

Elaine M. Frade Costa
Sorahia Domenice
Rafaela Vieira Correa
Suemi Marui
Ana Claudia Latronico
Berenice B. de Mendonça

*Unidade de Endocrinologia do
Desenvolvimento e Laboratório de
Hormônios e Genética Molecular
LIM/42, Hospital das Clínicas,
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo
(FMUSP), São Paulo, SP.*

RESUMO

Nessa revisão, descrevemos os genes que codificam uma rede de fatores de transcrição, proteínas, hormônios, enzimas e receptores expressos nos diversos níveis do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG), e relatamos nossa experiência na identificação e caracterização das mutações identificadas em pacientes com alterações do eixo HHG, incluindo o hipogonadismo hipergonadotrófico e o hipogonadismo hipogonadotrófico isolado ou associado a outras deficiências hormonais hipofisárias, e alterações do desenvolvimento puberal e sexual. Até o momento, foram identificados 15 genes que atuam no desenvolvimento e função do eixo HHG: *KAL*, *SF1*, *DAX1*, *LEPTINA*, *PC1*, *GnRH*, *GnRHR*, *HESX1*, *LHX3*, *PROP1*, *FSHR*, *LHR*, *FSH β* , *LH β* e *FGFR1*. A maioria das mutações identificadas em nossa casuística foi descrita pela primeira vez na literatura e frequentemente esteve associada a novos aspectos clínicos e hormonais das doenças. As consequências dessas mutações, caracterizadas por estudos *in vitro*, contribuíram para um melhor entendimento da estrutura e função das proteínas codificadas por esses genes. A união do diagnóstico clínico, hormonal e molecular dos distúrbios do eixo HHG contribui significativamente para aprimorar o conhecimento e, conseqüentemente, o diagnóstico e a terapêutica destes pacientes. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/4:440-452)

Descritores: Genes; Hipogonadismo; Eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

ABSTRACT

Molecular Genetics of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis.

In this review, we described the genes that encode an array of transcription factors, matrix proteins, hormones, enzymes and receptors that are expressed at multiple levels of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis (HPG). In addition, we reported our experience in the identification and characterization of naturally occurring mutations in patients affected by HPG disorders, including hypergonadotropic hypogonadism and hypogonadotropic hypogonadism, isolated or associated with others pituitary hormonal deficiencies, and abnormalities of pubertal and sexual development. To date, fifteen distinct genes implicated with HPG axis development and function were identified: *KAL*, *SF1*, *DAX1*, *LEPTIN*, *PC1*, *GnRH*, *GnRHR*, *HESX1*, *LHX3*, *PROP1*, *FSHR*, *LHR*, *LH β* , *FSH β* and *FGFR1*. Most mutations identified in our cohort were described for the first time in literature and they frequently were associated with new clinical and hormonal aspects of the diseases. Characterization of the consequences of these mutations in *in vitro* studies have provided increased understanding of the structure and function of the proteins encoded by these genes. The combined clinical, hormonal and molecular diagnosis of HPG disorders have helped significantly to improve the knowledge and, consequently, the diagnosis and treatment of these patients. (Arq Bras Endocrinol Metab 2003;47/4:440-452)

Keywords: Genes; Hypogonadism; Hypothalamo-pituitary-gonadal axis

Recebido em 14/04/03
Aceito em 02/06/03

NA ÚLTIMA DÉCADA, UM GRANDE número de genes que atuam no desenvolvimento e na função do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HHG) foram identificados. Estes genes codificam uma rede complexa de fatores de transcrição, hormônios, enzimas e receptores hormonais cujas ações são fundamentais para a aquisição e manutenção de uma função reprodutiva normal (1). Mutações identificadas nesses genes representam a base molecular de diversas doenças do eixo HHG. Benefícios valiosos para o paciente, como aconselhamento genético e tratamento específico, foram conquistados com estas descobertas na área da genética molecular. Entretanto, o diagnóstico molecular, incluindo pesquisa de mutações ou anomalias da expressão gênica, deve ser sempre precedido por uma criteriosa e completa avaliação clínica e hormonal. Os achados moleculares representam uma ferramenta adicional, permitindo a confirmação de uma hipótese clínica formulada previamente. Portanto a descrição detalhada do fenótipo, incluindo dados clínicos, história familiar (presença de consangüinidade e de outros membros afetados) e avaliação hormonal, são fundamentais para orientar o pesquisador na busca de mutações em genes já conhecidos ou na procura de novos genes candidatos. Por exemplo, a herança ligada ao cromossomo X, sugerida pelo acometimento exclusivo de indivíduos com cariótipo 46,XY, em uma família com hipogonadismo hipogonadotrófico, direciona a pesquisa molecular para genes localizados no cromossomo X, tais como KAL-1 e DAX-1. Por outro lado, uma família com relato de consangüinidade, cujos membros de ambos os sexos são acometidos pelo quadro de hipogonadismo, sugere a alteração de um gene de localização autossômica com herança recessiva, tal como o gene do receptor do GnRH. Além disso, a associação de hipogonadismo hipogonadotrófico com outras deficiências hormonais de origem hipofisária ou adrenal pode direcionar a investigação molecular para os fatores de transcrição implicados na organogênese hipofisária ou adrenal.

Nesta revisão, focalizaremos as alterações gênicas que acometem o eixo HHG e que foram investigadas em pacientes brasileiros avaliados na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP.

GENES ENVOLVIDOS NA PRODUÇÃO OU AÇÃO DO GNRH

Gene KAL

A síndrome de Kallmann consiste na associação de hipogonadismo hipogonadotrófico com alterações do

olfato (anosmia ou hiposmia). É a forma mais comum de hipogonadismo hipogonadotrófico com incidência estimada de 1:10.000 homens e 1:50.000 mulheres. É caracterizada por uma alteração na migração neuronal durante o desenvolvimento fetal, especialmente dos neurônios olfatórios e produtores de GnRH. Ambos originam-se na placa olfatória, migram através do septo nasal e entram no sistema nervoso central contornando a área septal pré-óptica até o hipotálamo (2,3). A associação de hipogonadismo hipogonadotrófico com anosmia ou hiposmia é resultado da migração inadequada dos neurônios produtores de GnRH e olfatórios determinando a agenesia ou hipoplasia dos bulbos e tratos olfatórios.

O único gene conhecido, ligado ao X, responsável pela síndrome de Kallmann, era o gene KAL que está localizado na região Xp22.3 e codifica uma glicoproteína de matriz extracelular denominada anosmina, que está intimamente relacionada à migração dos neurônios olfatórios e produtores de GnRH até o hipotálamo (1). A anosmina também é expressa no desenvolvimento nas células de Purkinje, localizadas no cerebelo, meso e metanefrons, núcleo oculomotor e mesênquima facial, explicando a associação da síndrome de Kallmann ligada ao X com sincinesia, agenesia renal, anormalidades visuais e defeitos faciais de linha média (4). Mutações ou deleções no gene KAL causam a síndrome de Kallmann ligada ao X (5,6) e grandes deleções na região Xp22.3 determinam a chamada síndrome dos genes contíguos. A frequência de deleções ou mutações no gene KAL não foi determinada até o momento, pois essa é uma doença rara e a obtenção de uma grande casuística é difícil.

