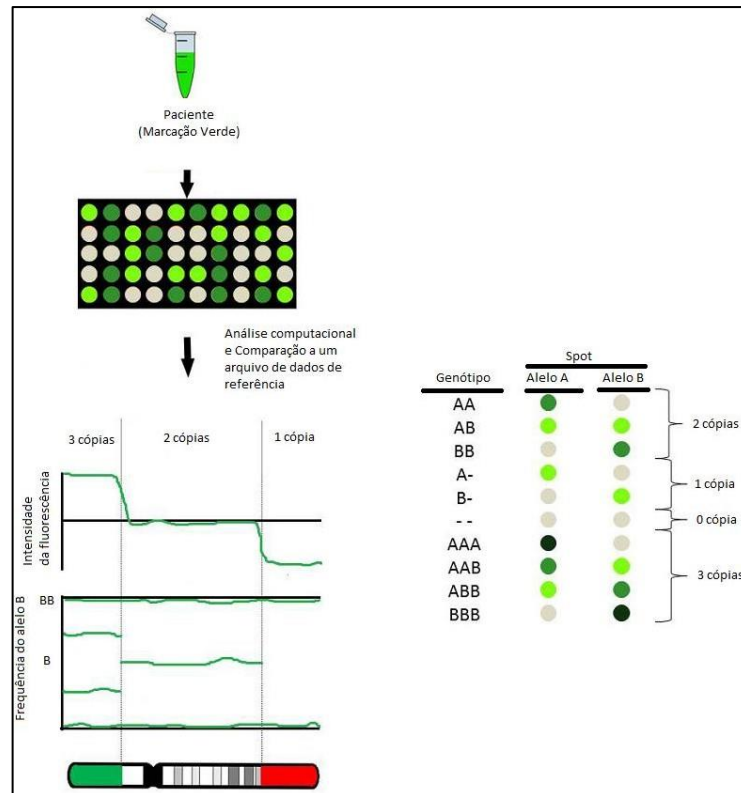


Figura 6. Metodologia de *SNP-array*: DNA do paciente é marcado usando um fluorocromo e subsequentemente hibridado a uma lâmina de *microarray*. Cada *spot* na lâmina representa um alelo A ou B para um *locus* específico no genoma. O DNA hibrida nas sondas com sequência complementar. Após a hibridação, a lâmina é escaneada por um aparelho que mede a fluorescência de cada sonda. A intensidade da fluorescência para cada *locus* e para cada alelo em um determinado *locus* é calculada. Um *locus* heterozigoto (AB) mostrará intensidade igual para ambos os alelos. Um alelo homozigoto (AA ou BB) mostrará maior intensidade para o alelo presente (A ou B). Informações sobre o número de cópias podem ser extrapoladas destes dados. O *software* de análise compara os dados a um arquivo de referência *in silico* e plota cada sonda ao longo do comprimento do cromossomo dependendo da sua localização e intensidade de fluorescência; também plota separadamente a frequência do alelo B (*B Allele Frequency* - BAF), de acordo com a proporção das intensidades de fluorescência dos alelos A e B. (Modificado de Karampetsou et al 2014) (93).

3.5 - Análise de bioinformática

A análise dos dados brutos do *array* foi realizada por meio do *software BlueFuse Multi*[®] 4.3 (BlueGnome[®]), assim as amostras foram normalizadas e parâmetros foram selecionados para que as alterações pudessem ser identificadas.

As CNVs e as regiões de homozigose (ROH - copy neutral runs of homozygosity) foram identificadas a partir dos gráficos B Allele Frequency (BAF) e Log R Ratio (LRR). Deste modo, os gráficos de BAF representaram a frequência alélica e possuíam valores que variavam de 0 a 1, sendo que regiões diploides normais apresentavam sondas distribuídas em 0, 0,5 e 1, regiões de homozigose exibiam sondas com valores de BAF em 0 e 1, e áreas de alteração alélica apresentavam valores intermediários (deleção – valores das sondas em 0 e 1; e duplicação – valores das sondas em 0, 0,25, 0,75 e 1). Já os gráficos de LRR representaram o número de cópias genômicas, sendo que valores em 0 referiram-se a duas cópias, valores menores a deleções e valores maiores a duplicações (**Figura 7**) (LaFramboise, 2009). Foram consideradas as deleções e as duplicações que envolviam pelo menos 10 sondas consecutivas, e as ROHs que envolviam pelo menos 500 sondas consecutivas e 3 Mb de tamanho (**Figura 8**). Além disso, todas as alterações foram checadas para que fossem obtidas apenas as CNVs e as ROHs verdadeiras.

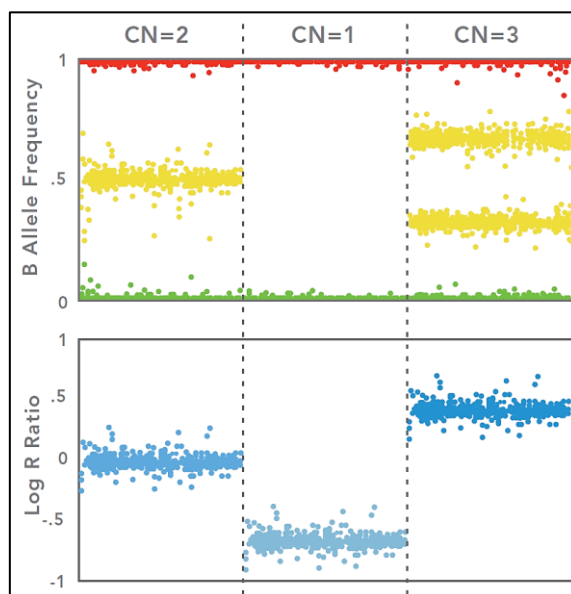


Figura 7 – Representação gráfica dos resultados obtidos por meio da técnica de *array*. CN=2 refere-se ao resultado normal (duas cópias genômicas), CN=1 representa a deleção (uma cópia genômica), e CN=3 equivale à duplicação (3 cópias genômicas).

Referência: https://HHCn.illumina.com/documents/products/datasheets/datasheet_cytogenetics.pdf.

Array Parameters

Microarray Type
 Illumina CytoSNP-850K v1.1

Region Sizes

Minimum Del Size - exclusively backbone (Kb)	0
Minimum Del Size - including disease (Kb)	0
Minimum Dup Size - exclusively backbone (Kb)	0
Minimum Dup Size - including disease (Kb)	0
Minimum LOH Region Size (Mb)	3

Significant Clones

Minimum Number of Clones - CGH region	10
Minimum Number of Clones - LOH region	500

Smoothing

Smoothing Parameter - backbone (clones)	9
Smoothing Parameter - disease (clones)	9

Figura 8 – Parâmetros utilizados no *software BlueFuse*[®] para análise das CNVs e das ROHs por meio da técnica de *array*

3.6 – Interpretação das CNV's

As coordenadas genômicas dos segmentos cromossômicos considerados CNVs na análise do *SNP-array* foram dispostas de acordo com o Human Genome Building de referência GRCh37/hg19 disponíveis no site do Genome Reference Consortium Human Genome a seguir: <http://HHCn.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/>.

Como exposto, as CNVs são comuns e também presentes em indivíduos da população em geral (94). Dessa maneira, o primeiro passo no processo de interpretação das CNVs, é saber se existe evidência da patogenicidade daquela CNV em bancos de dados públicos e realizar a exclusão de CNVs comuns, provavelmente benignas e que não estão envolvidas no fenótipo clínico (95). Outro critério importante para classificação da CNV é se a região comprometida

se sobrepõe a uma coordenada genômica já anteriormente publicada ou bem reconhecida com certo desequilíbrio cromossômico associado com alguma doença ou síndrome. Além disso, devem ser consideradas as características morfológicas da CNV, como tamanho e tipo de CNV, com perda ou ganho de número de cópias, assim como conteúdo gênico, incluindo o comprometimento de um gene importante, o número de genes envolvidos, o comprometimento de uma região gênica que seja fundamental para codificação de proteínas, ou quaisquer elementos conhecidos funcionalmente importantes. Por outro lado, o envolvimento de uma região com genes/regiões genômicas sabidamente benignas ou uma região de haploinsuficiência estabelecida/prevista já direciona para uma classificação de benignidade. E por fim, a ocorrência da CNV nos genitores (segregação familiar) também é um dado avaliado para considerar a patogenicidade (96, 97).

Para a análise do significado clínico das variantes, a primeira etapa neste estudo foi a comparação das CNVs com dados de indivíduos sem doenças genéticas referidas (controles), presentes na plataforma *Database of Genomic Variants (DGV)*. Portanto, CNVs foram classificadas como benignas quando CNVs similares foram encontradas com frequência >1% em controles não afetados. (98) Após ter excluído as CNVs comuns, as restantes foram consideradas candidatas à patogenicidade. Uma vez constatado que a CNV identificada é rara, bancos de dados públicos estão disponíveis e contém informação de CNVs patogênicas. Portanto, o segundo princípio usado foi a busca das CNVs em indivíduos com fenótipos alterados, depositados no banco de dados *Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER)* (99), banco de dados que descreve desequilíbrios cromossômicos e seus fenótipos associados, assim como pelo *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Men; <http://HHCn.ncbi.nlm.nih.gov/omim>)*.

Os fenótipos descritos para tais pacientes portadores de CNVs foram sobrepostos as de nossos pacientes para verificar uma possível sobreposição com o fenótipo do presente estudo. Avaliamos se as CNVs apresentavam sobreposição em regiões genômicas que são definidas como clinicamente significantes, tais como regiões subteloméricas ou regiões de síndromes conhecidas que são provavelmente patogênicas por natureza. E para fins de diagnóstico, essas CNVs devem incluir a região crítica da síndrome. Dessa maneira, o terceiro critério usado foi o conteúdo gênico das CNVs encontradas, realizando-se sua anotação e sua avaliação através do *UCSC (University of California, Santa Cruz)* e *GeneCards*.

O conteúdo gênico incluiu o número total de genes codificadores, bem como a presença de genes com função associada a processos de desenvolvimento puberal ou ainda a presença de genes cujos modelos animais apresentassem prejuízo no eixo gonadotrófico. Para análise do papel dos genes contidos nos segmentos dessas CNVs, consultamos o banco de dados

como OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*; <http://HHCn.nvbi.nlm.nih.gov/omim>) para avaliar tanto a relação de causa, como seu efeito fenotípico conhecido de dosagem.

Para as CNVs *de novo*, especialmente aquelas que não foram observadas entre os indivíduos da população em geral e não coincidem com CNVs recorrentes observadas em indivíduos com fenótipos clínicos similares, muitos fatores podem ser usados para guiar a avaliação da sua relevância clínica, tais como tamanho, localização (intersticial, centromérica ou em regiões repetidas), tipo (deleção ou duplicação) e conteúdo gênico. (97, 100, 101) O tamanho da CNV está associado com o número de genes afetados, portanto a probabilidade de patogenicidade aumenta proporcionalmente com o tamanho da CNV. Dessa maneira, o tamanho das CNVs é um dos critérios de classificação de patogenicidade: as CNVs < 200 kb, classificadas como menores, são mais sugestivas de benignidade e as maiores que 500 kb são consideradas sugestivas de patogenicidade. As CNVs entre 200-500 kb, são consideradas de tamanho intermediário. É importante ressaltar aqui que o tamanho da CNV é apenas um dos critérios a ser avaliado em conjunto com outras características, não sendo um critério avaliado isoladamente, determinante da classificação. O tipo de alteração estrutural da CNV (deleção ou duplicação) é outro critério importante a ser considerado, tendo em vista que as duplicações são alterações genéticas melhor toleradas que deleções e, portanto, deleções têm uma probabilidade maior de serem patogênicas (100).

Juntamente com as CNVs patogênicas, as plataformas de *microarrays* também tem identificado muitas outras CNVs difíceis de serem categorizadas em benignas ou patogênicas, chamadas de variantes de significado incerto (VUS). As VUS são alterações que não foram previamente descritas, nem foram vistas (em frequência razoável) em indivíduos controle já estudados, por exemplo, na plataforma *Database of Genomic Variants* (DGV). E por fim, a análise da segregação das alterações nas famílias dos pacientes que seria interessante e um outro critério usado para pontuar na classificação da CNV, não foi realizada devido à falta de material genético dos familiares dos pacientes.

Os critérios de análise e as etapas de avaliação das CNVs bem como os sites das plataformas utilizadas estão resumidos seguir (**Tabela 3 e Tabela 4**)

Tabela 3: Critérios utilizados para a interpretação clínica das CNVs

CRITÉRIOS PRINCIPAIS	CNVs patogênicas	CNVs benignas
Alteração sobreposta a regiões descritas em indivíduos saudáveis como apresentando número de cópias variável em frequência aumentada (por exemplo, DGV)		X
Alteração sobreposta a regiões com duplicações e deleções reportadas em pacientes com fenótipos alterados (por exemplo, DECIPHER)	X	
CNV contém gene (s) OMIM (<i>categoria morbid</i>) ou já relacionados a doenças genéticas (PubMed)	X	
CNV rica em genes	X	
CNV pobre em genes		X
CRITÉRIOS SECUNDÁRIOS		
CNV é uma deleção	X	
CNV é uma duplicação		X
CNV é uma amplificação (ganho de mais de uma cópia)	X	
CNV de tamanho > 500KB	X	
CNV de tamanho < 200KB		X
CNV não tem genes		X

FONTE: adaptado Lee et al., 2007 (100)

Tabela 4: Bancos de dados disponíveis na internet para análise de dados de CNVs

Banco de dados	Endereço eletrônico	Propósito
Database of Genomic Variants (DGV)	http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home	Banco de dados de variantes benignas
Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources (DECIPHER)	http://decipher.sanger.ac.uk/	Banco de dados de variantes em afetados. Inclui fenótipo associado a cada alteração
National Center for Biotechnology Information (NCBI), inclui Online Mendelian Inheritance in Men (OMIM) e PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Banco de dados citogenômicos geral. Contém localização de genes, sondas, SNPs, variantes, etc.
UCSC Genome Browser	http://genome.ucsc.edu/	
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html	

FONTE: adaptado Kulikowski et al., 2013 (102)

Legenda: UCSC: University of California, Santa Cruz Genome Browser

4. RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1- Caracterização da casuística

A apresentação clínica dos pacientes está sintetizada na **Tabela 5**. A coorte foi constituída por 50 indivíduos adultos diagnosticados com HHC (35 homens e 15 mulheres), sendo 29 com HHC normósmico e 21 com síndrome de Kallmann. Doze pacientes apresentavam história familiar positiva para hipogonadismo ou atraso puberal, com alguns casos de familiares com hipogonadismo confirmado com exames laboratoriais, outros apenas sugestivos, com relatos de parentes de 1º ou 2º grau com ausência ou atraso de aparecimento de caracteres sexuais secundários, menarca tardia ou até infertilidade.

