

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Ericka Barbosa Trarbach

“ESTUDO CITOGENÉTICO E MOLECULAR EM PACIENTES COM
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO COM E SEM ANOSMIA -
SÍNDROME DE KALLMANN E HIPOGONADISMO
HIPOGONADOTRÓFICO NORMÓSMICO”

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Genética e Biologia
Molecular na área de Genética
Humana e Médica.

Orientadora: Profa. Dra. Christine Hackel

Campinas
2004

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	T/11/ni'camp
	T689P
V	6x
TOMBO BC	62034
PRCC	16 P-0086-05
C	☐
D	☒
PREÇO	11,00
DATA	10/02/05
Nº CPD	

Bibid: 342360

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

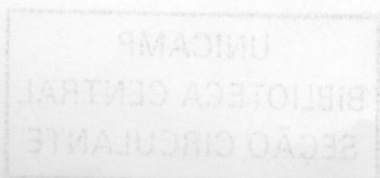
Trarbach, Ericka Barbosa

T689e Estudo citogenético e molecular em pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico com e sem anosmia – síndrome de Kallmann e hipogonadismo hipogonadotrófico / Ericka Brabosa Trarbach. --
Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientadora: Christine Hackel

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Genética médica. 2. Cromossomo. 3. Genética molecular. I. Hackel, Christine.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.



Campinas, 18 de outubro de 2004.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Christine Hackel (Orientadora)

Assinatura

Profa. Dra. Ana Cláudia Latrônico

Assinatura

Profa. Dra. Maria Isabel Aranha Melaragno

Assinatura

Profa. Dra. Antônia Paula Marques de Faria

Assinatura

Prof. Dr. Heraldo Mendes Garmes

Assinatura

Profa. Dra. Denise Engelbrecht Zantut Wittmann

Assinatura

Profa. Dra. Maria Tereza Mathias Baptista

Assinatura

À minha mãe, Perciliana, e minha irmã, Marcia, que estão sempre comigo, apoiando e respeitando as minhas decisões (vocês me ensinaram muito e por isso podem ter a certeza de que estarei sempre bem e feliz).

Ao meu pai, José, minha madrinha, “Bebé” e minha pequenina avó, “Vó Ana”, que também muito me ajudaram.

Ao meu irmão, Bruno, em quem sempre penso e por quem sinto um profundo carinho.

AGRADECIMENTOS

À “VIDA”, de quem sou uma eterna aprendiz, simplesmente por sua grandiosidade.

Aos meus pais, *Mamy* e *Papy*, minha irmã, Marcia, e demais familiares, Vó Ana, Bebê e Camila, pelo apoio, dedicação e amor.

À Chris, orientadora e amiga, com quem trabalharia pelo resto de minha carreira! Com essa afirmação espero que tenham ficado registrados toda a admiração e o respeito que tenho pela excelente profissional e pessoa maravilhosa que é a Chris.

Ao Alberto, pela paciência e compreensão, pelo imenso carinho e pelas flores de sempre.

À Madá, pela ajuda e pelo delicioso sorriso com que nos recebe todos os dias.

À minha “casa”, Alberto 18, Morango, Xr e Cleyton, e agregados, Lucy, Sharon, Élcio Japipa, Paulinho e Ivan Lima, pela convivência harmoniosa! “Minha filha” é muito grata a vocês por terem aturado o meu inconstante humor.

À Neusa, e família, pelo carinho e ensinamentos de valor inestimável.

Aos professores e amigos da academia, Sandro, grande amigo, Luizão e Marien, que sempre me deram a maior “força”, especialmente ao Alexandre, meu professor de boxe.

Às amigas Dani, minha companheira de sempre, Frauzinha (“fecho os olhos pra não ver passar o tempo, já sinto falta de você”), Ferzinha e Renata, pelas quais sinto um carinho super especial.

À Dra Valquiria Magrini e ao Dr Marcelo K. Dias, pelo apoio e incentivo.

À Dra Tereza e demais docentes, aos internos e residentes do Ambulatório de Endocrinologia e Ambulatório de Endocrinologia Pediátrica do Hospital de Clínicas da UNICAMP, que fizeram a avaliação clínica da maioria dos pacientes desse estudo.

Á Dra Isabella, que muito contribui nos enviando material de uma das famílias avaliadas nesse estudo.

Aos pacientes, que sempre foram muito solícitos em nossos encontros.

Aos gatinhos, Luiz Eduardo, Andrey, Dud's e Lúcio, e gatinhas, Frauzinha, Fernandas I, II e III, Renata, Lucy, Camila, Carla, Thalita e Marta, meus queridíssimos colegas de laboratório.

Aos excelentíssimos sócios diretores da Thorus Scisoft, Alberto, Aquiles, Cláudio e Sérgio, em especial ao Cantão pela ajuda em computação gráfica, pelos almoços divertidíssimos desses últimos meses.

Aos funcionários e amigos do laboratório de Citogenética Humana, Nilma, Henry, Jô, Jair e Daniel, pela colaboração prestada.

A Andrezza, funcionária do Ambulatório de Endocrinologia, pela coleta das amostras de sangue.

A todos que, embora não nomeados, contribuíram, direta ou indiretamente, na realização desse projeto.

À FAPESP pelo apoio financeiro e concessão de bolsa.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO E ANOSMIA – SÍNDROME DE KALLMANN	3
1.1.1 – Síndrome de Kallmann ligada ao X	6
1.1.2 – Formas autossômicas da síndrome de Kallmann	10
1.2 – HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO E OLFAÇÃO NORMAL – HHn	14
1.2.1 – Gene <i>GnRH-R</i> e seu receptor.	14
1.2.2 – Outros genes relacionados ao HHn.	17
1.3 – NOVOS GENES CANDIDATOS AO HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 – Casuística	23
3.2 – Metodologia	28
3.2.1 – Técnicas de cultivo de linfócitos de sangue periférico e de análise cromossômica com bandamento GTG	28
3.2.2 – Análise molecular dos genes <i>KAL-1</i> , <i>GnRH-R</i> , <i>NELF</i> <i>EBF2</i>	31
4. RESULTADOS	39
4.1 – Análise citogenética por bandamento GTG e FISH	39
4.2 – Análise molecular do gene <i>KAL-1</i>	40
4.3 – Análise molecular do gene <i>GnRH-R</i> .	44
4.4 – Análise molecular dos genes <i>NELF</i> e <i>EBF2</i>	44
5. DISCUSSÃO	48
5.1 – Análise citogenética.	48
5.2 – Detecção de mutações no gene <i>KAL1</i>	48
5.3 – Análise mutacional do gene <i>GnRH-R</i> .	54
5.4 – Análise mutacional dos genes <i>NELF</i> e <i>EBF2</i>	55
6. CONCLUSÕES	56

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
8. ARTIGO PUBLICADO	72
9. ANEXOS	77

ABREVIATURAS

AST – “alcohol sniff test”

BLAST – “Basic Local Alignment Search Tool”

del – deleção

der – derivado

DMSO – N,N-dimetil sufóxido

dup - duplicação

DNA – ácido desoxirribonucléico

EBF2 – gene do “early B-cell factor”

DNTPs - desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDAS – “electrophoresis documentation and analysis system”

EDTA - ácido etilenodiaminotetraacético

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

FGFR1 – gene do receptor 1 do fator de crescimento de fibroblastos

FISH – hibridação *in situ* por fluorescência

FNIII – fibronectina tipo III

FSH – hormônio folículo-estimulante

GnRH - hormônio liberador de gonadotrofinas

GnRH-R – receptor para o hormônio liberador de gonadotrofinas

GPR54 – gene do receptor 54 acoplado à proteína G

GTG – bandamento G com Tripsina-Giemsa

HCl – ácido clorídrico

HH – hipogonadismo hipogonadotrófico

HHI – hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático

HHn – hipogonadismo hipogonadotrófico normósmico

ins – inserção

inv - inversão

IVS – “intervening sequence”

KAL-1 – gene da síndrome de Kallmann ligado ao X

kb – quilobases

KCl – cloreto de potássio

LH - hormônio luteinizante
LSI - “*locus* specific identifier”
 MgCl_2 – cloreto de magnésio
MIM – “Mendelian inheritance in man”
NaOH - hidróxido de sódio
NCBI – “National Center for Biotechnology Information”
NELF - gene do fator nasal embrionário do hormônio liberador de hormônio luteinizante
p – braço curto do cromossomo
pb – pares de bases
q – braço longo do cromossomo
PCR – reação em cadeia da polimerase
RMI – ressonância magnética por imagem
RNA - ácido ribonucléico
rpm – rotações por minuto
SK – síndrome de Kallmann
SK-X - síndrome de Kallmann ligada ao X
SRY – “sex-determining region Y”
t – translocação
ter – terminal
Tris – Tris hidroximetilaminometano
UNCSISAL – Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo
WAP – “whey acidic protein”

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.1 – Eixo hipotálamo-hipófise (página 2)

Figura 1.2 – Rota de migração dos neurônios olfativos e secretores de GnRH (página 4).

Figura 1.3 – Diagrama de deleções em Xp22.3 (página 7).

Figura 1.4 – Representação esquemática do gene *KAL-1* com a distribuição das mutações descritas neste gene e da anosmina (página 7).

Figura 1.5 - Modelo patogênico da SK (página 10).

Figura 1.6 – Estrutura esquemática do gene e do receptor GnRH-R com a localização de algumas mutações identificadas neste receptor (página 15).

Figura 3.1 – Heredogramas dos casos familiares de SKX (página 26).

Figura 3.2 – Heredogramas dos casos familiares com herança autossômica na SK (página 27).

Figura 3.3 – Heredogramas dos casos familiares de HHn (página 27).

Figura 3.4 – Fluxograma das análises utilizadas na investigação do HH (página 29).

Figura 4.1 – Mutação encontrada no éxon 12 do gene *KAL-1* (página 40).

Figura 4.2 – Sequência de nucleotídeos do gene *KAL-1* de um paciente com uma deleção da base C no éxon 12 e sequência de aminoácidos correspondente (página 40).

Figura 4.3 – Deleção intragênica dos éxons 5-10 do gene *KAL-1* (página 41).

Figura 4.4 – PCR multiplex utilizado na detecção de heterozigotas para deleção dos éxons 5-10 do gene *KAL-1* (página 42).

Figura 4.5 – Mutação encontrada no éxon 5 do gene *KAL-1* (página 43).

Figura 4.6 – Polimorfismo encontrado no gene *EBF2* (página 45).

Figura 4.7 – Alinhamento das sequências do éxon 8 do gene *NELF* depositada no GenBank e aquela vista em nossos pacientes (página 45).

Figura 5.1 – Representação esquemática da deleção intragênica dos éxons 5-10 do gene *KAL-1* e da área de cobertura da sonda KAL (página 50).

Figura 5.2 – Elementos de repetição encontrados nos íntrons 4 e 10 do gene *KAL-1* (página 51).

Tabela I – Mutações descritas no gene *KAL-1* (página 8).

Tabela II – Correlação entre expressão do gene *KAL-1* e o fenótipo da SK (página 9).

Tabela III – Mutações descritas no gene *GnRH-R* (página 16).

Tabela IV – Resumo dos achados clínicos em pacientes com SK (página 24).

Tabela V – Resumo dos achados clínicos em pacientes com HHn (página 25).

Tabela VI – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene *KAL-1* (página 33).

Tabela VII – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene *GnRH-R* (página 33).

Tabela VIII – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene *NELF* (página 34).

Tabela IX – Oligonucleotídeos utilizados na amplificação do gene *EBF2* (página 35).

Tabela X – Intensidade das bandas de amplificação dos genes *KAL-1* e *NPC1* (página 42).

Tabela XI – Resumo das alterações encontradas no gene *KAL-1* (página 43).

Tabela XII – Resumo dos resultados obtidos nas análises citogenéticas e moleculares entre pacientes com SK (página 46).

Tabela XIII – Resumo dos resultados obtidos nas análises citogenéticas e moleculares entre pacientes com HHn (página 47).

RESUMO

A síndrome de Kallmann (SK) é uma afecção relativamente rara, caracterizada pela associação de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) e anosmia/hiposmia. Embora a maioria dos casos de SK seja esporádica, diferentes padrões de herança, recessivo ligado ao X, autossômico dominante e autossômico recessivo têm sido descritos, sendo que a forma ligada ao X da síndrome (SKX) encontra-se genotípica e fenotipicamente melhor definida. O gene *KAL-1* localizado em Xp22.3 escapa à inativação e codifica uma proteína, a anosmina, cujo papel tem sido relacionado ao processo de migração de neurônios produtores de GnRH que ocorre durante a embriogênese humana. No entanto, muitos casos de hipogonadismo hipogonadotrófico não podem ser relacionados a qualquer alteração olfativa, sendo estes classificados como hipogonadismo hipogonadotrófico normósmicos (HHn). Mutações no gene do receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas (*GnRH-R*) têm sido descritas numa parcela desses casos. Além disso, os genes *NELF* (fator nasal embrionário do hormônio liberador de hormônio luteinizante) e *EBF2* (“early B-cell factor”) têm sido relacionados ao processo de migração de neurônios produtores de GnRH, sendo considerados possivelmente envolvidos na gênese do HH.

O presente trabalho foi elaborado com o objetivo de se investigar a base genética das diferentes formas do HH. Para tal, foram avaliados 31 indivíduos com hipogonadismo hipogonadotrófico (pertencentes a 26 famílias), 22 com anosmia e nove com olfação normal, mediante a análise do cariótipo pela técnica de bandamento GTG seguida da análise molecular dos genes *KAL-1* e *GnRH-R*, por PCR e seqüenciamento. Todos os

pacientes estudados apresentaram cariótipo normal, à exceção de um caso esporádico de SK com microdeleção do *locus KAL-1* detectada somente por FISH em estudo anteriormente realizado. Entre os pacientes com SK, foram detectadas mutações na região codificante do gene *KAL-1* nas três famílias com herança recessiva ligada ao X e em um caso esporádico. Duas famílias apresentaram duas deleções intragênicas similares envolvendo os éxons 5-10; na terceira família detectou-se uma mutação 721C>T no éxon 5 levando a um códon de parada prematuro. Esta mutação ainda não se encontra descrita na literatura. No caso esporádico identificou-se uma mutação “frameshift” 1956delC no éxon 12. Em relação aos pacientes com HHn, não foram identificadas mutações nos genes *GnRH-R* e *KAL-1*. Nesses casos, e nos pacientes com SK cuja etiologia não pôde ser esclarecida, foram ainda analisados os genes *NELF* e *EBF2*. Contudo, nenhuma alteração nas seqüências desses genes foi identificada entre os pacientes da nossa casuística.

Em conclusão, não foram encontradas evidências cromossômicas da localização de outros genes candidatos responsáveis pelo surgimento do HH. Duas mutações novas e duas deleções intragênicas semelhantes foram identificadas no gene *KAL-1* entre os casos esporádicos e familiares da SK, observando-se que essas mutações ocorreram numa freqüência relativamente elevada em nossa casuística. Os pacientes com HHn não apresentaram mutações nos genes *KAL-1* e *GnRH-R*. Não foram observadas anomalias nas seqüências codificantes dos genes *NELF* e *EBF2* em nenhuma das formas de HH.

ABSTRACT

Kallmann syndrome (KS) is a relatively rare disorder characterized by the association of hypogonadotropic hypogonadism (HH) with anosmia or hyposmia. Although the majority of KS cases are sporadic, the syndrome may be transmitted as an autosomal dominant, autosomal recessive and X-linked modes of inheritance. The *KAL-1* gene responsible for the X linked form of KS (X-KS) was mapped in Xp22.3 and encodes a protein called anosmin, that could function in the migration of GnRH-secreting neurons during embryonic development. However, many cases of hypogonadotropic hypogonadism do not have olfactory alterations, and are referred as normosmic hypogonadotropic hypogonadism (nHH). Mutations in the *GnRH-R* gene have been described in some of these cases. In addition, the *NELF* and *EBF2* genes have been implicated in the neuronal GnRH migration and are considered promising candidate to HH manifestation.

The aim of the present study was to investigate the genetic basis of different forms of HH. Thirty-one patients with HH (belonging to 26 families), 22 affected by KS and nine with normal olfaction, were evaluated by karyotype analysis using GTG banding technique followed by molecular analysis of the *KAL-1* and *GnRH-R* genes, by PCR and sequencing techniques. All patients exhibited normal karyotypes, with exception of a previously studied KS sporadic case, where a microdeletion of the *KAL-1 locus* was detected only by

FISH. Mutations were identified in the coding region of the *KAL-1* gene in the three familial cases with X-linked inheritance and in one of the sporadic cases of KS. Two similar intragenic deletions involving exons 5-10 were observed in two families. In the third, a new point mutation on exon 5 (721C>T) leading to a premature stop codon was found, while a frameshift mutation caused by one nucleotide deletion (1956delC) within exon 12 was identified in the sporadic case. Mutations in the *KAL-1* and *GnRH-R* genes were not observed in the patients with nHH. In these cases and in the KS patients without *KAL-1* abnormalities, the coding sequences of genes *NELF* and *EBF2* were analyzed. However, no mutation was detected in these genes in our sample.

In conclusion, no chromosomal rearrangements or deletions that could be useful for the localization of other candidate genes responsible for HH were detected. Two new point mutations and two similar intragenic deletions of the *KAL-1* gene were identified among sporadic and familial KS cases, with a relative high frequency in our sample. In the HHn patients, neither *KAL-1* nor *GnRH-R* mutations were detected. No sequence abnormalities were demonstrated for the coding regions of the *NELF* and *EBF2* genes in both forms of HH.

Em humanos, o início e a manutenção da vida reprodutiva dependem da secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). O GnRH é um decapeptídeo secretado por neurônios do hipotálamo que modula a produção e a liberação hipofisária dos hormônios gonadotróficos luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). Estes hormônios vão atuar sobre os testículos e os ovários controlando a produção dos esteróides sexuais e a gametogênese nesses órgãos (Figura 1.1). Com a elevação da concentração dos hormônios sexuais, predominantemente testosterona em homens e estradiol nas mulheres, tem início o processo de desenvolvimento sexual que ocorre na puberdade e resulta em indivíduos sexualmente maduros e aptos para reprodução (SWERDLOFF & ODELL, 1975).

A produção de andrógenos ocorre ainda na vida intra-uterina, onde a testosterona produzida pelos testículos embrionários é responsável pela diferenciação dos genitais internos masculinos e, uma vez convertida em di-hidrotestosterona, viriliza os rudimentos genitais externos. Nesses embriões, a secreção de andrógenos é induzida pela gonadotrofina coriônica até o final da primeira metade da gestação; a partir de então, esse estímulo é feito pelas gonadotrofinas hipofisárias do próprio feto, em especial o LH, que é, portanto, fundamental para que se complete a descida testicular bem como para o crescimento peniano (JOSSO, 1992).

Déficits na produção ou secreção de GnRH levam a uma liberação insuficiente de gonadotrofinas hipofisárias e de esteróides sexuais, resultando em hipogonadismo hipogonadotrófico (HH). A deficiência de GnRH pode estar associada a lesões estruturais que interfiram com o padrão normal de secreção de GnRH pela destruição ou compressão de áreas críticas na eminência média do hipotálamo. O HH idiopático (HHI), por sua vez, tem sido descrito e caracterizado pela deficiência isolada de gonadotrofinas na ausência de tais lesões. Pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico associado a uma deficiência olfativa (anosmia ou

hiposmia) recebem o diagnóstico de síndrome de Kallmann (SK) e aqueles com olfação normal, HHI. Contudo, ambas as apresentações podem ocorrer dentro de uma mesma família e há controvérsia sobre SK e HHI fazerem parte da mesma síndrome ou serem síndromes distintas (QUINTON *et al.*, 1996; GEORGOPOULOS *et al.*, 1997).

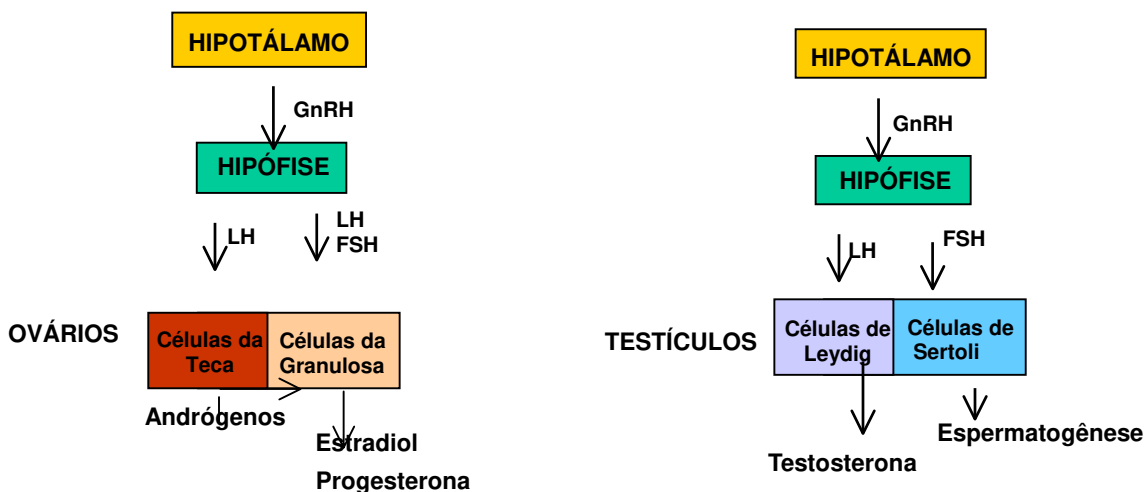


Figura 1.1 - Eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. À esquerda, estímulo hipofisário sobre os ovários na liberação de esteróides sexuais. À direita, atuação da hipófise sobre os testículos na liberação de testosterona e na produção de espermatozóides. Em ambos os casos, a hipófise libera LH e FSH em resposta ao GnRH hipotalâmico.

Uma vez que as etiologias de diferentes formas de HH têm sido recentemente estabelecidas, a terminologia HHI não vem se mostrando muito adequada e será substituída neste trabalho por HHn na denominação de indivíduos portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico normósmicos.

1.1 HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO E ANOSMIA – SÍNDROME DE KALLMANN

A síndrome de Kallmann é a forma mais comum de hipogonadismo resultante da deficiência isolada de gonadotrofinas, ocorrendo em 1/10.000 indivíduos do sexo masculino e 1/50.000 indivíduos do sexo feminino (PAWLOWTZKI *et al.*, 1987). Esta síndrome é definida pela associação de hipogonadismo hipogonadotrófico e anosmia, podendo ser transmitida de forma recessiva ligada ao X (MIM 308700) ou autossômica dominante (MIM244200) ou recessiva (MIM147950), embora a maioria dos casos observados seja esporádica. Entre os casos familiares de SK existe predominância do modo de herança autossômico (cerca de 65% dominante e 25% recessivo) com apenas uma minoria (aproximadamente 11%) de herança recessiva ligada ao X (WALDSTREICHER *et al.*, 1996; GEORGOPOULOS *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Historicamente, a SK foi primeiramente descrita por MAESTRE DE SAN JUAN (1856). Entretanto, KALLMANN *et al.* (1944) foram os primeiros a assegurar a base genética de sua transmissão. Além deles, DE MORSIER (1954) descreveu sob o termo “displasia olfacto-genital” uma série de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico nos quais foi detectada, na autopsia, agenesia de bulbos e tratos olfativos. Na SK, a associação entre hipogonadismo e anosmia pode ser explicada pela origem embrionária comum dos neurônios olfativos e liberadores de GnRH. Os neurônios liberadores de GnRH são os únicos entre os neurônios hipotalâmicos que têm sua origem fora do sistema nervoso central. Esses neurônios são formados por células progenitoras da placa olfativa (WRAY *et al.*, 1989) e migram em associação com os neurônios olfativos até alcançarem a placa crivosa, onde as fibras olfativas juntam-se ao bulbo olfativo e os neurônios secretores de GnRH seguem rumo ao hipotálamo, um processo que se completa com cerca de 3,5 semanas de gestação (SCHWANZEL & PFAFF, 1989) (Figura 1.2). Clinicamente,

distúrbios nessa rota de migração poderiam explicar a deficiência de gonadotrofinas e a anosmia observadas em SK. Esta hipótese foi confirmada por estudos anatomopatológicos realizados em um feto humano de 19 semanas afetado pela síndrome que apresentava um emaranhado anormal sobre a placa crivosa formado pelo acúmulo de neurônios olfativos e secretores de GnRH na área superior nasal (SCHWANZEL *et al.*, 1989).

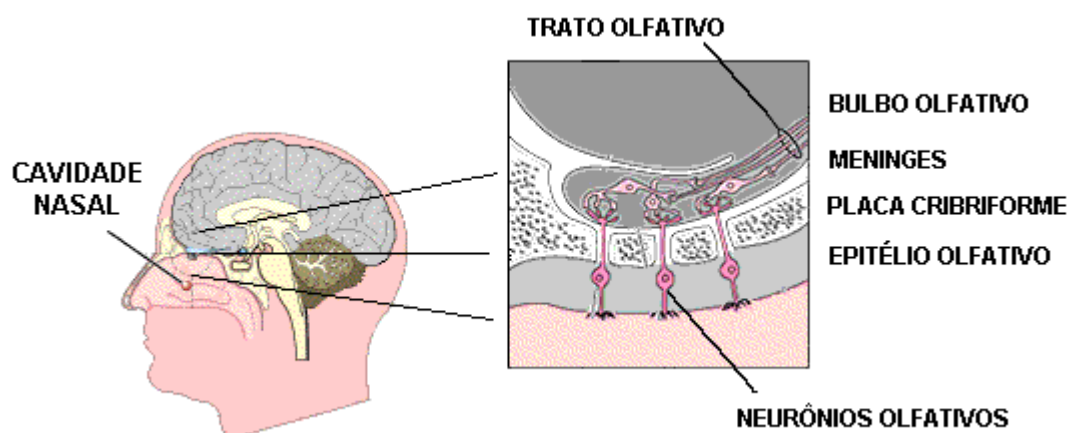


Figura 1.2 – Rota de migração dos neurônios olfativos e secretores de GnRH. Os neurônios olfativos são formados no epitélio olfativo e seus axônios atravessam a placa crivosa para alcançar o bulbo olfativo, onde fazem sinapse com dendritos das células mitrais, formando o trato olfativo. Os neurônios secretores de GnRH seguem a rota de migração dos neurônios olfativos e atravessam o bulbo olfativo até alcançarem o hipotálamo.