Além da herança ligada ao X, foram descritas famílias tanto com herança autossômica dominante, como autossômica recessiva (7).

Avaliamos 23 pacientes portadores de síndrome de Kallmann. O diagnóstico clínico de hipogonadismo hipogonadotrófico foi baseado no desenvolvimento incompleto ou ausente dos caracteres sexuais secundários após os 17 anos de idade cronológica, associado a níveis baixos ou normais de LH em ambos os sexos, e níveis baixos de testosterona nos homens e estradiol nas mulheres. Os níveis basais de LH eram pré-puberis em 95% e puberais no restante dos casos. A resposta do LH após estímulo com GnRH foi ausente em 20% dos casos, de padrão pré-puberal em 65% e puberal em 15% (8). Todos os pacientes tinham anosmia ou hiposmia confirmados por um teste olfatório específico, *The Smell Identification Test* (9). Não observamos doenças associadas em nenhum dos pacientes. Dos 23 pacientes, 12 eram familiares. Não

identificamos deleções na região codificadora do gene *KAL* e encontramos uma mutação de ponto, R191X, descrita pela primeira vez em um paciente com história familiar sugestiva de herança ligada ao X com desenvolvimento parcial dos caracteres sexuais secundários, com níveis de LH basal e após estímulo com GnRH pré-puberais e sem doenças associadas. A heterogeneidade de apresentação clínica e hormonal é comum em pacientes com mutações no gene *KAL*, sugerindo que genes modificadores ou fenômeno epigenético influenciam na expressão fenotípica (10). Confirmamos que mutações na região codificadora do gene *KAL* ocorrem na minoria dos casos de síndrome de Kallmann, como previamente relatado por Oliveira e cols., que demonstraram que apenas 14% dos casos familiares e 11% dos casos esporádicos tinham mutações identificadas no gene *KAL* (7), sugerindo que genes autossômicos, sejam responsáveis pela maioria dos casos familiares de síndrome de Kallmann.

Gene *FGFR1*

Recentemente, várias mutações do receptor do fator de crescimento I dos fibroblastos (*FGF1R*) foram descritas em pacientes com uma forma autossômica dominante da síndrome de Kallmann, associado a alterações do olfato e a outros estigmas também presentes nesta síndrome, como sincinesia, fenda palatina e agenesia de corpo caloso. A razão para a sobreposição de fenótipos nesta síndrome, causada por mutações em 2 genes distintos, é a interferência da anosmina na ação do fator de crescimento de fibroblastos por impedir a dimerização do *FGF1R* (11).

Genes *SF1* e *DAX1*

Os genes *SF1* (*NR5A1*) e *DAX1* (*NR0B1*) são receptores nucleares órfãos expressos no hipotálamo (neurônios do núcleo ventro-medial), adenohipófise (gonadotrófos), gônadas (nas células da teca e granulosa do ovário, células de Sertoli e Leydig) e nas três camadas do córtex da supra-renal, e regulam o desenvolvimento e função de todo o eixo hipotálamo-hipófise-gônadal. Estudos em animais e humanos comprovam o papel crucial destes dois fatores transcricionais na função reprodutiva.

Gene *SF1* - (*Steroidogenic Factor 1 gene*)

O gene *SF1* humano está localizado no cromossomo 9q33 e pertence à superfamília 5 dos receptores nucleares, grupo A, membro 1 (*NR5A1*). O *SF1* é um fator transcricional que regula a expressão dos genes do grupo citocromo P450 esteróides hidroxilases (*CYP*), da proteína reguladora da esteroidogênese

aguda (*StAR*), da sub-unidade alfa dos hormônios glicoprotéicos hipofisários e do hormônio anti-Mülleriano (12).

Animais homocigotos para a deleção do gene *Sf1* apresentam agenesia gonadal e supra-renal, sexo reverso 46,XY, persistência dos ductos Müllerianos nos machos e anormalidades no desenvolvimento do núcleo ventro-medial do hipotálamo e expressão alterada das gonadotrofinas nos gonadotrofos, além de obesidade (13).

Poucas informações são disponíveis sobre o papel do gene *SF1* na puberdade humana. Até o momento, apenas três mutações no *SF1* foram descritas em humanos (14-16). Duas delas foram identificadas em dois pacientes pré-púberes com sexo reverso XY, que apresentavam disgenesia gonadal, persistência dos ductos de Müller e insuficiência supra-renal primária. A terceira descrição de mutação do *SF1* é a de uma menina com insuficiência supra-renal, cujo acompanhamento acrescentará informações adicionais sobre o papel do *SF1* na biossíntese estrogênica e no desenvolvimento puberal.

Analizamos o gene *SF1* em 32 pacientes com sexo reverso 46, XY sem insuficiência adrenal e identificamos uma nova mutação no *SF1*, uma deleção de 8 pares de bases em heterocigose no exon 6, em uma paciente portadora de sexo reverso 46,XY, que apresentava genitália ambígua, ausência bilateral de tecido gonadal, função supra-renal normal e hipogonadismo hipergonadotrófico (17). Esta deleção resulta em uma proteína truncada com perda da porção C-terminal do *ligand-binding domain* e do domínio AF-2, região importante para a ativação proteica. A descrição do primeiro caso de mutação do *SF1* sem insuficiência supra-renal amplia consideravelmente o fenótipo das mutações do *SF1* em humanos.

Gene *DAX-1* - (*Dosage sensitive sex reversal Adrenal insufficiency, X chromosome, gene 1*)

O gene *DAX-1* (*NR0B1*) está localizado no braço curto do cromossomo X (Xp21.3). A presença de mutações no gene *DAX1* causa a hipoplasia adrenal congênita ligada ao X (HAC). Nesta doença, há perda das zonas permanentes do córtex supra-renal, que se caracteriza histologicamente por grandes células vacuolizadas lembrando as células adrenais fetais.

O locus da hipoplasia adrenal congênita (HAC) foi mapeado inicialmente na região crítica da HAC, região de 250 a 500Kb no cromossomo Xp21, pelo estudo de pontos de deleção em homens com a síndrome da deleção dos genes contíguos (deficiência da glicerol quinase, distrofia muscular de Duchenne, defi-

ciência da ornitina transcarbamoiltransferase e retardo mental). O *locus* DSS (*Dosage Sensitive Sex reversal*) foi também mapeado no Xp21, região de 160Kb, que se sobrepõem à região crítica da HAC (18). Em 1994, o gene *DAX1* humano foi clonado e identificado como o gene responsável pela HAC ligado ao X (19,20).