Todos os 25 pacientes do sexo masculino nos quais foi possível fazer o exame físico antes do início da reposição de testosterona apresentavam micropênis, com comprimento peniano variando entre 4,0 e 10 cm. Sete pacientes (20%) apresentavam criptorquidia, dois deles com apresentação bilateral. Dos 50 pacientes, 41 apresentavam hipogonadismo completo e nove apresentavam hipogonadismo parcial, sendo que dentre esses, dois homens evoluíram com reversão do hipogonadismo. Em relação as características fenotípicas não reprodutivas, cinco pacientes apresentavam déficit auditivo com diferentes graus de gravidade e lateralidade. Alterações renais foram detectadas em três casos: dois casos com redução volumétrica unilateral e um com ectasia pielocalicial também unilateral, nenhum deles com disfunção renal associada. A ocorrência de cistos renais não foi considerada devido a elevada prevalência na população geral e grau de benignidade dos achados. Um paciente apresentou cardiopatia congênita do tipo comunicação interatrial. As alterações esqueléticas descritas foram: clinodactilia (presentes em dois pacientes), encurtamento da quarta e quinta articulações metacarpofalangeanas (um paciente). Entre outros dismorfismos presentes, os mais frequentes foram: palato ogival, cúbito valgo, atresia de coanas em quatro, dois e um paciente respectivamente. Nenhuma das alterações esqueléticas ou dismórficas caracterizaram síndromes genéticas estabelecidas. Dentre as alterações neuropsicológicas, quatro pacientes apresentavam déficit cognitivo leve e um paciente foi diagnosticado com depressão grave com histórico de tentativa de autoextermínio e internação em clínica de reabilitação.

Tabela 5 – Apresentação clínica dos pacientes com HHC avaliados no estudo e os respectivos resultados encontrados no SNP array

ID	Gênero	Diagnóstico	História Familiar	Fenótipos associados	RM de SNC	SNP array	Tamanho (kb)	Cromossomo	Classificação
P1	M	SK	N		bulbos ausentes	del	46,1	7q35	PB
P2	M	HHCn	N		s/a	del	515,7	16p11.2	P
P3	M	SK	S	Déficit cognitivo	s/a	-			
P4	M	HHCn	N		s/a	-			
P5	M	HHCn	N		s/a	dup	40,6	7q36.1	VUS
P6	M	SK	S		bulbos ausentes	-			
P7	M	SK	N		bulbos hipoplásicos	-			
P8	M	SK	N		s/a	dup	474	12q24.32	PB
P9	M	SK	S	Ectasia pielocalicial a E, hiperextensão de cúbito, hipertrofia gengival, agenesia de 8 dentes, palato em ogiva.	bulbos ausentes	del	645,5	2q22.1q22.2	VUS
P10	M	HHCn	N		s/a	-			
P11	M	SK	N		s/a	-			
P12	M	HHCn	N		s/a	del del	121,7 230,1	5q33.1 13q33.3	VUS VUS
P13	M	SK	S		bulbos ausentes	-			
P14	M	SK	N		bulbos ausentes	-			
P15	M	HHCn	N		s/a	-			
P16	M	HHCn	S		s/a	dup	192	3q29	PB
P17	M	HHCn	N		s/a	-			
P18	M	SK	N			-			
P19	M	HHCn	N	Atraso no DNPM, microcefalia, estrabismo, palato ogival, rim E com dimensões reduzidas	s/a	-			
P20	M	SK	N	Surdez a E, rim E com dimensões reduzidas	s/a	-			
P21	M	SK	N	Atresia de coanas, cúbito valgo, desvio de mamilo direito, retificação da coluna, assimetria (dimídio D>E). Palato ogival.	s/a	-			
P22	M	HHCn	N		s/a		33,631,168	15q11	

P23	M	HHCn	N	Surdez bilateral, coloboma, microftalmia, comunicação interatrial	s/a				
P24	M	HHCn	S		s/a	-			
P25	M	SK	N	Hipoacusia bilateral, atraso cognitivo leve, asma, DM2 e características faciais dismórficas, como: rosto comprido com cabelo de implantação alta, epicantus, nariz em sela, ponte nasal achatada, orelhas grandes, sobrancelhas extensas e raras, ponte nasal larga e/ou deprimida, filtrum labial longo e boca pequena Clinodactilia.	ausência de bulbos e sulcos olfatórios rudimentares	dup	579,6	15q24.2	VUS
P26	M	HHCn	N		s/a	del	403,8	13q13.3q13.3	PB
P27	M	HHCn	N			del	598,8	3q26.31q26.32	P
P28	M	SK	S			dup	438,7		VUS
P29	M	SK	N		sulcos e bulbos olfatórios hipoplásicos	del	640,3		VUS
P30	M	SK	N	Surdez a E	sulcos e bulbos olfatórios hipoplásicos	dup	1,038,1	14q12	
P31	M	SK	N	Criptorquidia a direita	adenohípófise reduzida	-			
P32	M	SK	N		sulcos e bulbos olfatórios hipoplásicos	dup	320.9	15q26.3	VUS
P33	M	SK	N	4º e 5º MCF curtos, cúbito valgo, ictiose	s/a	-			
P34	M	HHCn	N		s/a				PB
P35	M	SK	N		sulcos e bulbos olfatórios hipoplásicos	-			
P36	F	HHCn	S		s/a	-			
P37	F	HHCn	N	Depressão, hepatopatia grave	s/a	dup	56,1		VUS
P38	F	HHCn	S		s/a				
P39	F	HHCn	N		s/a	-			
P40	F	HHCn	S			dup	148,4	Xp11.4	VUS

P41	F	HHCn	N		s/a	-			
P42	F	HHCn	N		s/a	-			
P43	F	HHCn	N	Surdez a E	s/a	-			
P44	F	HHCn	N		s/a	-			
P45	F	HHCn	S		s/a	-	415,998		VUS
P46	F	HHCn	N		s/a	-	25,373		VUS
P47	F	SK	N		sulcos e bulbos olfatórios hipoplásicos	-			
P48	F	HHCn	N		s/a	-			
P49	F	HHCn	N	Palato ogival	s/a	-	88.4	1p21.2	PB
P50	F	HHCn	S		s/a	-			

Legenda: M: masculino; F: feminino; E: esquerda; SK: Síndrome de Kallmann; HHCn: Hipogonadismo Hipogonadotrófico congênito normósico; DM2: Diabetes Mellitus tipo 2, Del: deleção; Dup: duplicação; MCF: metacarpofalangeanas; DNPM: desenvolvimento neuropsicomotor; s/a: sem alterações; PB: provavelmente benigna; P: patogênica; VUS: variante de significado incerto; D: direta; E: esquerda

4.2 - Resultados de SNP array no grupo estudado

A análise dos dados brutos obtidos após o processamento inicial permitiu a identificação de 21 CNVs em 19 pacientes. Todos os resultados alterados foram checados por reações independentes. As CNVs foram classificadas em benignas (B), provavelmente benignas (PB), variantes de significado incerto (VUS), provavelmente patogênicas (PP) e patogênicas (P) de acordo com a interpretação conjunta dos critérios citados na sessão de métodos.

Nenhuma dessas CNVs foi descrita no banco de dados de 400 controles saudáveis do Laboratório do Centro de Estudos do Genoma Humano do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Tampouco os segmentos foram considerados polimorfismos quando comparados com estudos do DGV.

Entre as CNVs encontradas, sete foram classificadas como provavelmente benignas, doze como de significado indeterminado e duas patogênicas. A menor alteração encontrada pelo *array* foi de cerca de 25 kb (paciente P46) e a maior foi de 1038 kb (paciente P30). A maioria dos pacientes apresentou apenas uma CNV, com exceção de dois pacientes: o paciente P24 apresentou três CNVs (2 PB e 1 VUS) e o P12, duas (ambas VUS). A **Figura 9** apresenta uma visão esquematizada da análise geral dos resultados. As CNVs encontradas estão descritas na **Tabela 6**.

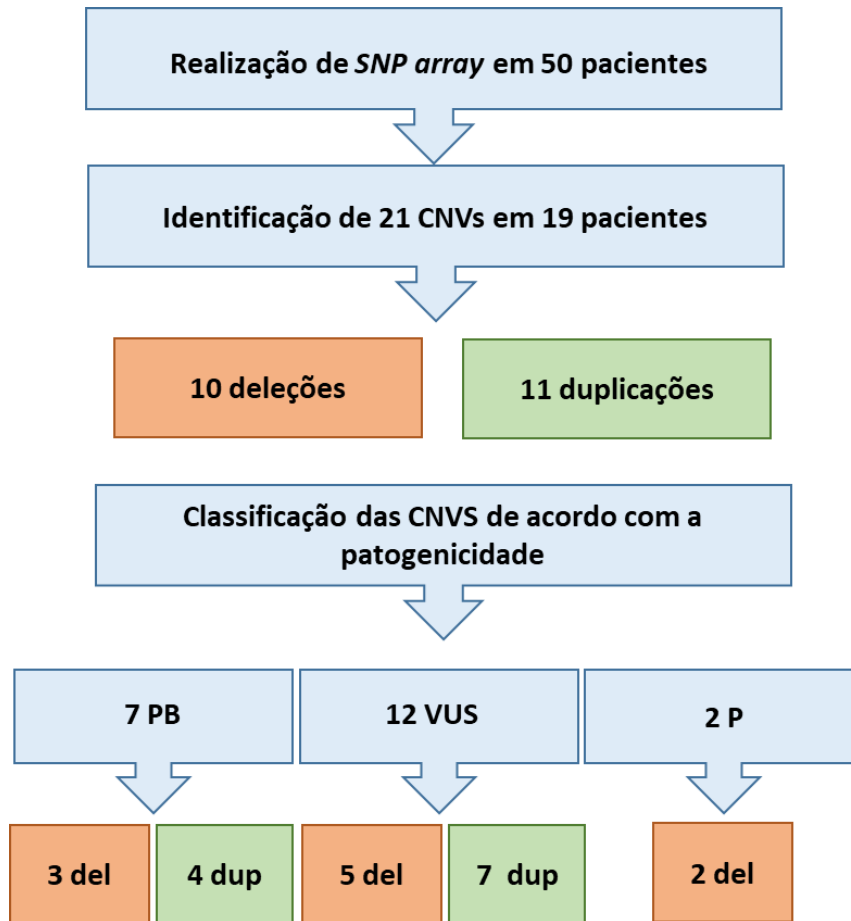


Figura 9: Fluxograma das CNVs obtidas a partir da avaliação dos participantes por *SNP-array*.

Tabela 6 - Variações do número de cópias genômicas (CNVs) patogênicas e de significado indeterminado identificadas nos pacientes com HHC avaliados no presente estudo

Identificação do paciente	Tipo de CNV	Identificação da CNV*	Tamanho (PB)	Localização Cromossômica	Início	Final	Classificação
P2	del	C1	515.747	16p11.2	28618318	29134064	Patogênica
P5	dup	C2	40.628	7q36.1	151945060	151985687	VUS
P9	del	C3	645.517	2q22.1q22.2	141683630	142329146	VUS
P12	del	C4	121.702	5q33.1	151097281	151218982	VUS
P12	del	C5	230.137	13q33.1	108691594	108921730	VUS
P24	dup	C6	579.684	3p25.1	15808707	16388390	VUS
P25	del	C7	598.804	15q24.2	75473227	76072030	Patogênica
P26	dup	C8	438.7	13q13.3q13.3	35603527	36042269	VUS
P27	del	C9	640.361	3q26.31q26.32	175081967	175722327	VUS
P30	dup	C10	1.038.102	14q12	27955485	28993586	VUS
P37	dup	C11	56.166	14q23.2	64360733	64416898	VUS
P41	dup	C12	148.474	Xp11.4	40464822	40613295	VUS
P46	dup	C13	415.998	12p13.33	1203900	1619897	VUS
P47	del	C14	25.373	2p22.2	36934513	36959885	VUS

Legendas: As CNVs foram identificadas pela letra C e seu respectivo numeral para facilitar a discussão. Del: deleção; Dup: duplicação; VUS: variante de significado incerto;

4.3 - Descrição clínica, SNP array e análise de bioinformática para caracterização do conteúdo gênico das variações

Entre os resultados mais importantes, destacamos duas CNVs classificadas como patogênicas e uma VUS em três pacientes do sexo masculino. As duas CNVs patogênicas foram identificadas em regiões cromossômicas com um número relevante de genes codificantes e associadas a síndromes conhecidas. A VUS em destaque contempla uma duplicação intragênica do *KMT2C*, envolvido na patogênese de uma síndrome complexa, possivelmente associada ao HHC em alguns casos.

4.3.1 - CNVs patogênicas

Foram encontradas duas CNVs classificadas como patogênicas pelos critérios do ACMG nos pacientes P2 e P25. Os detalhes e conteúdo gênico dessas CNVs estão descritos na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Conteúdo gênico das CNVs patogênicas encontradas nos pacientes utilizando a técnica de SNP array.