Além do hipogonadismo e da anosmia, outros sinais e sintomas ocasionais têm sido descritos em pacientes com SK. Estes incluem malformações como anomalias faciais (atresia e estenose de coanas, fissura labiopalatina e hipertelorismo), anomalias neurológicas (sincinesia bimanual, nistagmo, agenesia do lobo olfativo e ataxia) e anomalias genitourinárias (agenesia renal unilateral), sendo que sincinesia bimanual e agenesia renal têm sido relatadas mais freqüentemente na forma da síndrome ligada ao X (BOULOUX *et al.*, 1994; QUINTON *et al.*, 1997). Muitas famílias com SK exibem ainda uma variação fenotípica entre seus membros afetados que podem apresentar anosmia e/ou hipogonadismo (WALDSTREICHER *et al.*, 1996).

Existe assim, uma expressividade variável dos genes relacionados à doença, sendo tal variação mais extensa nas famílias com herança autossômica dominante do que naquelas com síndrome de Kallmann ligada ao X. Além disso, a expressividade é variável, existindo o relato de gêmeos idênticos com fenótipo discordante para a SK (HIPKIN *et al.*, 1990).

O diagnóstico da SK é feito, em geral, na adolescência, por atraso no desenvolvimento puberal, sendo que a avaliação hormonal deve evidenciar a produção insuficiente de gonadotrofinas hipofisárias (SEMINARA *et al.*, 1998). Porém, o diagnóstico pode ser feito de forma precoce, ainda na infância ou mesmo em recém-nascidos, uma vez que a observação de micropênis e criptorquidismo podem ser fortes indícios da presença da SK (SEMINARA *et al.*, 1998; WHITE *et al.*, 1983). A anosmia/hiposmia, que por definição está presente na SK, pode ser diagnosticada com o auxílio de kits comerciais como o “Smell Identification Test”TM (SENSONICS, INC) desenvolvido pela Universidade da Pensilvânia. No entanto, testes alternativos, em que são empregadas uma série de diluições de odorantes múltiplos (ROSEN *et al.*, 1979; STEVENS *et al.*, 1988) ou mesmo lenços de papel umedecidos em soluções alcoólicas (DAVIDSON & MURPHY, 1997), têm sido descritos e utilizados com sucesso na determinação do *status* olfativo. Em muitos casos, a realização da ressonância magnética por imagem (RMI) pode auxiliar na caracterização da anosmia, pois evidencia a existência de aplasia ou hipoplasia de bulbos e lobos olfativos (CASTILLO *et al.*, 1998). Contudo, essa técnica é limitada e menos sensível que o diagnóstico clínico, existindo relatos de indivíduos com SK portadores de anosmia que não possuem alterações anatômicas visíveis nas estruturas olfativas (DISSANEVATE *et al.*, 1998; QUINTON *et al.*, 2001a). Quanto ao tratamento, este consiste na reposição hormonal com administração de esteróides sexuais, o que permite o desenvolvimento e a manutenção dos

caracteres sexuais secundários, e na administração de GnRH, quando é desejada a indução da fertilidade (CROWLEY & WHITCOM, 1990).

1.1.1 - Síndrome de Kallmann Ligada ao X (SK-X)

A caracterização molecular de aberrações cromossômicas envolvendo a região Xp22.3 em pacientes com SK que exibem fenótipo de síndrome de genes contíguos, caracterizada pela associação com ictiose ligada ao X, condrodisplasia punctata, albinismo ocular e retardo mental (Figura 1.3), levou ao mapeamento do gene *KAL-1* nesta região (BALLABIO *et al.*, 1986; BALLABIO *et al.*, 1987; BICK *et al.*, 1989; BALLABIO & ANDRIA, 1992). A localização deste gene foi confirmada por análise de ligação utilizando-se o marcador CRI-S232 (previamente mapeado na região) em famílias com SK-X (MEITINGER *et al.*, 1990) e pelo achado de uma deleção intragênica de 3,3 kb dentro do *locus KAL-1* em dois irmãos com a síndrome (BICK *et al.*, 1992).

Posteriormente, dois grupos distintos, FRANCO *et al.* (1991) e LEGOUIS *et al.* (1991), isolaram e clonaram o gene *KAL-1*, mostrando que este compreende uma região de 210 kb e é formado por 14 éxons codificantes (Figura 1.4a), cujo produto é uma proteína de 680 aminoácidos (proteína KAL ou anosmina) que possui propriedades de moléculas de adesão celular. A porção amino-terminal da proteína contém uma região rica em cisteína, vista em inibidores de proteases e neurofisinas, seguido por um domínio WAP (“whey

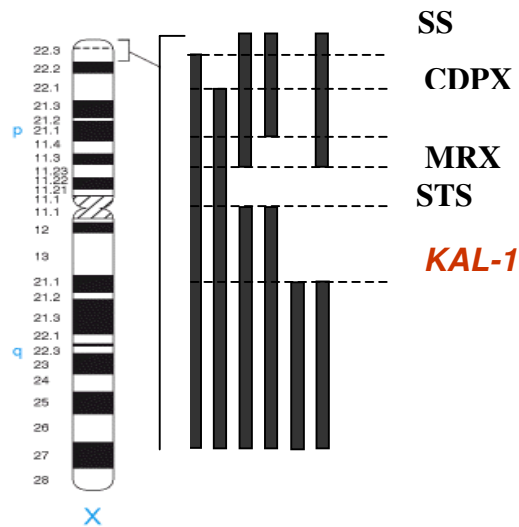


Figura 1.3 – Diagrama de algumas deleções em Xp22.3 que levaram a localização dos genes SS (baixa estatura), *CDPX1* (condrodysplasia punctata ligada ao X), *MRX* (retardamento mental ligado ao X), *STS* (sulfatase de esteróides) e *KAL-1* (síndrome de Kallmann) pela observação do fenótipo da síndrome de genes contíguos (adaptado de BALLABIO *et al.*, 1989).

acidic protein”), enquanto sua região carboxi-terminal possui regiões de repetições de fibronectina tipo III (FNIII), que ocorrem em moléculas de adesão de células neurais e quinases (Figura 1.4b). Diversas mutações tem sido descritas no *locus KAL-1*, incluindo deleções completas do gene, deleções intragênicas e alterações de bases, das quais as mais freqüentes e heterogêneas são as mutações pontuais (Figura 1.4a e Tabela I).

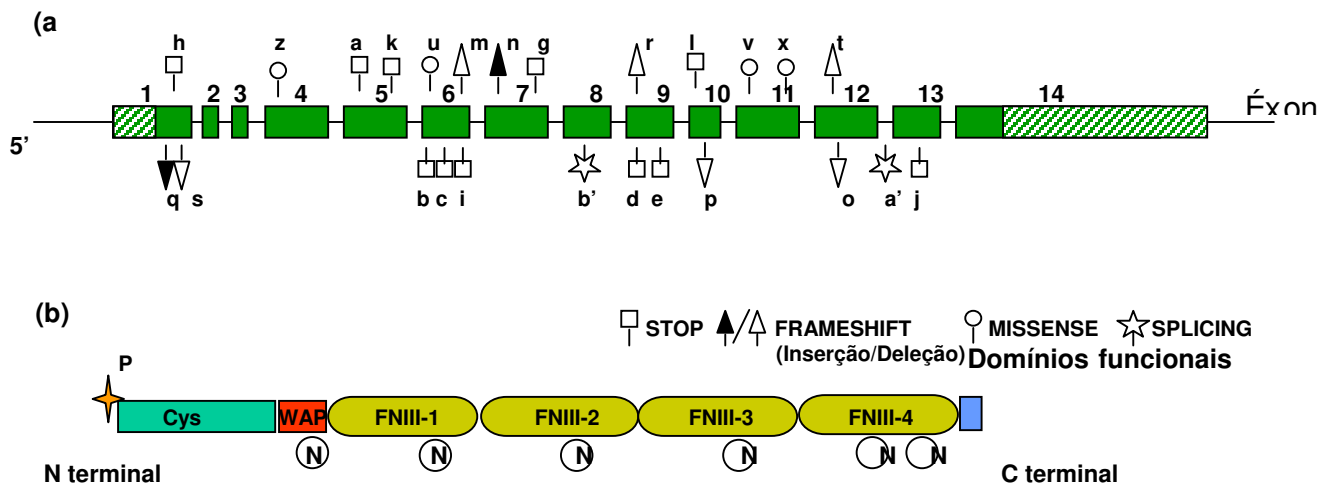


Figura 1.4 – (a) Representação esquemática do gene *KAL-1* com a distribuição das mutações descritas para o *locus* (veja tabela I.2) e (b) estrutura da proteína anosmina com seus domínios funcionais: PS, peptídeo sinal; Cys, região rica em cisteína; N, sítios de N-glicosilação, WAP, “whey acidic protein”; FNIII, fibronectina tipo III e H, região rica em histidina (adaptado de ROBERTSON *et al.*, 2001).

Obs: a região hachurada corresponde as regiões não codificantes dos éxons 1-14.

Tabela I – Mutações descritas no gene *KAL-1*

M	EXON	TIPO	NUCLEOTIDEO	AMINOÁCIDO	REFERÊNCIA
a	5	Non sense	861G>A	Trp ²³⁷ STOP	Hardelin <i>et al.</i> , 1992.
b	6	Non sense	919C>T	Arg ²⁵⁷ STOP	Hardelin <i>et al.</i> , 1992.
c	6	Non sense	924G>A	Trp ²⁵⁸ STOP	Hardelin <i>et al.</i> , 1992.
d	9	Non sense	1411C>T	Gln ⁴²¹ STOP	Hardelin <i>et al.</i> , 1993.
e	9	Non sense	1417C>T	Arg ⁴²³ STOP	Hardelin <i>et al.</i> , 1993.
g	7	Non sense	328C>G	Tyr ³²⁸ STOP	Georgopoulos <i>et al.</i> , 1997.
h	1	Non sense	346C>T	Glu ⁶⁶ STOP	Izumi <i>et al.</i> , 1999.
i	6	Non sense	934C>T	Arg ²⁶² STOP	Soderlund <i>et al.</i> , 2002.
j	13	Non sense	2041C>T	Arg ⁶³¹ TOP	Jansen <i>et al.</i> , 2000.
k	5	Non sense	721C>T	Arg ¹⁹¹ STOP	Oliveira <i>et al.</i> , 2001.
l	10	Non sense	1519T>C	Arg ⁴⁵⁷ STOP	Oliveira <i>et al.</i> , 2001.
m	6	Frameshift	981delC	-	Hardelin <i>et al.</i> , 1992.
n	7	Frameshift	1166insA	-	Hardelin <i>et al.</i> , 1993.
o	12	Frameshift	1847delC	-	Quinton <i>et al.</i> , 1996.
p	10	Frameshift	1542_1555delTTGAAGCGTGTGCCC	-	Georgopoulos <i>et al.</i> , 1997.
q	1	Frameshift	242_252delCTGCGCGGCGG	-	Gu <i>et al.</i> , 1998.
r	9	Frameshift	1407_1420delTTTTCAAAGACGAC	-	Matsuo <i>et al.</i> , 2000.
s	1	Frameshift	53_63dupCGCGGCGGCTG	-	Soderlund <i>et al.</i> , 2002.
t	12	Frameshift	1951delC	-	Oliveira <i>et al.</i> , 2001.
u	6	Missense	951T>A	Asn ²⁶⁷ Lys	Hardelin <i>et al.</i> , 1993.
v	11	Missense	1701C>G	Phe ⁵¹⁷ Leu	Georgopoulos <i>et al.</i> , 1997.
x	11	Missense	1690G>A	Glu ⁵¹⁴ Lys	Maya-Nunez <i>et al.</i> , 1998.
z	4	Missense	664T>C	Cys ¹⁷² Arg	Oliveira <i>et al.</i> , 2001.
a'	Intron12	Splicing	IVS12 + 1G>A	-	Hardelin <i>et al.</i> , 1993.
b'	8	Splicing	1351_1357delAACAACA IVS9 + 1_2delGT	-	Georgopoulos <i>et al.</i> , 1997.
c'	2	Deleção	-	-	Parenti <i>et al.</i> , 1995.
d'	11	Deleção	-	-	Quinton <i>et al.</i> , 1996.
e'	1	Deleção	-	-	Quinton <i>et al.</i> , 1996.
f'	5	Deleção	-	-	Soderlund <i>et al.</i> , 2002.
g'	13-14	Deleção	-	-	Bick <i>et al.</i> , 1992.
h'	3-5	Deleção	-	-	Maya-Nunez <i>et al.</i> , 1998.
i'	5-10	Deleção	-	-	Nagata <i>et al.</i> , 2000.
m'	3-13	Deleção	-	-	Massin <i>et al.</i> , 2003.

O gene *KAL-1* escapa à inativação do X, e um pseudogene em Yq11.2 foi identificado (DEL CASTILLO *et al.*, 1992). É interessante notar que, apesar da demonstração da existência de anosmina em camundongos (SOUSSEI-YANICOSTAS *et al.*, 2002), o ortólogo do gene *KAL-1* ainda não foi identificado em roedores, estando presente em galináceos, primatas e bovinos (INCERTI *et al.*, 1992; DELLOVADE *et al.*, 2003). Em galinhas, sua expressão foi observada no epitélio olfativo, núcleo oculomotor, mesênquima facial, mesonefros e metanefros (LEGOUIS *et al.*, 1993). Um padrão de expressão similar foi confirmado em fetos humanos, sendo observado

que o gene *KAL-1* é também expresso no trato córtico-espinal do cordão medular (DUKE *et al.*, 1995) (Tabela II).

Tabela II – Tentativa de correlação entre o padrão de expressão do gene *KAL-1* e o fenótipo da síndrome de Kallmann (RUGARLI & BALLABIO, 1993).

Padrão de Expressão		Características Clínicas
Bulbo olfativo (células mitrais)	↔	Anosmia
Cerebelo (células de Purkinje)	↔	Disfunção cerebelar
Núcleo óculo-motor	↔	Anomalias no movimento dos olhos
Mesonefros/metanefros	↔	Anomalias renais
Mesênquima facial	↔	Palato fendido

A anosmina parece exercer um papel no processo de migração dos neurônios olfativos e liberadores de GnRH que ocorre durante a embriogênese humana. RUGARLI & BALLABIO (1993) propuseram que a anosmina atuaria como mediadora de interações entre os axônios dos neurônios olfativos e os dendritos das células mitrais essenciais para a morfogênese do bulbo olfativo. A ausência da proteína funcional afetaria tais interações impedindo que o bulbo olfativo adquirisse sua estrutura normal acarretando, assim, a anosmia. Desde que os neurônios secretores de GnRH precisam atravessar essa estrutura para alcançarem o hipotálamo, a falha em seu desenvolvimento traria, como efeito secundário, a ausência de uma rota normal de migração (Figura 1.5).

SOUSSI –YANICOSTAS *et al.* (2002) mostraram que anticorpos anti-anosmina bloqueiam a formação dos ramos colaterais de neurônios do bulbo olfativo em roedores, sendo a anosmina capaz de aumentar a ramificação axônica de neurônios dissociados em cultura e agir como uma molécula quimiotrativa para os axônios do córtex piriforme. RUGARLI *et al.* (2002), analisando a expressão do ortólogo do gene *KAL-1* em *Caenorhabditis elegans*, revelaram que a

anosmina induz a formação de ramificações axônicas e age na orientação dos axônios. BULOW *et al.* (2002) obtiveram resultados semelhantes também em *C. elegans*, demonstrando ainda que tais atividades são relacionadas a um domínio de ligação a proteoglicanos dependentes de sulfato de heparina. Esses domínios foram localizados nas regiões 1, 2 e 3 de FNIII (ROBERTSON *et al.*, 2001).

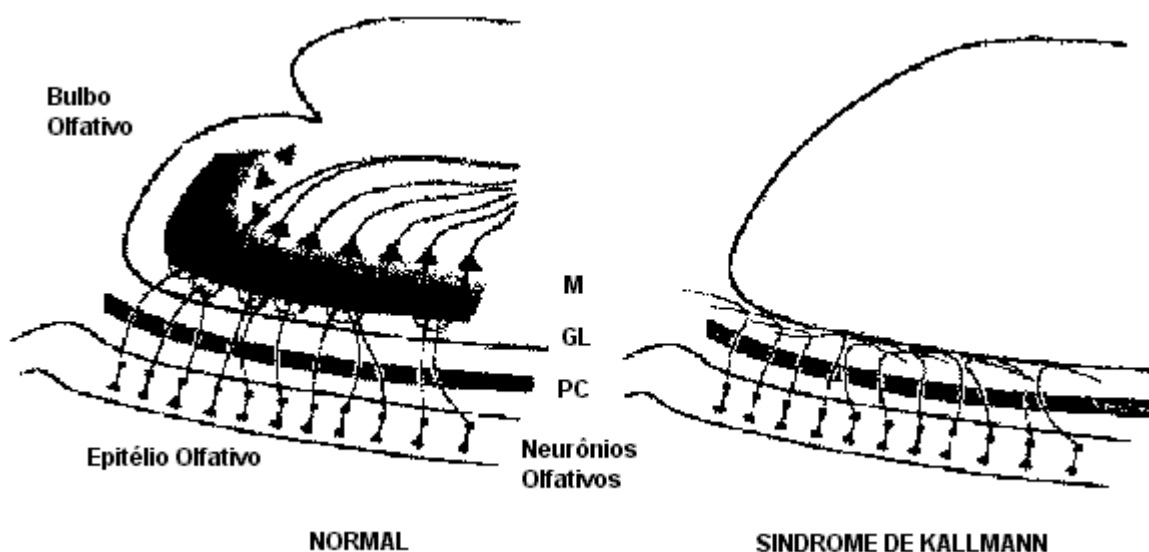


Figura 1.5 – Modelo Patogênico da SK, onde é proposto que a anosmina seria secretada pelas células mitrales (M) sendo necessária para o estabelecimento/manutenção das interações dos axônios olfativos na camada glomerular (GL). Em SK, a proteína KAL estaria ausente; deste modo os axônios olfativos não poderiam interagir adequadamente com seu alvo, finalizando sua migração entre a placa crivosa (PC) e o córtex cerebral (adaptado de RUGARLI & BALLABIO, 1993).

1.1.2 – Formas Autossômicas da Síndrome de Kallmann

A descrição de indivíduos portadores de rearranjos cromossômicos, sobretudo translocações equilibradas e deleções intersticiais, e posterior mapeamento e caracterização dos pontos de quebra são importantes meios para identificação de novos genes candidatos em doenças

humanas. No entanto, existem poucas descrições de tais anomalias em cromossomos autossomos de pacientes com SK.

O primeiro relato consistente foi feito por BEST *et al.* (1990). Os autores descreveram um paciente cuja a análise cariotípica revelou a presença de uma translocação recíproca, 46,XY,t(7;12)(7pter→7q22::12q24→12qter;12pter→12q24::7q22→7qter). Três anos mais tarde, CASAMASSIMA *et al.* (1993) relataram um outro paciente com fenótipo característico da síndrome de Kallmann, cujo estudo cromossômico revelou um rearranjo complexo entre os cromossomos 3, 9, 12, resultando no cariótipo: 46,XY,t(3;9)(9;12)(3pter→3q13.3::9q21.2→9pter;12qter→12q15::9p13→9q21::3q13→3qter;12pter→12q15::9p13→9pter).

SCHINZEL *et al.* (1995) descreveram o caso de um paciente pré-pubere com cariótipo 46,XY,der(1),(1pter→1q44::10q26→10qter) apresentando algumas manifestações fenotípicas da SK. Neste último, a hipótese de SK-X foi afastada pelo exame molecular que demonstrou a ausência de mutações no gene *KAL-1*. KROISEL *et al.* (2000) relataram o achado de uma translocação cromossômica complexa entre os cromossomos 3; 13 e 18 em um paciente com SK, que ainda exibia uma inversão paracêntrica no braço longo do outro cromossomo 3. Neste paciente, foi realizada a técnica de FISH com sonda específica para o gene *KAL-1*, sendo visualizado o sinal referente ao *locus*. O cariótipo desse indivíduo foi descrito como 46,XY,inv(3)(q24q26.32),t(3;13;18)(q26.32;q21.2;q12.2), tendo os pontos de quebra sido determinados com o auxílio da técnica de pintura cromossômica. LITVINOVICH *et al.* (2001) analisaram um paciente com SK portador de uma translocação balanceada entre as regiões q29 e q21 dos cromossomos 3 e 14, respectivamente: cariótipo 46,XY,t(3;14)(q29;q21). E, finalmente,

VERMEULEN *et al.* (2002) descreveram uma deleção intersticial, 46,XY,del(8)(p11.2) em um paciente com síndrome de genes contíguos incluindo SK e esferocitose congênita.

Vários genes foram assinalados nas regiões envolvidas nesses rearranjos cromossômicos (www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink), entre eles *LAMB1* (lamina beta 1, em 7q22), *PTPRR* (receptor para proteína tirosina-fosfatase, em 12q15), *FGFR2* (receptor 2 para fator de crescimento de fibroblastos, em 10q26), e *FGFR1* (receptor 1 para fator de crescimento de fibroblastos, em 8p11.2), cujas funções têm sido relacionadas a diversos processos celulares, incluindo diferenciação e migração neuronal; até o momento, porém, apenas o gene *FGFR1* foi associado ao aparecimento da SK.

O papel do *FGFR1* na SK foi sugerido por DODE *et al.* (2003) a partir da descrição e caracterização da deleção intersticial em 8p11.2 descrita por VERMEULEN *et al.* (2002). DODE *et al.* (2003) consideraram o gene *FGFR1* como melhor candidato a SK e pesquisaram alterações neste gene numa casuística de 129 indivíduos com a síndrome. Esses autores encontraram mutações em heterozigose, que acarretam a perda de função do receptor codificado pelo alelo mutante, em quatro casos familiares (936G>A, sítio doador de “splicing” no éxon 7; Val⁶⁰⁷Met; Arg⁶²²STOP; 1970_1971delCA) e nove esporádicos (Gly⁹⁷Asp; Tyr⁹⁹Cys; 303_304insCC; Ala¹⁶⁷Ser; Cys²⁷⁷Tyr; Trp⁶⁶⁶Arg; IVS15+G1>A; Met⁷¹⁹Arg e Pro⁷⁷²Ser). É importante mencionar que mutações com ganho de função de *FGFR1* são referidas como causa de uma das formas de craniossinostose, denominação atribuída à fusão prematura das suturas ósseas (MUNKE & SCHELL, 1995).

O FGF (fator de crescimento dos fibroblastos) atua como uma proteína sinalizadora, controlando os processos de diferenciação e proliferação celular em inúmeros tecidos e órgãos, e

sua ação é mediada pela ligação e ativação de seu receptor tirosina-quinase, o FGFR1 (RUTA *et al.*, 1989). DODE *et al.* (2003) sugeriram que a anosmina seria importante na sinalização do FGF e que os produtos dos genes *KAL-1* e *FGFR1* poderiam interagir funcionalmente. Esses autores propuseram ainda que tal interação explicaria a alta prevalência de SK em homens, baseando-se no fato de que o gene *KAL-1* escapa à inativação do cromossomo X. Assim, as mulheres produziriam uma quantidade maior de anosmina, sendo esta suficiente para iniciar a cascata de sinalização do FGF mesmo num contexto de haploinsuficiência de *FGFR1*. De fato, foi observado que a anosmina possui sítios de ligação para proteoglicanas dependentes de sulfato (ROBERTSON *et al.*, 2001; BULOW *et al.*, 2002), moléculas importantes na formação do complexo FGF-FGFR1 (PELLEGRINI *et al.*, 2000). Além disso, nos casos familiares onde foram encontradas alterações no gene *FGFR1*, a transmissão da mutação foi feita por mulheres portadoras não afetadas (DODE *et al.*, 2003).

1.2 -HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROFICO E OLFAÇÃO NORMAL – HHn

1.2.1 – Gene *GnRH* e seu Receptor

Devido ao seu papel central na regulação da liberação de gonadotrofinas, o gene do *GnRH* foi um dos primeiros a serem investigados nos casos de HHn. Contudo, embora camundongos hipogonádicos com deleções no gene *Gnrh* tenham sido descritos (MASON *et al.*, 1986), alterações no gene *GnRH* humano não foram, até o momento, identificadas (LAYMAN *et al.*, 1992; WEISS *et al.*, 1989; BO-ABBAS *et al.*, 2003). No entanto, o gene que codifica para seu receptor, o *GnRH-R*, tem sido extensivamente estudado e diversas mutações neste gene já foram descritas em pacientes com HH e olfação normal.

O gene *GnRH-R* é composto por três éxons que se estendem numa região de 19 kb em 4q13 (KAISER *et al.*, 1994), cujo produto é um receptor protéico da família de receptores acoplados à proteína G, formado por sete domínios trans-membrânicos helicoidais, seis alças (três intracelulares e três extracelulares) e um segmento extracelular em sua porção amino-terminal, mas falta um domínio citoplasmático carboxi-terminal (Figura 1.6). Estes receptores estão localizados na superfície celular dos gonadotrofos sendo responsáveis pela transdução de sinais do hormônio GnRH, via produção de fosfolipase C e inositol trifosfato que resulta na mobilização de Ca^{++} intracelular e liberação de LH e FSH (KAKAR *et al.*, 1992).