A maioria dos meninos portadores de HAC desenvolve o quadro de insuficiência supra-renal nas primeiras semanas de vida, sendo as crises de perda de sal freqüentes neste período e fatais se não forem adequadamente tratadas. No entanto, a insuficiência supra-renal pode ocorrer também mais tardiamente na infância (faixa de 2 a 9 anos). A ambigüidade genital não é observada nestes pacientes, porém a criptorquidia pode estar presente. Os achados hormonais usualmente observados são níveis elevados de ACTH e renina e níveis baixos de cortisol e aldosterona e dos seus respectivos precursores, que permitem o diagnóstico diferencial com a hiperplasia adrenal congênita. A falência no desenvolvimento puberal espontâneo devido à presença de hipogonadismo hipogonadotrópico é uma característica da doença (19). Estudamos um paciente com 16 anos de idade com queixa de retardo puberal. Aos 2 anos de idade, foi diagnosticada insuficiência supra-renal e, desde então, foi tratada com glicocorticóide e mineralocorticóide. O estudo hormonal confirmou a presença de insuficiência supra-renal e hipogonadismo hipogonadotrófico. A análise do DNA identificou uma troca de base no nucleotídeo 1133 do exon 1 do gene *DAX1*, com a substituição de uma alanina por uma valina no codon 300 da proteína (21).

Nos casos estudados na infância, observou-se que o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal estava intacto nos meninos portadores da HAC ligada ao X (22) porém, a maioria não desenvolve sinais puberais espontaneamente. A resposta das gonadotrofinas é variável ao estímulo pulsátil com GnRH, e raros pacientes apresentam elevação do FSH e menos freqüentemente do LH, em contraste ao observado nos pacientes com deficiência de GnRH, nos quais a administração pulsátil de GnRH causa a progressiva elevação do LH. Assim, na HAC, existe uma resposta hipofisária anormal ao GnRH exógeno, além de uma provável deficiência na produção e/ou secreção de GnRH endógeno. Conseqüentemente, a terapia com GnRH pulsátil é ineficaz. A resposta testicular ao estímulo com hCG apresenta um incremento adequado dos níveis de testosterona, sugerindo preservação da função das células de Leydig. Poucos dados estão disponíveis em relação ao papel do *DAX1* na espermatogênese humana, porém o estudo de animais *knockout* (*Dax1*) tem sugerido um papel significativo no desenvolvimento testicular e na espermatogênese.

Descrevemos um paciente do sexo masculino com 2 anos de idade, cuja primeira manifestação clínica da doença foi puberdade precoce isossexual independente de gonadotrofinas (23). Este menino apresentava pelos pubianos Tanner II, aumento peniano e testicular e avanço de idade óssea. Os níveis de testosterona basal eram elevados enquanto as gonadotrofinas basais e após estímulo com GnRH eram compatíveis com valores pré-púberais. Durante o tratamento sem sucesso com análogo de GnRH, a criança apresentou uma crise de insuficiência supra-renal. A reposição dos esteróides adrenais determinou a redução do tamanho testicular bem como dos valores de testosterona a níveis pré-púberais. O estudo molecular deste paciente revelou uma mutação, a inserção de uma base no exon 1 do gene *DAX1*, que resultou em um *stop codon* prematuro na posição 71 da proteína *DAX1*. Nossos achados sugerem que níveis excessivos e cronicamente elevados de ACTH poderiam estimular as células de Leydig e determinar, em meninos com mutações no gene *DAX1*, quadro de puberdade precoce independente de GnRH.

Fenotipicamente, a HAC pode se apresentar sob diversas formas que não se correlacionam com o genótipo. Foram descritas insuficiência supra-renal isolada na infância, insuficiência supra-renal isolada no adulto, hipogonadismo hipogonadotrófico isolado, insuficiência supra-renal e hipogonadismo hipogonadotrófico, insuficiência supra-renal de início tardio na infância e hipogonadismo hipogonadotrófico parcial (19,20,22, 24-26). A variabilidade clínica pode ocorrer dentro de uma mesma família, onde mulheres carreadoras de mutação do *DAX-1* podem apresentar puberdade atrasada (24). Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado foi descrito em uma paciente portadora de mutação do gene *DAX1* em homozigose pelo fenômeno de conversão gênica (25). Apesar do estudo de cerca de 120 pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático não ter identificado nenhuma mutação do *DAX1*, mais recentemente casos de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico parcial e insuficiência supra-renal manifestada na idade adulta foram descritos, caracterizando formas clínicas leves da doença (14,26).

Gene da Leptina

A leptina, principal proteína secretada pelos adipócitos, tem um papel importante na regulação dos estoques de tecido gorduroso corpóreo e participa também da fisiologia da puberdade e reprodução. O gene humano que codifica essa proteína está localizado no cromossomo 7 (7q31.3) e é constituído por 3 exons.

Chehab demonstrou que a esterilidade presente em camundongos fêmeas deficientes em leptina (camundongos *ob/ob*) era conseqüente à insuficiência de hormônios estimuladores hipotalâmicos e hipofisários, e que a terapêutica com leptina corrigia esta deficiência, resultando em ovulação e gestação (27). Estudos em camundongos revelaram que a leptina age no eixo HHG centralmente estimulando a liberação de LH e FSH da hipófise (28). Infusões de leptina aceleram o início puberal em animais (29). Os diferentes estudos em roedores não apenas confirmam o papel da leptina na fisiologia da puberdade e reprodução, como também demonstram que estes efeitos não são somente secundários aos efeitos no balanço energético e do acúmulo de gordura.

A leptina parece ser necessária, porém não suficiente, para a indução do processo de desenvolvimento puberal em humanos. Observa-se uma diferença nos padrões de secreção de leptina em meninos e meninas durante a evolução puberal. Este fato pode ser explicado parcialmente pelas diferenças na composição corpórea dos dois sexos durante a puberdade. Nas meninas, o acúmulo de gordura corpórea parece seguir de modo quase linear ao incremento nos níveis de leptina (30). Já nos meninos, o aumento nos níveis de testosterona no início da puberdade é precedido por um pico nos níveis de leptina, que tendem a cair progressivamente aos valores pré puberais com o evoluir da puberdade, compatível com o acúmulo de massa muscular e não de tecido gorduroso que ocorre nos meninos, especialmente durante o período puberal tardio (31).

Assim, uma função normal da leptina parece ser essencial para o início do desenvolvimento puberal. Pacientes portadores de deficiência de leptina, por mutação em homozigose, apresentam hipogonadismo (32). O mecanismo que determina o desenvolvimento de hipogonadismo nestes pacientes não está totalmente esclarecido, porém supõe-se uma origem hipotalâmica. Esta hipótese baseia-se no estudo hormonal de um homem adulto deficiente em leptina, no qual a administração de GnRH induziu um incremento normal de LH e FSH e a administração de gonadotrofinas determinou a elevação dos níveis de testosterona (32).

Gene PC 1 - (Prohormone convertase-1 gene)
Mutações no gene da endopeptidase, Pró-hormônio convertase 1, que regula as modificações pós tradução de pró-hormônios e neuropeptídeos, foram descritas em pacientes portadores de obesidade, hipocortisolemia e hipogonadismo hipogonadotrófico (33). O mecanismo determinante do hipogonadismo nestes pacientes não está esclarecido até o momento.