Paciente	CNV	Localização	Genes	RNAs*	Classificação
P2	Deleção 515 kb	chr16:28618318- 29134064	<i>SULT1A1, NPIPL1, EIF3C, EIF3CL, ATXN2L, AK125489, TUFM, SH2B1, ATP2A1, LOC100289092, RABEP2, NFATC2IP, CD19, LAT, RRN3P2, AK075019</i>	mRNA 4721	Patogênica
P25	Deleção 598 kb	chr15:75473227- 76072030	<i>C15ORF39, DNM1P34, SIN3A, NEIL1, MAN2C1, PTPN9, SNUPN, SNX33, CSPG4, IMP3, ODF3LI</i>	GOLGA6D, GOLGA6C, DQ588973 DQ582071, DQ577530, UBE2Q2, GOLGA6C, COMMD4, DNM1P35, BC016143, MIR4313	Patogênica

*RNAs mensageiros e microRNAs

Paciente P2

Paciente do sexo masculino, portador de HHC normósmico parcial, filho de pais não consanguíneos e saudáveis, iniciou seguimento no serviço de Urologia aos 30 anos de idade com queixa de infertilidade. Não apresentava queixa de alterações olfatórias ou atraso de desenvolvimento puberal, porém ao exame físico, apresentava volume testicular reduzido bilateralmente, o que foi confirmado posteriormente por ultrassonografia de bolsa escrotal (8,2 e 8,0 cm³). Exames complementares mostraram azoospermia ao espermograma, LH basal < 0.6 U/L (1,7 a 8,6), FSH < 1 U/L (1,5 a 12,4), Testosterona: 61 ng/dL (249 a 836). Ultrassonografia de abdome total e RM de sela túrcica sem alterações e cariótipo 46XY. Não foi possível caracterizar mais detalhadamente o fenótipo clínico, assim como realizar a evolução clínica e hormonal desse paciente, pois o mesmo perdeu o seguimento no ambulatório.

O SNP *array* evidenciou uma CNV do tipo deleção, de 515 kb, localizada no braço curto do cromossomo 16, com a coordenada genômica seguinte: *arr[GRCh37]: chr16(28618318-29134064)x1*, classificada como patogênica pelos critérios do ACMG. A deleção está representada graficamente nas **Figuras 10 e 11**. O estudo do DNA dos pais não foi realizado pois não tivemos acesso ao material genético dos familiares. A análise dessa CNV demonstrou tratar-se de uma CNV rara, não observada nos indivíduos saudáveis descritos na plataforma DGV. A região deletada abrange 10 genes descritos no banco de base OMIM (**Tabela 6**) e o comprometimento desta região está associada à Síndrome de microdeleção 16p11.2 (OMIM: [611913](#)). A maioria dos casos descritos dessa síndrome são deleções *de novo* na região 16p11.2 de tamanhos variáveis e a relação entre genótipo e fenótipo clínico permanece indefinida (103, 104). Na base de dados do *DECIPHER*, são descritos diversos pacientes com deleções da região 16p11.2 com fenótipos diversos, entre os mais prevalentes: autismo, comportamento agressivo, ansiedade e malformações de sistema nervoso central. No entanto, não há nenhuma descrição de fenótipo sugestivo hipogonadismo associado à microdeleção do 16p11.2.

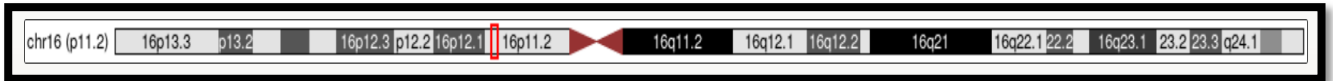


Figura 10 - Ideograma ilustrando o cromossomo 16 com destaque na região p11.2

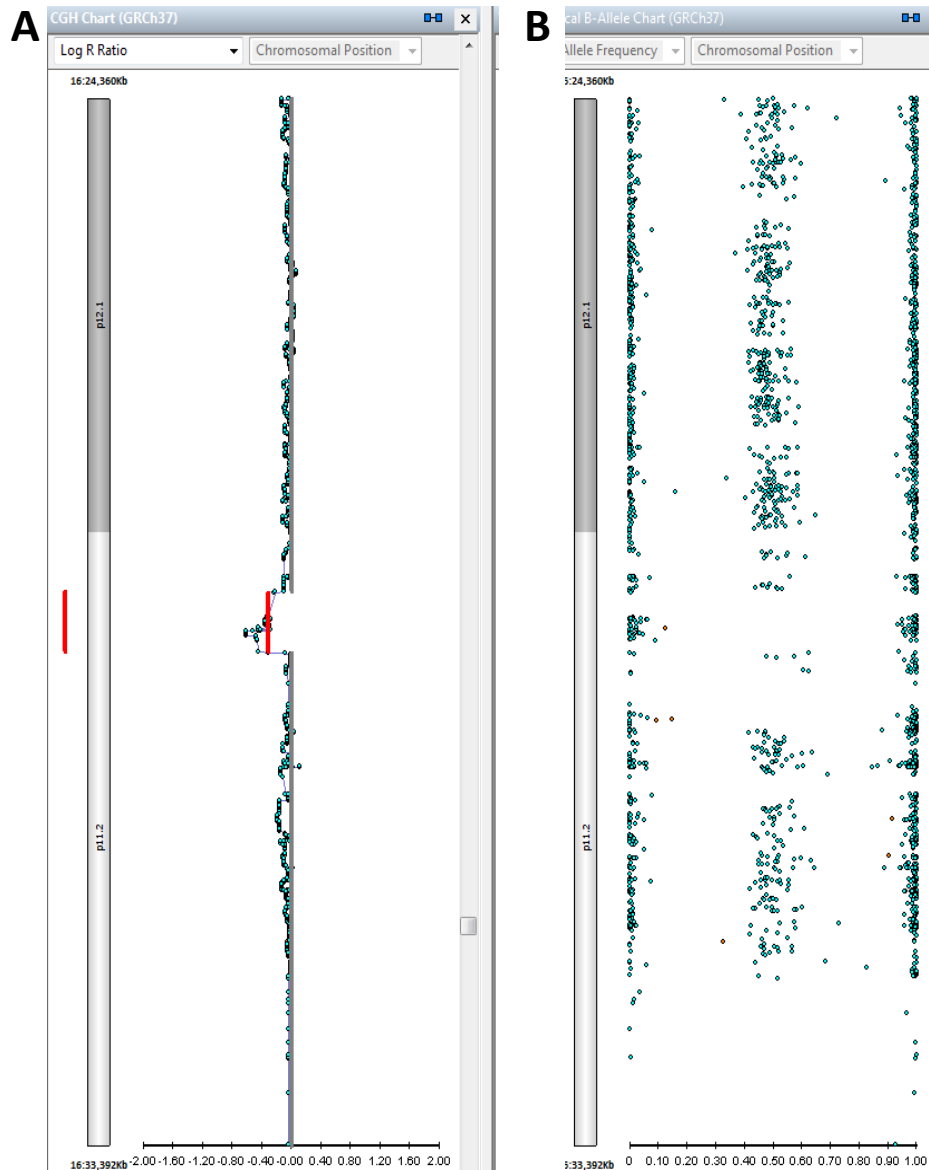


Figura 11 - Representação das CNV patogênicas identificadas no paciente P2. A) Representação do cromossomo 16. A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada $\text{arr}[\text{GRCh37}] \text{arr}[\text{GRCh37}] \text{chr16}:(28618318-29134064) \times 1$ identificada no estudo de *SNP array*. B) Imagem do *SNP array* demonstrando a redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado de heterozigose no cromossomo 16.

Paciente P25

Paciente do sexo masculino, com SK esporádica, filho de pais não consanguíneos atendido a primeira vez no ambulatório aos 48 anos de idade com história de atraso puberal e criptorquidia a direita corrigida ainda na infância. Já chegou no serviço realizando reposição de testosterona de forma irregular, iniciada em outro serviço. O paciente apresentava relato de anosmia, confirmada por meio de *Brief Smell Identification Test*®, hipoacusia bilateral neurossensorial, atestado por audiometria e potencial evocado auditivo, assim como atraso cognitivo leve. Apresentava ainda diagnóstico de diabetes mellitus tipo 2, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial.

Ao exame físico, apresentava estatura 172,5 cm, peso 86,4 kg (IMC 29 kg/m²), envergadura 174 cm e padrão de distribuição de gordura central. Também apresentava algumas características faciais dismórficas como um rosto comprido com cabelo de implantação alta, presença de epicanto, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, nariz em sela com ponte nasal achatada e pavilhão auricular volumoso em concha. Ao exame físico da genitália, apresentava pênis 10 cm de comprimento, testículos direito: 1,5x2,0 cm e testículo esquerdo: 2,5x2,0 cm, pelos pubianos Tanner 3. Exames complementares mostravam LH < 0.6 IU/L, FSH < 1.0 IU/L, Testosterona = 28 ng/dL e restante da função hipofisária sem alterações. RM de sela túrcica e de encéfalo mostraram hipófise de dimensões reduzidas, sulcos olfatórios rudimentares e ausência de bulbos olfatórios.

A análise do SNP array revelou a presença de uma deleção de 598 kb no braço longo do cromossomo 15, graficamente representada nas **Figuras 12 e 13**, classificada como uma CNV patogênica pelos critérios do ACMG. É uma CNV rara, em geral de ocorrência esporádica, sem casos familiares descritos na literatura e não observada nos indivíduos saudáveis pesquisados na plataforma DGV. A segregação familiar não foi possível devido à falta de disponibilidade de material genético dos familiares.

Essa deleção engloba um total de 11 genes e 9 RNAs (Tabela 8) com destaque para um gene conhecido por ser causador da síndrome Witteveen-Kolk (WITKOS). De herança autossômica dominante, essa síndrome é causada por microdeleções que englobam o gene *SIN3A* ou mutações em ponto desse gene. A WITKOS é caracterizada pela presença de dismorfismos faciais e corporais associados a graus variados de atraso do desenvolvimento neuropsicomotor (105, 106).

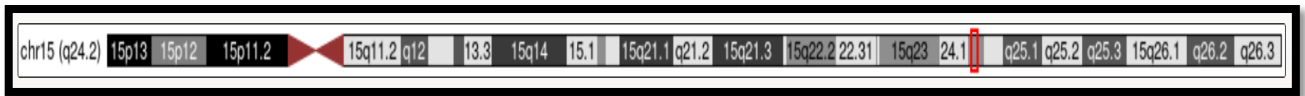


Figura 12 - Ideograma ilustrando o cromossomo 15 com destaque na região 15q24

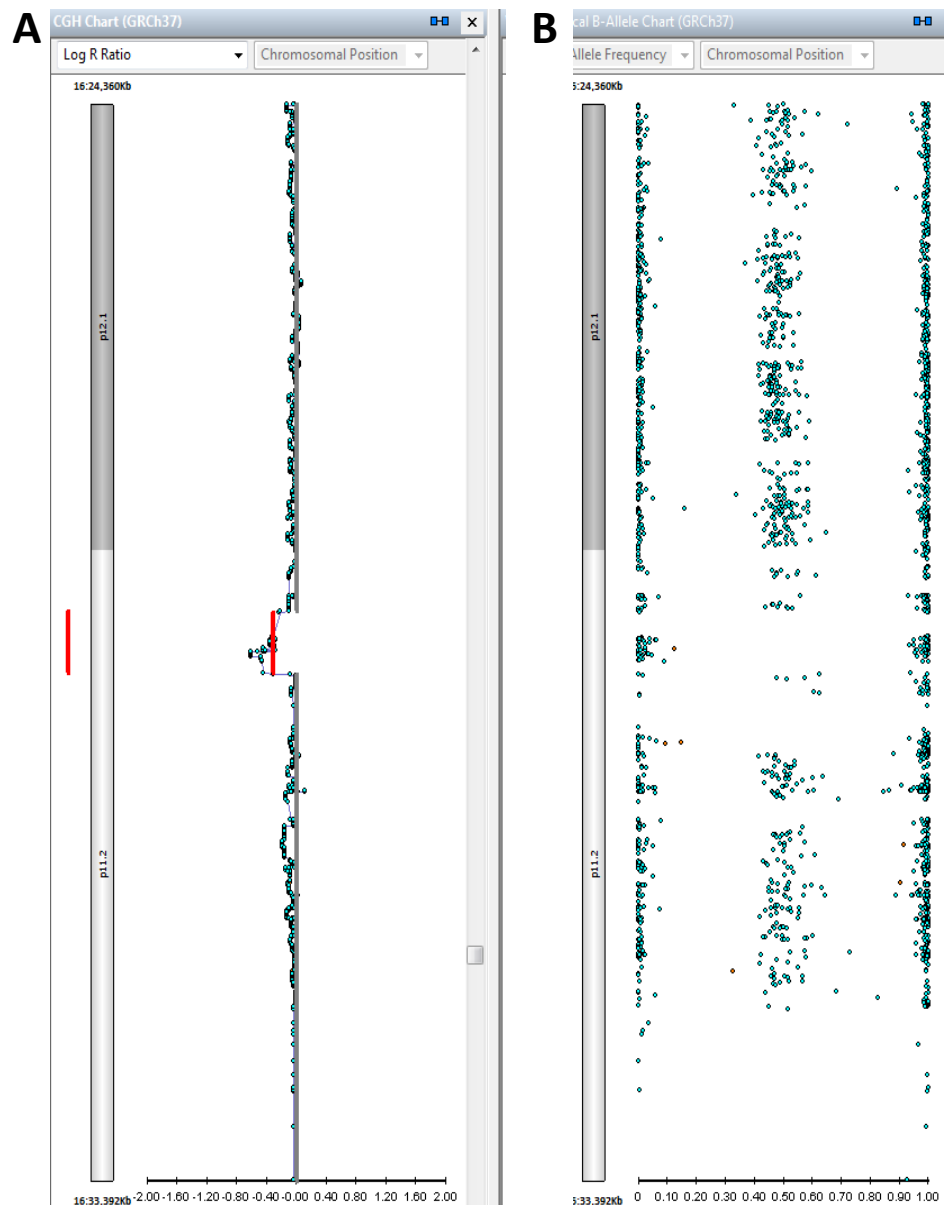


Figura 13 - Representação das CNV patogênicas identificadas no paciente 25. A) Representação do cromossomo 15. A barra vermelha destaca a região cromossômica deletada $arr[GRCh37]$

15q24.2(75473227_76072030)x1 identificada no estudo de SNP-array. B) Imagem do SNP-array demonstrando a redução da intensidade do sinal gerado e da perda do estado de heterozigose no cromossomo 15.