De ROUX *et al.* (1997) foram os primeiros a descrever alterações no gene *GnRH-R*. Esses autores demonstraram que dois irmãos com HHn eram heterozigotos compostos para as mutações Gln¹⁰⁶Arg e Arg²⁶²Gln no receptor de GnRH, sendo as transições 317A>G e 785G>A as

responsáveis pelas alterações dos aminoácidos 106 e 262, respectivamente. Um ano mais tarde, LAYMAN *et al.* relataram uma outra família com HH onde os quatro membros afetados eram portadores das mutações Tyr²⁸⁴Cys (transição da base 851A>G), e Arg²⁶²Gln. Desde então, novos relatos foram surgindo, sendo descritas mais de dez mutações diferentes neste gene (Tabela III). De um modo geral, é observado que as mutações no gene *GnRH-R* parecem ocorrer em frequências de 40% e 16,7% entre os casos com padrão de herança autossômica recessiva e esporádicos de HHn, respectivamente (BERANOVA *et al.*, 2001).

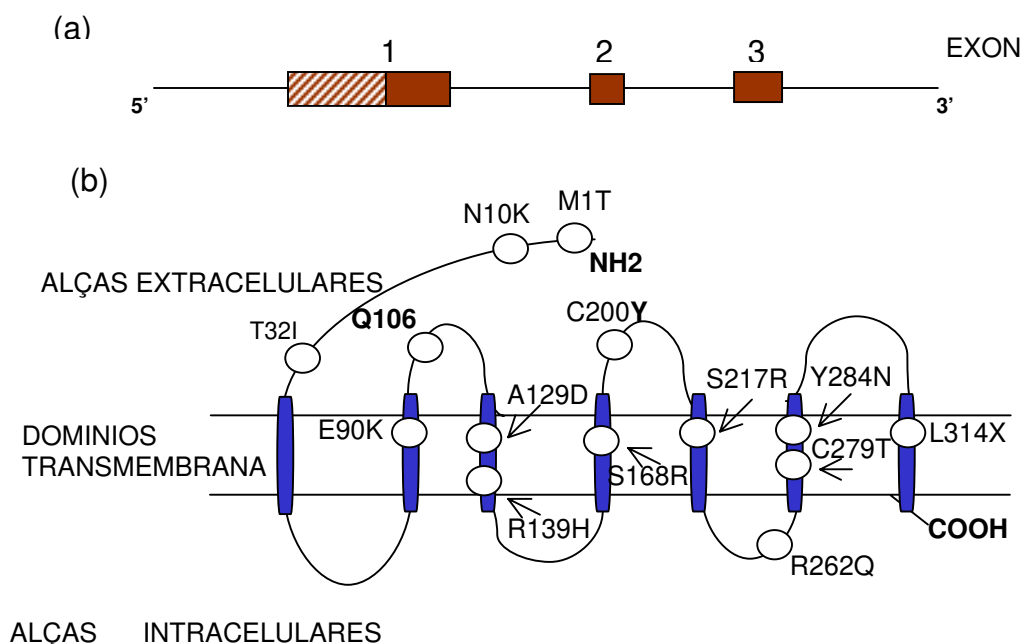


Figura 1.6 – Estrutura esquemática (a) do gene e (b) do receptor de GnRH-R mostrando a localização de algumas mutações descritas neste receptor. A área hachurada corresponde à região não codificante do gene.

Obs: para descrição das mutações consulte a tabela III

As mutações no gene *GnRH-R*, em sua maioria, impedem ou reduzem a formação do complexo hormônio-receptor, sendo que a combinação alélica dessas alterações pode estar associada ao amplo espectro fenotípico apresentado por pacientes com HH (KOTTLER *et al.*,

1999). Esses pacientes exibem características que variam de hipogonadismo hipogonadotrófico completo com criptorquidismo e falta de desenvolvimento puberal, a hipogonadismo parcial com atraso no desenvolvimento sexual (PRALONG *et al.*, 1999). De fato, têm sido observadas boas correlações entre o genótipo e o fenótipo dos indivíduos com HHn portadores de mutações no gene *GnRH-R* (COSTA *et al.*, 2001).

Tabela III – Mutações descritas no gene *GnRH-R*.

EXON	TIPO	NUCLEOTIDEO	AMINOÁCIDO	REFERÊNCIA
1 3	Missense	386C>A 785G>A	Ala ¹²⁹ Asp (A129D) Arg ²⁶² Gln (R262Q)	CARON <i>et al.</i> , 1999.
1	Missense	502A>C	Ser ¹⁶⁸ Arg (S168R)	PRALONG <i>et al.</i> , 1999.
3 1	Non sense Missense	941T>A 317A>G	Leu ³¹⁴ STOP (L314X) Gln ¹⁰⁶ Arg (Q106R)	KOTTLER <i>et al.</i> , 2000.
1 2	Missense	95C>T 599G>A	Thr ³² Ile (T32I) Cys ²⁰⁰ Tyr (C200Y)	BERANOVA <i>et al.</i> , 2001.
3	Missense	328C>G	Cys ²⁷⁹ Tyr (C279Y)	BERANOVA <i>et al.</i> , 2001.
1 1	Missense	317A>G 30T>A	Gln ¹⁰⁶ Arg (Q106R) Asn ¹⁰ Lys (N10K)	COSTA <i>et al.</i> , 2001.
1	Missense	416G>A	Arg ¹³⁹ His (R139H)	PITTELOUD <i>et al.</i> , 2001.
1 1	Missense	416G>A 2T>C	Arg ¹³⁹ His (R139H) Met ¹ Thr (M1T)	WOLCZYNSKI <i>et al.</i> , 2003.
2 3	Missense	651C>A 785G>A	Ser ²¹⁷ Arg (S217R) Arg ²⁶² Gln (R262Q)	de ROUX <i>et al.</i> , 1999.
1	Missense	268G>A	Glu ⁹⁰ Lys (E90L)	SODERLUND <i>et al.</i> , 2001.
1 3	Missense	30A>T+31A>C 959T>C	Asn ¹⁰ Lys(N10K+Q11K) Pro ³²⁰ Leu(P320L)	MEYSING <i>et al.</i> , 2004.
Intron1	Splicing	IVS1 – 1G>A	-	SILVEIRA <i>et al.</i> , 2002.

1.2.2 – Outros Genes relacionados ao HHn

A presença de um novo *locus* para HH em 19p13.3 foi proposta por ACIERNO *et al.* (2003), que realizaram um amplo “screening” genômico em uma família consanguínea com seis indivíduos afetados. Estudo semelhante foi feito por de ROUX *et al.* (2003) em outra família com HH e relato de consanguinidade, onde também foram encontradas evidências de que o gene causador do hipogonadismo estivesse localizado em 19p13. O seqüenciamento de vários genes candidatos presentes nessa região, mostrou que os indivíduos afetados desta família eram portadores de uma deleção de 155 nucleotídeos em homozigose no gene *GPR54* (gene para o receptor 54 acoplado a proteína G). O GPR54 foi inicialmente identificado como um receptor acoplado a proteínas G da família das rodopsinas ao qual se liga o produto do gene *Kiss-I*, gene supressor de metástase (LEE *et al.*, 1999).

SEMINARA *et al.* (2003) realizaram um amplo estudo do gene GPR54 em humanos e camundongos. Mutações neste gene foram identificadas em seis indivíduos afetados pertencentes a uma família com padrão de herança autossômico recessivo (443T>C[L148S]) e em um de 83 casos esporádicos (991C>T[R331X]/1195T>A[X399R]) de HHn. Para determinar se essas alterações afetam a função do receptor, células COS-7 foram transfectadas com mutantes L148S e R331X, observando-se um decréscimo no acúmulo de fosfato de inositol em relação a células contendo o gene GPR54 normal. Nesse mesmo estudo, descreve-se um camundongo “knockout” *Gpr54*^{-/-} com hipogonadismo hipogonadotrófico isolado e fenótipo semelhante ao observado em humanos com deficiência neste gene.

Com esses resultados, de ROUX *et al.* (2003) e SEMINARA *et al.* (2003) sugeriram que a proteína GPR54 desempenha um papel importante na regulação do desenvolvimento puberal.

Mais recentemente, de ROUX *et al.* (2004) investigaram a ocorrência de mutações no gene *KISS-1* em 260 pacientes com HHn, identificando-se um caso esporádico portador de uma inserção de 20 nucleotídeos (413-432dup) em homozigose no éxon 3 deste gene.

1.3 – GENES CANDIDATOS AO HIPOGONADISMO HIPOGONADOTROFICO

Estudos recentes mostram que alguns fatores de transcrição e moléculas guia, especialmente as relacionadas com a interação célula-célula/célula-substrato (receptores de membranas, moléculas de adesão e moléculas de matriz extracelular) e comunicação à distância (neurotransmissores, moléculas quimioatrativas e moléculas repelentes) (MacCOLL *et al.*, 2002), estão envolvidos no desenvolvimento e migração de neurônios liberadores de GnRH. Alguns parecem ter papel importante no estabelecimento e manutenção das estruturas olfativas, sendo considerados candidatos em potencial ao surgimento das outras formas da SK ou do HHn.

KRAMER & WRAY (2000), realizando um “screening” diferencial que comparava a população de RNAs obtidos de células secretoras de GnRH ainda em migração com a de células pós-embrionárias em camundongos, identificaram uma nova proteína chamada fator nasal embrionário do hormônio liberador de hormônio luteinizante, Nelf. Durante o desenvolvimento, a expressão desta proteína foi observada em neurônios secretores de GnRH e axônios olfativos, sendo demonstrado também que Nelf está presente na matriz extracelular. Estes resultados sugerem que Nelf funciona como uma molécula guia para projeção de axônios olfativos e subsequente migração de neurônios secretores de GnRH. Contudo, o padrão de expressão desta proteína não é restrito aos sistemas olfativo e de neurônios liberadores de GnRH, sendo também observado no córtex, hipocampo e talâmo de camundongos (KRAMER & WRAY, 2001). Curiosamente, com exceção dos neurônios secretores de GnRH, a expressão de Nelf é mantida nessas regiões, bem como no bulbo olfativo, mesmo no período pós-natal. O homólogo do gene *Nelf* foi mapeado em humanos em 9q34, sendo este formado por 16 éxons que compreendem cerca de 2,2 kb. O segundo gene identificado por expressão diferencial em neurônios liberadores

de GnRH em migração codifica um receptor tirosina-quinase, o *ARK* (“adhesion-related kinase”), que parece regular a expressão de GnRH durante o desenvolvimento (ALLEN *et al.*, 1999).

Da classe dos fatores de transcrição, o gene *EBF2* (“Early B-Cell Factor”) é um forte candidato ao HH. CORRADI *et al.* (2003), descreveram camundongos “knock-out” para o gene *Ebf2* com hipogonadismo associado a neuropatia periférica. Esses autores demonstraram que o hipogonadismo visto nestes camundongos foi decorrente de uma falha na migração de neurônios secretores de GnRH interrompida ainda no mesênquima nasal, mas não foram encontradas alterações nas fibras olfativas que servem como rota de migração desses neurônios. O gene *EBF2* é um dos quatro membros da família dos fatores de transcrição Olf/Ebf isolados em mamíferos. Os produtos desses genes são fatores HLH (“helix-loop-helix”) altamente conservados na evolução e têm sido implicados em numerosos processos, desde o desenvolvimento de células do sistema imune, onde foram originalmente descritos (HAGMAN *et al.*, 1993), até a migração e diferenciação de células neurais (GAREL *et al.*, 1997; POZZOLI *et al.*, 2001). Em humanos, o *locus EBF2* foi mapeado em 8p21.2.

Além disso, a quantidade de neurônios secretores de GnRH que alcança o hipotálamo é influenciada pela ação de neurotransmissores e estudos recentes têm demonstrado que receptores GABA (γ -ácido aminobutírico), AMPA (α -amino ácido propiônico) e NMDA (N-metil-D-aspartato) têm papel importante na regulação da migração dos neurônios através do sistema olfativo e em seu posicionamento dentro do sistema nervoso central (BLESS *et al.*, 2000; SIMONIAN & HERBISON, 2001). O gene *DCC* (deletado em câncer coloretal) também tem sido relacionado à migração de neurônios secretores de GnRH pela demonstração de que camundongos com deficiência de *DCC* também apresentam migração inadequada desses neurônios (SCHWARTING *et al.*, 2001).

Com esses estudos, novos genes candidatos tem sido revelados como causadores do hipogonadismo hipogonadotrófico em seres humanos, sendo interessante verificar a participação dos genes *KAL-1* e *GnRH-R*, previamente relacionados a forma ligada ao X da SK e ao HHn respectivamente, e de novos genes candidatos, como *NELF* e *EBF2*, no surgimento do HH, com o intuito de se contribuir com o esclarecimento e a compreensão desse complexo fenótipo.

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- investigar a ocorrência de aberrações cromossômicas em culturas de linfócitos de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico (síndrome de Kallmann e hipogonadismo hipogonadotrófico normósmico), utilizando técnicas citogenéticas de alta resolução, a fim de obter evidências sobre a localização de novos genes que atuam no desenvolvimento e funcionamento do eixo reprodutivo,
- determinar a frequência de mutações no gene *KAL-1* em todos os casos de hipogonadismo hipogonadotrófico,
- verificar a frequência de alterações no gene *GnRH-R* entre os pacientes com HH e olfato normal, e
- avaliar a ocorrência de mutações nos genes *NELF* e *EBF2* nos casos de hipogonadismo hipogonadotrófico onde não foram encontradas evidências da etiologia da deficiência de GnRH.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – CASUISTICA

Foram estudados 31 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial (Anexo I) de hipogonadismo hipogonadotrófico, sendo 22 casos classificados como SK (18 homens e quatro mulheres) e 9 HHn (oito homens e uma mulher), com base na presença ou ausência de anosmia, respectivamente (Tabelas IV e V). Tal avaliação foi feita por questionamento direto e, quando possível, foram aplicados testes olfativos alternativos aos testes comerciais: o AST – “Alcohol Sniff Test” (DAVIDSON & MURPHY, 1999) e o teste com butanol (STEVENSON *et al.*, 1988). Esses testes foram realizados em 18/31 pacientes e encontram-se descritos no Anexo II juntamente com seus resultados.

A maior parte dos indivíduos estudados foi atendida nos ambulatórios de Endocrinologia (Endocrinologia Geral e Endocrinopediatria) do Hospital de Clínicas da UNICAMP, onde os critérios adotados no diagnóstico do HH são: 1) sintomas e sinais clínicos de hipogonadismo; 2) baixas concentrações de esteróides sexuais e gonadotrofinas 3) ausência de resposta ao teste de estímulo com GnRH; 4) imagem tomográfica normal do hipotálamo e hipófise para exclusão de tumor; 5) função tireoideana normal para afastar panhipopituitarismo. Alguns casos foram provenientes de outras instituições (P17, Hospital de Clínicas da USP/Ribeirão Preto/SP; P19, UNIFESP/São Paulo/SP; P20, Departamento de Pediatria UNCISAL/AL) ou de consultório particular de Campinas (P26 e P28).

Todos os pacientes foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos e procedimentos utilizados neste projeto e um termo de consentimento, aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, foi assinado por cada um, com exceção dos pacientes P17 e P19, para os quais foi utilizado um termo de consentimento

próprio de suas respectivas instituições.

Tabela IV - Resumo dos achados clínicos observados nos pacientes com SK e provável modo de herança nos casos em que há recorrência familiar da síndrome.

Nº	SEXO	IDADE	ANOSMIA/ HIPOSMIA	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HIPOGONADISMO				CARACTERÍSTICAS ADICIONAIS	HERANÇA
				Mp	Mc	Gn	Am		
P2	M	27	+	+	-	+		-	Esporádico
P3	M	24	+	+	+	-		Pés cavos	Esporádico
P4	M	27	+	+	+	-		Ataxia	Esporádico
P5 ^{&}	M	35	+	+	-	+		Rim ectópico	Ligada ao X
P6 ^{&}	M	28	-?	+	+	-		Hipoplasia renal unilateral; Retardo mental	Ligada ao X
P7#	M	32	+	+	+	+		Agenesia renal unilateral; Pés cavos	Ligada ao X
P8#	M	28	+	+	+	-		Agenesia renal unilateral	Ligada ao X
P10	F	26	+				+		Esporádico
P11	M	37	+	+	+	-		Rim em ferradura	Esporádico
P12♣	M	16	+	+	-	-		Hipersonia	AD?
P13	M	27	+	+	-	+		<i>Cubitus valgus</i>	AD?
P15♣	F	37	+				+	-	AD?
P20	M	21	+	+	+	-		Agenesia renal unilateral; Sincinesia bimanual	Ligada ao X
P21	F	32	+				+	Bexiga neurogênica	Esporádico
P23#	M	18	+	+	-	-		Agenesia renal unilateral	Ligada ao X
P24	M	22	+	+	-	-		Malformação facial	Esporádico
P25	M	12	+	+	-	-		Hipoplasia de 4° e 5° metacarpos	Esporádico
P26	M	50	+	+	-	-		-	Esporádico
P27	M	50	+						Esporádico
P28	F	33	+				+	-	AR?
P29	M	12	+	+	-	-		-	Esporádico?
P30	M	13	+	+	-	-		Sincinesia bimanual	Esporádico

* nesses casos não foram realizados testes olfativos, a anosmia/hiposmia foi referida pelo próprio paciente.

? nesses pacientes a ocorrência de anomalia olfativa esta interrogada devido a presença de características (retardo mental, P6 e rinite, P24 e P30) que dificultaram a realização do teste olfativo.

& # ♣ pacientes pertencentes à mesma família.

MP, micropênis; Cp, criptorquidia; Gn, ginecomastia; Am, amenorréia primária; AD, autossômico dominante; AR, autossômico

Tabela V - Resumo dos achados clínicos observados nos pacientes com HHn.

Nº	SEXO	IDADE	ANOSMIA/ HIPOSMIA	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS ASSOCIADAS AO HIPOGONADISMO				CARACTERÍSTICAS ADICIONAIS	HERANÇA
				Mp	Cp	Gn	Am		
P1	M	27	-*	+	+	+		-	Esporádico
P9	F	31	-*				+	-	Esporádico
P14	M	17	-*	+	+	-		-	Esporádico
P16	M	17	-*	+	+	+		Obesidade	ND
P17	M	30	-*	+	-	-		Megacolon congênito	Esporádico
P18	M	36	-	+	+	-		-	Esporádico
P19	M	28	-*	+	-	-			Esporádico
P22▲	M	24	-	+	-	-		-	ND
P31▲	M	14	-	+	-	-		-	ND

* nesses casos não foram realizados testes olfativos, a normosmia foi referida pelo próprio paciente.

▲ pacientes pertencentes à mesma irmandade.

MP, micropênis; Mc, microrquidia; Cp, criptorquidia; Gn, ginecomastia; Am, amenorréia primária; ND, não determinada.

Na avaliação clínica os pacientes foram ainda questionados quanto à história familiar, sendo a característica considerada como recessiva ligada ao X quando padrões clássicos desse tipo de herança foram observados: presença de no mínimo dois indivíduos afetados do sexo masculino, ausência de transmissão do caráter de pai para filho e ausência de mulheres afetadas. O estabelecimento desse tipo de herança foi possível nos casos P5 e P6 (Família 1), P7, P8 e P23 (Família 2) e P20 (Família 5), sendo que na Família 1, apesar de não pode ser excluída herança autossômica pela análise do heredograma, a observação de características clínicas descritas apenas em indivíduos com SKX (agenesia renal, por exemplo), indicou o envolvimento do gene *KAL-1* na determinação da síndrome (Figura 3.1). Na figura 3.1 a consangüinidade relatada nas Famílias 2 e 5 refere-se a primos em primeiro grau.

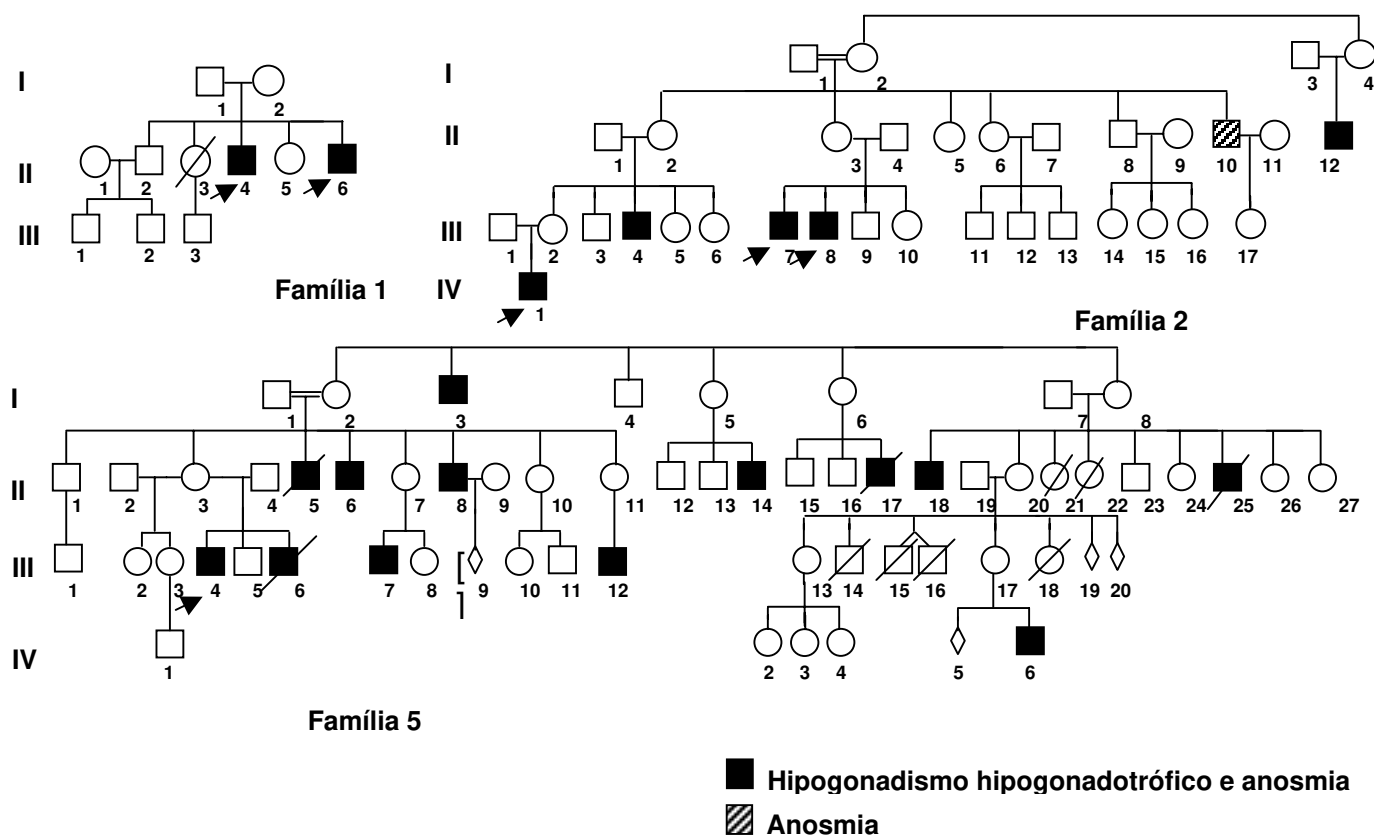


Figura 3.1 - Heredogramas dos pacientes P5 e P6 (II-6e II-4 respectivamente, Família 1), P7, P8 e P23 (III-8, III-7 e IV-1 respectivamente, Família 2) e P20 (III-4, Família 5), representando os modelos de herança recessiva ligada ao X encontrados em nossa casuística com SK. As setas assinalam os indivíduos estudados.

Nas famílias com presença de homens e mulheres com SK suspeitou-se logo de herança autossômica, sendo esta considerada dominante quando foram observados indivíduos afetados por duas gerações consecutivas. Nos casos P12, P15 (Família 3) e P13 (Família 4) a história genealógica é sugestiva de padrão de herança autossômico dominante com penetrância incompleta e expressividade variável, enquanto em P28 (Família 6), onde a probanda é filha de primos em terceiro grau, a característica parece ser herdada de modo autossômico recessiva (Figura 3.2).

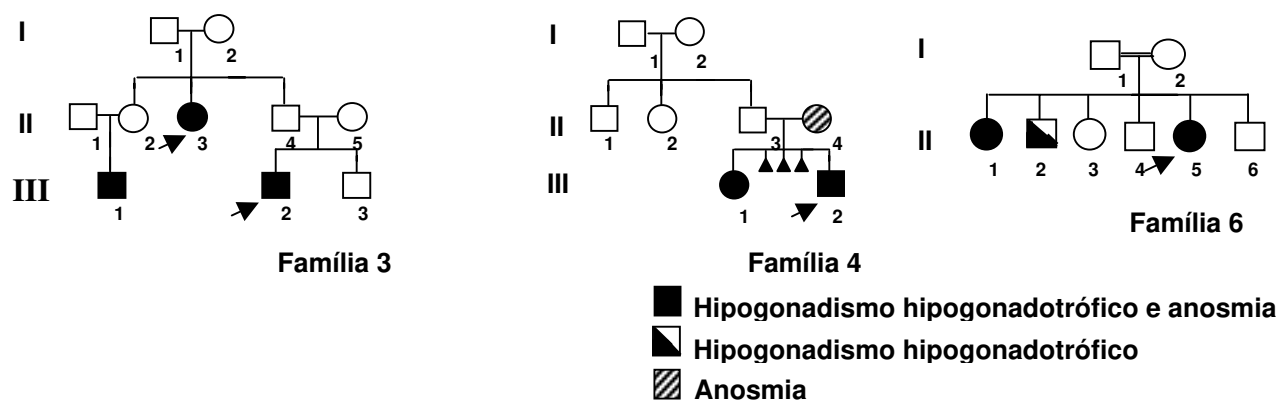


Figura 3.2 - Heredogramas dos pacientes P12 e P15 (III-2 e II-3 respectivamente, família 3), P13 (III-2, família 4) e P28 (III-2, família 6) com SK. Nas duas primeiras famílias é observado um provável padrão de herança autossômica dominante e na terceira, autossômica recessivo.

Entre os casos de HHn, a recorrência familiar da síndrome foi observada nos pacientes P16 (Família 7) e P22 e P31 (Família 8), cujo padrão de herança é difícil de ser determinado (Figura 3.3). Na Família 7, os avós do paciente P16 são primos em 2º grau.