Gene GnRH

O GnRH é um peptídeo que exerce um importante papel na regulação do eixo neuroendócrino pelo estímulo da produção e liberação de LH e FSH. Em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico, os níveis de gonadotrofinas são baixos ou normais, e a administração pulsátil de GnRH restaura o potencial reprodutivo na maioria deles. Com base nesses dados, a deficiência de GnRH foi considerada como a etiologia do hipogonadismo hipogonadotrófico e o *gene do GnRH*, localizado na região 8p21, um candidato óbvio para mutações em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (34). Essa hipótese foi confirmada pela identificação de deleção no *gene do GnRH* em ratos com hipogonadismo hipogonadotrófico com herança autossômica recessiva (35,36). No entanto, até o momento, nenhuma mutação nesse gene foi identificada em humanos com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (37-39). Mutações no gene do GnRH, outro candidato à causa de hipogonadismo hipogonadotrófico, não foram ainda identificadas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico sem alterações do olfato, que não apresentam mutações no gene *GnRHR*.

Gene GnRHR

O gene do *GnRHR* é a primeira causa genética identificada do hipogonadismo hipogonadotrófico isolado com herança autossômica recessiva. Está localizado na região 4q21.2 e codifica a síntese do receptor de GnRH, que pertence à grande família dos receptores ligados à proteína G. De Roux e cols. pioneiramente lançaram, na literatura, a hipótese de que, à semelhança ao que ocorre no receptor do LH/hGC, mutações que determinem a perda parcial da função do receptor poderiam ocorrer nos pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado parcial. Identificaram no gene *GnRHR*, em dois irmãos afetados, uma mutação em heterozigose composta, a G106R/R262G, (40). Várias mutações nesse gene já foram descritas em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado; no entanto, essas mutações esclareceram a etiologia do hipogonadismo hipogonadotrófico em apenas 20% dos pacientes estudados até o momento (40,41). A apresentação clínica dos pacientes com mutações no gene *GnRHR* é bastante heterogênea, podendo variar de um hipogonadismo completo a um desenvolvimento parcial dos caracteres sexuais secundários.

Em nosso serviço, estudamos 17 pacientes de 14 famílias com hipogonadismo hipogonadotrófico e função olfatória normal confirmada pelo teste olfatório específico já mencionado acima. Identificamos uma

mutação nova em homozigose, a Arg139His, localizada no sítio DRS conservado na junção da terceira alça transmembrânica e a segunda intracelular do receptor, em um caso isolado do sexo feminino com a forma completa de hipogonadismo hipogonadotrófico. Essa mutação eliminou completamente a ligação do GnRH ao receptor, e impediu a produção de fosfato de inositol *in vitro*. Em outra família com 4 membros afetados portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico isolado parcial, identificamos uma mutação em heterozigose composta, a Asn10Lys/Gln106Arg. A Gln106Arg, localizada na primeira alça extracelular do receptor, foi previamente descrita e a análise *in vitro* indicou redução da afinidade do receptor na ligação com o GnRH. A mutação nova, N10K, localizada no domínio extracelular amino terminal do receptor, também reduziu a afinidade do receptor na ligação com o GnRH *in vitro*. Portanto, observamos uma boa correlação entre o genótipo e o fenótipo dos nossos pacientes: a mulher homozigota para a mutação R139H que inativa completamente o receptor, apresentou a forma completa de hipogonadismo hipogonadotrófico com níveis basais indetectáveis de LH sem resposta ao estímulo com GnRH. Já os pacientes com heterozigose composta para as mutações Asn10Lys/Gln106Arg, que inativavam incompletamente o receptor, tinham uma forma parcial de hipogonadismo hipogonadotrófico com níveis basais baixos de LH responsivos ao estímulo com GnRH. No entanto, não observamos diferença clínica ou hormonal entre os pacientes com e sem mutações no gene *GnRHR*, indicando que esses dados não contribuem para a identificação de pacientes portadores de mutações no gene *GnRHR* (42).

Genes que Codificam Fatores Envolvidos no Desenvolvimento Hipofisário

Diversos fatores de transcrição e de sinalização estão envolvidos no mecanismo de formação da hipófise e da diferenciação celular para a secreção dos diferentes hormônios hipofisários (43). Mutações em genes que atuam na organogênese hipofisária podem causar hipogonadismo hipogonadotrófico sempre associado à deficiência de GH ou de outros hormônios hipofisários (TSH, ACTH e Prolactina). Assim, o paciente quase sempre apresenta baixa estatura associada à ausência de desenvolvimento dos caracteres sexuais.

Os genes da família *homeobox* têm participação desde a formação inicial da hipófise até a diferenciação das diferentes linhagens celulares. Até o momento, foram descritas mutações nos genes *HESX-1*, *PROP-1* e *LHX3*, que afetam a função dos gonadotrofos.

Gene *HESX-1*

O *HESX1* pertence à classe *paired-like homeobox* e está localizado no cromossomo 3 (3p21.2) em humanos. Durante a embriogênese no camundongo, esse gene está inicialmente expresso logo no início da gastrulação (44). Sua expressão é restrita ao diencéfalo ventral e depois desaparece.

Mutações na região do homeodomínio do *HESX-1* foram identificadas em pacientes portadores da síndrome de displasia septo-óptica (DSO) (45,46). Porém, a ocorrência de mutação no *HESX-1* em pacientes com DSO é rara (47). A DSO é diagnosticada caso o paciente apresente dois dos seguintes critérios: hipoplasia do nervo óptico; alterações radiológicas de linha média (ausência do septo pelúcido, agenesia de corpo caloso etc.) e hipoplasia hipofisária. A endocrinopatia mais comum é a deficiência de hormônio de crescimento, que pode ser isolada ou associada a outras deficiências hipofisárias. A maioria dos casos é esporádica e, quando familiar, a doença parece ter uma herança autossômica recessiva. Mutações no *HESX-1* também foram identificadas em pacientes sem características de DSO (47,48). Estes pacientes apresentam hipopituitarismo geralmente associado à neurohipófise ectópica. Estudamos 78 pacientes com deficiência de GH associado ou não a defeitos de linha média, e identificamos a primeira mutação no domínio repressor do *HESX-1* (I26T) em uma paciente com hipopituitarismo (deficiências de GH, LH, FSH, TSH e PRL) e neurohipófise ectópica.

Gene *LHX3*

O *LHX3* pertence à classe LIM dos genes *homeobox* e sua expressão é detectada desde o início da formação da hipófise até na hipófise de adultos. O gene está localizado no cromossomo 9 (9q34.3) em humanos.

Netchine e cols. identificaram duas mutações em homozigose no *LHX3* (49). A doença tem herança autossômica recessiva e os pacientes apresentam deficiência de GH, gonadotrofinas, TSH e PRL, preservando apenas a função dos corticotrofos. Os pacientes também apresentam ombros elevados e antevitados, associado à severa limitação na rotação cervical, que impede a dissociação dos movimentos da cabeça e tronco. A RM da região hipofisária evidenciou hipoplasia severa em dois pacientes e um paciente evoluiu de uma hipófise hiperplásica para uma hipófise hipoplásica após 10 anos. Até o momento, não identificamos mutações no *LHX3* em 10 pacientes com hipopituitarismo e neurohipófise ectópica.