4.34 – CNV de significado indeterminado (VUS)

Paciente P5

Paciente do sexo masculino, filho de pais não consanguíneos, com HHC sem alterações de olfato ou histórico familiar de hipogonadismo e atraso puberal, apresentava histórico de atraso puberal com relato de pubarca tardia aos 14 anos de idade, micropênis e testículos de volume reduzidos, sem criptorquidia associada. Iniciou seguimento clínico no ambulatório aos 29 anos de idade.

Ao exame físico, apresentava estatura 166cm, peso 53kg (IMC 19 kg/m²), envergadura 174 cm e ausência de ginecomastia. Apresentava testículos tópicos, de volumes reduzidos: testículo direito 3,5 x 2,0cm, testículo esquerdo 2,8 x 1,5cm e pênis de 6.5cm de comprimento. Exames complementares mostraram LH < 0.6 IU/L, FSH < 1.0 IU/L, testosterona total = 54 ng/dL com restante da função hipofisária e perfil bioquímico e metabólico normais. RM de sela túrcica sem alterações.

A análise do SNP array revelou a presença duplicação com 40,6 kb localizada no braço longo do cromossomo 7, graficamente representada nas **Figuras 14 e 15**, classificada com VUS pelos critérios da ACMG. Essa CNV foi identificada em indivíduos da população geral em frequência relativamente alta (0.24-24%). Por outro lado, é uma CNV intragênia, que pode levar a interrupção da sequência genica do gene envolvido que é o *KMT2C*, gene causador da rara Síndrome de Kleefstra-2 (KLEFS2). A KLEFS2 caracteriza-se pela ocorrência de transtorno do neurodesenvolvimento autossômico dominante com atraso no desenvolvimento psicomotor, deficiência intelectual variável e características dismórficas leves (107) (108) (109). Novas características clínicas, como o atraso puberal, vem sendo descritas, nos levando a pensar em uma possível sobreposição fenotípica com o HHC. Além disso, o gene *KMT2C* apresenta ações cruzadas com um outro gene chamado de *EHMT1* (*euchromatic histone methyltransferase 1*, OMIM 607001) (107) causador da Síndrome de Kleefstra-1 que é já foi descrita em associação com o HHC (110). Portanto por essa CNV se localizar em uma região genômica sobreposta a uma síndrome já descrita que possivelmente apresenta relação com o quadro clínico do paciente, a consideramos clinicamente relevante.



Figura 14 - Ideograma ilustrando o cromossomo 16 com destaque na região 7q

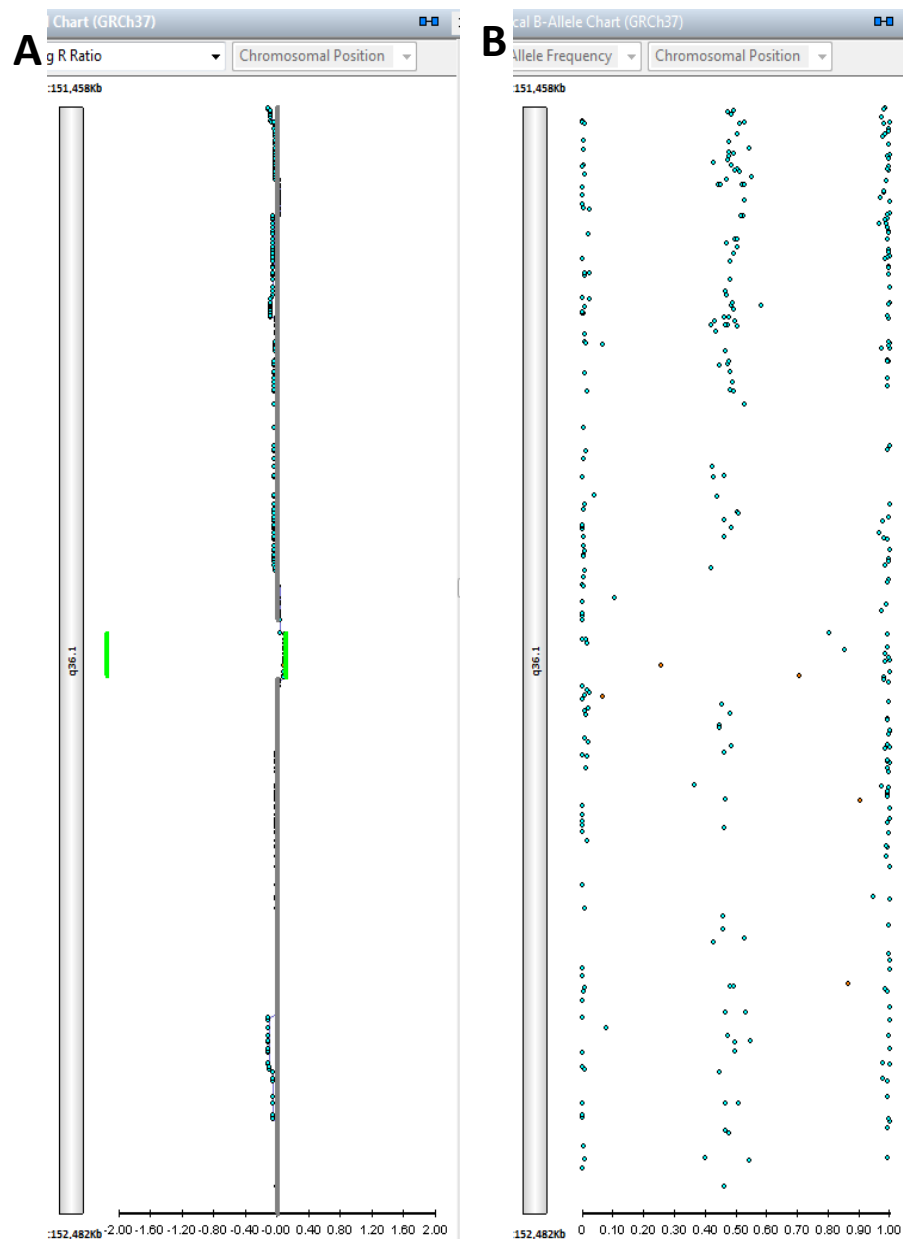


Figura 15 - Representação das CNV de significado indeterminado identificada no paciente 5. A) Representação do cromossomo 7. A barra verde destaca a região cromossômica duplicada na coordenada $\text{arr}[\text{GRCh37}] \text{7q36.1}(151945060_151985687)\times 3$ identificada no estudo de SNP-array. B) Imagem do SNP-array demonstrando um ganho da intensidade do sinal gerado caracterizando uma duplicação

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Neste estudo, foram identificadas um total de 21 CNVs em 50 pacientes, 7 classificadas como benignas, 12 VUS e 2 patogênicas. Todas as CNVs identificadas pela técnica de array foram avaliadas cuidadosamente quanto ao grau de patogenicidade pelos critérios da ACMG. Estabelecer o caráter patogênico ou benigno de uma VUS representa atualmente um desafio na análise de arrays genômicos. A crescente quantidade de informações disponibilizadas nos diferentes bancos de dados permitirá no futuro estabelecer mais precisamente a relação entre determinada CNV e uma possível condição patogênica (111, 112). A interpretação das contribuições das duas CNVs categorizadas como patogênicas, assim como a VUS em destaque serão discutidas detalhadamente a seguir.

5.1 - Paciente P2

A análise de SNP array do paciente P2, portador de HHC normósmico parcial, detectou uma CNV do tipo deleção de 515 kb em uma região do cromossomo 16. Essa região é afetada de forma recorrente e é uma das etiologias mais frequentes de transtornos do neurodesenvolvimento e transtorno do espectro autista (TEA), recebendo o nome de síndrome de microdeleção 16p11.2 (OMIM #611913). Estima-se que as CNVs de dessa região afetem cerca de 3 em cada 10.000 indivíduos e confirmam suscetibilidade em até 1% dos pacientes ao desenvolvimento de TEA (113, 114). A maioria dos casos descritos são deleções de novo de tamanhos variáveis e, apesar do nome da síndrome, há relatos na literatura de casos envolvendo duplicações (código OMIM* 614671) (115).

A síndrome de microdeleção 16p11.2 é caracterizada por um amplo espectro fenotípico incluindo distúrbio motor da fala, distúrbio de linguagem, dificuldades de coordenação motora, condições psiquiátricas e uma maior suscetibilidade ao transtorno do espectro do autismo (TEA). Nas descrições dos casos, a maioria dos os indivíduos, se não todos, com deleção da região 16p11.2 experimentam algum grau de atraso no desenvolvimento com variação significativa de gravidade. Destaca-se ainda que a maioria dos indivíduos afetados não tem deficiência intelectual (definida como um QI <70), mas sim deficiências cognitivas e de aprendizagem abaixo da média nos domínios verbal e não verbal. (104, 114, 116). Outras características que podem estar presentes são convulsões, microcefalia, anomalias cardíacas, catarata e obesidade são outras possíveis manifestações dessa síndrome (117). Não encontramos na literatura descrição de hipogonadismo associado à microdeleção 16p11.2. Há apenas a descrição de um caso de um menino de 13 anos de idade com quadro de ansiedade, distúrbio do sono, características faciais

atípicas e sindactilia associado a ocorrência de micropênis (115). É importante destacar que a maioria dos casos foi descrita em crianças, dificultando a avaliação de um possível atraso puberal ou hipogonadismo.

A região cromossômica deletada nessa CNV localiza-se na posição aproximada de 28,6 – 29.1 Mb no genoma de referência GRCh37/hg19 que contém genes OMIM como: *SULTA1*, *EIF3C*, *ATXN2L*, *TUFM*, *SH2B1*, *ATP2A1*, *NFATC21P*, *CD19*, *LAT*. A maioria desses genes estão associados à síndrome de microdeleção 16p11.2 e tem algum papel relacionado ao desenvolvimento neurológico. Nenhum dos genes envolvidos na deleção tem associação conhecida com o desenvolvimento ou função do eixo gonadotrófico. A tabela 9 apresenta uma lista dos genes envolvidos nesta região, excluindo pseudogenes, com um pequeno resumo da principal função de cada gene. O maior destaque é um dos genes mais descritos na literatura é o *SH2B1* que já apresenta relação muito bem estabelecida com diversos relatos de CNVs no envolvimento com quadros clínicos graves de obesidade. (118) Alguns trabalhos demonstram o envolvimento do gene *SH2B1* com o peso corporal por ele atuar como uma proteína *scaffold* transmembrana envolvida na regulação e sinalização do hormônio GH sob diversas células incluindo neurônios (119).

Sendo assim, diante do exposto, essa CNV não parece ser causadora do quadro de HHC no paciente P2. Porém, apesar paciente P2 não apresentar descrição de distúrbio do neurodesenvolvimento, obesidade, ou outra característica associada à síndrome, não podemos descartar a possibilidade de ele tenha apresentado alguma dessas características, pois não foi possível realizar todas as avaliações por testes neuropsicológicos devido à perda de sua continuidade no seguimento clínico do no nosso ambulatório. Por outro lado, ainda não é claro se o hipogonadismo pode estar associado à microdeleção 16p11.2.

Em conclusão, essa CNV é considerada patogênica, pois está fortemente associada à uma síndrome conhecida. No entanto, isso não significa que seja responsável pelo quadro de HHC do paciente P2. Porém essa possibilidade não deve ser completamente descartada, pelos motivos expostos no parágrafo acima.

5.2 - Paciente P25

No paciente P25, portador de SK, identificou-se uma CNV do tipo deleção, de tamanho intermediário (598 kb) localizada na região 15q24.2. Essa região merece destaque por incluir o gene *SIN3A*, responsável pela Síndrome Witteveen-Kolk (WITKOS; MIM # 613406). Com exceção das deleções mais proximais no cromossomo 15 como as da região 11-q13, associadas às síndromes de Prader-Willi e de Angelman, deleções constitucionais do cromossomo 15 são relativamente raras. Até recentemente, deleções nessa região específica do braço longo do cromossomo 15 (q24) recebiam o nome de síndrome de microdeleção 15q24, pois acreditava-se que os quadros clínicos decorrentes seriam resultado da deleção de vários genes contíguos nessa região (120-124). Em 2016, Witteveen et al, descreveram a ocorrência de 13 casos com mutações e deleções em heterozigose no gene *SIN3A* (*SIN3 Transcription Regulator Family Member A*) que passou a ser considerado o gene responsável por essa síndrome (105). Desde então, a síndrome de microdeleção 15q24 passou a ser denominada de síndrome Witteveen-Kolk (WITKOS) e novos casos vem sendo descritos envolvendo mutações no gene *SIN3A*, com padrão autossômico dominante (106, 125).

A apresentação clínica da síndrome Witteveen-Kolk é bastante variável (**Tabela 8**), mas majoritariamente são descritas alterações do neurodesenvolvimento como atraso global no desenvolvimento, deficiência intelectual leve, transtorno do espectro autista e transtorno de déficit de atenção e hiperatividade. Obesidade e perda auditiva podem estar presentes em cerca de 18% dos casos. Cerca de um terço dos casos apresenta crescimento intrauterino retardado e baixa estatura em idade escolar, assim como deficiência de GH (105, 106, 125). Cerca de 50% dos afetados têm alterações cerebrais discretas evidenciadas por RM como hipoplasia ou disgenesia de corpo caloso, ventriculomegalia e até alterações maiores como a microcefalia em 20% dos casos (125). A ocorrência de deformidades esqueléticas digitais é bastante frequente, sendo descritas em até 90% dos casos (dedos implantados proximalmente e/ou hipoplasia do polegar, clinodactilia, braquidactilia, sobreposição dos dedos, sindactilia dos dedos do pé, mãos pequenas), assim como características faciais distintas como rosto longo, ponte nasal larga e orelhas grandes. Alterações genitais como hipospádia, micropênis e criptorquidia também são pontuadas em meninos com WITKOS, com destaque para as duas últimas manifestações que são possíveis pistas diagnósticas precoces para identificar HHC antes do período puberal no sexo masculino (120, 121, 123, 126, 127). Recentemente, nove crianças com distúrbios do desenvolvimento sexual foram investigadas por meio sequenciamento exômico (WES), e foi identificada uma mutação *indel* no *SIN3A* em um menino com 8 anos de idade, com micropênis

grave e volume testicular de 1 mL associado a um quadro clínico de retardo mental, hidrocefalia, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (128). Em uma série de relatos de 19 casos de WITKOS houve uma prevalência de 33% e 20% de micropênis e criptorquidia dos casos, respectivamente (122). Na maior parte das descrições não há relatos das características genitourinárias ou estágio do desenvolvimento puberal dificultando a avaliação da gravidade do fenótipo e um possível diagnóstico de HHC. Apesar dos relatos de micropênis e criptorquidia serem possíveis sinais da associação de hipogonadismo com a WITKOS, é possível que o atraso puberal ou hipogonadismo seja subdiagnosticado em pacientes com casos de síndromes complexas tanto porque a maioria dos casos são descritos em crianças em idade pré-puberal dificultando o diagnóstico de hipogonadismo hipogonadotrófico, quanto pelo fato de naturalmente haver um maior foco nas manifestações mais graves da síndrome, como as de atraso no desenvolvimento neurológico, levando os especialistas a reduzirem a sua atenção às características sexuais, diminuindo assim, a frequência de encaminhamentos para endocrinologistas, como ocorre em outras síndromes neurológicas associadas ao hipogonadismo (125).