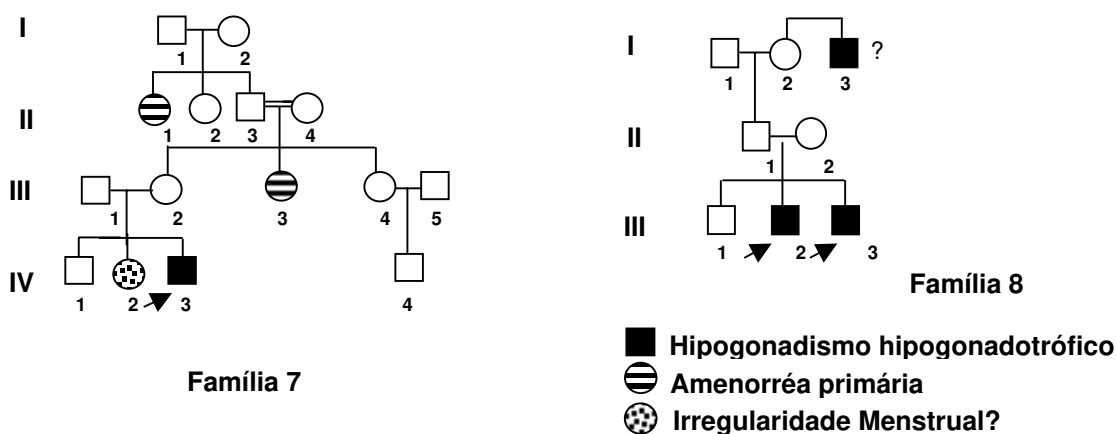


Figura 3.3 - Heredograma dos pacientes P16 (Família 7) P22 e P31 (III-2 e III-3 respectivamente, Família 8). O modo de herança nessas famílias não pôde ser determinado.

3.2 - METODOLOGIA

Amostras de sangue para obtenção de material cromossômico e extração de DNA foram colhidas de cada paciente. As preparações cromossômicas foram analisadas pela técnica de bandamento GTG (banda G-Giemsa-Tripsina) para avaliar a presença ou ausência de rearranjos estruturais tanto na SK quanto no HHn. O DNA genômico foi empregado na análise mutacional por PCR (“polymerase chain reaction”) e no sequenciamento dos genes *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2*. A investigação molecular foi iniciada com o estudo sistemático do gene *KAL-1* em todos os pacientes com HH e do gene *GnRH-R* apenas nos casos sem deficiência olfativa. Quando não foram encontradas alterações nesses genes, seguiu-se a análise dos genes *NELF* e *EBF2* em ambos os grupos. A figura 3.4 apresenta um fluxograma de como foram conduzidas as análises.

3.2.1 – Técnicas de Cultivo de Linfócitos de Sangue Periférico e de Análise Cromossômica com Bandamento GTG

a) Técnica Citogenética de Alta Resolução com Brometo de Etídio (YUNIS, 1976)

Foram preparados, para cada caso, três frascos de cultura contendo 10mL de meio RPMI-1640 completo suplementado com 15% de soro fetal bovino e 0,2mL de fitohemaglutinina (pH 6.8-7.0), sendo todo o material manipulado sob condições assépticas. Cada frasco foi devidamente etiquetado indicando o número do paciente e data da coleta. Em cada frasco foi inoculado cerca de 0,5mL de sangue (colhido com seringa e agulha descartáveis previamente heparinizadas com Lique mine), seguindo-se incubação em estufa a 37°C.

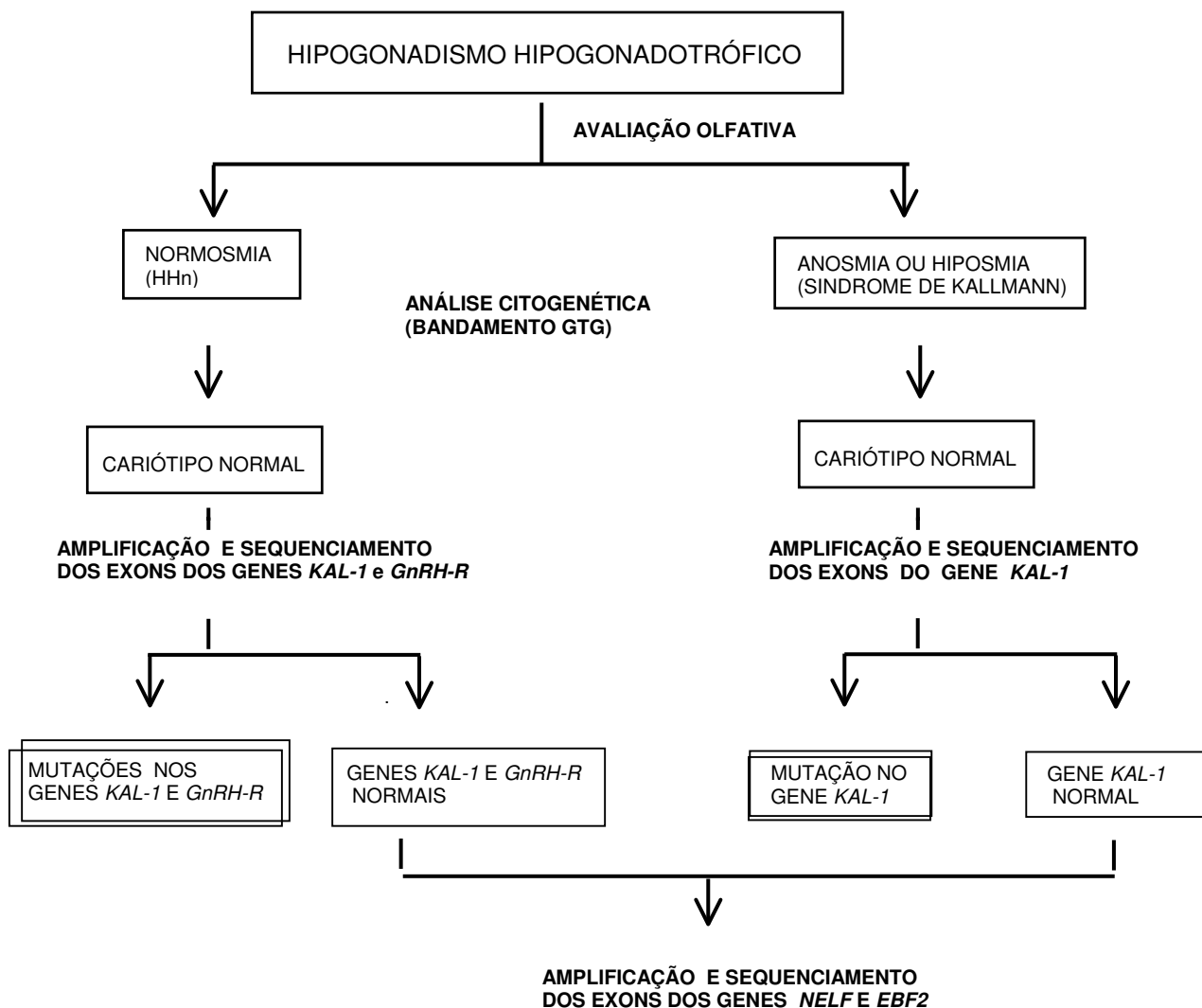


Figura 3.4 – Fluxograma mostrando a seqüência das análises utilizadas na investigação do hipogonadismo hipogonadotrófico em pacientes com anosmia associada (síndrome de Kallmann) e em pacientes normosmicos (HHn).

Decorridas 70 horas foram adicionados aos tubos 10uL de solução de brometo de etídio (100ug/mL) e duas gotas de colquicina (4×10^{-5} M) retornando-os à estufa. Após 30 minutos antes da coleta o conteúdo dos frascos foi transferido para um tubo cônico e centrifugado por 10 minutos a 900 rpm. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram mantidos em banho-maria a 37°C/40min com solução hipotônica KCl 0,075M. Passados os 40 minutos, foram acrescentados 3mL de fixador (etanol:ácido acético 3:1) a cada tubo, misturando-se gentilmente a solução, e

estes foram centrifugados por outros 10 minutos, sendo este procedimento repetido por mais três vezes para lavagem do pellet.

Após a última lavagem, a suspensão de células foi colhida com auxílio de uma pipeta Pasteur e duas ou três gotas foram pingadas sobre uma lâmina levemente inclinada. Antes de serem utilizadas na técnica de bandamento GTG, as lâminas foram envelhecidas “overnight” à temperatura ambiente.

b) Técnica de Bandamento GTG (DRETS & SHAW, 1971).

Foram preparados 300mL de tampão fosfato, juntando-se as soluções A (14,2g de fosfato dissódico anidro (NaHPO_4)/1000mL de água desionizada) e B (13,8g de fosfato monobásico de sódio $10 \text{ H}_2\text{O}$ /1000mL de água desionizada) na proporção de 1:1. O pH foi ajustado para 6,8. A solução tampão foi distribuída em três boréis: dois foram mantidos à temperatura ambiente e um, onde foi dissolvido 0,1g de tripsina 1:1250 (Gibco), foi deixado em banho-maria a 37°C. As lâminas foram mergulhadas, uma de cada vez, no borel contendo tripsina e agitadas por 6-12 segundos (esse tempo foi ajustado conforme a qualidade das bandas obtidas). Em seguida, as lâminas foram imediatamente lavadas nos boréis com tampão e coradas utilizando solução de Giemsa diluída na proporção de 1:3 no tampão fosfato.

c) Análise Citogenética

De cada paciente foram analisadas dezesseis preparações cromossômicas (aproximadamente doze metáfases, 400-550 bandas por lote haplóide, e quatro pró-metáfases, 550-650 bandas por lote haplóide), sendo estas analisadas em microscópio Olympus BX 60 acoplado a um sistema de captura de imagens da CytovisionTM da Applied Imaging Corporation.

3.2.2 – ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2*

a) Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total (10mL de sangue periférico colhidos em tubos “vacutainer” com EDTA) utilizando um método que inclui lise celular, digestão com proteinase K, extração com fenol/clorofórmio e precipitação por intermédio de etanol absoluto gelado, seguindo o protocolo estabelecido no Laboratório de Genética Humana do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP.

No total, foram obtidas 21 amostras de DNA, não sendo possível a coleta de sangue dos pacientes P3, P4, P10, P15, P21 e P23 (casos com SK) e P9, P14 e P17 (casos com HHn). Foram analisadas, portanto, amostras de DNA de dezenove indivíduos com SK pertencentes a nove famílias, e de seis indivíduos com HHn pertencentes a cinco famílias.

b) Amplificação via PCR dos genes *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2*

A PCR foi utilizada na amplificação de cada um dos éxons dos genes *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2*, sendo as reações realizadas num volume final de 50uL contendo 100-200ng de DNA molde, 0,2mM de dNTP, 0,6pmol de cada oligonucleotídeo, 1,5mM de MgCl₂, tampão de PCR 1X (20mM Tris-HCl pH 8.4 e 50mM KCl) e 1 U de enzima Taq polimerase (Invitrogen). Após uma desnaturação inicial de 10 min a 95°C, as amostras foram submetidas a 30 ciclos como se segue: desnaturação a 94°C/1 min; anelamento a 56-62°C/1 min e extensão a 72°C/1 min. Para os éxons 1 (gene *KAL-1*) e 1, 2, 4, 7, 8-9, 10-11 e 14-15 (gene *NELF*), as reações foram realizadas com 10% de DMSO, a fim de se evitar o aparecimento de bandas inespecíficas. As amostras foram então aplicadas em gel de agarose 1,2% e, após corrida eletroforética, coradas em solução de

brometo de etídio (0,05ug/100mL). O gel foi então visualizado sobre o transluminador de luz ultravioleta para análise do padrão de bandas obtido.

As seqüências dos oligonucleotídeos, suas respectivas temperaturas de anelamento e o tamanho esperado dos produtos da amplificação de cada gene encontram-se listados nas tabelas VI (*KAL-1*), VII (*GnRH-R*), VIII (*NELF*) e IX (*EBF1*). Os oligonucleotídeos utilizados nas amplificações dos genes *KAL-1* e *GnRH-R* foram previamente descritos por HARDELIN *et al.* (1993) e BERANOVA *et al.* (2001), e aqueles empregados nas amplificações dos genes *NELF* e *EBF2* foram criados com o auxílio do programa PRIMER 3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3www.cgi/>) de acordo com as seqüências NM_015567 e NM_022659 depositadas no NCBI, respectivamente.

c) Reações de PCR multiplex – Gene *KAL-1*

Reações de PCR multiplex foram empregadas para confirmar o achado de deleções intragênicas do gene *KAL-1*. Para tal, foram montadas reações combinando-se oligonucleotídeos do(s) éxon(s) envolvido(s) na deleção do *locus KAL-1* com oligonucleotídeos específicos para uma região de 380 pb do gene *SRY* (5' – CATTGTCGACCAGTGTGAAACGGGAGAAAACA – 3'/5' – CATTGTCGACGTACAACCCTGTTGTCCAGTTGC – 3') como controle interno da reação. As condições da reação foram similares às utilizadas na amplificação dos éxons do gene *KAL-1*, aumentando-se a concentração desses oligonucleotídeos para 1,2pmol. Os oligonucleotídeos para o *SRY* foram utilizados numa concentração final de 0,8pmol.

Tabela VI - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos éxons *KAL-1*, temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.

Éxon	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Amplificado (pb)
1	CCTCGCCCTCGCCCTCGACCCGCAG (s*) GAACTTTGCGAGCCCAGGCTGGGAG (as**)	62	329
2	TTGGAAGGGAAGGACAGCAGG (s) GCACCATTACATACAGGTATAG (as)	58	230
3	TCTCAGCTTTGTTTGTTCAG (s) CGTAAGCATAGTCAGATTTGG (as)	58	174
4	ATGTCTTGGAAATCAGACTTC (s) ATGTGACACTGCATGTGTCTT (as)	58	334
5	CAGATTGTTTAAATTGATACG (s) GCAGACACTACCTCCAGGATG (as)	58	267
6	AGTGACATGTTCCCTGTGCTC (s) CTGGTAGCAAGGATAGTATTC (as)	58	218
7	ATGATGTGTCTTTGTACTGGG (s) TGGGAATAACAATCCTTCCTC (as)	58	269
8	GACGTGGAAGGTTTGTAAACGC (s) ATCATGTCACAATCATCTTGA (as)	58	237
9	TGCCCAGGAATCTATAATTAC (s) ACTATCTCTATATTACTGTGC (as)	58	266
10	ACCTGGAATGTAACATCCAGC (s) ACCATTCTGCTTTCCACTTCC (as)	58	293
11	AATATGATTTCAATTCTTGCC (s) GATGTAGAAGTCCTTCAGGTG (as)	58	272
12	TCTCCAGTCGCCTAATCCTGG (s) CCAATGACAACGACATAGTAC (as)	58	302
13	GTGCATTGCATGTTGTCTCTG (s) TGACAGGATGGCTTAATGCCC (as)	58	241
14	ATGTTACTGACATATTTTGTG (s) GGCCGAAGTTCAACAAGCTTA (as)	58	147

*s sense

** as antisense

Obs: Para os éxons 2-13 os oligonucleotídeos são correspondentes a seqüências intrônicas que flanqueiam os éxons, enquanto os oligonucleotídeos para os éxons 1 e 14 correspondem a regiões não codificantes presentes nestes éxons.

Tabela VII - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação dos éxons *GnRH-R*, temperatura de anelamento e tamanho do produto da amplificação.

Exon	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de anelamento (°C)	Amplificado (pb)
1A	ACACAAGGCTTGAAGCTCTGTCC (s*) GCTGGGGCATACATGGAGAAAA (as**)	56	418
1B	ACACAGAAGAAAGAGAAAGGG (s) AGACCTTATATCAAATTTAGATAGGA (as)	56	408
2	CTAGCAGAGTACCAAAGAGAAACTT (s) AAACTGCCCACAAATGACACT (as)	56	336
3	CACCTCTCTTTTCTCTATCCAACA (s) ACATTTGTGTTAATCATTCCCAGA (as)	56	349

*s sense

** as antisense

Obs: para o éxon 1 foram necessários dois pares de oligonucleotídeos (1A e 1B)

Tabela VIII: Oligonucleotídeos criados para amplificação dos éxons do gene *NELF*, temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.

Exon	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de Anelamento (°C)	Amplificado (pb)
1	CCTGACGTCACGGTAGGTG(s*) ACACACCCTTGGTCCTGGT (as**)	60	725
2	CCGACCCTCCTTCCAGAC (s) GAGGCAGGGATCAGCATC (as)	60	250
3A	CCTTCGGCCTGCTATGAAAC (s) GCTGGCTGTGATGGTGAG (as)	60	352
3B	CACCCTCACCATCACAGC (s) CACCCCCAAACCTGTCTATG (as)	59	278
4	CACCGCTCCTTTTTGTCTCT(s) ATAGGCACGTGGGTCTGTTC (as)	60	228
5	ACTGTCCCGACGTCTGTGT (s) CAGCACAGACCAGAGATGGA (as)	59	187
6	ACCGAAGGGGTGAGAGTAGA (s) TCTTATCGCAGCTAGCAGCA (as)	60	198
7	GCTAATGCGGGTTTGTCTC(s) GGTCTAGGGGAGGCTCTGG (as)	60	167
8-9	TGGCCAGGATAGGAGGTG (s) CGCAAGAGGGCATCTGTT (as)	59	547
10-11	CTCTGACGCAGCCTTGATGT (s) CTTCTTCCCCTTGGTCTTCC (as)	60	341
12-13	AAACTACCTCCCACGCATGT (s) AAGGCTCTGCCCTGTCTGT (as)	60	491
14-15	TCTCTCTGCCTCGGACTCAT (s) AGTGGCCTGATGGTGACTG (as)	60	357

*s sense

** as antisense

Obs: para o éxon 3 foram necessários dois pares de oligonucleotídeos (3A e 3B).

O PCR multiplex foi também empregado na confirmação do estado heterozigoto de mulheres presentes na família de pacientes portadores de deleção intragênica em *KAL-1*, tal como proposto por NAGATA *et al* (2000). Nessa situação, utilizou-se o gene autossômico *NPC1* (“Nieman Pick disease type C”) como padrão interno na quantificação dos produtos de PCR do gene *KAL-1*. A reação de PCR foi realizada num volume final de 10µL, contendo 100ng de DNA molde, 0,2mM de dNTPs, 1,0mM de MgCl₂, tampão de PCR 1x (20mM Tris-HCl e 50mM KCl) e 0,5 U de TaqDNA polimerase (Invitrogen), combinando-se oligonucleotídeos sense e

Tabela IX - Oligonucleotídeos criados para amplificação dos éxons do gene *EBF2*, temperatura de anelamento e tamanho do produto de amplificação.

Exon	Oligonucleotídeos 5' → 3'	Temperatura de Anelamento (°C)	Amplificado (pb)
1	GTCAACAACGGTGAATGTGG (s*) AGCAGGCTGGAGTCTGTGTT (as**)	56	283
2	CCCATGAAAGAACAAACCTGA (s) CCCATGCCTGATTTACTATGA (as)	56	295
3	GTCCTTGGTGATGGCTTGTC (s) GAACTAGCGCAAAGGCAAAC (as)	56	243
4	AGGTTTGCTTTATAGCCAGGA (s) GCCTGCATTTGTCTAAGTTTCC (as)	56	214
5-6	TTTGCCATCTTGGATTTTGC (s) CCCAACCTCTGACTCTGTCC (as)	56	460
7	GCACGCCTGTTGATTTACCT (s) TCCCAAAGGCCCAATAGTA (as)	56	300
8	TGTGCCAATGTGTGAACTG (s) TTTGCTTTACTTTGCCAACC (as)	56	298
9	CCCTCATTCTGTTGCATAGCC (s) CAGTTTGTGTAGCCACCATCA (as)	56	297

*s sense

** as antisense

antisense para os éxons 7 do gene *KAL-1* e 20 do *NPC1* (5' – GTAATGCCCCTCACTGTCAG – 3'/5' – GTCTTAGCCCAGTCCTCTCC – 3'), numa concentração final de 0,6pmol cada. As condições da reação foram: 5 min a 95°C, seguidos por 23 ciclos: 30s a 95°C, 30s a 58°C e 1 min a 72°C, com extensão final de 10 min. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2,8% e corados em solução de brometo de etídio (0,05ug/100mL). A imagem do gel foi capturada e digitalizada com o auxílio da câmera Kodak DC40 e a leitura da intensidade das bandas foi feita com o software 1D IMAGE ANALYS (ambos, componentes do “Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System” - EDAS), avaliando-se a razão *KAL-1/NPC1*. Foram examinadas amostras de 12 indivíduos controles (seis homens e seis mulheres) para avaliar se a razão obtida refletia a dosagem dos genes analisados.

d) Seqüenciamento Manual – Genes *KAL-1* e *GnRH-R*

No início desse estudo, o seqüenciamento dos genes *KAL-1* e *GnRH-R* foi feito utilizando [α -³³P]ddNTPs. Os produtos de amplificação dos segmentos correspondentes aos genes foram purificados e seqüenciados utilizando os kits IN CONCERT GEL EXTRACTION SYSTEMS (Life Technologies) e THERMO SEQUENASE RADIOLABED TERMINATOR CYCLE SEQUENCING KIT (USB TM) respectivamente, seguindo instruções dos fabricantes. As amostras obtidas foram desnaturadas por 15 min a 95°C e aplicadas em gel de poliacrilamida 6% (75mL de 19 acrilamida: 1 bis-acrilamida, 210g de uréia e 500mL de 1xTBE) para corrida eletroforética. O tempo e o número de corridas necessários para análise das seqüências variaram de acordo com o tamanho do produto amplificado. Não raras vezes, foram realizadas reações de seqüenciamento da fita antisense dos éxons para completar a leitura, feita após detecção por auto-radiografia.

e) Seqüenciamento Automático - Genes *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2*

Purificação dos Produtos de PCR

Antes de serem utilizados nas reações de seqüenciamento, os produtos de amplificação correspondentes aos éxons do gene *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2* foram purificados utilizando kit comercial WIZARD[®] SV GEL AND PCR CLEAN-UP SYSTEM (PROMEGA) .

Um outro método de purificação foi também empregado nesse estudo, sendo, na maioria das vezes, utilizado em substituição ao kit comercial. Nesse método, cerca de 50uL da reação de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1,5- 1,8% contendo 2uL de brometo de etídio (10ug/mL). Ao final da corrida, a banda de interesse foi cortada com o auxílio de um bisturi cirúrgico e colocada num tubo “eppendorff” de 0,5mL (previamente perfurado com agulha de insulina). Este “eppendorff” foi inserido num “eppendorff”

coletor de 2mL e deixado a -70°C por uma hora. Após esse período, os tubos foram imediatamente centrifugados a 7000 rpm por 5 minutos. A solução retida no tubo coletor foi transferida para um “eppendorff” de 1,5mL, e a ela foram misturados metade do seu volume de acetato de amônio 7,5 M e duas vezes seu volume de etanol absoluto gelado. O tubo foi levado à centrifugação a 13000rpm/30 minutos, descartando-se o líquido e deixando secar o pellet à temperatura ambiente. O DNA precipitado foi então solubilizado em 3-5uL de água desionizada estéril.

Reação de seqüenciamento

Para a reação de seqüenciamento foram misturados 1-2uL de PCR purificado, 1,0uL de oligonucleotídeo (sense ou anti-sense contendo 5 pmol), 2,0uL de BIG DYE TERMINATOR v3.1 CYCLE SEQUENCING KIT (ABI PRISM), contendo didesoxinucleotídeos terminadores marcados com compostos fluorescentes, e água desionizada estéril para um volume final de 10uL. A reação foi levada a um termociclador por $96^{\circ}\text{C}/2\text{min}$, seguindo-se 36 ciclos: $96^{\circ}\text{C}/30\text{s}$, $58^{\circ}\text{C}/20\text{s}$ e $60^{\circ}\text{C}/4\text{min}$.

Ao término do tempo de reação, o produto foi precipitado adicionando-se 80uL de isopropanol 75% (preparado antes do uso) e incubando-se no escuro por 15 min à temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 13.000 rpm por 30 min e o sobrenadante foi descartado. Ao tubo foram adicionados 150uL de etanol 70% gelado e centrifugado a mesma velocidade por mais 15min. O etanol foi completamente descartado invertendo-se o tubo sobre papel toalha e deixado secar sobre a bancada ao abrigo da luz. A reação foi então ressuspensa em 3uL de solução 2:5 dextran:formamida.

Desnaturação das amostras, leitura e análise das seqüências

As amostras foram desnaturadas por 2 min a 95°C e encaminhadas ao seqüenciador ABI 377, onde foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 4,5% (10mL de 18,5 acrilamida: 1 bis-acrilamida, 36 g de uréia e 60mL de 1xTBE) e lidas por um feixe de laser. As informações captadas pelo seqüenciador foram automaticamente enviadas para um computador MACINTOSH e interpretadas pelo ABI ANALYSIS SOFTWARE. Este Software gera um cromatograma, formado por picos de quatro cores diferentes (cada uma correspondendo a uma das bases C, A, T e G), referente à seqüência das amostras. Os cromatogramas foram então exportados para o programa

CHROMAS 1.45 (livremente distribuído pela Technelysium no site <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) onde as seqüências obtidas foram analisadas.

4.RESULTADO

Dos 31 casos de HH estudados, 22 (71%) foram diagnosticados como portadores da SK devido a presença de anosmia/hiposmia, sendo esta referida pelo paciente ou detectada após a realização de um teste olfativo adequado. Em apenas três dos dezoito casos de SK nos quais foram realizados os testes olfativos, a ocorrência ou não de anosmia não foi esclarecida, pois estes pacientes apresentavam características que dificultaram seu diagnóstico (P6, retardo mental e P24 e P30, rinite). Entre os 22 casos da SK, dezoito representam indivíduos não relacionados, dos quais doze são casos esporádicos (67%) e seis familiares (50% com sugestão de herança recessiva ligada ao X, 33% autossômica dominante e 17% autossômica recessiva). Nove pacientes representam casos de HH e olfação normal (29%), sendo que destes seis são casos isolados (67%) e três (33%) pertencem a duas famílias distintas; nessas famílias o provável modo de herança não pôde ser determinado.