Gene *PROP-1*

O *PROP-1*, *Prophet of PIT-1*, pertence à classe *paired-like homeobox* e está localizado no cromossomo 5 (5q35) em humanos.

Mutação no *PROP-1* é a causa genética mais freqüente de hipopituitarismo esporádico ou familiar. Até o momento, doze diferentes mutações, todas localizadas dentro do homeodomínio no *PROP-1*, foram identificadas em pacientes com hipopituitarismo (50-56). A mutação mais freqüentemente encontrada é a deleção AG 301,302, tanto em casos isolados quanto em famílias não relacionadas. A doença tem sempre herança autossômica recessiva. Todos os pacientes com mutações no *PROP-1* apresentam deficiências de GH, PRL, TSH, e hipogonadismo hipogonadotrófico. Uma parte destes pacientes podem desenvolver a deficiência de cortisol (53). Os pacientes apresentam parênquima hipofisário diminuído e neurohipófise tópica à RNM, porém alguns pacientes podem ter uma hipófise hiperplásica que evolui para uma diminuição importante do parênquima (53).

A deficiência de gonadotrofinas é evidente na puberdade; porém, existe descrição de um paciente com micropênis, indicando uma deficiência muito precoce das gonadotrofinas, até pacientes que iniciaram normalmente a puberdade, porém, foi interrompida pelo hipogonadismo hipogonadotrófico identificado aos 15 e 20 anos de idade (51). Portanto, há uma grande variabilidade no fenótipo para um mesmo genótipo e mesmo dentro de uma mesma família. Recentemente, um único paciente com mutação no *PROP-1* atingiu altura normal sem tratamento hormonal adequado, indicando uma nova variação no fenótipo. Provavelmente isto ocorreu pelo hipogonadismo mais importante que a deficiência de GH, o que retardou a fusão epifisária (57).

GENES QUE ATUAM NA PRODUÇÃO OU AÇÃO DAS GONADOTROFINAS

Genes das sub-unidades β do FSH e do LH

Os hormônios hipofisários, LH, FSH e TSH, e a gonadotrofina coriônica (hCG) pertencem à família dos hormônios glicoprotéicos (58). Estes hormônios apresentam uma estrutura heterodimérica comum, composta por duas cadeias polipeptídicas diferentes codificadas por genes distintos. A cadeia α é comum aos 4 hormônios, enquanto a cadeia β é única para cada hormônio glicoprotéico, conferindo especificidade à ligação aos seus receptores específicos.

Três mutações em homozigose ou em heterozigose composta foram identificadas no gene que codifica a cadeia β do FSH em quatro mulheres com atraso puberal caracterizado por ausência ou pequeno desenvolvimento mamário, amenorréia primária e infertilidade (59-62). O perfil hormonal típico desta condição inclui concentrações indetectáveis de FSH e valores elevados de LH (63). O tratamento com FSH exógeno resultou em desenvolvimento folicular, ovulação e fertilidade. Recentemente, identificamos uma mutação inativadora na sub-unidade β do FSH (Tyr76X) em uma paciente brasileira com amenorréia primária e pequeno desenvolvimento mamário. Os valores de FSH, medidos por ensaio imunofluorométrico, foram $< 0,1\text{UI/L}$ em condição basal e após estímulo com GnRH, enquanto os valores de LH foram elevados (30-90UI/L). Esta mesma mutação foi descrita previamente em uma outra paciente brasileira com fenótipo de deficiência de FSH semelhante, sugerindo uma boa correlação genótipo e fenótipo nesta rara condição (62).

Uma única mutação em homozigose na cadeia β do LH foi descrita, até o momento, em um paciente do sexo masculino portador de atraso puberal, concentrações baixas de testosterona e oligospermia (63). Os níveis de LH foram elevados, indicando a presença de imunorreatividade para o LH sem ação biológica. O tratamento crônico com hCG neste paciente resultou em aumento do volume testicular, virilização e aumento do número de espermatozoides (63).

Genes dos Receptores das Gonadotrofinas

Os efeitos dos hormônios glicoprotéicos são mediados por receptores localizados na membrana plasmática, que ativam a enzima adenil ciclase através da ligação à proteína Gs (64,65). Os hormônios, LH e hCG, exercem seus efeitos biológicos através de um único receptor. Os receptores do LH/hCG e do FSH (LHR e FSHR, respectivamente) são polipeptídeos caracterizados por uma estrutura composta de três domínios: um extenso domínio extracelular aminoterminal, um domínio intermediário composto de sete segmentos helicoidais hidrofóbicos interligados por 3 alças extracelulares e 3 alças intracelulares, e um curto domínio intracelular carboxi-terminal (64).

Gene *LHR*

O gene humano do LHR está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p21) e sua organização estrutural caracteriza-se por 11 exons e 10 introns. Os primeiros 10 exons codificam a maior parte do domínio aminoterminal extracelular do receptor,

enquanto o extenso exon 11 (> 1000pb) codifica aproximadamente 50 resíduos do domínio extracelular, os sete segmentos do domínio transmembranoso e toda a região intracitoplasmática carboxi-terminal do LHR (65).

Mutações Ativadoras do LHR

Mutações germinativas ativadoras do gene do LHR determinam o fenótipo de puberdade precoce independente de gonadotrofinas de origem familiar ou esporádica, com acometimento exclusivo do sexo masculino (66,67). Esta rara condição autossômica dominante, caracterizada por autonomia testicular, é denominada de testotoxicose ou FMPP (*familial male limited precocious puberty*). Após a identificação da primeira mutação ativadora do gene do LHR em 1993 (68), diversas mutações foram identificadas em mais de 60 famílias com testotoxicose (65). Todas as mutações ativadoras identificadas em meninos com testotoxicose, até o presente momento, estão localizadas no exon 11 do gene do LHR (69).

Realizamos o estudo clínico e molecular de 8 meninos pertencentes a 7 famílias brasileiras com diagnóstico de testotoxicose (70). Os níveis de testosterona nestes pacientes foram puberais e variaram amplamente (104-975ng/dL). Os níveis de LH e FSH basais foram pré-puberais em todos os 8 meninos (70). O teste de estímulo com GnRH evidenciou níveis pré-puberais de gonadotrofinas em 7 meninos, e apenas um paciente apresentou níveis puberais de LH. A evidência de supressão completa das gonadotrofinas com agonista de GnRH associada à persistência de concentrações elevadas de testosterona neste caso, indicou maturação secundária do eixo hipotálamo-hipofisário devido a exposição androgênica crônica.

O seqüenciamento do DNA genômico extraído de sangue periférico dos 8 meninos brasileiros com testotoxicose evidenciou 5 diferentes mutações, sendo três destas mutações identificadas pela primeira vez: Ala568Val, Leu457Arg e Leu368Pro (66,67,71). A mutação Ala568Val foi a mais freqüente mutação na série brasileira, tendo sido identificada em 43% das famílias estudadas. Um dos pacientes estudados apresentou a mutação Ala568Val inesperadamente em estado de homozigose. Este achado inédito foi determinado pela dissomia uniparental materna, confirmada pela análise de microssatélites do cromossomo 2 (72).