Interessantemente, encontramos em um relato de quatro casos com WITKOS, a descrição de dois meninos com fenótipos clássicos, ambos com 14 anos de idade, apresentando micropênis, em que se cita que em um deles foi induzido a puberdade devido à ocorrência de atraso puberal e um outro caso com hipogonadismo hipogonadotrófico associada a déficit de GH sem descrição de alterações olfatórias ou mais detalhes de comportamento hormonal (127). Porém, nesses dois casos, ocorreram grandes deleções da região 15q24 (72.15–76.01 Mb) em que houve o envolvimento não apenas do gene *SIN3A*, como também do gene *SEMA7A* (OMIM 607961, Semaphorin 7A), um gene possivelmente associado ao HHC (3, 77, 129).

As semaforinas são uma classe de proteínas que agem como moléculas guia de axônios. Em camundongos, mutações nos genes *SEMA3A* e *SEMA7A* reduzem o número de neurônios de GnRH, sendo o *SEMA3A* essencial para a migração de axônios vomeronasais, enquanto o sistema olfatório nas mutações no *SEMA7A* parece estar inalterado. Portanto, considera-se o gene *SEMA3A* como um candidato para síndrome de Kallmann e o *SEMA7A* para HHC normósmico, mas a maioria dos casos descritos de HHC são não esclarecedoras do diagnóstico molecular dos pacientes por estarem associadas a mutações deletérias em genes clássicos do HHC (*KISS1R* e *KAL1*), sendo na maioria das vezes classificadas como VUS, principalmente por serem encontradas também em indivíduos sem o fenótipo de HHC (3, 76, 77, 130). Por isso, acreditamos que o envolvimento do gene *SEMA7A* nesses dois casos de WITKOS com quadro

de atraso puberal e HHC não invalida a associação do quadro clínico diretamente com o gene *SIN3A* já que temos associação caso de mutação pontuais do gene *SIN3A* com distúrbios do desenvolvimento sexual.

Revisando os casos de WITKOS da literatura é possível pontuar diversas características sobrepostas ao fenótipo no nosso paciente com síndrome de Kallmann representadas na Figura 16), associada como atraso cognitivo leve, hipoacusia neurossensorial bilateral associado a mãos pequenas e clinodactilia do quinto dedo bilateralmente, além de características faciais marcantes muito semelhantes às descritas na maioria dos casos relatados de WITKOS (105, 106, 125). Na **Tabela 8** enumeramos as características diversas da síndrome de Witteveen-Kolk com destaque das presentes no paciente P25. Até onde sabemos, este é o primeiro paciente com SK e características sobrepostas com a Witteveen-Kolk. Consideramos que a possível causa do HHC apresentado pelo paciente 25 possa ser atribuída à deleção em heterozigose do *SIN3A*, contida na CNV detectada pelo SNP array, frente a clara sobreposição clínica do paciente com as características de uma síndrome bem descrita na literatura. Além dessa importante correlação do fenótipo apresentado pelo nosso paciente com a CNV descrita, parece existir uma possível correlação da função do *SIN3A* com mecanismos de maturação cortical que poderia estar envolvido com as bases biológicas neuronais de maturação do eixo gonadotrófico, a exemplo do que ocorre com outros genes causadores da HHC já conhecidos, como *PNPLA6* e *SOX10* (13).

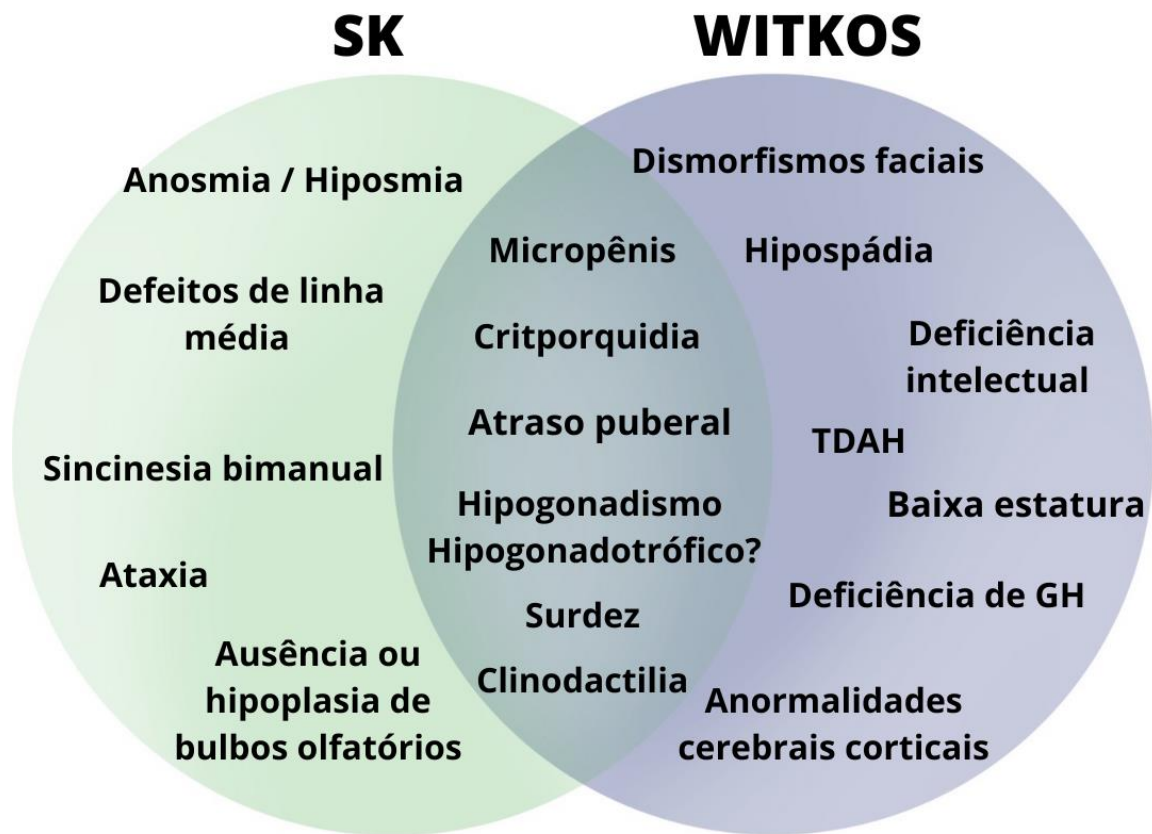


Figura 16 – Esquema ilustrando o overlapping entre as características clínicas entre as Síndromes de Kallmann e Witteveen-Kolk.

Legenda: SK: síndromes de Kallmann; WITKOS: síndrome de Witteveen-Kolk; TDAH: Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade; GH: do inglês Growth Hormone, hormônio do crescimento. Figura elaborada pelo autor.

Tabela 8 – Características clínicas da síndrome de Witteveen-Kolk e em destaque as que estão presentes no paciente P25

	Síndrome de Witteveen-Kolk
Crescimento	Baixa estatura Baixo peso de nascimento Retardo de crescimento intrauterino Retardo de crescimento pós-natal Obesidade (menos comum)
Dimorfismos craniofaciais	Microcefalia, assimetria facial, rosto longo, testa alta, filtro longo. Olhos: Hipertelorismo, fissuras palpebrais inclinadas para baixo, estrabismo, microftalmia (leve), hipopigmentação da íris, epicanto . Orelhas: volumosas, em concha . Nariz: Nariz em sela, ponte nasal larga , ponte nasal alta e alargamento da asa nasal. Boca: pequena, lábio inferior fino, palato alto, palato arqueado e microrretrognatia.
Pele, unhas e cabelo	Cabelo fino, linha anterior do cabelo alta. Sobrancelhas mediais largas que afilam lateralmente
Esquelético	Frouxidão articular. Anormalidades digitais: braquidactilia, polegares hipoplásicos, polegares implantado proximalmente. Clinodactilia , dedos longos e finos, inserção anormal dos dedos dos pés
Genitália Externa	Hipospádia , micropênis, criptorquidia
Alterações neurológicas	Hipoacusia / Surdez neurosensorial Deficiência intelectual leve com atraso no desenvolvimento e na fala. Retardo mental, hipotonia. Convulsões (raro)
Manifestações Psiquiátricas	Déficit de atenção, hiperatividade, características autistas, agressividade
Alterações de estrutura cerebral	Anormalidades corticais: ventrículos aumentados, hipoplasia do corpo caloso.
Alterações hormonais	Deficiência de GH Atraso puberal
Outros	Hérnia diafragmática (menos comum)

Tabela elaborada pelo autor. <https://www.omim.org/entry/613406> e (105, 125)

Existem alguns genes causadores do HHC que foram descritos a partir da associação de alguns sinais clínicos do hipogonadismo congênito em algumas síndromes complexas. O gene *CHD7*, causador da síndrome CHARGE, também foi descrito em associação com HHC a partir de descrições de pacientes com fenótipo de HHC associado a alguma manifestação isolada da síndrome CHARGE (26). Essa síndrome se caracteriza por um quadro clínico complexo e variável de alterações diversas como coloboma da íris, cardiopatia congênita, atresia de coanas, hipoplasia genital, associado a retardo no crescimento e desenvolvimento e surdez, em que foi analisado a ocorrência de hipogonadismo (28). Atualmente, mutações no *CHD7* são identificadas em cerca de 5% dos casos de HHC normósmico e SK, principalmente quando associado a alguma outra característica da síndrome, como surdez, levantando a hipótese de que o HHC possa ser uma forma frustra da síndrome (25, 27, 28).

Outro exemplo similar é o gene *SOX10*. Defeitos no gene *SOX10* são conhecidos como causa genética da síndrome de Waardenburg, caracterizada por um sobreposição variável de manifestações clínicas como surdez neurossensorial, alterações pigmentares (hipocromia de pele, cabelos e olhos), doença de Hirschsprung e neuropatia desmielinizante. O gene *SOX10* foi recentemente associado ao HHC, principalmente SK, devido a uma sobreposição de manifestações clínicas das duas síndromes (112). Ao realizarem tomografia computadorizada ou RM da região de ouvido interno para melhor entender a ocorrência da surdez em pacientes com síndrome de Waardenburg, os pesquisadores encontraram casos de hipoplasia ou ausência de bulbos olfatórios nesses pacientes, levantando a suspeita para associação com SK (23). Desde então vários casos de mutações ou deleções no *SOX10* foram identificados em pacientes com SK, principalmente quando associado à surdez, levando à hipóteses de que esses pacientes poderiam ser considerados uma forma frustra ou variante da síndrome de Waardenburg (3, 23, 24, 112, 131).

A proteína codificada pelo gene *SIN3A* é uma proteína andaime (scaffolding) que medeia a transcrição ou o silenciamento gênico por meio de interações com uma ampla variedade de fatores de transcrição, envolvidos na regulação de DNA, histonas e metilação, desempenhando um papel importante na repressão de genes neuronais pelo mecanismo regulador REST (fator de transcrição de silenciamento RE1, também conhecido como fator silenciador restritivo de neurônios, NRSF) (132). O REST está expressamente envolvido na repressão de genes neurais em células não neuronais e atua em inúmeras funções biológicas críticas regulando a expressão de outras proteínas por mecanismo epigenéticos, como metilação direta do DNA e modificações de histonas por meio da desacetilação provocando pequenas alterações químicas no DNA, ou

nas proteínas, mudando a acessibilidade à cromatina e gerando mudanças na leitura dos genes (133). Dessa maneira, o *SIN3A* é um fator de transcrição que forma um complexo com as histonas desacetilases (HDACs Classe I: HDAC1 e HDAC2), denominado SIN3a-HDAC1/2, que por meio da remoção dos grupos acetila da cromatina promovem uma mudança arquitetural dela, com maior compactação de sua estrutura, dificultando a exposição de determinadas regiões do DNA e, conseqüentemente, o acesso de proteínas específicas envolvidas na expressão gênica (134, 135).

Um estudo recente demonstrou que o *SIN3A* parece ter um papel no desenvolvimento cortical do cérebro de camundongos, mais especificamente na diferenciação e no alongamento axonal, participando da expansão e maturação cortical, podendo ser considerado um regulador transcricional chave do desenvolvimento cortical do sistema nervoso central (105). O *SIN3A* interage com outras várias proteínas como a MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2 ou proteína metil-CpG 2) por meio do domínio transcricional de MeCP2 que regula a expressão de uma ampla gama de genes no hipotálamo e que pode funcionar tanto como um ativador, como um repressor de transcrição. Ambos parecem contribuir com fenótipos de deficiência intelectual e apresentar uma função neuronal assim como o *SIN3A* (136, 137). Curiosamente, defeitos no gene *MeCP2*, localizado no cromossomo X, estão associados à síndrome de Rett (OMIM 312750) em 95% dos casos descritos, que é uma doença neurológica relativamente rara, caracterizada por deficiência intelectual com características autistas, movimentos estereotipados de mãos, podendo estar associada também com alterações do eixo puberal (137-139). As trajetórias puberais na síndrome de Rett diferem da população geral, com descrições de ocorrência da puberdade mais precoce porém com a menarca mais tardia (com um intervalo médio de 3,9 anos) (140). A perda de *Mecp2* em camundongos causa defeitos sinápticos em desenvolvimento de circuito neural por desregulação da transmissão GABAérgica e excitabilidade cortical (141). Esse funcionamento prejudicado do circuito cortical é pensado para estar subjacente à perda de motor e cognitivo habilidades e as interações sociais prejudicadas vistas em indivíduos com Síndrome de Rett, porém o mecanismo subjacente exato pelo qual uma mutação *MeCP2* pode afetar as vias puberais permanece incerto.