4.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA POR BANDAMENTO GTG E FISH

Não foram observadas alterações cromossômicas em nenhum dos pacientes analisados, sendo que a análise citogenética, e também por FISH do gene *KAL-1*, já havia sido realizada nos pacientes P1-P15 (TRARBACH, 2000). Como previamente descrito em TRARBACH *et al.* (2001), análise por FISH com sonda específica para o *locus KAL-1* em Xp22.3 demonstrou uma microdeleção deste gene em um caso esporádico de SK, paciente P2.

Com o início da análise molecular do gene *KAL-1* e a constatação de que a sonda comercial empregada na detecção de microdeleções deste gene falha na detecção de deleções intragênicas (a sonda em questão engloba os éxons de 2-7 do *locus KAL-1*), optou-se por abandonar em definitivo a utilização dessa técnica de FISH nesse estudo.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *KAL-1*

Dos doze casos esporádicos de SK, amostras de DNA foram obtidas de oito indivíduos. Uma mutação “frameshift” ainda não descrita na literatura foi observada no paciente P30, consistindo esta na deleção de um nucleotídeo C na posição 1956 do éxon 12 (Figura 4.1) que altera a matriz de leitura a partir do códon 602, levando a substituição de 17 aminoácidos e criando um códon STOP prematuro na posição 619 da proteína (Figura 4.2).

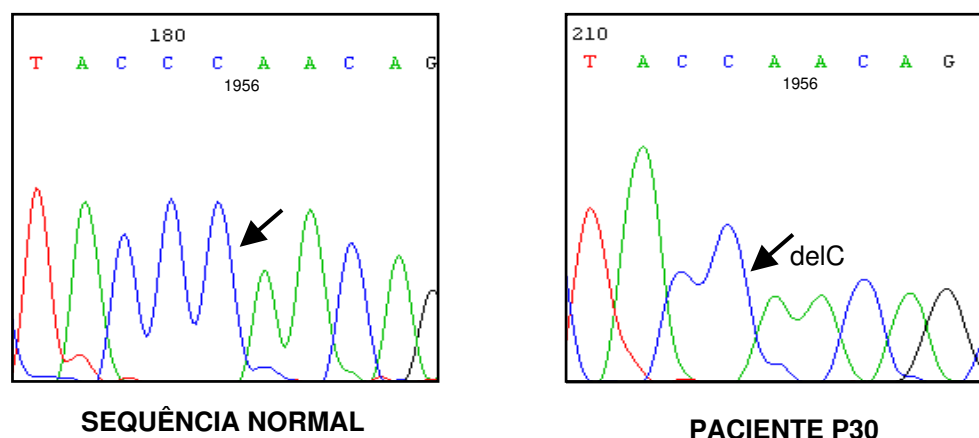


Figura 4.1 – Parte da sequência do éxon 12 do gene *KAL-1* do paciente P30 (SK) onde foi encontrada uma deleção 1956C acarretando numa mutação “frameshift”. A esquerda é apresentada a sequência normal desse éxon.

		L	P	N	S	I	I	S	Q	S	Q	I	L	P	S	D	H	Y	V
601		CTA	CCC	AAC	AGC	ATT	ATT	TCA	CAG	TCC	CAG	ATT	CTG	CCT	TCC	GAT	CAT	TAT	GTC
1951																			
619		L	T	V	P	N	L	R	P	S	T	L	Y	R	L	E	V	Q	V
2005		CTA	ACA	GTG	CCC	AAT	CTG	AGA	CCA	TCT	ACT	CTT	TAC	CGA	CTG	GAA	GTG	CAA	GTG
a)	637	L	T	P	G	G	E	G	P	A	T	I	K	T	F	R	T	P	E
	2059	CTG	ACC	CCA	GGA	GGG	GAG	GGG	CCG	GCC	ACC	ATC	AAG	ACG	TTC	CGG	ACG	CCG	GAG
	655	L	P	P	S	S	A	H	R	S	H	L	K	H	R	H	P	H	H
	2113	CTC	CCA	CCC	TCT	TCA	GCA	CAC	AGA	TCT	CAT	CTT	AAG	CAT	CGT	CAT	CCA	CAT	CAT
	673	Y	K	P	S	P	E	R	Y	#									
	2167	TAC	AAG	CCT	TCT	CCA	GAA	AGA	TAC	TAA									
		L	P	T	A	L	F	H	S	P	R	F	C	L	P	I	I	M	S
	601	CTA	CCA	ACA	GCA	TTA	TTT	CAC	AGT	CCC	AGA	TTC	TGC	CTT	CCG	ATC	ATT	ATG	TCC
	1951																		
	-	#																	
b)	2005	TAA																	

Figura 4.2 – (a) sequências de nucleotídeos e de aminoácidos normais indicando a base C que foi deletada (em vermelho). (b) alteração do quadro de leitura e da sequência protéica, onde é observada a substituição de 17 aminoácidos além da introdução de um codón STOP prematuro na posição 619 (em verde).

Nos casos familiares de SK, a análise por PCR do gene *KAL-1* levou à detecção de duas deleções intragênicas similares no gene *KAL-1*, ambas envolvendo os éxons 5-10 (Figura 4.3). Essas deleções foram encontradas em indivíduos pertencentes a duas famílias distintas (P5 e P6, Família 1; P20, Família 5), onde também foram observadas mulheres heterozigotas portadoras da deleção no gene *KAL-1* (Tabela X e Figura 4.4). Na Família 2, o sequenciamento do gene *KAL-1* levou à identificação de uma mutação em dois irmãos com SK-X, P7 e P8, onde foi observada uma alteração 721C>T no éxon 5, levando à introdução de um códon STOP prematuro TAG no transcrito desse gene (Figura 4.5).

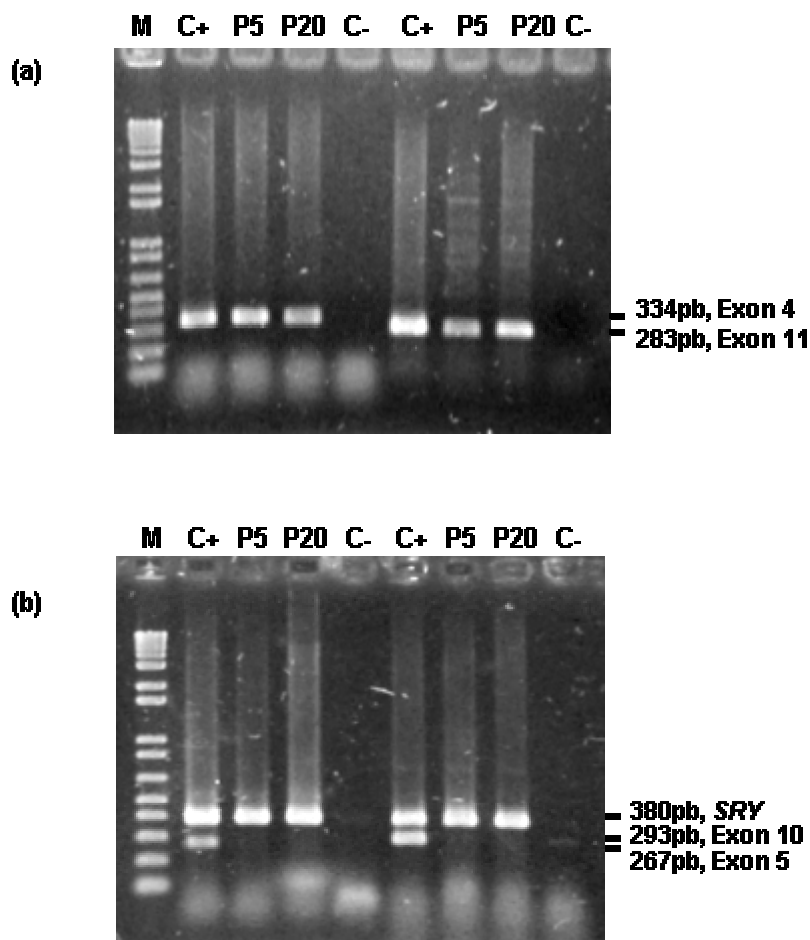


Figura 4.3 – Resultado da amplificação por PCR dos éxons 4 e 11 (a) e 5 e 10 (b) do gene *KAL-1* dos pacientes P5 e P20 (a mesma deleção foi encontrada em P6, irmão do paciente P5, resultado não mostrado). Em (b) o gene *SRY* foi utilizado como controle interno da reação. M marcador de pares de base, C+ controle positivo e C- controle negativo.

Tabela X – Resultados da leitura da intensidade das bandas dos produtos do gene *KAL-1* e *NPC1* (feita pelo software 1D IMAGE ANALYS após análise digital das bandas observadas no gel apresentado na figura 4.4) e de sua razão entre familiares (mães e irmãs) dos pacientes com P5, P6 e P20 portadores de deleção dos éxon 5-10 no gene *KAL-1*.

	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>KAL-1</i>	67333	23192	-	33230	31789	31458	45666	34923
<i>NPC1</i>	67611	40366	42173	59983	58270	66915	45929	35200
KAL/NPC1	0,995888	0,574543	0	0,553990	0,545547	0,470119	0,994274	0,992131

para legenda vide figura 4.4

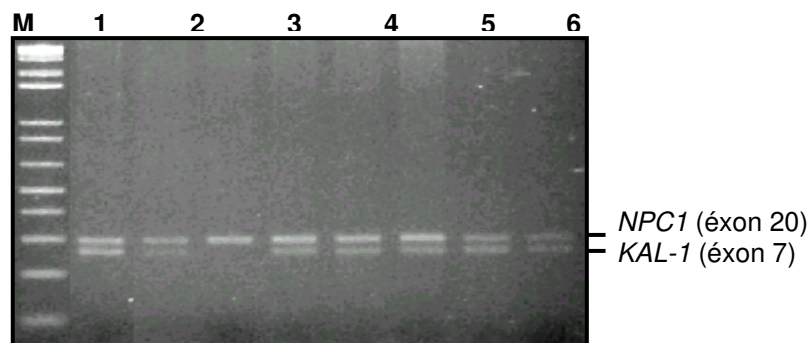


Figura 4.4 – Imagem do gel de agarose utilizado para medição da intensidade das bandas dos éxons 7 e 20 dos genes *KAL-1* e *NPC1*, respectivamente. 1- Controle Feminino; 2- Controle Masculino; 3 - Paciente P20; 4 – Indivíduo I-2 (mãe dos pacientes P5 e P6), Família 1; 5 – Indivíduo III-17, 6 – Indivíduo II-7 (mães de afetados), 7- Indivíduo II-24 e 8 – Indivíduo II-26 (irmãs de afetados), Família 5.

Polimorfismos nos éxons 11 e 12, previamente descritos em outros trabalhos, foram também encontrados em alguns pacientes com SK: P11, P13, P24 e P25. Trata-se, respectivamente, de três transições 1750A>G no códon 534, levando a substituição de uma isoleucina por uma valina (P11, P13 e P24) e de duas transições 1983T>C no códon 611 que não altera o aminoácido codificado, a isoleucina (P13 e P25).

Nos nove casos com HHn, não foram observadas mutações na sequência codificante do gene *KAL-1*, apenas os polimorfismos descritos para os éxons 11 e 12 em dois casos: Ile⁵³⁴Val e Ile⁶¹¹Ile no paciente P1 e Ile⁶¹¹Ile no paciente P19.

Na tabela XI são listadas as alterações (deleções, mutações e polimorfismos), encontradas no gene *KAL-1* em todos os indivíduos analisados.

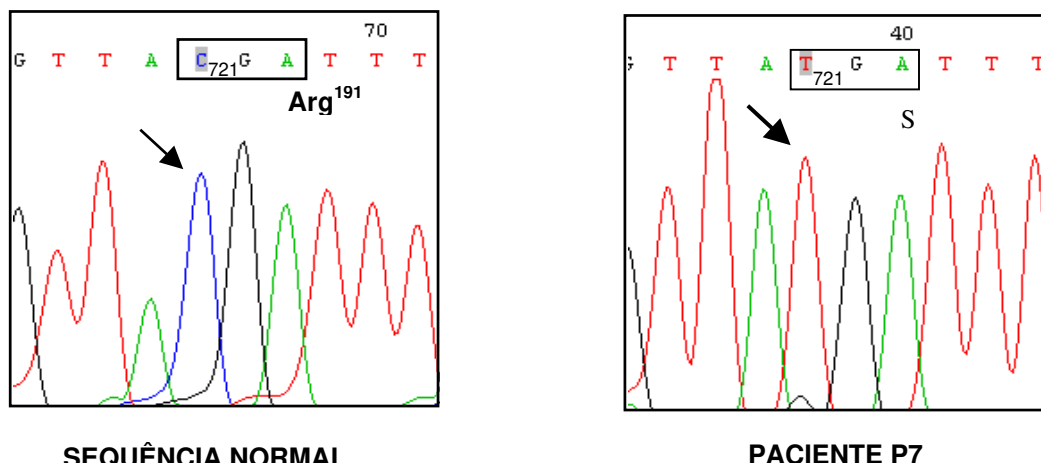


Figura 4.5 – Mutação 721C para T no códon 191 do éxon 5, encontrada no gene *KAL-1* do paciente P7, que leva a alteração do aminoácido arginina por um códon de terminação (STOP) prematuro. A mesma alteração foi observada em seu irmão, P8 (dados não mostrados). A esquerda é mostrada a sequência normal do éxon 5.

Tabela XI – Resumo das alterações encontrados no gene *KAL-1* em treze pacientes com HH (cinco com SK e seis com HHn).

ALTERAÇÕES OBSERVADAS NO GENE <i>KAL-1</i>					
SÍNDROME DE KALLMANN	MUTAÇÕES COM ALTERAÇÕES FUNCIONAIS DA PROTEÍNA	Paciente	Éxon	Nucleotídeos Alterados	Aminoácidos Alterados
		P2*	1-14	deleção do gene	
		P5/P6	5-10	deleção dos éxons 5-10	
		P20	5-10	deleção dos éxons 5-10	
		P7/P8	5	C ₇₂₁ GA→TGA	Arg ¹⁹¹ → STOP
		P30	12	delC ₁₅₆	“frameshift”
	POLIMORFISMOS	P11	11	ATT → G ₁₇₅₀ TT	Ile ⁵³⁴ → Val
		P13	11	ATT → G ₁₇₅₀ TT	Ile ⁵³⁴ → Val
			12	ATT → ATC ₁₉₈₃	Ile ⁶¹¹ → Ile
		P24	11	ATT → G ₁₇₅₀ TT	Ile ⁵³⁴ → Val
		P25	12	ATT → ATC ₁₉₈₃	Ile ⁶¹¹ → Ile
HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO NORMÓSMICO	POLIMORFISMOS	P1	11	ATT → G ₁₇₅₀ TT	Ile ⁵³⁴ → Val
			12	ATT → ATC ₁₉₈₃	Ile ⁶¹¹ → Ile
		P19	12	ATT → ATC ₁₉₈₃	Ile ⁶¹¹ → Ile

*previamente descrito em TRARBACH *et al.* (2001).

4.3 ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *GnRH-R*

Não foram encontradas quaisquer alterações na sequência codificante do gene *GnRH-R* nos seis pacientes com HHn avaliados.

4.4 ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *NELF* e *EBF2*

A análise do gene *NELF* não revelou qualquer alteração em sua sequência. No gene *EBF2*, tanto em indivíduos com SK quanto com HHn, foi observado um polimorfismo 843A>G (Ser²⁴⁴Ser) no éxon 8, que ocorreu em homozigose nos pacientes P8, P11 e P22 (Figura 4.6b) e em heterozigose em P1, P6, P12, P25 e P27 (Figura 4.6c). Nesse mesmo éxon, foi visto que a base 842 é diferente daquela depositada no GenBank do NCBI NM_022659 mas idêntica à depositada no Ensembl ENSG0134025 (Figura 4.6a). Desse modo, o aminoácido Leu₂₄₄ predito de acordo com a sequência do GenBank deve ser substituído pela Ser (Figura 4.7).

Nas tabelas XII e XIII são apresentados os resumos dos resultados obtidos nas análises citogenéticas e moleculares realizadas nos pacientes SK e HHn respectivamente, bem como a descrição das características clínicas adicionais observadas nestes indivíduos.

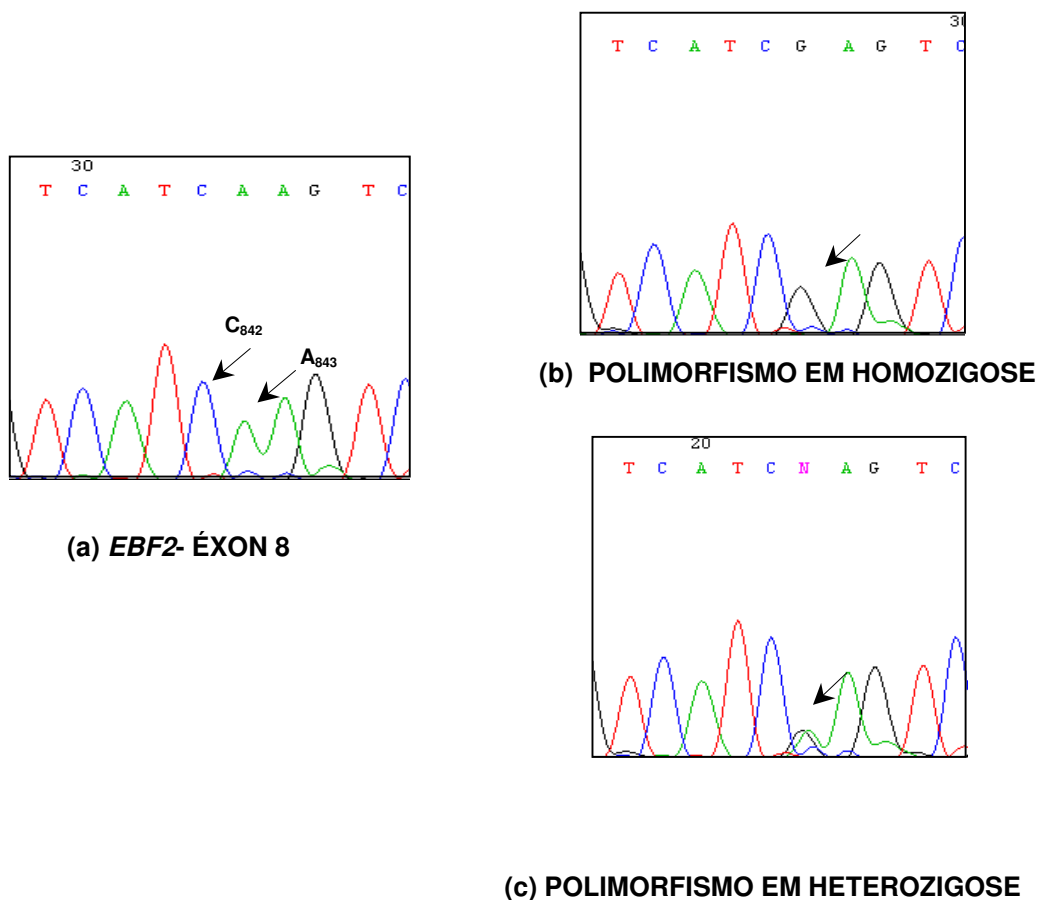


Figura 4.6 – (a) Parte da sequência do éxon 8 do gene *EBF2* mostrando que a base presente na posição 842 é uma citosina e não uma timina como consta no GenBank. (b) Polimorfismo 843TCA>TCG observado nesse mesmo éxon em alguns pacientes de nossa casuística. (c) Esse mesmo polimorfismo visto em heterozigose.

242	Met	Ser	Leu	Ser	Pro	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	GenBank
835	ATG	TCA	TTA	AGT	CCC	ACC	GTT	GGG	TCT	TCC	AGC	ACA	
242	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	Thr	Val	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Casuística
835	ATG	TCA	TCA	AGT	CCC	ACC	GTT	GGG	TCT	TCC	AGC	ACA	

Figura 4.7 – Comparação entre as sequências de nucleotídeos e de aminoácidos codificados pelo éxon 8 do gene *EBF2* encontrada em nossos pacientes e a depositada no GenBank. A sequência vista em nossa casuística confere com a depositada no banco de dados do Ensembl.

Tabela XII – Resumo dos resultados das análises citogenéticas e moleculares dos genes *KAL-1*, *NELF* e *EBF2* observados nos pacientes com síndrome de Kallmann. Nesta tabela são também apresentados as características clínicas adicionais encontradas em cada paciente e o provável modo de herança observado entre os casos familiares.

N	SEXO	ANOSMIA/ HIPOSMIA (AST)	CARACTERÍSTICAS ADICIONAIS	CARIÓTIPO	ANÁLISE MOLECULAR			HERANÇA
					<i>KAL-1</i>	<i>NELF</i>	<i>EBF2</i>	
P2	M	+	-	46,XY.fish del (X) (p22.3) (KAL)	-	-	-	Esporádico
P3	M	+	Pés cavos	46,XY	(NA)	(NA)	(NA)	Esporádico
P4	M	+	Ataxia,	46,XY	(NA)	(NA)	(NA)	Esporádico
P5 ^{&}	M	+	Rim ectópico	46,XY	Deleção dos éxons 5-10	-	-	Ligada ao X
P6 ^{&}	M	- ?	Agenesia renal, Retardo mental	46,XY	Deleção dos éxons 5-10	-	-	Ligada ao X
P7 [#]	M	+	Agenesia renal, Pés cavos	46,XY	Mutação no éxon 5**	-	-	Ligada ao X
P8 [#]	M	+	Agenesia renal	46,XY	Mutação no éxon 5**	-	-	Ligada ao X
P10	F	+	-	46,XX	(NA)	(NA)	(NA)	Esporádico
P11	M	+	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P12 [*]	M	+	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	AD?
P13	M	+	Cubitus valgus	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	AD?
P15 [*]	F	+	-	46,XX	(NA)	(NA)	(NA)	AD?
P20	M	+	Agenesia renal, Sincinesia bimanual	46,XY	Deleção dos éxons 5-10	-	-	Ligada ao X
P21	F	+	-	46,XX	(NA)	(NA)	(NA)	Esporádico
P23 [#]	M	+	Agenesia renal	46,XY	(NA)	(NA)	(NA)	Ligado ao X
P24	M	+	Malformação facial	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P25	M	+	Hipoplasia de 4° e 5° metacarpos	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P26	M	+	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P27	M	+	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P28	F	+	-	46,XX	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	AR?
P29	M	+	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P30	M	+	Sincinesia bimanual	46,XY	Mutação no éxon 5***	-	--	Esporádico

AST "Alcohol Sniff Test", AD autossômica dominante, AR autossômica recessiva.

NA não analisado (não foi possível a coleta de sangue para cultura de linfócitos e/ou extração de DNA).

& # ♠ pacientes pertencentes a mesma família.

? nesses pacientes a ocorrência de deficiência olfativa esta interrogada devido a presença de características (retardo mental, P6 e rinite, P24 e P30) que dificultaram a realização do teste olfativo.

*nesses casos não foram realizados testes olfativos, a anosmia/hiposmia foi referida pelo paciente.

** 721C para T, Arg₁₉₁STOP

*** 1956delC, "frameshift"

Obs: os pacientes P2-P15 foram previamente descritos em TRARBACH, 2000.

Tabela XIII – Resumo dos resultados das análises citogenéticas e moleculares dos genes *KAL-1*, *GnRH-R*, *NELF* e *EBF2* observados nos pacientes com HHn. Nesta tabela são também apresentados as características clínicas adicionais encontradas em cada paciente e o provável modo de herança observado entre os casos familiares.

N	SEXO	ANOSMIA/ HIPOSMIA (AST)	CARACTERÍSTICAS ADICIONAIS	CARIÓTIPO	ANÁLISE MOLECULAR				HERANÇA
					<i>KAL-1</i>	<i>GnRH-R</i>	<i>NELF</i>	<i>EBF2</i>	
P1	M	-*	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P9	F	-*	Baixa estatura	46,XX	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	Esporádico
P14	M	-*	-	46,XY	**	**	**	**	Esporádico
P16	M	-*	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P17	M	-*	Megacólon congênito e obstrução intestinal	46,XY	(NA)	(NA)	(NA)	(NA)	Esporádico
P18	M	-	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P19	M	-*	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Esporádico
P22♣	M	-	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	AR?
P31♣	M	-	-	46,XY	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	Seqüência Normal	AR?

AST “Alcohol Sniff Test”, AR autossômica recessiva.

NA não analisado (não foi possível a coleta de sangue para cultura de linfócitos e/ou extração de DNA).

♣ pacientes pertencentes a mesma irmandade.

*nesses casos não foram realizados testes olfativos, a olfação normal/normosmia foi referida pelo paciente.

** falecido, causa do óbito não informada.

Obs1: nos pacientes P18, P22 e P31 a normosmia foi confirmada pelo teste do butanol.

Obs2: os pacientes P1, P9 e P14 foram previamente descritos em TRARBACH, 2000.

5. DISCUSSÃO

.1 ANÁLISE CITOGENÉTICA

No presente estudo, todos os pacientes com SK e HHn analisados apresentaram cariótipo normal. Apesar desses resultados, é importante enfatizar a importância da análise citogenética no mapeamento gênico baseando-se no fato de que, como anteriormente mencionado, dois genes relacionados ao aparecimento da SK (o *FGFR-1* e o *KAL-1*) foram clonados pela descrição de indivíduos afetados portadores de rearranjos cromossômicos.

5.2 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *KAL-1*

Pacientes com SK foram analisados quanto a presença de anomalias na sequência codificadora do gene *KAL-1*, sendo encontradas alterações em dois de oito casos esporádicos cujo DNA estava disponível e nas três famílias com SK-X. Em todos esses casos de SK foram observadas manifestações fenotípicas típicas da SK-X, como sincinesia bimanual e agenesia renal.