Mulheres portadoras de mutações ativadoras do LHR não desenvolvem puberdade precoce e apresentam função reprodutiva normal. O estudo clínico e hormonal de duas mulheres brasileiras portadoras de mutações, evidenciou concentrações de gonadotrofi-

nas, estrógenos e andrógenos normais, confirmando a ausência de fenótipo nestas mulheres (70).

Mutações Inativadoras do LHR

Mutações inativadoras do gene LHR foram inicialmente identificadas em pacientes com pseudo-hermafroditismo masculino causado pela hipoplasia das células de Leydig (58,73). Esta rara condição autossômica recessiva é caracterizada pela presença de genitália externa feminina, gônadas masculinas em região inguinal e concentrações baixas de testosterona e não responsivas ao teste de estímulo com hCG. Mutações inativadoras do gene do LHR foram posteriormente identificadas em pacientes com micropênis associado ou não à hipospádia e criptorquidismo (69,74).

Uma mutação inativadora do LHR em homozigose foi descrita pela primeira vez em uma mulher brasileira com amenorréia secundária e infertilidade (69). Esta paciente era irmã de 3 pseudo-hermafroditas masculinos devido à hipoplasia das células de Leydig. A mutação Arg554X identificada nesta família resultou em um receptor truncado na terceira hélice transmembrana do LHR (69). Clinicamente, mulheres com mutações inativadoras do LHR em homozigose apresentam genitália externa e interna feminina normais e desenvolvimento mamário e pubiano adequado no período da puberdade (75,76). No entanto, amenorréia primária ou irregularidade menstrual (oligoamenorréia) e infertilidade foram relatados em todas as pacientes estudadas (76).

As concentrações de LH e a relação LH/FSH foram elevadas em todas as pacientes com mutações inativadoras do LHR em homozigose, caracterizando, desta forma, o quadro hormonal da resistência ovariana ao LH. As concentrações de andrógenos foram normais, assim como as concentrações de estradiol na fase folicular precoce, permitindo o completo desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e proliferação endometrial parcial nestas pacientes. A ultrassonografia pélvica ou transvaginal revelou a presença de útero hipoplásico e ovários aumentados contendo cistos. Duas pacientes foram submetidas à biópsia ovariana, que evidenciou a presença de folículos antrais com atividade proliferativa, porém ausência de corpo lúteo ou albicans (75).

Gene do FSHR

O gene humano do FSHR apresenta localização e organização estrutural semelhante a do LHR, exceto pela presença de 10 exons e 9 introns (58).

Mutações Ativadoras do FSHR

Uma única mutação ativadora (Asp567Gly) foi descrita na terceira alça intracitoplasmática do FSHR em um homem que apresentou espermatogênese e fertilidade normais, apesar da presença de níveis de gonadotrofinas indetectáveis após hipofisectomia por tumor hipofisário e reposição hormonal com testosterona apenas (77).

Mutações Inativadoras do FSHR

A falência ovariana prematura, responsável por 2 a 3% das causas de infertilidade feminina, é uma condição heterogênea cuja etiologia permanece indeterminada na maioria dos casos. Caracteriza-se por hipogonadismo hipergonadotrófico, ocorrência de amenorréia, hipoestrogenismo e níveis elevados de gonadotrofinas antes dos 40 anos. Na maioria dos casos, a falência ovariana prematura apresenta-se de forma esporádica, no entanto, casos familiares podem ocorrer, sugerindo uma base genética em sua etiologia.

A primeira mutação inativadora do gene do FSHR foi identificada no exon 7 do gene do FSHR em pacientes finlandesas com falência ovariana prematura secundária à disgenesia gonadal 46,XX (78). Esta mutação caracterizou-se pela substituição do nucleotídeo citosina por timina na posição 566 (566C > T) do gene do FSHR, resultando na troca

do aminoácido alanina por valina no códon 189 (Ala189Val) do domínio aminoterminal do receptor (79). O estudo funcional desta mutação revelou uma queda significativa dos níveis de AMPc gerados nas células transfectadas com o receptor mutado (78).

O estudo de 25 pacientes brasileiras com diagnóstico de falência ovariana prematura e cariótipo 46,XX não identificou a presença da mutação Ala189Val do FSHR (80). De fato, a frequência dessa mutação em populações diferentes da finlandesa é muito baixa ou mesmo ausente, sugerindo o efeito do gene fundador. Novas mutações do gene do FSHR em heterozigose composta foram recentemente descritas em mulheres com amenorréia primária e secundária, desenvolvimento puberal normal e desenvolvimento folicular até estágio antral, sugerindo apresentações clínicas menos severas em relação à primeira mutação inativadora descrita (81,82).

Apresentamos na tabela 1, um resumo dos principais genes envolvidos neste eixo e propomos um fluxograma para orientação diagnóstica de pacientes portadores de hipogonadismo (figura 1). A associação dos estudos clínicos, hormonais e moleculares dos distúrbios do eixo HHG amplia significativamente o conhecimento e, conseqüentemente, o diagnóstico e a terapêutica do hipogonadismo.

Tabela 1. Doenças genéticas causadas por mutações nos genes que atuam no desenvolvimento e função gonadal.

| Gene | Locus | Herança* | Fenótipo Predominante |
|----------------|----------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>KAL</i> | Xp22.3 | X-linked | Hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia/hiposmia |
| <i>FGFR1</i> | 8p11.2 | AD | Hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia/hiposmia |
| <i>SF1</i> | 9q33 | AR or AD | Sexo reverso XY, agenesia gonadal associada ou não à insuficiência adrenal |
| <i>DAX1</i> | Xp21.3 | Ligada ao X | Hipogonadismo e hipoplasia adrenal congênita; puberdade precoce independente de gonadotrofinas em meninos |
| <i>Leptina</i> | 7q31.3 | AR | Hipogonadismo hipogonadotrófico e obesidade |
| <i>PC1</i> | 5q15 | AR | Hipogonadismo hipogonadotrófico, hipocortisolismo e obesidade |
| <i>GnRH</i> | 8p21 | ND | Provável hipogonadismo hipogonadotrófico isolado |
| <i>GnRHR</i> | 4q21.2 | AR | Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado |
| <i>HESX1</i> | 3p21.2 | AR/AD | Hipopituitarismo, neurohipófise ectópica, displasia septo óptica |
| <i>LHX3</i> | 9q34.3 | AR | Hipopituitarismo, mal formações esqueléticas cervicais |
| <i>PROP1</i> | 5q35 | AR | Hipopituitarismo |
| <i>FSHR</i> | 2p21 | AR | Hipogonadismo hipergonadotrófico, Falência ovariana precoce |
| <i>LHR</i> | 2p21 | AR | Hipogonadismo hipergonadotrófico em ambos os sexos; genitália ambigua em homens |
| <i>LHβ</i> | 19q13.32 | AR | Hipogonadismo hipergonadotrófico |
| <i>FSHβ</i> | 11p13 | AR | Hipogonadismo hipergonadotrófico |