Diante do exposto, consideramos que a deleção em heterozigose do *SIN3A*, contida na CNV detectada pelo SNP array, pode estar associada a patogênese da SK nesse paciente. Frente a clara sobreposição clínica do paciente com as características de uma síndrome bem descrita na literatura, poderíamos considera-lo como uma forma leve da WITKOS, em uma apresentação na qual predominaram os achados fenotípicos da SK. Além dessa importante associação do fenótipo

apresentado pelo nosso paciente com a CNV descrita, parece existir uma possível correlação da função do *SIN3A* com mecanismos de maturação cortical que poderia estar envolvido com as bases biológicas neuronais de maturação do eixo HHG como já ocorre com outros genes causadores da HCC já conhecidos. Dessa forma, este parece ser o primeiro caso descrito de SK associado a um defeito no *SIN3A*. Tomando como exemplo as associações com de HHC com defeitos no *CHD7* e *SOX10*, acreditamos que o *SIN3A* pode ser um novo gene candidato em casos de HHC, principalmente quando associado a alguma característica da WITKOS. A pesquisa de defeitos no *SIN3A* em outros casos de HHC será necessária para confirmar essa associação.

5.3 - Paciente P5

No paciente P5 foi identificada uma duplicação intragênica de 40,6 kb envolvendo o gene *KMT2C*, responsável pela Síndrome de Kleefstra-2 (KLEFS2). A KLEFS2 é caracterizada principalmente por um quadro clínico que inclui transtorno do neurodesenvolvimento com atraso no desenvolvimento psicomotor, deficiência intelectual variável e características dismórficas leves (108). Várias outras características clínicas podem estar associadas com a KLEFS2, como baixa estatura, microcefalia, hipotonia infantil, plagiocefalia e sinofris (sobrancelhas unidas) (107). Mais detalhes do fenótipo dessa síndrome estão descritos a seguir na **Tabela 9**. Apesar de a descrição da síndrome de KLEFS2 não incluir originalmente características fenotípicas relacionadas ao hipogonadismo, entre os raros relatos na literatura, recentemente foram publicados casos que levantam a hipótese de uma possível sobreposição clínica do HHC com a KLEFS2. Em um relato de 3 casos de meninas com mutações no gene *KMT2C*, foi descrito um caso de atraso do desenvolvimento puberal e surdez neurosensorial em uma menina de 17 anos, além da ocorrência de criptorquidia em um caso de KLEFS2 em um menino (107, 142).

Tabela 9 - Manifestações clínicas na Síndrome de Síndrome de Kleeftstra-2

Dismorfismos craniais	Microcefalia, Macrocefalia, Braquicefalia, Plagiocefalia
Dismorfismos faciais	Fácies grosseira, testa larga e arredondada, olhos profundos, vincos infra-orbitais marcados, hipoplasia do terço médio da face, face média achatada, hipertelorismo, fissuras palpebrais oblíquas ptose, sinofris,, sobrelhas arqueadas, nariz curto, nariz com ponte de sela, filtro estreito Alterações labiais: Lábio superior em forma de tenda, Lábio inferior espesso e evertido, Lábio superior fino, boca virada para baixo, dentes desalinhados, queixo pontudo, Alterações de orelhas: hélices auriculares displásicas, apêndice pré-auricular
Esquelético	Polegar direito e esquerdo duplicados, hiperfrouxidão ligamentar, escoliose, cifose
Alterações neurológicas	Surdez ou hipoacusia neurosensorial, hipotonia, epilepsia, alterações de sono
Manifestações Psiquiátricas	Autismo, hiperatividade, agressividade, mutismo eletivo
Alterações de estrutura cerebral	Hidrocefalia, hipoplasia de vermis cerebelar, ectasia dos espaços perivasculares
Outros	Criptorquidia, atraso puberal, atraso na erupção dentária

Tabela elaborada pelo autor (107, 108, 143, 144)

Outro ponto que merece destaque é o fato de o quadro clínico da KLEFS2 ser muito semelhante ao da Síndrome de Kleefstra tipo 1 (KLEFS1), previamente chamada de síndrome de microdeleção 9q34.3 e atualmente associada a defeitos do gene *EHMT1* (Euchromatic Histone Methyltransferase 1) localizado no cromossomo 9. A KLEFS1 é também uma doença rara, descrita anteriormente à KLEFS2, caracterizada por deficiência intelectual associada a um espectro de características clínicas complexas sobrepostas às da KLEFS2 (145). Curiosamente a KLEFS1 apresenta em seu fenótipo alterações genitourinárias como micropênis, criptorquidia e hipospádia em 30 a 40% dos homens diagnosticados (110, 146) e recentemente foram descritos dois casos com apresentações não usuais: um paciente com KLEFS1 aos 18 meses de vida com um achado não usual de hipoplasia de bulbo olfatório (108) e outro caso que merece destaque é relato de um adolescente do sexo masculino com hipogonadismo hipogonadotrófico parcial, ambos com variantes patogênicas no gene *EHMT1* (110) que nos levam a pensar em uma possível sobreposição clínica com o HHC. O *EHMT1* codifica uma proteína com atividades muito semelhantes ao *KMT2C*, afetado pela CNV em discussão, com descrições de interação biológica entre suas proteínas em drosophilas (107), corroborando com a possibilidade dessa sobreposição clínico e funcional existir.

O *EHMT1* e o *KMT2C* codificam histonas metiltransferases, que são enzimas que com propriedade de modificar as histonas. As histonas são proteínas carregadas positivamente que se ligam ao DNA carregado negativamente formando os nucleossomos que são essenciais para o acondicionamento do DNA no núcleo. A compactação e compressão dos nucleossomos formam fibras de cerca de 250 nano milímetros, diminuindo o volume do DNA, dando origem a cromatina. E a estrutura da cromatina tem funções essenciais como condensar e proteger o DNA, preservar a informação genética e controlar a sua expressão. Como o nome sugere, as metiltransferases promovem a metilação das histonas, o que consiste na adição de um grupo metil a essas proteínas. A metilação do DNA é um processo epigenético que leva a uma modificação covalente de DNA sem alterar a sequência de DNA, porém é importante para a regulação da expressão e atividade do gene. Nos mamíferos, é caracterizada pela adição do grupo metil (-CH₃) no carbono 5 das citosinas e ocorre predominantemente no contexto dos dinucleotídeos CpG, forma que corresponde à cerca de três quartos do conteúdo total da metilação nas células humanas. Com o efeito específico de atenuar a expressão gênica pela inibição da transcrição, certas as metiltransferases como a *KMT2C* e *KMT2D*, transcritas pelos genes *KMT2C* e *EHMT1*, respectivamente, são grandes proteínas andaime que formam o núcleo de estruturas reguladoras

conhecidas como complexos KMT2C/D COMPASS (*complex of proteins associating with Set1* ou complexo de proteínas associadas ao set1) (144, 147).

Estas proteínas regulam os elementos promotores e potenciadores da transcrição do DNA, modulando a atividade de diversos tipos de células importantes para a morfogênese embrionária e no desenvolvimento do sistema nervoso central. Existem quatro tipos de histonas (H2A, H2B, H3, H4) e o gene *KMT2C* codifica uma metiltransferase que catalisa a metilação da histona tipo 3 lisina 4 (H3K4) e regulam epigeneticamente a expressão de diversos genes no cérebro através da modificação da cromatina. A desregulação da metilação de H3K4 no cérebro tem sido implicada em vários distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo autismo e esquizofrenia e mais recentemente relacionada ao início da puberdade (144).

Nas últimas duas décadas, mutações em cinco genes centrais de complexos COMPASS foram associados a três síndromes humanas conhecidas: síndrome de Kabuki tipo 1 (KABUK1 Phenotype MIM number #147920, *KMT2D* Gene/LocusMIM number #602113) e 2 (KABUK2 Phenotype MIM number #300867, *KDM6A* Gene/LocusMIM number #300128), síndrome de Rubinstein-Taybi tipo 1 (RSTS1 Phenotype MIM number #180849, *CBP* Gene/LocusMIM number 600140) e e 2 (RSTS2 Phenotype MIM number #613684, *EP300* Gene/LocusMIM number #602700) e síndrome de Kleeftstra tipo 2 (*KMT2C*) (143). Interessantemente, a Síndrome de Kabuki tipo 1 foi descrita em associação com alterações endocrinológicas incluindo atraso constitucional da puberdade e deficiência de GH (148).

Na última década têm surgido várias evidências demonstrando que o processo de metilação do DNA interfere no início da puberdade. Um estudo de metilação do DNA no hipotálamo médio-basal de macacos mostrou redução da metilação na ilha CpG do gene *GnRH* concomitante ao aumento de sua expressão. Desde então, a epigenética foi proposta como parte do sistema regulatório que controla a secreção do *GnRH* (149). A influência do início da puberdade por com mecanismos epigenéticos também foi demonstrado em fêmeas camundongos por meio da repressão do gene *Kiss1* a partir do aumento da metilação nas regiões promotoras de dois genes do complexo Polycomb (PcG) e redução da sua expressão hipotalâmica (150). O grupo PcG consiste em um complexo sistema formado por proteínas que participam do silenciamento transcricional. Esses achados mostraram a existência de um mecanismo epigenético de inibição transcricional que ocorre durante a fase pré-puberal, sugerindo uma nova teoria sobre o início da puberdade, segundo a qual é necessária a repressão epigenética de fatores inibidores do eixo gonadotrófico para o início do desenvolvimento puberal (151).

Recentemente foi demonstrado que o gene *KMT2C* codifica uma proteína que é componente central de um complexo chamado de “ativador epigenético *Trithorax* (TrxG)” que neutralizam as proteínas do grupo PcG que por sua vez participam do processo de início puberdade por meio da inativação do gene *Kiss1* em neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico (ARC) (144). Dessa maneira, além das descrições recentes de fenótipos como atraso puberal que apenas pela idade da apresentação clínica impede o diagnóstico de HHC, existem algumas descrições clínicas e biológicas do gene *KMT2D* reforçando a correlação molecular com hipogonadismo. Portanto, as evidências atuais nos levam a formular a hipótese de que o prejuízo gerado por essa duplicação intragênica do gene *KMT2C* poderia estar implicado na patogênese do HHC no paciente P5.

Nossos resultados reforçam que a realização do SNP array parece ser um método útil para o diagnóstico molecular principalmente de pacientes síndrômicos com HHC ou até mesmo para o reconhecimento de possíveis regiões genômicas ou genes envolvidos na patogênese do HHC, em casos sem diagnóstico molecular estabelecido pelo sequenciamento genético. Os genes *SIN3A* e o *KMT2C* são genes envolvidos em mecanismos epigenéticos, uma área ainda pouco estudada nas bases moleculares do eixo gonadotrófico, mas que nos últimos anos vem ganhando espaço com o aumento do número de trabalhos e evidências que corroboram essa associação entre a epigenética e processos de maturação sexual. É importante destacar a necessidade de uma criteriosa avaliação clínica, com destaque para a ocorrência de micropênis, criptorquidia e atraso puberal, em casos de síndromes de apresentação neurológica, bem como a observação da presença de características fenotípicas possivelmente associadas a síndromes complexas em casos diagnosticados originalmente como HHC isolado, possibilitando um maior número diagnósticos e o manejo precoce de distúrbios puberais associados a quadros síndrômicos.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

A técnica de SNP-array permitiu a identificação de 21 CNVs em 19 pacientes. Entre os resultados mais importantes, CNVs patogênicas e potencialmente relevantes foram detectadas em 6% dos pacientes de nossa coorte, sugerindo que as CNVs podem desempenhar um papel significativo na patogênese da HHC, principalmente quando associada a características sindrômicas, e contribuir para revelar novos genes e fenótipos associados a essa doença.

- As duas CNVs patogênicas foram identificadas em regiões cromossômicas associadas a síndromes conhecidas e a VUS em destaque contempla um gene envolvido na patogênese de uma síndrome complexa, possivelmente associada ao HHC em alguns casos. Nossos resultados corroboram as evidências atuais da importância da análise global do número de cópias genômicas como um teste genético-clínico para elucidação diagnóstica em pacientes com HHC principalmente sindrômico.
- Em dois pacientes, os resultados obtidos sugerem a associação de duas síndromes complexas (WITKOS e KLEFS2) ao HHC colocando os genes *SIN3A* e o *KMT2C* como possíveis genes candidatos nas próximas investigações principalmente de casos de apresentação sindrômica do HHC.