De acordo com os dados da literatura, anomalias no gene *KAL-1* são encontradas em aproximadamente 5-8% e 50-58% dos casos esporádicos e familiares da SK, respectivamente (HARDELIN *et al.*, 1993; QUINTON *et al.*, 1996; GEORGOUPOLUS *et al.*, 1997; SATO *et al.*, 2004). OLIVEIRA *et al.* (2001) observaram dados conflitantes com esses achados. Esses autores, examinando uma casuística de 101 indivíduos com HH, identificaram 59 pacientes com SK dos quais apenas 14% dos casos familiares e 11% dos casos esporádicos apresentaram alterações em regiões codificantes do gene *KAL-1*. Apesar de pequena, nossa casuística mostra uma frequência relativamente elevada de mutações no gene *KAL-1* entre os casos esporádicos de SK: 25%,

considerando n= 8. Entre os casos familiares, esta frequência foi de 50%, sendo que em todas as famílias com padrão sugestivo de herança ligada ao X foram detectadas alterações no gene *KAL-1*.

As mutações no *locus KAL-1* são amplamente distribuídas ao longo de seus éxons, variando desde mutações pontuais (inserção, deleção, inversão e transição de bases) até deleções que envolvem todo o gene. Em um de nossos pacientes, a deleção C₁₉₅₆ no éxon 12 do gene *KAL-1*, uma mutação “frameshift” ainda não descrita na literatura, identificada em um caso esporádico da SK provoca uma alteração no quadro de leitura a partir do códon 602, levando a substituição de 17 aminoácidos e criando um códon STOP prematuro na posição 619 da proteína. Essa mutação pode conduzir a expressão de uma proteína truncada e, presumivelmente, não funcional.

Ainda entre os casos esporádicos, uma deleção envolvendo todo o locus *KAL-1* foi detectada por FISH em um pacientes com SK-X, sendo este caso previamente descrito e discutido em TRARBACH *et al.* (2001).

Nos casos familiares da SK, em uma das famílias foi encontrada uma mutação pontual em dois irmãos com SK-X, previamente descrita por OLIVEIRA *et al.* (2001) consistindo esta numa transição de bases 721C para T, alterando o aminoácido arginina por um códon STOP prematuro na posição 191. Como nas mutações “frameshift”, as mutações STOP também predizem ao aparecimento de proteína truncada inativa. Por outro lado, é possível que tais proteínas sequer sejam produzidas, pois os RNA mensageiros “nonsense” gerados podem ser degradados por um mecanismo pós-transcricional de controle da expressão gênica, o “messenger RNA decay”, impedindo a síntese de proteínas truncadas (CULBERTSON *et al.*, 1999).

Nas duas outras famílias foram detectadas duas deleções intragênicas similares do gene *KAL-1*, envolvendo os éxons de 5-10. Análises por citogenética de alta resolução e por FISH

tinham sido previamente realizadas em dois irmãos de uma dessas famílias (Família 1, TRARBACH, 2000) e, apesar de compreender uma região de cerca de 60 kb, esta deleção não pôde ser detectada pela técnica de FISH. A sonda LSI KAL utilizada (Vysis Inc) cobre apenas parte do gene, estendendo-se sobre uma região de 160 kb que não inclui os éxons 1 nem os éxons 8-14 do *locus KAL-1* (Figura 5.1). Deste modo, mesmo que o indivíduo possua uma deleção que compreenda os éxons localizados na extremidade 3' do gene *KAL-1*, ou parte desses éxons como no caso apresentado acima, a análise por FISH não indicará a presença de tal deleção. Assim, essa técnica de FISH é válida apenas na detecção de deleções completas do gene *KAL-1*, mas não exclui a presença de deleções intragênicas envolvendo determinados éxons.

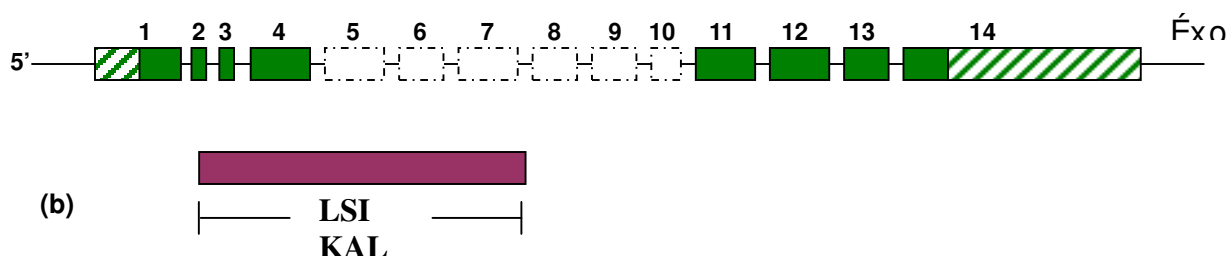


Figura 5.1 – (a) Representação esquemática da deleção dos éxons 5-10 do gene *KAL-1* detectada pela técnica de PCR nos pacientes P5 e P6 (Família 1) e (b) da área de cobertura da sonda LSI KAL.

Deleções maiores envolvendo mais que um éxon do gene *KAL-1* foram relatadas para os éxons 13-14 (BICK *et al.*, 1992), 3-5 (MAYA-NUNEZ *et al.*, 1998), 5-10 (NAGATA *et al.* 2000) 3-13 (MASSIN *et al.*, 2003). Embora os pontos de quebra não tenham sido determinados em nenhum desses casos, é possível que as regiões intrônicas que flanqueiam esses éxons contenham elementos repetitivos capazes de promover mecanismos de recombinação não alélica. Para a identificação de tais elementos entre os éxons 4-5 e 10-11 do gene *KAL-1*, íntrons envolvidos no aparecimento da deleção 5-10, nós utilizamos o RepeatMasker software, acessado em 16/09/2003 pelo site <http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>. Elementos de repetição

FLAM_A pertencente à família *Alu* foram localizados, sobre fitas opostas, nos íntrons 5 e 10 (Figura 5.2a). Embora não tenha sido observada nenhuma similaridade significativa entre esses dois elementos utilizando o BLAST (acesso em 07/10/2003), quando os íntrons 5 e 10 foram comparados como um todo, foi identificada uma sequência curta de 51 pb muito similar nos dois íntrons (Figura 5.2b). Esta sequência está contida na região FLAM_A no íntron 10 e adjacente à essa repetição no íntron 4. Outros elementos repetitivos que pudessem mediar eventos de recombinação ilegítima não puderam ser detectados utilizando essas análises.

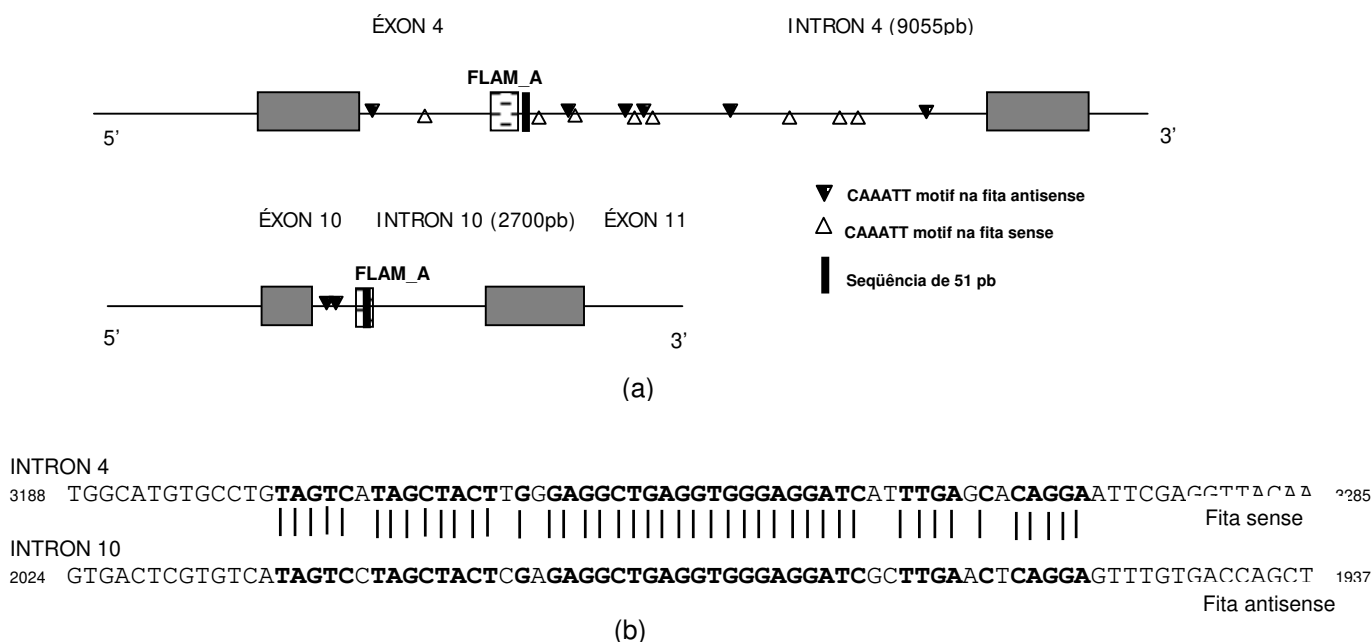


Figura 5.2 – (a) Posição relativa das repetições FLAM_A da família *Alu* e dos “motifs” CAAATT nos íntrons 4 e 10 do gene *KAL-1*. (b) alinhamento da sequência de 51 pb identificada nesses íntrons (E: 2e-04).

Na deleção de éxons 13-14 descrita por BICK *et al.* (1992), o seqüenciamento dos fragmentos de junção revelou um “motif” de 6 pb (CAAATT) no ponto de quebra da deleção. Vários autores têm sugerido que essas sequências facilitam eventos de recombinação em várias regiões do genoma (KRAWCZAD & COOPER, 1991; WOODS-SAMUELS *et al.*, 1991). É interessante mencionar que o “motif” CAAATT está presente nas regiões intrônicas que

flanqueiam a deleção 5-10 (Figura 5.2a). Assim, no mínimo dois mecanismos moleculares diferentes podem ser responsáveis pela deleção intragênica observada em nossos pacientes. Nossos dados, juntamente com o relato anteriormente feito por NAGATA *et al.* (2000), sugerem que um mecanismo recorrente pode predispor ao aparecimento de deleções grandes éxons-específicas no gene *KAL-1*.

Em geral, as mutações no gene *KAL-1* não exibem recorrência entre indivíduos não aparentados e não parece haver correlação entre o genótipo e os sinais ocasionais freqüentemente observados em indivíduos com SK-X, nem mesmo dentro da mesma irmandade. Em uma das famílias (Família 1) em que foi detectada deleção dos éxons 5-10 do gene *KAL-1*, um dos irmãos afetados apresentou retardo mental e rim em ferradura em associação com a SK. Na outra família (Família 5), as características adicionais relatadas entre os indivíduos afetados incluíam sincinesia bimanual, agenesia renal e palato alto. NAGATA *et al.* (2000) descreveram dois irmãos portadores de uma deleção semelhante também envolvendo os éxons de 5-10, mas nem retardo mental nem sincinesia bimanual foram observados nesses casos. De fato, o retardo mental é raramente observado em pacientes com SK isolada, sendo descrita em pacientes afetados pela associação de várias doenças ligadas a região Xp22.3, como a síndrome de genes contíguos (MEINDL *et al.*, 1993; WEISSORTEL *et al.*, 1998). A sincinesia bimanual é um dos achados mais freqüentes e é considerado um marcador para a SK-X (KRAMS *et al.*, 1999; QUINTON *et al.*, 2001), com uma prevalência estimada em 85% entre indivíduos com SK-X (MacCOLL *et al.*, 2002). Contudo, em uma família com uma mutação no gene *FGFR1*, mapeado em 8p, a ocorrência de sincinesia bimanual foi também descrita, sugerindo que esta característica não deva ser considerada um marcador específico para a SK-X (DODÉ *et al.*, 2003).

Muitos dos indivíduos afetados com quadro clínico sugestivo de SK não apresentaram quaisquer alterações nas regiões codificantes do gene *KAL-1*. Nesses casos é possível que a mutação envolva uma região não codificante no éxon 1 ou 14 do gene *KAL-1* (GUIOLI *et al.*, 1992) ou esteja relacionada à região promotora, alterando a razão de transcrição do gene. Tal alteração pode estar ainda posicionada numa região intrônica, levando à criação de um novo sítio de "splicing" (IZUMI *et al.*, 1999), não podendo ser excluída a existência de um outro gene ligado ao X responsável pela SK (HARDELIN *et al.*, 1993) ou que a síndrome seja determinada por um gene autossômico. De fato, como mencionado acima, mutações no gene autossômico *FGFR1* foram recentemente descritas em indivíduos com uma forma autossômica dominante de SK (DODE *et al.*, 2003). Nesse sentido, os casos de SK em que não foram evidenciadas alterações no gene *KAL-1* poderiam ser investigados para mutações no gene *FGFR1*.

O gene *KAL-1* foi ainda analisado nos casos de HHn, porém, como descrito em outras casuísticas (GEORGOPOULOS *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001) anomalias neste gene não foram detectadas em nossos pacientes.

Quanto aos polimorfismos encontrados no *locus KAL-1*, estes levaram a uma variação neutra Ile⁶¹¹Ile e uma alteração Ile⁵³⁴Val, onde a troca de aminoácidos ocorre entre dois resíduos não polares que, provavelmente, não afeta a função da proteína KAL. Estes polimorfismos foram previamente descritos em outros trabalhos, não sendo estabelecida, até o momento, nenhuma relação entre tais polimorfismos e a ocorrência de mutações no gene *KAL-1* ou gravidade da doença entre pacientes com SK (GEORGOPOULOS *et al.*, 1997; MAYA-NUNEZ *et al.*, 1998).

5.3 ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE *GNRH-R*

Embora as mutações no gene *GnRH-R* representem a base molecular de cerca de 10% e 40% dos casos esporádicos e familiares com herança autossômica recessiva de HHn, respectivamente (BERANOVA *et al.*, 2001), não foram encontradas alterações nesse gene entre nossos pacientes com HH e olfação normal. De ROUX *et al.* (2003) sugeriram que o gene *GPR54* pode estar envolvido na secreção de gonadotrofinas pela demonstração de que mutações nesse gene levaram ao aparecimento do hipogonadismo em uma família com HHn. Desse modo, além da pesquisa mutacional no *GnRH-R*, pacientes com HHn tornam-se candidatos a investigação de alterações no gene *GPR54* como etiologia para deficiência de gonadotrofinas observada nesses casos.

5.4 ANÁLISE MUTACIONAL DOS GENES *NELF* E *EBF2*

A despeito da descrição de alterações nos genes *KAL-1* e *GnRH-R* em indivíduos com HH com anosmia associada e normósmicos respectivamente, e da recente descoberta de que alterações no gene *FGFR1* podem levar ao aparecimento da SK, a base genética da deficiência de GnRH tem sido estabelecida em menos de 20% dos casos de hipogonadismo (KOTTLER *et al.*, 1999; QUINTON *et al.*, 2001b). Os genes *NELF* e *EBF2*, como descrito anteriormente, têm sido relacionados à migração de neurônios GnRH e se tornam excelentes candidatos ao aparecimento do HH em humanos. MIURA *et al.* (2004) realizaram um “screening” de mutação no gene *NELF* em 65 pacientes com HH, encontrando uma mutação missense em heterozigose (1438A → G/T480A). Esta mutação não foi identificada em 100 indivíduos controles, sendo sugerido que esta possa estar associada ao surgimento do HH nesse paciente.

Com esses estudos, investigamos a ocorrência de mutações nos genes *NELF* e *EBF2* em nossos pacientes; no entanto, nenhuma alteração nesses genes foi identificada. De fato, a ontogenia dos neurônios secretores de GnRH envolve eventos de alta complexidade, mediante interação de diversos fatores, muitos dos quais ainda desconhecidos, o que torna difícil o esclarecimento da etiologia genética de todas as formas de hipogonadismo hipogonadotrófico.

6. CONCLUSÕES

A análise citogenética realizada em nossos pacientes não detectou qualquer rearranjo cromossômico que pudesse ser indicativa da localização de outros genes envolvidos no desenvolvimento do hipogonadismo hipogonadotrófico.

Mutações no gene *KAL-1* foram identificadas em uma proporção relativamente alta dos casos esporádicos da SK (dois em oito) e nas três famílias com herança ligada ao X, sendo observado que três dessas alterações correspondem a deleções, inter e intragênicas, provavelmente originadas por mecanismos de recombinação não homóloga.

Nos pacientes com HH e olfação normal, não foram encontradas alterações na sequência codificante do gene *GnRH-R*. Nesses casos também não foram identificadas mutações no gene *KAL-1*.

Os genes *NELF* e *EBF2* apresentaram sequência preservada entre os casos de SK e HHn, sendo pouco provável a participação desses no aparecimento do hipogonadismo hipogonadotrófico entre os pacientes de nossa casuística. Muitos dos genes envolvidos no desenvolvimento e funcionamento do eixo reprodutivo permanecem ainda elusivos, dificultando o esclarecimento etiologia da maioria das formas de hipogonadismo hipogonadotrófico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACIERNO JS JR, SHAGOURY JK, BO-ABBAS Y, CROWLEY WF JR & SEMINARA SB.

A *locus* for autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism on chromosome 19p13.3. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2947-50, 2003.

ALLEN MP, ZENG C, SCHNEIDER K, XIONG X, MEINTZER MK, BELLOSTA P, BASILICO C, VARNUM B, HEIDENREICH KA & WIERMAN ME. Growth arrest-specific gene 6 (Gas6)/adhesion related kinase (Ark) signaling promotes gonadotropin-releasing hormone neuronal survival via extracellular signal regulated kinase (ERK) and Akt. *Endocrinol* 13:191-201, 1999.

BALLABIO A, PARENTI G, TIPPETT P, MONDELLO C, DI MAIO S, TENORE A & ANDRIA G. X-linked ichthyosis, due to steroid sulphatase deficiency, associated with Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia): linkage relationships with Xg and cloned DNA sequences from the distal short arm of the X chromosome. *Hum Genet* 72:237-40, 1986.

BALLABIO A, SEBASTIO G, CAROZO R, PARENTI G, PICCIRILLO A, PERSICO MG & ANDRIA G. Deletions of the steroid sulphatase gene in "classical" X-linked ichthyosis and in X-linked ichthyosis associated with Kallmann syndrome. *Hum Genet* 77:338-41, 1987.

BALLABIO A, BARDONI B, CARROZZO R, ANDRIA G, BICK D, CAMPBELL B, HAMEL B, FERGUSON-SMITH MA, GIMELLI G, FRACCARO M, MARASCHIO P, ZUFFARDI O, GUIOLI S & CAMERINO G. Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10001-5, 1989.

BALLABIO A & ANDRIA G. Deletions and translocations involving the distal short arm of the human X chromosome: review and hypothesis. *Hum Mol Genet* 1:221-7, 1992.

- BERANOVA M, OLIVEIRA LM, BEDECARRATS GY, SCHIPANI E, VALLEJO M, AMMINI AC, QUINTOS JB, HALL JE, MARTIN KA, HAYES FJ, PITTELOUD N, KAISER UB, CROWLEY WF JR & SEMINARA SB.** Prevalence, phenotypic spectrum, and modes of inheritance of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1580-8, 2001.
- BEST LG, WASDAHL WA, LARSON LM & STURLAUGSON J.** Chromosome abnormality in Kallmann syndrome. *Am J Med Genet* 3: 306-9, 1990.
- BICK D, CURRY CJ, MCGILL JR, SCHORDERET DF, BUX RC & MOORE CM.** Male infant with ichthyosis, Kallmann syndrome, chondrodysplasia punctata, and an Xp chromosome deletion. *Am J Med Genet* 33:100-7, 1989.
- BICK D, FRANCO B, SHERINS RJ, HEYE B, PIKE L, CRAWFORD J, MADDALENA A, INCERTI B, PRAGLIOLA A, MEITINGER T & BALLABIO A.** Intragenic deletion of the KALIG-1 gene in Kallmann's syndrome. *New England J Med* 25:1752-5, 1992.
- BLESS EP, WESTAWAY WA, SCHWARTING GA & TOBET SA.** Effects of γ -aminobutyric acid A receptor manipulation on migrating gonadotropin-releasing hormone neurons through the entire migratory route in vivo and in vitro. *Endocrinology* 141:1254-62, 2000.
- BO-ABBAS Y, ACIERNO JS JR, SHAGOURY JK, CROWLEY WF JR & SEMINARA SB.** Autosomal recessive idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: genetic analysis excludes mutations in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor genes. *Clin Endocrinol Metab* 88:2730-7, 2003.
- BOULOUX PM, DUKE VM, HALL-CRAGGS M, MANNING P, QUINTON R & JACOBS HS.** Kallmann's syndrome. *Curr Opin Obstet Gynecol* 6:301-3, 1994.

- BULOW HE, BERRY KL, TOPPER LH, PELES E & HOBERT O.** Heparan sulfate proteoglycan-dependent induction of axon branching and axon misrouting by the Kallmann syndrome gene kal-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 30:6346-51, 2002.
- CASAMASSIMA AC, WILMOT PL, VIBERT BK & SHAPIRO LR.** Kallmann syndrome associated with complex chromosome rearrangement. *Am J Med Genet* 45: 539-41, 1993.
- CASTILLO GGV, MOLINA HL, GONZÁLEZ LB & UIRBE.** La resonancia magnética en el diagnóstico el síndrome de Kallmann. Presentación de dos casos y revisión de la literatura. *Ginec Obst Mex* 66:57-61, 1998.
- CORRADI A, CROCI L, BROCCOLI V, ZECCHINI S, PREVITALI S, WURST W, AMADIO S, MAGGI R, QUATTRINI A & CONSALEZ GG.** Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development* 130:401-10, 2003.
- COSTA EM, BEDECARRATS GY, MENDONCA BB, ARNHOLD IJ, KAISER UB & LATRONICO AC.** Two novel mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene in Brazilian patients with hypogonadotropic hypogonadism and normal olfaction. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2680-6, 2001.
- CROWLEY WF & WHITCOMB RW.** Gonadotropin-releasing hormone deficiency in men: diagnosis and treatment with exogenous gonadotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 163:1752-8, 1990.
- CULBERTSON R.** RNA Surveillance – unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trend Genet* 15:74-80, 1999.
- DAVIDSON TM & MURPHY C.** Rapid clinical evaluation of anosmia. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 123: 591-4, 1997.

DEL CASTILLO I, COHEN-SALMON M, BLANCHARD S, LUTFALLA G & PETIT C.

Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologues pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2:303-310, 1992.

DELLOVADE TL, HARDELIN JP, SOUSSI-YANICOSTAS N, PFAFF DW, SCHWANZEL-

FUKUDA M & PETIT C. Anosmin-1 immunoreactivity during embryogenesis in a primitive eutherian mammal. *Brain Res Dev* 140:157-67, 2003.

DE MORSIER G. Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques. Agenesie de lobes olfactifs

(telencephaloschizis lateral) et des commissures calleuse et anterieure (telencephaloschizis median). La dysplasie olfacto-genitale. *Schweiz Arch Neurol Neurochir Psychiatr* 74:309-361, 1954.

DE ROUX N, YOUNG J, MISRAHI M, GENET R, CHANSON P, SCHAISON G &

MILGROM E. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med* 337:1597-602, 1997.

DE ROUX N, YOUNG J, MISRAHI M, SCHAISON G & MILGROM E. Loss of function

mutations of the GnRH receptor: a new cause of hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab Suppl* 1: 267-75, 1999.

DE ROUX N, ACIERNO JS, HOUANG M, DERBOIS D, MATSUDA F, MEYSING AU,

PUGEAT M, LE BOUC Y, CROWLEY W F JR, KELLY P & STEPHANIE SEMINARA. An Unique Short 3' Duplication of the Coding Sequence of the GPR54 Ligand Identified in a Large Cohort of Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism Patients. *Endocrine Society's 86th Annual Meeting.* <http://www.endo-society.org/scimeetings/endo2004/index.cfm>

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 USA.* 100:10972-6, 2003.

DISSANEEVATE P, WARNE GL & ZACHARIN MR. Clinical evaluation in isolated hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann syndrome). *J Pediatr Endocrinol Metab* 11:631-8, 1998.

DODÉ C, LEILLIERS J, DUPONT J-M, DE PAEPE A, DÛ NL, SOUSSI-YANICOSTAS N, COIMBRA RS, DELMAGHANI S, COMPAIN-NOUAILLE S, BAVEREL F, PÊCHEAUX C, LE TESSIER D, CRUAUD C, DELPECH M, SPELEMAN F, VERMEULEN S, AMALFITANO A, BACHELOT Y, BOUCHARD P, CABROL S, CAREL J-C, DELEMARRE-VAN DER WAAL H, GOULET-SALMON B, KOTTLER A-L & RICHARD O. Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 33:463-5, 2003.

DRETS ME & SHAW MW. Specific banding patterns of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:2073-7, 1971.

DUKE VM, WINYARD PJ, THOROGOOD P, SOOTHILL P, BOULOUX PM & WOOLF AS. KAL, a gene mutated in X-linked Kallmann's syndrome, is expressed in the first trimester of human development. *Mol Cell Endocrin* 110:73-9, 1995.

FRANCO B, GUIOLI S, PRAGLIOLA A, INCERTI B, BARDONI B, TONLORENZI R, CARROZZO R, MAESTRINI E, PIERETTI M, TAILLON-MILLER P, BROWN CJ, WILLARD HF, LAWRENCE C, PERSICO MG, CAMERINO G & BALLABIO A. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353: 529-36, 1991.

GAREL S, MARIN F, MATTEI MG, VESQUE C, VINCENT A & CHARNAY P. Family of Ebf/Olf-1-related genes potentially involved in neuronal differentiation and regional specification in the central nervous system. *Dev Dyn* 210:191-205, 1997.