*ND: não descrito; A: autossômica; R: recessiva; D: dominante

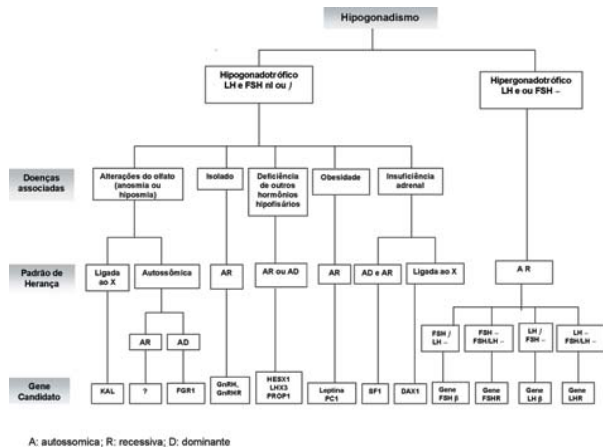


Figura 1. Fluxograma para diagnóstico de hipogonadismo.

REFERÊNCIAS

- Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ, Jameson JL. Genetic causes of human reproductive disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:2447-54.
- Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:8132-6.
- Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 1989;338:161-4.
- Hardelin JP, Julliard AK, Moniot B, Soussi-Yanicostas N, Verney C, Schwanzel-Fukuda M, et al. Anosmin-1 is a regionally restricted component of basement membranes and interstitial matrices during organogenesis: implications for the developmental anomalies of X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Dev Dyn* 1999;215:26-44.
- Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 1991;353:529-36.
- Legouis R, Hardelin JP, Leveilliers 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;67:423-35.
- Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1532-8.
- Costa EMF. Deficiência isolada de gonadotrofinas: diagnóstico clínico, hormonal, molecular e por imagem. Universidade de São Paulo, Departamento de Clínica Médica. *Tese de Doutorado* 2000.

- Doty RL, Shaman P, Kimmelman CP, Dann MS. University of Pennsylvania Smell Identification Test: a rapid quantitative olfactory function test for the clinic. *Laryngoscope* 1984;94:176-8.
- Seminara SB, Hayes FJ, Crowley WF Jr. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocr Rev* 1998;19:521-39.
- Dode CLJ, Dupont JM, Paepe A, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature Genetics published online* 2003.
- Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 1992;6:1249-58.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994;77:481-90.
- Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 1999;22:125-6.
- Biason-Lauber A, Schoenle EJ. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor 1 (NR5A1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. *Am J Hum Genet* 2000;67:1563-8.
- Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, et al. Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1829-33.
- Correa RV DS, Billerbeck AE, Melo KFAS, Costa EMF, Latronico AC, Mendonça BB. A microdeletion in the ligand binding domain of steroidogenic factor 1 causing XY sex reversal without adrenal insufficiency. *Pediatric Research* 2001;49:55A.
- Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet* 1994;7:497-501.
- Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature* 1994;372:672-6.
- Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature* 1994;372:635-41.
- Correa RV DS, Estefan V, Villares SMF, Mendonça BB. A missense mutation A300V in the DAX1 gene in a Brazilian male with X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Medical Science Monitor (in press.)*
- Takahashi T, Shoji Y, Haraguchi N, Takahashi I, Takada G. Active hypothalamic-pituitary-gonadal axis in an infant with X-linked adrenal hypoplasia congenita. *J Pediatr* 1997;130:485-8.

23. Domenice S, Latronico AC, Brito VN, Arnhold IJ, Kok F, Mendonça BB. Adrenocorticotropin-dependent precocious puberty of testicular origin in a boy with X-linked adrenal hypoplasia congenita due to a novel mutation in the DAX1 gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:4068-71.
24. Seminara SB, Achermann JC, Genel M, Jameson JL, Crowley WF Jr. X-linked adrenal hypoplasia congenita: a mutation in DAX1 expands the phenotypic spectrum in males and females. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84:4501-9.
25. Merke DP, Tajima T, Baron J, Cutler GB Jr. Hypogonadotropic hypogonadism in a female caused by an X-linked recessive mutation in the DAX1 gene. **N Engl J Med** 1999;340:1248-52.
26. Mantovani G, Ozisik G, Achermann JC, Romoli R, Borretta G, Persani L, et al. Hypogonadotropic hypogonadism as a presenting feature of late-onset X-linked adrenal hypoplasia congenita. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87:44-8.
27. Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. **Nat Genet** 1996;12:318-20.
28. Yu WH, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, McCann SM. Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997;94:1023-8.
29. Ahima RS, Dushay J, Flier SN, Prabakaran D, Flier JS. Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. **J Clin Invest** 1997;99:391-5.
30. Blum WF, Englaro P, Hanitsch S, Juul A, Hertel NT, Muller J, et al. Plasma leptin levels in healthy children and adolescents: dependence on body mass index, body fat mass, gender, pubertal stage, and testosterone. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:2904-10.
31. Mantzoros CS, Flier JS, Rogol AD. A longitudinal assessment of hormonal and physical alterations during normal puberty in boys. V. Rising leptin levels may signal the onset of puberty. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82:1066-70.
32. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. **Nat Genet** 1998;18:213-5.
33. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. **Nat Genet** 1997;16:303-6.
34. Crowley WF Jr, Filicori M, Spratt DI, Santoro NF. The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. **Recent Prog Horm Res** 1985;41:473-531.
35. Krieger DT, Perlow MJ, Gibson MJ, Davies TF, Zimmerman EA, Ferin M, et al. Brain grafts reverse hypogonadism of gonadotropin releasing hormone deficiency. **Nature** 1982;298:468-71.
36. Mason AJ, Hayflick JS, Zoeller RT, Young WS 3rd, Phillips HS, Nikolic K, et al. A deletion truncating the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the hpg mouse. **Science** 1986;234:1366-71.
37. Weiss J, Crowley WF Jr, Jameson JL. Normal structure of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene in patients with GnRH deficiency and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **J Clin Endocrinol Metab** 1989;69:299-303.
38. Nakayama Y, Wondisford FE, Lash RW, Bale AE, Weintraub BD, Cutler GB Jr, et al. Analysis of gonadotropin-releasing hormone gene structure in families with familial central precocious puberty and idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;70:1233-8.
39. Layman LC, Wilson JT, Huey LO, Lanclos KD, Plouffe L Jr, McDonough PG. Gonadotropin-releasing hormone, follicle-stimulating hormone beta, luteinizing hormone beta gene structure in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **Fertil Steril** 1992;57:42-9.
40. 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;337:1597-602.
41. Beranova M, Oliveira LM, Bedecarrats GY, Schipani E, Vallejo M, Ammini AC, et al. Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86:1580-8.
42. Costa EM, Bedecarrats GY, Mendonça 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;86:2680-6.
43. Treier M, Rosenfeld MG. The hypothalamic-pituitary axis: co-development of two organs. **Curr Opin Cell Biol** 1996;8:833-43.
44. Hermes E, Mackem S, Mahon KA. Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. **Development** 1996;122:41-52.
45. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Martensson IL, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. **Nat Genet** 1998;19:125-33.
46. Dattani ML, Martinez-Barbera J, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Wales JK, et al. Molecular genetics of septo-optic dysplasia. **Horm Res** 2000;53:26-33.
47. Thomas PQ, Dattani MT, Brickman JM, McNay D, Warne G, Zacharin M, et al. Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. **Hum Mol Genet** 2001;10:39-45.
48. Tajima T, Hattori T, Nakajima T, Okuhara K, Sato K, Abe S, et al. Sporadic heterozygous frameshift mutation of HESX1 causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88:45-50.
49. Netchine I, Sobrier ML, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, et al. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. **Nat Genet** 2000;25:182-6.