6- REFERÊNCIAS

1. Young J, Xu C, Papadakis GE, Acierno JS, Maione L, Hietamäki J, et al. Clinical Management of Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Rev.* 2019;40(2):669-710.
2. Silveira LF, MacColl GS, Bouloux PM. Hypogonadotropic hypogonadism. *Semin Reprod Med.* 2002;20(4):327-38.
3. Amato LGL, Montenegro LR, Lerario AM, Jorge AAL, Guerra Junior G, Schnoll C, et al. New genetic findings in a large cohort of congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol.* 2019;181(2):103-19.
4. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev.* 1998;19(5):521-39.
5. Tsai PS, Gill JC. Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2(3):160-71.
6. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism-- pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(9):547-64.
7. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, et al. Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2001;55(2):163-74.
8. Tusset C, Trarbach EB, Silveira LF, Beneduzzi D, Montenegro L, Latronico AC. [Clinical and molecular aspects of congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2011;55(8):501-11.
9. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet.* 2009;41(3):354-8.
10. Silveira LG, Noel SD, Silveira-Neto AP, Abreu AP, Brito VN, Santos MG, et al. Mutations of the KISS1 gene in disorders of puberty. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(5):2276-80.
11. Lewkowitz-Shpuntoff HM, Hughes VA, Plummer L, Au MG, Doty RL, Seminara SB, et al. Olfactory phenotypic spectrum in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: pathophysiological and genetic implications. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(1):E136-44.
12. Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2447-54.
13. Maione L, Dwyer AA, Francou B, Guiochon-Mantel A, Binart N, Bouligand J, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic counseling for congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome: new challenges in the era of oligogenism and next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(3):R55-R80.
14. Gonçalves CI, Fonseca F, Borges T, Cunha F, Lemos MC. Expanding the genetic spectrum of ANOS1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Reprod.* 2017;32(3):704-11.
15. Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;22(7):249-58.
16. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(28):11703-8.

17. Costa-Barbosa FA, Balasubramanian R, Keefe KW, Shaw ND, Al-Tassan N, Plummer L, et al. Prioritizing genetic testing in patients with Kallmann syndrome using clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):E943-53.
18. Pitteloud N, Acierno JS, Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahimi OA, et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(16):6281-6.
19. Pitteloud N, Acierno JS, Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley WF. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1317-22.
20. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.* 1998;18(3):213-5.
21. Caron P, Imbeaud S, Bennet A, Plantavid M, Camerino G, Rochiccioli P. Combined hypothalamic-pituitary-gonadal defect in a hypogonadic man with a novel mutation in the DAX-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3563-9.
22. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):707-24.
23. Elmaleh-Bergès M, Baumann C, Noël-Pétrouff N, Sekkal A, Couloigner V, Devriendt K, et al. Spectrum of temporal bone abnormalities in patients with Waardenburg syndrome and SOX10 mutations. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2013;34(6):1257-63.
24. Rojas RA, Kutateladze AA, Plummer L, Stamou M, Keefe DL, Salnikov KB, et al. Phenotypic continuum between Waardenburg syndrome and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in humans with SOX10 variants. *Genet Med.* 2021;23(4):629-36.
25. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;83(4):511-9.
26. Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC. Molecular and phenotypic aspects of CHD7 mutation in CHARGE syndrome. *Am J Med Genet A.* 2010;152A(3):674-86.
27. Bergman JE, de Ronde W, Jongmans MC, Wolffenbuttel BH, Drop SL, Hermus A, et al. The results of CHD7 analysis in clinically well-characterized patients with Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(5):E858-62.
28. Bilan F, Legendre M, Charraud V, Manière B, Couet D, Gilbert-Dussardier B, et al. Complete screening of 50 patients with CHARGE syndrome for anomalies in the CHD7 gene using a denaturing high-performance liquid chromatography-based protocol: new guidelines and a proposal for routine diagnosis. *J Mol Diagn.* 2012;14(1):46-55.
29. Topaloglu AK, Lomniczi A, Kretzschmar D, Dissen GA, Kotan LD, McArdle CA, et al. Loss-of-function mutations in PNPLA6 encoding neuropathy target esterase underlie pubertal failure and neurological deficits in Gordon Holmes syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(10):E2067-75.
30. Synofzik M, Gonzalez MA, Lourenco CM, Coutelier M, Haack TB, Rebelo A, et al. PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain.* 2014;137(Pt 1):69-77.
31. Wolf NI, Harting I, Innes AM, Patzer S, Zeitler P, Schneider A, et al. Ataxia, delayed dentition and hypomyelination: a novel leukoencephalopathy. *Neuropediatrics.* 2007;38(2):64-70.
32. Wolf NI, Vanderver A, van Spaendonk RM, Schiffmann R, Brais B, Bugiani M, et al. Clinical spectrum of 4H leukodystrophy caused by POLR3A and POLR3B mutations. *Neurology.* 2014;83(21):1898-905.
33. Timmons M, Tsokos M, Asab MA, Seminara SB, Zirzow GC, Kaneski CR, et al. Peripheral and central hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia. *Neurology.* 2006;67(11):2066-9.

34. Sato I, Onuma A, Goto N, Sakai F, Fujiwara I, Uematsu M, et al. A case with central and peripheral hypomyelination with hypogonadotropic hypogonadism and hypodontia (4H syndrome) plus cataract. *J Neurol Sci.* 2011;300(1-2):179-81.
35. Sonmez S, Forsyth RJ, Matthews DS, Clarke M, Splitt M. Oliver-McFarlane syndrome (chorioretinopathy-pituitary dysfunction) with prominent early pituitary dysfunction: differentiation from choroideremia-hypopituitarism. *Clin Dysmorphol.* 2008;17(4):265-7.
36. Haimi M, Gershoni-Baruch R. Autosomal recessive Oliver-McFarlane syndrome: retinitis pigmentosa, short stature (GH deficiency), trichomegaly, and hair anomalies or CPD syndrome (chorioretinopathy-pituitary dysfunction). *Am J Med Genet A.* 2005;138A(3):268-71.
37. Alazami AM, Al-Saif A, Al-Semari A, Bohlega S, Zlitni S, Alzahrani F, et al. Mutations in C2orf37, encoding a nucleolar protein, cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;83(6):684-91.
38. Woodhouse NJ, Sakati NA. A syndrome of hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, deafness, and ECG abnormalities. *J Med Genet.* 1983;20(3):216-9.
39. Nousbeck J, Spiegel R, Ishida-Yamamoto A, Indelman M, Shani-Adir A, Adir N, et al. Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis. *Am J Hum Genet.* 2008;82(5):1114-21.
40. Spiegel R, Shalev SA, Adawi A, Sprecher E, Tenenbaum-Rakover Y. ANE syndrome caused by mutated RBM28 gene: a novel etiology of combined pituitary hormone deficiency. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(6):1021-5.
41. Tata BK, Harbulot C, Csaba Z, Peineau S, Jacquier S, de Roux N. Rabconnectin-3 α is required for the morphological maturation of GnRH neurons and kisspeptin responsiveness. *Sci Rep.* 2017;7:42463.
42. Abdilla Y, Andria Barbara M, Calleja-Agius J. Prader-Willi Syndrome: Background and Management. *Neonatal Netw.* 2017;36(3):134-41.
43. Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(16):2041-52.
44. Barraud S, Delemer B, Poirsier-Violle C, Bouligand J, Mérol JC, Grange F, et al. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism with Anosmia and Gorlin Features Caused by a PTCH1 Mutation Reveals a New Candidate Gene for Kallmann Syndrome. *Neuroendocrinology.* 2021;111(1-2):99-114.
45. Moreira C, Morais P, Santos P, Castro M, Azevedo F. Phenotypic spectrum of a patient with Gorlin's syndrome and role of dermoscopy in the early detection of basal cell carcinomas. *An Bras Dermatol.* 2015;90(3):416-9.
46. Safronova MM, Arantes M, Lima I, Domingues S, Almeida M, Moniz P. [Gorlin-Goltz syndrome: review of the neuroradiological and maxillofacial features illustrated with two clinical cases]. *Acta Med Port.* 2010;23(6):1119-26.
47. Sanger F. *A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase*. In: *AR C, editor. J Mol Biol.* 1975 May;94(3):441-8. 1975.
48. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonca BB, Arnhold IJ, Kaiser UB, Latronico AC. Two novel mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2680-6.
49. Teles MG, Silveira LF, Bianco S, Latronico AC. Human diseases associated with GPR54 mutations. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2009;88:33-56.
50. Abreu AP, Kaiser UB, Latronico AC. The role of prokineticins in the pathogenesis of hypogonadotropic hypogonadism. *Neuroendocrinology.* 2010;91(4):283-90.
51. Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, et al. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4006-12.

52. Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*. 2008;29(23):4627-36.
53. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res*. 2002;30(12):e57.
54. Montenegro LR, Silveira LF, Tusset C, de Castro M, Versiani BR, Latronico AC, et al. Combined use of multiplex ligation-dependent probe amplification and automatic sequencing for identification of KAL1 defects in patients with Kallmann syndrome. *Fertil Steril*. 2013;100(3):854-9.
55. Jennings LJ, Yu M, Fitzpatrick C, Smith FA. Validation of multiplex ligation-dependent probe amplification for confirmation of array comparative genomic hybridization. *Diagn Mol Pathol*. 2011;20(3):166-74.
56. de Roux N, Carel JC, Léger J. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: A Trait Shared by Several Complex Neurodevelopmental Disorders. *Endocr Dev*. 2016;29:72-86.
57. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1151:157-66.
58. Connolly JJ, Glessner JT, Almoguera B, Crosslin DR, Jarvik GP, Sleiman PM, et al. Copy number variation analysis in the context of electronic medical records and large-scale genomics consortium efforts. *Front Genet*. 2014;5:51.
59. Girirajan S, Campbell CD, Eichler EE. Human copy number variation and complex genetic disease. *Annu Rev Genet*. 2011;45:203-26.
60. Zhang F, Gu W, Hurler ME, Lupski JR. Copy number variation in human health, disease, and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2009;10:451-81.
61. Chen L, Zhou W, Zhang L, Zhang F. Genome architecture and its roles in human copy number variation. *Genomics Inform*. 2014;12(4):136-44.
62. Marenne G, Rodríguez-Santiago B, Closas MG, Pérez-Jurado L, Rothman N, Rico D, et al. Assessment of copy number variation using the Illumina Infinium 1M SNP-array: a comparison of methodological approaches in the Spanish Bladder Cancer/EPICURO study. *Hum Mutat*. 2011;32(2):240-8.
63. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM, Committee WGfTACoMGaGLQA. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. *Genet Med*. 2013;15(11):901-9.
64. Canton AP, Costa SS, Rodrigues TC, Bertola DR, Malaquias AC, Correa FA, et al. Genome-wide screening of copy number variants in children born small for gestational age reveals several candidate genes involved in growth pathways. *Eur J Endocrinol*. 2014;171(2):253-62.
65. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, et al. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2014;102(4):1130-6.e3.
66. Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell*. 1991;67(2):423-35.
67. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):463-5.
68. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest*. 2008;118(8):2822-31.
69. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P, et al. Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *N Engl J Med*. 2009;360(26):2742-8.

70. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, et al. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med.* 1997;337(22):1597-602.
71. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2012;366(7):629-35.
72. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KISS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(19):10972-6.
73. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med.* 2003;349(17):1614-27.
74. Dode C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e175.
75. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):725-43.
76. Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, Francou B, Maione L, et al. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod.* 2012;27(5):1460-5.
77. Käsäkoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, Vaaralahti K, Hackman P, Pitteloud N, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res.* 2014;75(5):641-4.
78. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(28):11524-9.
79. Margolin DH, Kousi M, Chan YM, Lim ET, Schmahmann JD, Hadjivassiliou M, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med.* 2013;368(21):1992-2003.
80. Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2010;87(4):465-79.
81. Saitu H, Osaka H, Sasaki M, Takanashi J, Hamada K, Yamashita A, et al. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA Polymerase III subunits cause an autosomal-recessive hypomyelinating leukoencephalopathy. *Am J Hum Genet.* 2011;89(5):644-51.
82. Miura K, Acierno JS, Jr., Seminara SB. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet.* 2004;49(5):265-8.
83. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med.* 2013;368(26):2467-75.
84. Xie H, Cherrington BD, Meadows JD, Witham EA, Mellon PL. Msx1 homeodomain protein represses the α GSU and GnRH receptor genes during gonadotrope development. *Mol Endocrinol.* 2013;27(3):422-36.
85. Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S. A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(11):4351-9.
86. Trarbach EB, Baptista MT, Garmes HM, Hackel C. Molecular analysis of KAL-1, GnRH-R, NELF and EBF2 genes in a series of Kallmann syndrome and normosmic hypogonadotropic hypogonadism patients. *J Endocrinol.* 2005;187(3):361-8.

87. Howard AD, Feighner SD, Cully DF, Arena JP, Liberators PA, Rosenblum CI, et al. A receptor in pituitary and hypothalamus that functions in growth hormone release. *Science*. 1996;273(5277):974-7.
88. Sun Y, Bak B, Schoenmakers N, van Trotsenburg AS, Oostdijk W, Voshol P, et al. Loss-of-function mutations in IGSF1 cause an X-linked syndrome of central hypothyroidism and testicular enlargement. *Nat Genet*. 2012;44(12):1375-81.
89. Tata B, Huijbregts L, Jacquier S, Csaba Z, Genin E, Meyer V, et al. Haploinsufficiency of DmXL2, encoding a synaptic protein, causes infertility associated with a loss of GnRH neurons in mouse. *PLoS Biol*. 2014;12(9):e1001952.
90. Howard SR, Guasti L, Ruiz-Babot G, Mancini A, David A, Storr HL, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin-releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):626-42.
91. Domené HM, Bengolea SV, Martínez AS, Ropelato MG, Pennisi P, Scaglia P, et al. Deficiency of the circulating insulin-like growth factor system associated with inactivation of the acid-labile subunit gene. *N Engl J Med*. 2004;350(6):570-7.
92. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*. 1988;16(3):1215.
93. Karampetsou E, Morrogh D, Chitty L. Microarray Technology for the Diagnosis of Fetal Chromosomal Aberrations: Which Platform Should We Use? *J Clin Med*. 2014;3(2):663-78.
94. Gijssbers AC, Schoumans J, Ruivenkamp CA. Interpretation of array comparative genome hybridization data: a major challenge. *Cytogenet Genome Res*. 2011;135(3-4):222-7.
95. Whitby H, Tsalenko A, Aston E, Tsang P, Mitchell S, Bayrak-Toydemir P, et al. Benign copy number changes in clinical cytogenetic diagnostics by array CGH. *Cytogenet Genome Res*. 2008;123(1-4):94-101.
96. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). *Genet Med*. 2020;22(2):245-57.
97. Leung TY, Pooh RK, Wang CC, Lau TK, Choy KW. Classification of pathogenic or benign status of CNVs detected by microarray analysis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010;10(6):717-21.
98. Hehir-Kwa JY, Pfundt R, Veltman JA, de Leeuw N. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin Genet*. 2013;84(5):415-21.
99. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet*. 2009;84(4):524-33.
100. Lee C, lafrate AJ, Brothman AR. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. *Nat Genet*. 2007;39(7 Suppl):S48-54.
101. Hanemaaijer NM, Sikkema-Raddatz B, van der Vries G, Dijkhuizen T, Hordijk R, van Essen AJ, et al. Practical guidelines for interpreting copy number gains detected by high-resolution array in routine diagnostics. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(2):161-5.
102. *Kulikowski LD. Citogenômica aplicada à prática médica. ed., editor. São Paulo 2013.*
103. Goldenberg P. An Update on Common Chromosome Microdeletion and Microduplication Syndromes. *Pediatr Ann*. 2018;47(5):e198-e203.
104. Steinman KJ, Spence SJ, Ramocki MB, Proud MB, Kessler SK, Marco EJ, et al. 16p11.2 deletion and duplication: Characterizing neurologic phenotypes in a large clinically ascertained cohort. *Am J Med Genet A*. 2016;170(11):2943-55.
105. Witteveen JS, Willemsen MH, Dombroski TC, van Bakel NH, Nillesen WM, van Hulten JA, et al. Haploinsufficiency of MeCP2-interacting transcriptional co-repressor SIN3A causes mild intellectual disability by affecting the development of cortical integrity. *Nat Genet*. 2016;48(8):877-87.