GEORGOPOULOS NA, PRALONG FP, SEIDMAN CE, SEIDMAN JG, CROWLEY WF JR & VALLEJO M. Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of KAL-1 gene

- mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 213-7, 1997.
- GU WX, COLQUHOUN-KERR JS, KOPP P, BODE HH & JAMESON JL.** A novel aminoterminal mutation in the KAL-1 gene in a large pedigree with X-linked Kallmann syndrome. *Mol Genet Metab* 6: 59-61, 1998.
- GUIOLI S, INCERTI B, ZANARIA E, BARDONI B, FRANCO B, TAYLOR K, BALLABIO A & CAMERINO G.** Kallmann syndrome due to a translocation resulting in an X/Y fusion gene. *Nat Genet* 1:337-40, 1992.
- HAGMAN J, BELANGER C, TRAVIS A, TURCK CW & GROSSCHEDL R.** Cloning and functional characterization of early B-cell factor, a regulator of lymphocyte-specific gene expression. *Genes Dev* 7:760-73, 1993.
- HARDELIN JP, LEVILLIERS J, DEL CASTILLO I, COHEN-SALMON M, LEGOUIS R, BLANCHARD S, COMPAIN S, BOULOUX P, KIRK J, MOURAINE C, CHAUSSIN J-L, WEISSENBACH J & PETIT C.** X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8190-4, 1994.
- HARDELIN JP, LEVILLIERS J, BLANCHARD S, CAREL J-C, LEUTENEGGER M, PINARD-BERTELLETTOM J-P, BOULOUX P & PETIT C.** Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 2:373-7, 1993.
- HIPKIN LJ, CASSON IF & DAVIS JC.** Identical twins discordant for Kallmann's syndrome. *J Med Genet* 27:198-9, 1990.
- INCERTI B, GUIOLI S, PRAGLIOLA A, ZANARIA E, BORSANI G, TONLORENZI R, BARDONI B, FRANCO B, WHEELER D & BALLABIO A.** Kallmann syndrome gene

on the X and Y chromosomes: implications for evolutionary divergence of human sex chromosomes. *Nat Genet* 2:311-4, 1992.

IZUMI Y, TATSUMI K, OKAMOTO S, HOSOKAWA A, UENO S, FUKUI H & AMINO N.

A novel mutation of the KAL 1 gene in Kallmann syndrome. *Endocrinol J* 46:651-8, 1999.

JANSEN C, HENDRIKS-STEGEMAN BI & JANSEN M. A novel nonsense mutation of the

KAL gene in two brothers with Kallmann syndrome. *Horm Resear* 53:207-12, 2000.

JOSSO N. Hormonal regulation of sexual differentiation. *Semin Perinatol* 16:279-88, 1992.

KAISER UB, DUSHKIN H, ALTHERR MR, BEIER DR & CHIN WW. Chromosomal

localization of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene to human chromosome 4q13.1-q21.1 and mouse chromosome 5.

Genomics 3:506-8, 1994.

KALLMANN FJ, SCCHOENFFELD WA & BARRERA SE. The genetics aspects of primary

eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 48:203-236, 1944.

KAKAR SS, MUSGROVE LC, DEVOR DC, SELLERS JC & NEILL JD. Cloning,

sequencing, and expression of human gonadotropin releasing hormone (GnRH) receptor.

Biochem Biophys Res Commun 30:289-95, 1992.

KOTTLER M-L, COUNIS R & BOUCHARD P. Mutations of the GnRH receptor gene: a new

cause of autosomal-recessive hypogonadotropic hypogonadism *Arch Med Resear* 30:481-5, 1999.

KRAMER PR & WRAY S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of

olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons.

Gen Dev 14:1824-34, 2000.

KRAMER PR & WRAY S. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) expression within the CNS and PNS of the rodent. *Gene Expr Patterns* 1:23-6, 2001.

KRAMS M, QUINTON R, ASHBURNER J, FRISTON KJ, FRACKOWIAK RSJ, BOULOUX P-MG & PASSINGHAM RE. Kallmann's syndrome: mirror movements associated with bilateral corticospinal tract hypertrophy. *Neurology* 52:816-22, 1999.

KRAWCZAK M & COOPER DN. Gene deletions causing human genetic disease: mechanism of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 86:425-41, 1991.

KROISEL PM, PETEK E, WAGNER K & KURNIK P. Complex chromosomal translocation in a patient with Kallmann syndrome. *Am J Med Genet* 91:240, 2000

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* 57:42-9, 1992.

LAYMAN LC, COHEN DP, JIN M, XIE J, LI Z, REINDOLLAR RH, BOLBOLAN S, BICK DP, SHERINS RR, DUCK LW, MUSGROVE LC, SELLERS JC & NEILL JD. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet* 18:14-5, 1998.

LEE DK, NGUYEN T, O'NEILL GP, CHENG R, LIU Y, HOWARD AD, COULOMBE N, TAN CP, TANG-NGUYEN AT, GEORGE SR & O'DOWD BF. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS Lett.* 446:103-7, 1999.

LEGOUIS R, HARDELIN JP, LEVILLIERS J, CLAVERIE J-M, COMPAIN S, WUNDERLE V, MILLASSEAU P, LE PASLIER D, COHEN D, CATERINA D, BOUGUELERET L, DLEMARRE-VAN DER WAAL H, LUTFALLA G, WEISSENBAACH J & PETIT C. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67:423-35, 1991.

- LEGOUIS R, LIEVRE CA, LEBOVICI M, LAPOINTE F & PETIT C.** Expression of KAL gene in multiples neuronal sites during chicken development. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2461-5, 1993.
- LITVINOVICH EF, SAVTCHENKO AY, LAPOUTIN I, GERASIMENKO N, STEPHANENKO G, TOURITSA A, LEVTCHENKO O & VOLCHENKO V.** Kallmann syndrome in a patient with t(3;14)(q29;21). *European Journal of Human Genetics – 10th international congress of human genetics*, p180: 2001.
- MACCOLL G, QUINTON R & BOULOUX PM.** GnRH neuronal development: insights into hypogonadotropic hypogonadism. *Trends Endocrinol Metab* 13:112-8, 2002.
- MAESTRE DE SAN JUAN A.** Teratologia: falta total de los nervios olfactorios con anosmia en un individuo en quien existia un atrofia congenita de los testículos y miembro viril. *El Siglo Med* 3:211, 1856.
- MASON AJ, HAYFLICK JS, ZOELLER RT, YOUNG WS 3RD, PHILLIPS HS, NIKOLICS K & SEEBURG PH.** A deletion truncation the gonadotropin-releasing hormone gene is responsible for hypogonadism in the ‘hpg’ mouse. *Science* 234: 1366-71, 1986.
- MASSIN N, PÊUCHEUX C, ELIOT C, BENSINMON J-L, GALEY J, KUTTENN F, HARDELIN J-P, DODÉ C & TOURAINE P.** X chromosome-linked Kallmann syndrome: clinical heterogeneity in three siblings carrying an intragenic deletion of *KAL-1* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2003-8, 2003.
- MATSUO T, OKAMOTO S, IZUMI Y, HOSOKAWA A, TAKEGAWA T, FUKUI H, TUN Z, HONDA K, MATOBA R, TATSUMI K & AMINO N.** A novel mutation of the *KAL 1* gene in monozygotic twins with Kallmann syndrome. *Eur Journ End* 143:783-7, 2000.

- MAYA-NUNEZ G, ZENTENO JC, ULLOA-AGUIRRE A, KOFMAN-ALFARO, S & MENDEZ JP.** A recurrent missense mutation in the KAL-1 gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 1650-3, 1998.
- MEITINGER T, HEYE B, PETIT C, LEVILLIERS J, GOLLA A, MORAIN C, DALLA PICCOLA B, SIPPELL WG, MURKEN J & BALLABIO A.** Definitive localization of X-linked Kallmann syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia) to Xp22.3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI-S232. *Am J Hum Genet* 47:664-9, 1990.
- MEYSING AU, KANASAKI H, BEDECARRATS GY, ACIERNO JS JR, CONN PM, MARTIN KA, SEMINARA SB, HALL JE, CROWLEY WF JR & KAISER UB.** GnRHR mutations in a woman with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism highlight the differential sensitivity of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone to gonadotropin-releasing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3189-98, 2004.
- 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* 49:265-8, 2004.
- MUENKE M & SCHELL U.** Fibroblast-growth-factor receptor mutations in human skeletal disorders. *Trends Genet* 11:308-13, 1995.
- NAGATA K, YAMOMOTO T, CHIKUMI H, IKEDA T, YAMAMOTO H, HASHIMOTO K, YONEDA K, NANBA E, NINOMIYA H & ISHITOBI K.** A novel interstitial deletion of KAL-1 in a Japanese family with Kallmann syndrome. *J Hum Genet* 45:237-40, 2000.
- OLIVEIRA LM, SEMINARA SB, BERANOVA M, HAYES FJ, VALKENBURGH SB, SCHIPANI E, COSTA EM, LATRONICO AC, CROWLEY WF JR & VALLEJO M.** The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab* 86:1532-8, 2001.

- O'NEIL MJ, TRIDJAJA B, SMITH MJ, BELL KM, WARNE GL & SINCLAIR AH.** Familial Kallmann syndrome: a novel splice acceptor mutation in the KAL gene. *Hum Mutat* 11:340-2, 1998.
- PAWLOWTZKI H, DIEKSTALL P, SCHADEL A & MINY P.** Estimating frequency of Kallmann syndrome among hypogonadic and among anosmic patients. *Am J Med Genet* 26: 473-9, 1987.
- PELLEGRINI L, BURKE DE, VON DELFT F, MULLOY B & BLUNDELL TL.** Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407:1029-34, 2000.
- PITTELOUD N, BOEPPLE PA, DECRUZ S, VALKENBURGH SB, CROWLEY WF JR & HAYES FJ.** The fertile eunuch variant of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: spontaneous reversal associated with a homozygous mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2470-5, 2001.
- POZZOLI O, BOSETTI A, CROCI L, CONSALEZ GG & VETTER ML.** Xebf3 is a regulator of neuronal differentiation during primary neurogenesis in *Xenopus*. *Dev Biol* 15:495-512, 2001.
- PRALONG FP, GOMEZ F, CASTILLO E, COTECCHIA S, ABUIN L, AUBERT ML, PORTMANN L & GAILLARD RC.** Complete hypogonadotropic hypogonadism associated with a novel inactivating mutation of the gonadotropin-releasing hormone receptor. *J Clin Endocrinol Metab* 84:3811-6, 1999.
- QUINTON R, DUKE VM, PRIYAL A, ZOYSA PA, PLATIS AD, VALENTINE, A, KENDALL B, PICKMAN S, KIRK JMW, BESSER GM, JACOBS HS & BOULOUX PMG.** The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 81:3010-3017, 1996.

- QUINTON R, BEIRNE P, BOULOUX P-MG, STANHOPE RG & CONWAY.** Routine neuroimaging in classical isolated gonadotrophin deficiency is of limited clinical value. *Clin Endocrinol* 54:125-32, 2001(a).
- QUINTON R, DUKE VM, ROBERTSON A, KIRK JM, MATFIN G, DE ZOYSA PA, AZCONA C, MACCOLL GS, JACOBS HS, CONWAY GS, BESSER M, STANHOPE RG & BOULOUX PM.** Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol* 55:163-174, 2001(b).
- ROBERTSON A, MACCOLL GS, NASH JA, BOEHM MK, PERKINS SJ & BOULOUX PM.** Molecular modeling and experimental studies of mutation and cell-adhesion sites in the fibronectin type III and whey acidic protein domains of human anosmin-1. *Biochem J* 357: 647-59, 2001.
- ROSEN SW, GANN P & ROGOL AD.** Congenital anosmia: detection thresholds for seven odorant classes in hypogonadal and eugonadal patients. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 88:288-92, 1979.
- RUGARLI EI & BALLABIO A.** Kallmann syndrome. From genetics to neurobiology. *JAMA*. 270:2713-6, 1993.
- RUGARLI EI, DI SCHIAVI E, HILLIARD MA, ARBUCCI S, GHEZZI C, FACCIOELLI A, COPPOLA G, BALLABIO A & BAZZICALUPO P.** The Kallmann syndrome gene homolog in *C. elegans* is involved in epidermal morphogenesis and neurite branching. *Development* 129: 1283-94, 2002.
- RUTA M, BURGESS W, GIVOL D, EPSTEIN J, NEIGER N, KAPLOW J, CRUMLEY G, DIONNE C, JAYE M & SCHLESSINGER J.** Receptor for acidic fibroblast growth factor is related to the tyrosine kinase encoded by the FMS-like gene (FLG). *Proc Nat Acad Sci*. 86: 8722-6, 1989.

SATO N, KATSUMATA N, KAGAMI M, HASEGAWA T, HORI N, KAWAKITA S, MINOWADA S, SHIMOTSUKA A, SHISIBA Y, YOKOZAWA M, YASUDA T, NAGASAKI K, HASEGAWA D, HASEGAWA Y, TACHIBANA K, NAIKI Y, HORIKAWA R, TANAKA T & OGATA T. Clinical assessment and mutation analysis of Kallmann syndrome 1 (KAL1) and fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1, or KAL2) in five families and 18 sporadic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1079-1088, 2004.

SCHWANZEL-FUKUDA M, BICK D & PFAFF DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res* 6:311-26, 1989.

SCHWANZEL-FUKUDA M & PFAFF DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature* 338:161-4, 1989.

SCHINZEL A, LORDA-SANCHEZ I, BINKERT F, CARTER NP, BEBB CE, FERGUSON-SMITH MA, EIHOLZER U, ZACHMANN M & ROBINSON WP. Kallmann syndrome in a boy with a t (1;10) translocation detected by reverse chromosome painting. *J Med Genet* 32: 957-61, 1995.

SCHWARTING GA, KOSTEK C, BLESS EP, AHMAD N & TOBET SA. Deleted in colorectal cancer (DCC) regulates the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons to the basal forebrain. *J Neurosci.* 21:911-9, 2001.

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. *Endoc Rev* 19:521-39, 1998.

SEMINARA SB, MESSENGER S, CHATZIDAKI EE, THRESHER RR, ACIERNO JS JR, SHAGOURY JK, BO-ABBAS Y, KUOHUNG W, SCHWINOF KM, HENDRICK AG, ZAHN D, DIXON J, KAISER UB, SLAUGENHAUPT SA, GUSELLA JF,

- O'RAHILLY S, CARLTON MB, CROWLEY WF JR, APARICIO SA & COLLEDGE WH.** The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med* 349:1614-27, 2003.
- SILVEIRA LF, STEWART PM, THOMAS M, CLARK DA, BOULOUX PM & MACCOLL GS.** Novel homozygous splice acceptor site GnRH receptor (GnRHR) mutation: human GnRHR “knockout”. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2973-7, 2002.
- SIMONIAN SX & HERBISON WE.** Differing, spatially restricted roles of ionotropic glutamate receptors in regulating the migration of GnRH neurons during embryogenesis. *J Neurosci* 21:934-43, 2001.
- SÖDERLUND D, CANTO P & MÉNDEZ JP.** Identification of three novel mutations in the KAL1 gene in patients with Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2589-82, 2002.
- SOUSSI-YANICOSTAS N, DE CASTRO F, JULLIARD AK, PERFETTINI I, CHEDOTAL A & PETIT C.** Anosmin-1, defective in the X-linked form of Kallmann syndrome, promotes axonal branch formation from olfactory bulb output neurons. *Cell* 109:217-28, 2002.
- STEVENS JC, CAIN WS & BURKE RJ.** Variability of olfactory thresholds. *Chem Sens* 13:643-53, 1988.
- SWERDLOFF RS & ODELL WD.** Hormonal mechanisms in the onset of puberty. *Postgrad Med J* 51:200-8, 1975.
- TRARBACH EB, BAPTISTA MTM, MACIEL-GUERRA A & HACKEL C.** Cytogenetics analysis and detection of KAL-1 gene deletion with fluorescence in situ hybridization. *Arq Bras Endocrinol Metab* 45:552-7, 2001.
- TRARBACH EB.** Estudos citogenéticos em pacientes com síndrome de Kallmann. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, 2000.

VERMEULEN S, MESSIAEN L, SCHEIR P, DE BIE S, SPELEMAN F & DE PAEPE A.

Kallmann syndrome in a patient with congenital spherocytosis and an interstitial 8p11.2 deletion. *Am J Med Genet* 108: 315-8, 2002.

WALDSTREICHER J, SEMINARA SB, JAMESON JL, GEYER A, NACHTIGALL LB,

BOEPPLE PA, HOLMES LB & CROWLEY WF JR. The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 4388-95, 1996.

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* 69: 299-303, 1989.

WEISSORTEL R, STROM TM, DORR HG, RAUCH A & MEITINGER T. Analysis of an

interstitial deletion in a patient with Kallmann syndrome, X-linked ichthyosis and mental retardation. *Am J Med Genet* 108:315-8, 1998.

WHITE BJ, ROGOL AD, BROWN KS, LIEBLICH JM & ROSEN SW. The syndrome of

anosmia with hypogonadotropic hypogonadism: a genetic study of 18 new families and a review. *Am J Med Genet* 14:417-35, 1983.

WOLCZYNSKI S, LAUDANSKI P, JARZABEK K, MITTRE H, LAGARDE JP &

KOTTLER ML. A case of complete hypogonadotropic hypogonadism with a mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Fertil Steril* 79:442-4, 2003.

WOODS-SAMUELS P, KAZAZIAN HH JR & ANTONARAKIS SE. Nonhomologous

recombination in the human genome: deletions in the human factor VIII gene. *Genomics* 10:94-101, 1991.

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* 86:8132-6, 1989.

YUNIS J. High resolution of human chromosomes. *Science* 191:1268-70, 1976.

8. ARTIGO PUBLICADO



Similar interstitial deletions of the *KAL-1* gene in two Brazilian families with X-linked Kallmann Syndrome

Ericka Barbosa Trarbach¹, Isabella Lopes Monlleo², Carlos Guilherme Gaelzer Porciuncula³, Marshall Italo Barros Fontes², Maria Teresa Mathias Baptista⁴ and Christine Hackel^{1,5}

¹Univesidade Estadual de Campinas, Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Laboratório de Genética Humana, Campinas, SP, Brazil.

²Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas, Faculdade de Medicina, Departamento de Pediatria, Maceió, AL, Brazil.

³Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Toco-Ginecologia e Pediatria, Maceió, AL, Brazil.

⁴Univesidade Estadual de Campinas, Hospital das Clínicas, Departamento de Clínica Médica, Campinas, SP, Brazil.

⁵Univesidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Genética Médica, Campinas, SP, Brazil.

Abstract

Mutations in the *KAL-1* gene localized at Xp22.3 have been shown to be responsible for the X-linked Kallmann syndrome (KS), a disorder characterized by the association of hypogonadotropic hypogonadism and anosmia. In this paper, we describe the investigation of two families with X-linked KS, in which similar interstitial deletions spanning exons 5 to 10 of the *KAL-1* gene were identified. The presence of interspersed repetitive DNA sequences within the *KAL-1* gene might have predisposed to this type of mutation.

Key words: X-linked KS, intragenic deletions, *KAL-1* gene, PCR, phenotypic variability.

Received: Accepted:

Introduction

Kallmann syndrome (KS) is a disorder defined by the association of hypogonadotropic hypogonadism with anosmia or hyposmia (Kallmann *et al.*, 1944) that is due to a neuronal migration defect involving both the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and the olfactory-producing neurons (Schwanzel-Fukuda *et al.*, 1989). Although the majority of KS cases are sporadic, segregation analysis in familial cases revealed X-linked, as well as autosomal recessive and autosomal dominant modes of transmission, indicating genetic heterogeneity (Hermanussen and Sippell, 1985; Chaussain *et al.*, 1988; Waldstreicher *et al.*, 1996).

The *KAL-1* gene responsible for the X-linked form of KS (MIM 308700) was mapped to Xp22.3 by linkage analysis and deletion studies (Ballabio *et al.*, 1989; Petit *et al.*,

1990) and was subsequently isolated by different positional cloning strategies (Franco *et al.*, 1991; Legouis *et al.*, 1991). This gene consists of 14 exons spanning approximately 210 kb (Del Castillo *et al.*, 1992) and encodes a protein, anosmin-1, that contains four fibronectin type III repeats and a putative protease inhibitor domain, structural features found in several cell and substrate adhesion molecules (Franco *et al.*, 1991; Legouis *et al.*, 1991). This raises the possibility that anosmin-1 could function in the migration of GnRH-secreting neurons and olfactory axons, during embryonic development (Franco *et al.*, 1991; Legouis *et al.*, 1991; Rugarli *et al.*, 1996).

In addition to hypogonadism and anosmia, a variety of other defects occur in patients with X-linked KS. They include neurological deficits such as bimaneal synkinesis (Kallmann *et al.*, 1944; Sunohara *et al.*, 1986), cerebellar dysfunction, nystagmus (Sunohara *et al.*, 1986; Schwankhauser *et al.*, 1989), mental retardation (Kallmann *et al.*, 1944; Wegenke *et al.*, 1975), hearing loss (White *et al.*, 1983), and somatic defects, such as unilateral renal agenesis, *pes cavus* and high-arched palate (White *et al.*,

Send correspondence to Christine Hackel. Univesidade Estadual de Campinas, Laboratório de Genética Humana, Caixa Postal 6010, 13083-970 Campinas, SP, Brazil. E-mail: hackel@unicamp.br.

1983; Schwankhaus *et al.*, 1989; Zenteno *et al.*, 1999). Some of these symptoms (e.g. synkinesis and renal agenesis) are more frequently observed in patients with X-linked KS, indicating that these features represent pleiotropic effects of mutations in the *KAL-1* gene (Hardelin *et al.*, 1993) and suggesting a more generalized role of this gene during development, involving the nervous system and non-neuronal tissues (Hardelin *et al.*, 1992,1993).

In this paper, we report two unrelated Brazilian families with X-linked KS and similar interstitial deletions spanning exons 5 to 10 of the *KAL-1* gene.

Subjects and Methods

Patient reports

We studied two unrelated families with KS-affected males. In family 1 (Figure 1A), from Arapiraca, state of Alagoas, northeastern Brazil, five males were clinically evaluated (II-6, III-4, III-7, III-12, and IV-6), and in family 2 (Figure 1B), from Campinas, state of São Paulo, south-

eastern Brazil, two affected brothers (II-4 and II-6) were examined. In family 1, X-linked inheritance of KS was assumed, based on the presence of asymptomatic female carriers, the presence of at least two affected males in the maternal family or among male siblings, the absence of affected females and the absence of male-to-male transmission. In family 2, X-linked inheritance of KS was suspected because one of the affected patients had a renal abnormality.

Laboratory testing was performed in all patients, revealing low levels of testosterone, FSH (follicle-stimulating hormone) and LH (luteinizing hormone), consistent with hypogonadism. Formal olfactory testing was not performed, but anosmia was detected in the individuals II-6, III-4 (Family 1) and II-4 (Family 2) by direct inquiry. Clinical evaluation details of all patients are given in Table 1. The protocol was approved by the Ethics Committee of the State University of Campinas (UNICAMP) School of Medicine. Informed consent was obtained from all subjects included in this study.

Molecular analysis of the *KAL-1* gene

Genomic DNA of individuals II-11, III-4 and III-17 (Family 1), I-2, II-4 and II-6 (Family 2) was extracted from peripheral leukocytes, using the phenol/chloroform method. The 14 coding exons of the *KAL-1* gene were amplified by PCR from DNA of the affected males, patients III-4 (Family 1), II-4 and II-6 (Family 2). The sequences of primers and the size of the amplified products were as previously described by Hardelin *et al.* (1993). PCR amplifications were performed in 50 μ L reaction mixes containing 200-500 ng of genomic DNA, 0.2mM dNTPs, 1.5 mM of $MgCl_2$, 0.6 pmol of each of the primers, 1x PCR buffer, and 1 U Taq polymerase. After a first denaturation step (10 min,

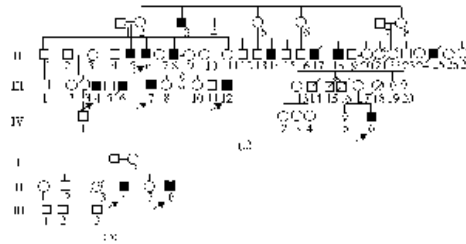


Figure 1 - Heredograms of (a) family 1 and (b) family 2 with X-linked KS. Affected males. Arrows indicate patients clinically examined in this study.

Table 1 - Clinical features of evaluated patients from families 1 and 2 with X-linked KS.

Patient	Age	Anosmia/hyposmia ^a	Hypogonadotropic hypogonadism	Micropenis/Cryptorchidism	Bimanual synkinesis	Renal abnormality ^b	Other characteristics	MRI of olfactory structures
II-6*	32 y	Yes	Yes	Yes	Yes	No	High-arched palate Genu valgum Eunuchoid habitus	Not performed
III-4*	20 y	Yes	Yes	Yes	Yes	Agenesis at left side	High-arched palate Genu valgum Eunuchoid habitus	Bilateral aplasia of sulcus and rudimentary bulbs
III-7*	6 y	?	Yes	Yes	Yes	No	High-arched palate	Not performed
III-12*	4 mo	?	Yes	Yes	?	No		Not performed
IV-6*	4 mo	?	Yes	Yes	?	No	Epicanthal folds Bilateral ptosis of eyelids Asymmetric ears	Not performed
II-4#	35 y	Yes	Yes	Yes	No	No	Gynecomastia	Not performed
II-6#	28 y	No	Yes	Yes	No	Horseshoe kidney on right side	Mental retardation	Not performed

*patients from family 1; # patients from family 2. y = year. mo = months. ^adetected by direct inquiry. ^bdetermined by abdominal ultrasonography. ? features not evaluated due to patient age.

95 °C), 30 PCR amplification cycles of 1 min at 95 °C, 1 min at 57 °C (except for exon 1, 60 °C), and 2 min at 72 °C were carried out, followed by a final extension of 10 min at 72 °C. The PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and photographed. If no amplification product of *KAL-1* exons was detected, PCR was repeated with the addition of primers SRY1 and SRY4 for the *SRY* gene (Assumpção *et al.*, 2002) as internal positive control.

Comparative duplex PCR for carrier female status determination was performed, following the procedure described by Nagata *et al.* (2000), in subjects II-11 and III-17 (Family 1) and I-2 (Family 2), mothers of affected males. The reactions included primers for exon 20 of the autosomal *NPC1* gene as internal standard to quantify the dosage of *KAL-1* exon 7 PCR products. The amplified products were analyzed by electrophoresis on 2.6% agarose gel stained with ethidium bromide, and the gel image was captured with a Kodak Digital Science DC120 camera. The intensity of each band was measured using ID IMAGE ANALYSIS software, and the gene dosage was evaluated by the *KAL-1/NPC1* ratio. Samples from normal males ($n = 10$) and females ($n = 10$) were also run as controls. The expected values were 0.0, 0.5, and 1.0 for affected males, carrier females and normal males, and normal females, respectively.

Results

The genomic DNA from patients III-4 (Family 1), II-4 and II-6 (Family 2) did not yield PCR products from exon 5 to exon 10, while the remaining exons were amplified. These findings indicate the presence of an interstitial deletion encompassing exons 5-10 in the *KAL-1* gene of these patients (Figure 2).

By duplex PCR, the status of obligatory carrier females was confirmed in subjects II-11 and III-17 (Family 1) and I-2 (Family 2). In these females, the *KAL-1/NPC1* ratios were 0.53, 0.54 and 0.47, respectively, indicating the presence of only one normal *KAL-1* allele. In the control subjects, the *KAL-1/NPC1* ratios were next to 0.5 for males and 1.0 for females (Figure 3).

Discussion

We describe here two interstitial deletions of the *KAL-1* gene encompassing exons 5-10 in two unrelated and geographically distant Brazilian families. Although molecular analysis by PCR was performed in only one patient from Family 1, the causative role of the *KAL-1* gene for KS in this family was confirmed by the demonstration of the carrier status of the mothers of patients III-12 and IV-6. Additional symptoms found in the five clinically examined affected males of this family included bimanual synkinesis (3/5), renal agenesis (1/5), high-arched palate (3/5), and dysmorphic facial features (1/5). In Family 2, molecular in-

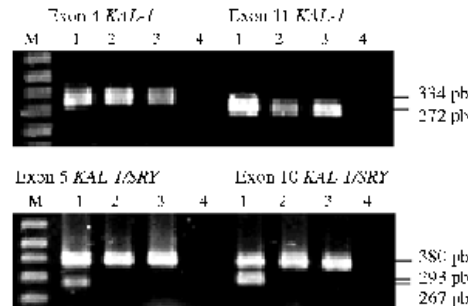


Figure 2 - PCR amplification of exons 4 (334 bp), 5 (267 bp), 10 (293 bp), and 11 (272 bp) of the *KAL-1* gene in two patients affected by X-linked KS. Lanes 1-4 correspond, respectively, to a normal 46,XY male, patient III-4 (Family 1), patient II-6 (Family 2), and a negative control with omission of the genomic DNA in the PCR. Lane M: molecular weight marker. Exons 4 and 11 (a) may be amplified in the three males (lanes 1-3), whereas exons 5 and 10 are amplified only in the control male (lane 1). For exons 5 and 10 (b), a product of the *SRY* gene (internal positive control, 380 bp) can also be visualized.

vestigation of the *KAL-1* gene was performed in both patients, and the carrier status of their mother was also demonstrated. One of these patients had mental retardation and a horseshoe right kidney in association with KS.

Nagata *et al.* (2000) described two brothers with X-linked KS due to a deletion of exons 5-10 of the *KAL-1* gene, but neither mental retardation nor bimanual synkinesis were reported to be present. In fact, mental retardation is rarely observed in patients with isolated KS, but has been described in patients affected by associations of several diseases linked to Xp22.3, as contiguous gene syndromes (Meindl *et al.*, 1993; Weissortel *et al.*, 1998). Bimanual synkinesis is one of the most frequent findings and is considered a marker for X-linked KS (Krams *et al.*, 1999; Quinton *et al.*, 2001), with an estimated prevalence

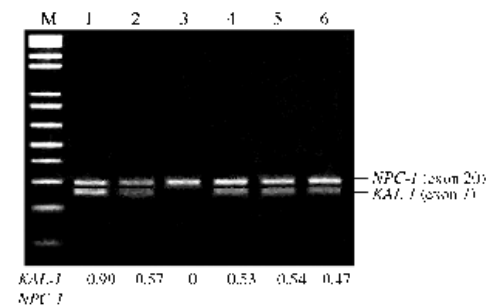


Figure 3 - Comparative duplex PCR for identification of carrier females. Lanes: 1 - control female; 2 - control male; 3-5 - individuals from family 1, respectively, III-4 (affected male), II-11 and III-17 (mothers of patients III-12 and IV-6); and 6 - individual I-2 from family 2 (mother of patients II-4 and II-6). M - molecular weight marker. Values for the *KAL-1/NPC1* ratio are given below each lane.

of 85% among X-KS patients (MacColl *et al.*, 2002). However, in a recent report on a family with a mutation in the *FRGRI* gene (*KAL-2*), mapped to 8p, bimanual synkinesis was observed, suggesting that this feature should not be considered specific to the X-linked form (Dodé *et al.*, 2003).

Several small deletions, point mutations and a few single-exon deletions have been identified in the *KAL-1* gene in patients with KS (Hardelin *et al.*, 1992; Parenti *et al.*, 1995; Georgopoulos *et al.*, 1997; Quinton *et al.*, 1996; Söderlund *et al.*, 2002). Large deletions involving more than one exon of *KAL-1* have been reported for exons 13-14 (Bick *et al.*, 1992), 3 to 5 (Maya-Nunez *et al.*, 1998), 5 to 10 (Nagata *et al.*, 2000), and 3 to 13 (Massin *et al.*, 2003). Although the breakpoints were not determined in most cases, it is possible that intronic regions flanking these deletions contain repeated elements that might promote nonallelic recombination. We used the RepeatMasker software (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/RepeatMasker>), accessed 9/16/2003 for repeat identification in the intronic sequences between exons 4-5 and 10-11 of *KAL-1*. Elements of a FLAM_A repeat of the *Alu* family were found in both introns on opposite strands (Figure 4a). Although no similarity was found between these two elements using BLAST (, accessed 10/7/2003), a significant similarity score was detected for a short sequence of 51 nucleotides when the whole intronic sequences were compared (Figure 4b). This short sequence is contained in the FLAM_A repeat in intron 10 and is adjacent to the FLAM_A repeat in intron 4. These analyses failed to detect other repeats with remarkable sequence identity that could mediate illegitimate recombination events.

In the deletion of exons 13-14 described by Bick *et al.* (1992), sequencing of the junction fragments revealed a 6 bp homology motif (CAAAATT) at the deletion breakpoints. These short stretches of sequence homology have been suggested to facilitate end-joining in recombination events in several regions of the genome (Krawczak and Cooper, 1991; Woods-Samuels *et al.*, 1991). It is noteworthy that copies of this 6bp motif are present in the intronic se-

quences flanking the 5-10 deletion (Figure 4a). Thus, at least two different molecular mechanisms may be responsible for the observed intragenic deletion. Together with the similar deletion previously described by Nagata *et al.* (2000), our data suggest that a recurrent mechanism could predispose to this specific large exon-type deletion.

Acknowledgments

EBT was supported by a fellowship from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 00/08834-8). We also thank FAPESP for grants received for the development of this research.

References

- Assumpção JG, Benedetti CE, Maciel-Guerra AT, Guerra Jr G, Baptista MT, Scolaro MR and De Mello MP (2002) Novel mutations affecting SRY DNA-binding activity: The HMG box N65H associated with 46,XY pure gonadal dysgenesis and the familial non-HMG box R30I associated with variable phenotypes. *J Mol Med* 80:782-90.
- Ballabio A, Bardoni B, Carozzo R, Andria G, Bick D, Campbell B, Hamel B, Ferguson-Smith MA, Gimelli G, Fraccaro M, Maraschio P, Zuffardi O, Guioli S and Camerino G (1989) Contiguous gene syndromes due to deletions in the distal short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10001-10005.
- Bick D, Franco B, Sherins RJ, Heye B, Pike L, Crawford J, Maddalena A, Incerti B, Pragliola A, Meitinger T and Ballabio A (1992) Intragenic Deletion of the *KAL-1* gene in Kallmann's syndrome. *New Engl J Med* 326:1752-1755.
- Chaussain JL, Toubiane JE, Feingold J, Naud C, Vassal J and Job JC (1988) Mode of inheritance in familial cases of primary gonadotropic deficiency. *Horm Res* 29:202-206.
- Del Castillo I, Cohen-Salmon M, Blanchard S, Lutfalla G and Petit C (1992) Structure of the X-linked Kallmann syndrome gene and its homologous pseudogene on the Y chromosome. *Nat Genet* 2:305-310.
- Dodé C, Leilliers J, Dupont J-M, De Paepé A, Dû NL, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pêcheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel J-C, Delemarre-van der Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler A-L and Richard O (2003) Loss-of-function mutations in *FGFR1* cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet* 33:463-465.
- Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, Carozzo R, Maestrini E, Pieretti M, Taillon-Miller P, Brown CJ, Willard HF, Lawrence C, Persico MG, Camerino G and Ballabio A (1991) A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature* 353:529-536.
- Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, Seidman JG, Crowley WF Jr and Vallejo M (1997) Genetic heterogeneity evidenced by low incidence of *KAL-1* gene mutations in sporadic cases of gonadotropin-releasing hormone deficiency. *J Clin End Metab* 82:213-217.
- Hardelin JP, Leveilliers J, Blanchard S, Carel J-C, Leutenegger M, Pinard-Bertellettom J-P, Bouloux P and Petit C (1993) Het-

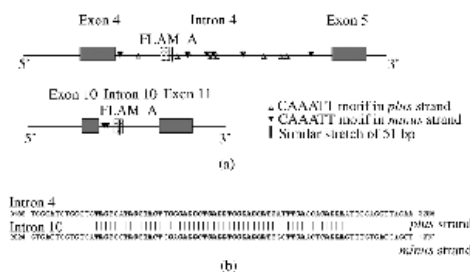


Figure 4 - (a) Relative positions of FLAM_A *Alu* repeats and CAAATT motifs on introns 4 and 10 of the *KAL-1* gene, and **(b)** alignment of the similar 51 bp stretch (E value: 2e-04).

- erogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Hum Mol Genet* 2:373-377.
- Hardelin JP, Levilliers J, Del Castillo I, Cohen-Salmon M, Legouis R, Blanchard S, Compain S, Bouloux P, Kirk J, Mouraine C, Chaussin J-L, Weissenbach J and Petit C (1992) X chromosome-linked Kallmann syndrome: Stop mutations validate the candidate gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:8190-8194.
- Hermanussen M and Sippell WG (1985) Heterogeneity of Kallmann's syndrome. *Clin Genet* 28:06-111.
- Kallmann FJ, Schoenfeld WA and Barrera SE (1944) The genetic aspects of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic* 48:203-236.
- Krams M, Quinton R, Ashburner J, Friston KJ, Frackowiak RSJ, Bouloux P-MG and Passingham RE (1999) Kallmann's syndrome: Mirror movements associated with bilateral corticospinal tract hypertrophy. *Neurology* 52:816-822.
- Krawczak M and Cooper DN (1991) Gene deletions causing human genetic disease: Mechanism of mutagenesis and the role of the local DNA sequence environment. *Hum Genet* 86:425-441.
- Legouis R, Hardelin JP, Levilliers J, Claverie J-M, Compain S, Wunderle V, Millasseau P, Le Paslier D, Cohen D, Caterina D, Bougueleret L, Dlemarre-van der Waal H, Lutfalla G, Weissenbach J and Petit C (1991) The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 67:423-435.
- MacColl G, Bouloux P and Quinton R (2002) Kallmann syndrome: Adhesion afferents and anosmia. *Neuron* 34:675-678.
- Massin N, Pêcheux C, Eliot C, Bensinmon J-L, Galey J, Kuttann F, Hardelin J-P, Dodé C and Touraine P (2003) X chromosome-linked Kallmann syndrome: Clinical heterogeneity in three siblings carrying an intragenic deletion of *KAL-1* gene. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2003-2008.
- Maya-Nunez G, Zenteno JC, Ulloa-Aguirre A, Kofman-Alfaro S and Mendez JP (1998) A recurrent missense mutation in *KAL-1* gene in patients with X-linked Kallmann's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 83:1650-1653.
- Meindl A, Hosenfeld D, Bruckl W, Schuffenhauer S, Jenderny J, Bacsulkin A, Oppermann HC, Swensson O, Bouloux P and Meitinger T (1993) Analysis of a terminal Xp223 deletion in a patient with six monogenic disorders: Implications for the mapping of X linked ocular albinism. *J Med Genet* 30:838-842.
- Nagata K, Yamamoto T, Chikumi H, Ikeda T, Yamamoto H, Hashimoto K, Yoneda K, Nanba E, Ninomiya H and Ishitobi K (2000) A novel interstitial deletion of *KAL-1* in a Japanese family with Kallmann syndrome. *J Hum Genet* 45:237-240.
- Parenti G, Rizzolo MG, Ghezzi M, Di Maio S, Sperandio MP, Incerti B, Franco B, Ballabio A and Andria G (1995) Variable penetrance of hypogonadism in a sibship with Kallmann syndrome due to a deletion of the *KAL* gene. *Am J Med Genet* 57:476-478.
- Petit C, Levilliers J and Weissenbach J (1990) Long-range restriction map of the terminal part of the short arm of the human X chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:3680-3684.
- Quinton R, Duke VM, Priyal A, Zoysa PA, Platis AD, Valentine A, Kendall B, Pickman S, Kirk JMW, Besser GM, Jacobs HS and Bouloux PMG (1996) The neuroradiology of Kallmann's syndrome: A genotypic and phenotypic analysis. *J Clin Endocr Metab* 81:3010-3117.
- Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, de Zoysa PA, Azcona C, MacColl GS, Jacobs HS, Conway GS, Besser M, Stanhope RG and Bouloux PM (2001) Idiopathic gonadotrophin deficiency: Genetic questions addressed through phenotypic characterization. *Clin Endocrinol* 55:163-174.
- Rugarli EI, Ghezzi C, Valsecchi V and Ballabio A (1996) The Kallmann syndrome gene product expressed in COS cells is cleaved on the cell surface to yield a diffusible component. *Hum Mol Genet* 5:1109-1115.
- Schwankhaus JD, Currie J, Jaffe MJ, Rose SR and Sherins RJ (1989) Neurologic findings in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Neurology* 39:223-226.
- Schwanzel-Fukuda M, Bick D and Pfaff DW (1989) Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Mol Brain Res* 6:311-326.
- Söderlund D, Canto P and Méndez JP (2002) Identification of three novel mutations in the *KAL-1* gene in patients with Kallmann syndrome. *J Clin End Metab* 87:2589-2592.
- Sunohara N, Sakuragawa N, Satoyoshi E, Tanae A and Shapiro LJ (1986) A new syndrome of anosmia ichthyosis hypogonadism and various neurological manifestations with deficiency of steroid sulfatase and arylsulfatase C. *Ann Neurol* 19:74-181.
- Waldstreicher J, Seminara SB, Jameson JL, Geyer A, Nachtigall LB, Boepple PA, Holmes LB and Crowley WF Jr (1996) The genetic and clinical heterogeneity of gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human. *J Clin Endocrinol Metab* 84:4388-4395.
- Wegenke JD, Vehling DT, Wear JB Jr, Gordon ES, Bargman GJ, Deacon JS R, Herrmann JPR and Opitz JM (1975) Familial Kallmann syndrome with unilateral renal aplasia. *Clin Genet* 7:368-381.
- Weissortel R, Strom TM, Dörr HG, Rauch A and Meitinger T (1998) Analysis of an interstitial deletion in a patient with Kallmann syndrome X-linked ichthyosis and mental retardation. *Clin Genet* 54:45-51.
- White BJ, Rogol AD, Brown SK, Lieblisch JM and Rosen SW (1983) The syndrome of anosmia with hypogonadotropic hypogonadism: A genetic study of 18 families and a review. *Am J Med Genet* 15:417-435.
- Woods-Samuels P, Kazazian HH Jr and Antonarakis SE (1991) Nonhomologous recombination in the human genome: Deletions in the human factor VIII gene. *Genomics* 10:94-101.
- Zenteno LC, Mendez JP, Maya-Nunez G, Ulloa-Aguirre A and Kofman-Alfaro (1999) Renal abnormalities in patients with Kallmann syndrome. *BJU Int* 83:383-386.

9. ANEXOS

ANEXO I - DOSAGENS HORMONAIS

Tabela A.1– Valores hormonais de LH, FSH e testosterona dos pacientes do sexo masculino usuários do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Dos pacientes provenientes de outras instituições recebemos apenas informações sobre as dosagens hormonais diminuídas.

	LH (mUI/mL)	FSH (mUI/mL)	TESTOSTERONA		TESTOSTERONA (ng/dL)	Resposta ao Estimulo	
			Total (ng/mL)	Livre (pg/mL)		LH	FSH
P1	0,01	0,20	0,07 ⁽¹⁾	1,0 ⁽¹⁾		-	-
P2	0,10	0,70	0,40 ⁽²⁾	1,94 ⁽²⁾		-	+
P3	<0,01	<0,01	<0,17 ⁽¹⁾	<0,10 ⁽¹⁾		-	+
P5	<0,01	1,90	0,50 ⁽¹⁾	3,0 ⁽¹⁾		-	-
P6	0,30	2,0	<2,0 ⁽³⁾	1,80 ⁽³⁾		-	-
P12	0,30	<0,01	0,46 ⁽⁴⁾	1,50 ⁽⁴⁾		+	+
P13	<0,70	0,30	<0,20 ⁽⁴⁾	1,40 ⁽⁴⁾		+	+
P16	1,20	0,90	0,20 ⁽⁴⁾	0,60 ⁽⁴⁾		+	+
VR	(0,90-10,60)	(2,0-17,7)					
P4	<12,0	<4,0			42 ⁽⁵⁾	+	+
P7#	11,5	<4,0			70 ⁽⁵⁾	-	+
P8#	<12,0	<4,0			32 ⁽⁵⁾	-	-
P11	<12,0	<4,0			53 ⁽⁵⁾	+	+
VR	(até 25)	(até 20)					
P18	12	2,40			indosável	+	-
VR	(40-100)	(5-20)					
P22	<0,10	<0,10	2,39 ⁽²⁾	6,61 ⁽²⁾		+	+
P27	<0,10	0,50	0,04 ⁽²⁾	0,65 ⁽²⁾		+	+
P24	3,70	0,80	<0,20 ⁽²⁾	1,39 ⁽²⁾		+	+
P29	<0,10	0,31	0,04 ⁽²⁾	1,20 ⁽²⁾		NR	NR
P30	0,10	0,48	<0,20 ⁽²⁾	0,55 ⁽²⁾		-	+
P31	<0,10	1,20	0,24 ⁽²⁾	<0,55 ⁽²⁾		NR	NR
VR	(10,8-27)	(5-20)					
P25	0,71	3,90	<0,20 ⁽⁴⁾	0,64 ⁽⁴⁾		NR	NR
VR	(1,7-8,6)	(0,2-3,8)					

Valores de referência: Testosterona Total (ng/mL): ¹(1,88-9,0), ²(14,4-40), ³(6,0-86), ⁴(2,86-15,1).
 Testosterona Livre (pg/mL): ¹(19-41), ²(2,86-14,1), ³(0,9-3,2), ⁴(3,9-27,0).
 Testosterona (ng/dL): ⁵(360-390).

VR valores de referência; NR não realizado; &, # e ♣ pacientes pertencentes à mesma família.

Obs: Esses dados foram obtidos pela consulta aos arquivos do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sendo apresentados valores de referência de acordo com o método utilizado para dosagem hormonal.

Tabela A.2– Valores hormonais de LH, FSH e estrógeno dos pacientes do sexo feminino usuários do Ambulatório de Endocrinologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Dos pacientes provenientes de outras instituições recebemos apenas informações sobre as dosagens hormonais diminuídas.

	LH (mUI/mL)	FSH (mUI/mL)	E2 (pg/mL)	Resposta ao Estimulo	
				LH	FSH
P9	<7,0	10	10,2	+	+
VR F.folicular	até 25	até 20	(100-400)		
VR F.ovular	(25-130)	(15-30)	(30-100)		
P10	<0,09	1,7	6,3	+	-
P21	<0,10	2,5	7,2	+	+
VR F.folicular	(1,1-11,1)	(9,6-16,0)	(30-60)		
VF F.ovular	(17,5-72,9)	(8,1-28,9)	(90-330)		
VR F.lútea	(0,4-15,1)	(1,8-11,7)	(65-180)		
VR Menopausa	(22,9-167,0)	(22,9-16,7)			

VR valores de referência; E2 estrógeno.

Obs: Esses dados foram obtidos pela consulta aos arquivos do Hospital de Clínicas da UNICAMP, sendo apresentados valores de referência de acordo com o método utilizado na época para dosagem hormonal.

ANEXO II – TESTES OLFATIVOS

a) AST- “Alcohol Sniff Test”

Para discriminar os indivíduos anósmicos ou hipósmicos daqueles com olfação normal, foi utilizado um protocolo padronizado por DAVIDSON & MURPHY (1997) – o Alcohol Sniff Test (AST). Na realização deste teste, foram empregados lenços de papel umedecidos em isopropanol 70%, obtidos em embalagens individuais produzidas pela empresa MAPPEL (SP). O teste do AST consiste na determinação da distância em que o paciente é capaz de detectar o odor do isopropanol. Para tal, uma régua de 30 cm foi posicionada em posição vertical ao lado da narina do paciente. Este foi orientado a respirar normalmente, mantendo os olhos fechados, devendo informar em que momento passa a sentir o cheiro da substância. A embalagem contendo o lenço de papel foi aberta, deixando-se cerca de um centímetro do lenço à mostra, e colocada na base da régua. A embalagem foi deslocada centímetro a centímetro em movimento ascendente, até que o indivíduo informasse a percepção do cheiro. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes, registrando-se a cada vez a quantos centímetros o odor foi percebido. A média desses valores foi comparada com a média obtida quando o mesmo teste foi realizado em 30 indivíduos sem deficiência olfativa. A anosmia/hiposmia foi considerada quando foram vistos valores abaixo de um desvio padrão da média da amostra controle ($\bar{X} = 26$ cm e $s = 1,8$).

Em adição, foram apresentadas a cada paciente diversas substâncias odoríferas, como café, canela, lavanda, pimenta, talco de bebê e álcool, para uma rápida avaliação de sua capacidade de sentir e discriminar cada odor.

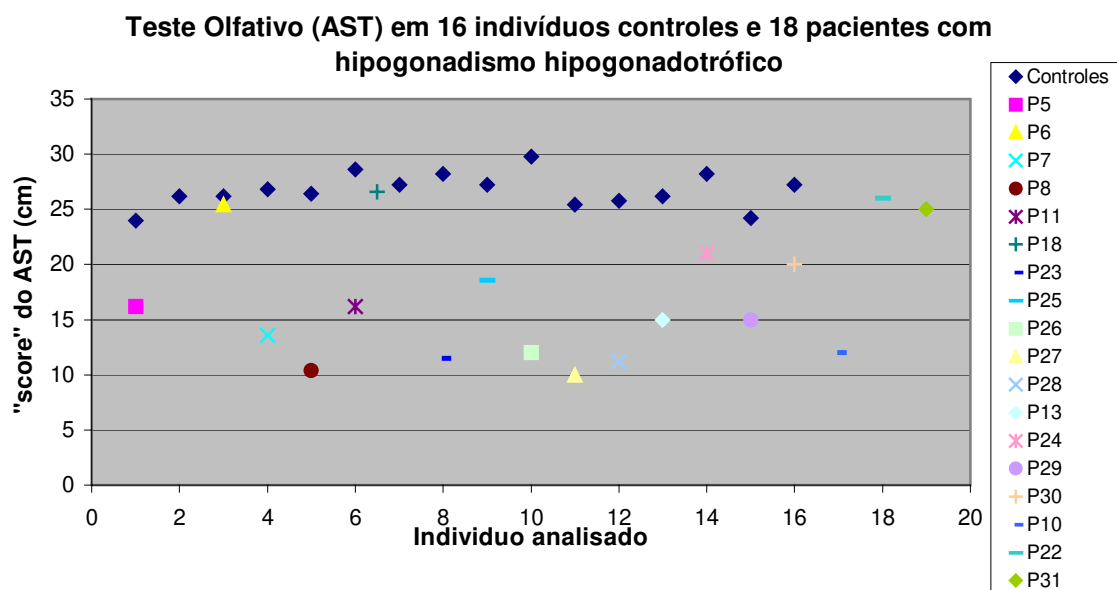


Figura A.1 – Gráfico de plotagem mostrando os resultados do teste olfativo AST (“Álcool Sniff Test”) em uma amostra de 16 indivíduos controle e de 18 pacientes com HH dessa casuística.

b) Avaliação da anosmia pelo teste do butanol

Em alguns casos, principalmente naqueles em que não foi detectada a deficiência olfativa, foi utilizada uma versão simplificada do teste do butanol descrito por STEVENS *et al* (1988). Para tal, foram preparados seis frascos contendo 60mL de sucessivas diluições ternárias feitas a partir de uma solução de butanol 4% (originalmente, o autor utilizou doze diluições). O teste foi iniciado pela concentração mais baixa, sendo apresentados ao paciente um frasco com a diluição e dois frascos contendo a mesma quantidade de água (substância usada como solvente) perguntando-se em qual deles o cheiro era mais forte. Quando a resposta foi incorreta, foi apresentado um frasco com uma concentração mais alta até que o paciente fizesse a escolha correta por quatro vezes consecutivas. Este teste foi aplicado nos pacientes P18, P22 e P31 sendo observados resultados compatíveis com a normosmia.