50. Cogan JD WW, Phillips JA, et al. The PROP-1 2-bp deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**;83:3346-9.
51. Flück CDJ, Rutishauser K, et al. Phenotypic variability in familial combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation resulting in the substitution of Arg>Cys at codon 120 (R120C). *J Clin Endocrinol Metab* **1998**;83:3727-34.
52. Wu W CJ, Pfäffle RW. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet* **1998**;18:147-9.
53. Mendonça BB, Osório MGF, Latronico AC, Estefan V, Lo LSS, Arnhold IJP. Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP-1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**;84:942-5.
54. Osório MG, Kopp P, Marui S, Latronico AC, Mendonça BB, Arnhold IJ. Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**;85:2779-85.
55. Vallette-Kasic S, Barlier A, Teinturier C, Diaz A, Manavella M, Berthezene F, et al. PROP-1 gene screening in patients with multiple pituitary hormone deficiency reveals two sites of hypermutability and a high incidence of corticotroph deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* **2001**;86:4529-35.
56. Vieira TC, Dias da Silva MR, Cerutti JM, Brunner E, Borges M, Arnaldi LT, et al. Familial combined pituitary hormone deficiency due to a novel mutation R99Q in the hot spot region of Prophet of Pit-1 presenting as constitutional growth delay. *J Clin Endocrinol Metab* **2003**;88:38-44.
57. Arroyo A, Pernasetti F, Vasilyev VV, Amato P, Yen SS, Mellon PL. A unique case of combined pituitary hormone deficiency caused by a PROP1 gene mutation (R120C) associated with normal height and absent puberty. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2002**;57:283-91.
58. Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* **2000**;21:551-83.
59. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, et al. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet* **1993**;5:83-6.
60. Matthews C, Chatterjee VK. Isolated deficiency of follicle-stimulating hormone re-revisited. *N Engl J Med* **1997**;337:642.
61. Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, et al. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* **1997**;337:607-11.
62. Layman LC, Porto AL, Xie J, da Motta LA, da Motta LD, Weiser W, et al. FSH beta gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* **2002**;87:3702-7.
63. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* **1992**;326:179-83.
64. Segaloff DL, Ascoli M. The lutropin/choriogonadotropin receptor... 4 years later. *Endocr Rev* **1993**;14:324-47.
65. Ascoli M, Fanelli F, Segaloff DL. The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective. *Endocr Rev* **2002**;23:141-74.
66. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Mendonça BB, Domenice S, Albano MC, et al. A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **1995**;80:2490-4.
67. Latronico AC, Shinozaki H, Guerra G Jr, Pereira MA, Lemos Marini SH, Baptista MT, et al. Gonadotropin-independent precocious puberty due to luteinizing hormone receptor mutations in Brazilian boys: a novel constitutively activating mutation in the first transmembrane helix. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**;85:4799-805.
68. Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino JJ Jr, Minegishi T, Cutler GB Jr. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* **1993**;365:652-4.
69. Latronico AC, Anasti J, Arnhold IJ, Rapaport R, Mendonça BB, Bloise W, et al. Brief report: testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* **1996**;334:507-12.
70. Latronico AC, Lins TS, Brito VN, Arnhold IJ, Mendonça BB. The effect of distinct activating mutations of the luteinizing hormone receptor gene on the pituitary-gonadal axis in both sexes. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2000**;53:609-13.
71. Latronico AC, Abell AN, Arnhold IJ, Liu X, Lins TS, Brito VN, et al. A unique constitutively activating mutation in third transmembrane helix of luteinizing hormone receptor causes sporadic male gonadotropin-independent precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* **1998**;83:2435-40.
72. Latronico AC BA, Modulo EP, Brasil CD, Mendonça BB. Maternal uniparental disomy of chromosome two causing homozygosity for a dominant mutation of luteinizing hormone receptor. *Clinical Endocrinology (Oxf)*, (in press.)
73. Latronico AC, Segaloff DL. Naturally occurring mutations of the luteinizing-hormone receptor: lessons learned about reproductive physiology and G protein-coupled receptors. *Am J Hum Genet* **1999**;65:949-58.
74. Martens JW, Verhoef-Post M, Abelin N, Ezabella M, Toledo SP, Brunner HG, et al. A homozygous mutation in the luteinizing hormone receptor causes partial Leydig cell hypoplasia: correlation between receptor activity and phenotype. *Mol Endocrinol* **1998**;12:775-84.
75. Arnhold IJ, Latronico AC, Batista MC, Izzo CR, Mendonça BB. Clinical features of women with resistance to luteinizing hormone. *Clin Endocrinol (Oxf)* **1999**;51:701-7.
76. Arnhold IJ, Latronico AC, Batista MC, Mendonça BB. Menstrual disorders and infertility caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene. *Fertil Steril* **1999**;71:597-601.
77. Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. *J Clin Endocrinol Metab* **1996**;81:1367-70.

-
78. Aittomaki K, Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J, Gromoll J, et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell** **1995**;82:959-68.
79. Aittomaki K, Herva R, Stenman UH, Juntunen K, Ylostalo P, Hovatta O, et al. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab** **1996**;81:3722-6.
80. da Fonte Kohek MB, Batista MC, Russell AJ, Vass K, Giacaglia LR, Mendonça BB, et al. No evidence of the inactivating mutation (C566T) in the follicle-stimulating hormone receptor gene in Brazilian women with premature ovarian failure. **Fertil Steril** **1998**;70:565-7.
81. Doherty E, Pakarinen P, Tiitinen A, Kiilavuori A, Huhtaniemi I, Forrest S, et al. A Novel mutation in the FSH receptor inhibiting signal transduction and causing primary ovarian failure. **J Clin Endocrinol Metab** **2002**;87:1151-5.
82. Allen LA, Achermann JC, Pakarinen P, Kotlar TJ, Huhtaniemi IT, Jameson JL, et al. A novel loss of function mutation in exon 10 of the FSH receptor gene causing hypergonadotrophic hypogonadism: clinical and molecular characteristics. **Hum Reprod** **2003**;18:251-6.

Endereço para correspondência:

Berenice B. de Mendonça
Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42
Hospital das Clínicas, FMUSP
Caixa Postal 3671
01060-970 São Paulo, SP
Fax: (011) 3083-0626