106. Narumi-Kishimoto Y, Araki N, Migita O, Kawai T, Okamura K, Nakabayashi K, et al. Novel SIN3A mutation identified in a Japanese patient with Witteveen-Kolk syndrome. *Eur J Med Genet.* 2019;62(9):103547.
107. Koemans TS, Kleefstra T, Chubak MC, Stone MH, Reijnders MRF, de Munnik S, et al. Functional convergence of histone methyltransferases EHMT1 and KMT2C involved in intellectual disability and autism spectrum disorder. *PLoS Genet.* 2017;13(10):e1006864.
108. Ciaccio C, Scuvera G, Tucci A, Gentilin B, Baccarin M, Marchisio P, et al. New Insights into Kleefstra Syndrome: Report of Two Novel Cases with Previously Unreported Features and Literature Review. *Cytogenet Genome Res.* 2018;156(3):127-33.
109. Chen CH, Huang A, Huang YS, Fang TH. Identification of a Rare Novel KMT2C Mutation That Presents with Schizophrenia in a Multiplex Family. *J Pers Med.* 2021;11(12).
110. Torga AP, Hodax J, Mori M, Schwab J, Quintos JB. Hypogonadotropic Hypogonadism and Kleefstra Syndrome due to a Pathogenic Variant in the. *Case Rep Endocrinol.* 2018;2018:4283267.
111. Nowakowska B. Clinical interpretation of copy number variants in the human genome. *J Appl Genet.* 2017;58(4):449-57.
112. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):707-24.
113. Rein B, Yan Z. 16p11.2 Copy Number Variations and Neurodevelopmental Disorders. *Trends Neurosci.* 2020;43(11):886-901.
114. Chung WK, Roberts TP, Sherr EH, Snyder LG, Spiro JE. 16p11.2 deletion syndrome. *Curr Opin Genet Dev.* 2021;68:49-56.
115. Fernandez BA, Roberts W, Chung B, Weksberg R, Meyn S, Szatmari P, et al. Phenotypic spectrum associated with de novo and inherited deletions and duplications at 16p11.2 in individuals ascertained for diagnosis of autism spectrum disorder. *J Med Genet.* 2010;47(3):195-203.
116. Niarchou M, Chawner SJRA, Doherty JL, Maillard AM, Jacquemont S, Chung WK, et al. Psychiatric disorders in children with 16p11.2 deletion and duplication. *Transl Psychiatry.* 2019;9(1):8.
117. Bijlsma EK, Gijsbers AC, Schuurs-Hoeijmakers JH, van Haeringen A, Franssen van de Putte DE, Anderlid BM, et al. Extending the phenotype of recurrent rearrangements of 16p11.2: deletions in mentally retarded patients without autism and in normal individuals. *Eur J Med Genet.* 2009;52(2-3):77-87.
118. Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K, et al. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature.* 2010;463(7281):666-70.
119. Carter-Su C, Schwartz J, Argetsinger LS. Growth hormone signaling pathways. *Growth Horm IGF Res.* 2016;28:11-5.
120. Van Esch H, Backx L, Pijkels E, Fryns JP. Congenital diaphragmatic hernia is part of the new 15q24 microdeletion syndrome. *Eur J Med Genet.* 2009;52(2-3):153-6.
121. Klopocki E, Graul-Neumann LM, Grieben U, Tönnies H, Ropers HH, Horn D, et al. A further case of the recurrent 15q24 microdeletion syndrome, detected by array CGH. *Eur J Pediatr.* 2008;167(8):903-8.
122. Magoulas PL, El-Hattab AW. Chromosome 15q24 microdeletion syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7:2.
123. Mefford HC, Rosenfeld JA, Shur N, Slavotinek AM, Cox VA, Hennekam RC, et al. Further clinical and molecular delineation of the 15q24 microdeletion syndrome. *J Med Genet.* 2012;49(2):110-8.
124. McInnes LA, Nakamine A, Pilorge M, Brandt T, Jiménez González P, Fallas M, et al. A large-scale survey of the novel 15q24 microdeletion syndrome in autism spectrum disorders identifies an atypical deletion that narrows the critical region. *Mol Autism.* 2010;1(1):5.
125. Balasubramanian M, Dingemans AJM, Albaba S, Richardson R, Yates TM, Cox H, et al. Comprehensive study of 28 individuals with SIN3A-related disorder underscoring the associated mild cognitive and distinctive facial phenotype. *Eur J Hum Genet.* 2021;29(4):625-36.

126. Cushman LJ, Torres-Martinez W, Cherry AM, Manning MA, Abdul-Rahman O, Anderson CE, et al. A report of three patients with an interstitial deletion of chromosome 15q24. *Am J Med Genet A*. 2005;137(1):65-71.
127. Sharp AJ, Selzer RR, Veltman JA, Gimelli S, Gimelli G, Striano P, et al. Characterization of a recurrent 15q24 microdeletion syndrome. *Hum Mol Genet*. 2007;16(5):567-72.
128. Tenenbaum-Rakover Y, Admoni O, Elias-Assad G, London S, Noufi-Barhoum M, Ludar H, et al. The evolving role of whole-exome sequencing in the management of disorders of sex development. *Endocr Connect*. 2021;10(6):620-9.
129. Messina A, Ferraris N, Wray S, Cagnoni G, Donohue DE, Casoni F, et al. Dysregulation of Semaphorin7A/beta1-integrin signaling leads to defective GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility. *Hum Mol Genet*. 2011;20(24):4759-74.
130. Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, Parkash J, Espy C, Fouveaut C, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002896.
131. Pingault V, Zerad L, Bertani-Torres W, Bondurand N. SOX10: 20 years of phenotypic plurality and current understanding of its developmental function. *J Med Genet*. 2022;59(2):105-14.
132. Grzenda A, Lomberg G, Zhang JS, Urrutia R. Sin3: master scaffold and transcriptional corepressor. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1789(6-8):443-50.
133. Coulson JM. Transcriptional regulation: cancer, neurons and the REST. *Curr Biol*. 2005;15(17):R665-8.
134. Kadamb R, Mittal S, Bansal N, Batra H, Saluja D. Sin3: insight into its transcription regulatory functions. *Eur J Cell Biol*. 2013;92(8-9):237-46.
135. Liu M, Pile LA. The Transcriptional Corepressor SIN3 Directly Regulates Genes Involved in Methionine Catabolism and Affects Histone Methylation, Linking Epigenetics and Metabolism. *J Biol Chem*. 2017;292(5):1970-6.
136. Klose RJ, Bird AP. MeCP2 behaves as an elongated monomer that does not stably associate with the Sin3a chromatin remodeling complex. *J Biol Chem*. 2004;279(45):46490-6.
137. Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, et al. MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*. 2008;320(5880):1224-9.
138. Knight O, Bebbington A, Siafarikas A, Woodhead H, Girdler S, Leonard H. Pubertal trajectory in females with Rett syndrome: a population-based study. *Brain Dev*. 2013;35(10):912-20.
139. Pohodich AE, Zoghbi HY. Rett syndrome: disruption of epigenetic control of postnatal neurological functions. *Hum Mol Genet*. 2015;24(R1):R10-6.
140. Killian JT, Lane JB, Cutter GR, Skinner SA, Kaufmann WE, Tarquinio DC, et al. Pubertal development in Rett syndrome deviates from typical females. *Pediatr Neurol*. 2014;51(6):769-75.
141. Westberry JM, Trout AL, Wilson ME. Epigenetic regulation of estrogen receptor alpha gene expression in the mouse cortex during early postnatal development. *Endocrinology*. 2010;151(2):731-40.
142. Faundes V, Newman WG, Bernardini L, Canham N, Clayton-Smith J, Dallapiccola B, et al. Histone Lysine Methylases and Demethylases in the Landscape of Human Developmental Disorders. *Am J Hum Genet*. 2018;102(1):175-87.
143. Siano MA, De Maggio I, Petillo R, Cocciadiferro D, Agolini E, Majolo M, et al. De Novo Mutation in KMT2C Manifesting as Kleefstra Syndrome 2: Case Report and Literature Review. *Pediatr Rep*. 2022;14(1):131-9.
144. Lavery WJ, Barski A, Wiley S, Schorry EK, Lindsley AW. KMT2C/D COMPASS complex-associated diseases [K. Clin Epigenetics. 2020;12(1):10.
145. Adam MP, Everman DB, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, et al. *GeneReviews*. 1993.
146. Willemsen MH, Vulto-van Silfhout AT, Nillesen WM, Wissink-Lindhout WM, van Bokhoven H, Philip N, et al. Update on Kleefstra Syndrome. *Mol Syndromol*. 2012;2(3-5):202-12.

147. Fagan RJ, Dingwall AK. COMPASS Ascending: Emerging clues regarding the roles of MLL3/KMT2C and MLL2/KMT2D proteins in cancer. *Cancer Lett.* 2019;458:56-65.
148. Moon JE, Lee SJ, Ko CW. A de novo KMT2D mutation in a girl with Kabuki syndrome associated with endocrine symptoms: a case report. *BMC Med Genet.* 2018;19(1):102.
149. Kurian JR, Terasawa E. Epigenetic control of gonadotropin releasing hormone neurons. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:61.
150. Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, et al. Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci.* 2013;16(3):281-9.
151. Rzeczowska PA, Hou H, Wilson MD, Palmert MR. Epigenetics: a new player in the regulation of mammalian puberty. *Neuroendocrinology.* 2014;99(3-4):139-55.



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

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F Ž

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

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

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

2. RESPONSÁVEL LEGAL

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

DOCUMENTO DE IDENTIDADE:SEXO: M F Ž

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

ENDEREÇO..... Nº..... APTO:

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

CEP: TELEFONE:

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **NOVAS ABORDAGENS NA INVESTIGAÇÃO GENÉTICO-MOLECULAR NO HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO CONGENITO**

2. PESQUISADORES RESPONSÁVEL: Dra Leticia Silveira

CARGO/FUNÇÃO: Médica Pesquisadora INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº : 119454
 UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/ Disciplina de Endocrinologia e Metabologia

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO <input type="checkbox"/> Ž	RISCO MÍNIMO <input type="checkbox"/> Ž	RISCO MÉDIO <input type="checkbox"/> Ž
RISCO BAIXO <input type="checkbox"/> Ž	RISCO MAIOR <input type="checkbox"/> Ž	

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: quatro anos

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

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: O hipogonadismo hipogonadotrófico é uma doença que interfere com a maturação sexual e a fertilidade. Várias alterações em diferentes genes foram identificadas como causa desta doença. Entretanto, suspeita-se que outros genes, ainda desconhecidos, possam também participar como causa desta doença. O objetivo deste estudo é realizar análise de genes implicados na origem do hipogonadismo hipogonadotrófico através do estudo do DNA.
2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Solicitamos ao senhor(a) sua permissão para coletar em tubo com EDTA (anti-coagulante) cerca de 10 ml de sangue de veia de antebraço, para que seja feita extração de DNA. O DNA obtido será utilizado no estudo de alterações nos genes já conhecidos empregando-se técnicas de estudo molecular.
3. Desconfortos e riscos esperados: Gostaríamos de salientar ao senhor(a) que os riscos e desconfortos da coleta de sangue são mínimos (dor, hematoma ou arroxamento da pele e sinais inflamatórios no local da punção venosa). A coleta será realizada por um profissional treinado e devidamente habilitado para sua realização. Não é preciso estar em jejum e não é necessária a ingestão de nenhum medicamento para a coleta de sangue
4. Benefícios que poderão ser obtidos: Esclarecemos ao senhor(a) que, tentando descobrir a origem dessa doença, poderemos no futuro aumentar as alternativas para o tratamento do hipogonadismo hipogonadotrófico.
5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo: Prezado senhor(a), se forem identificadas alterações gênicas no seu DNA, isso possibilitará o reconhecimento, por meio de análise genética, de outros indivíduos afetados e com o risco de desenvolver a mesma doença entre os seus familiares.

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

1. O participante terá acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para o esclarecimento de eventuais dúvidas.

O senhor(a) esta sendo convidado a participar deste projeto e terá livre acesso aos dados colhidos e obtidos assim como será informado sobre os riscos e os benefícios relacionados a pesquisa.

2. Terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo ao seu atendimento no ambulatório.

O senhor(a) terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo sem que isto traga prejuízo ao seu atendimento no ambulatório do HC.

3. Todos os dados são confidenciais e serão mantidos em sigilo, garantindo assim a privacidade do participante

O senhor(a) não terá seu nome revelado em nenhuma hipótese. Todo estudo será realizado com total confidencialidade, sigilo e privacidade.

4. O participante tem disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa

O senhor(a) terá total e plena assistência no HCFMUSP caso ocorra quaisquer eventuais danos a sua saúde decorrentes da pesquisa.

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

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

VI- CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, de de 20...

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador