



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Genética Molecular do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Idiopático

**Catarina Inês Nunes Pires Gonçalves**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Biomedicina**  
(3º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos  
Co-orientador: Prof. Doutora Sílvia Cristina da Cruz Marques Socorro

**Covilhã, Fevereiro 2016**

Ao André e aos meus pais, Inês e Luis,  
sem eles não teria sido possível.

# Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todos os que de alguma forma permitiram a concretização desta tese de doutoramento, incluindo aqueles que não irei identificar aqui mas que também foram relevantes para cumprir este objetivo.

Em primeiro lugar quero manifestar o meu agradecimento ao meu orientador. Muito obrigada Prof. Manuel Lemos por todo o conhecimento transmitido, profissionalismo, disponibilidade, incentivo, apoio nos bons e maus momentos, paciência e sobretudo por ter acreditado em mim. O seu talento revelou-se uma fonte de inspiração.

Agradeço à minha co-orientadora Prof. Sílvia Socorro pela sua disponibilidade, conhecimento científico, apoio e por me ter dado a conhecer o Prof. Manuel Lemos, sem si provavelmente a endocrinologia não teria atravessado o meu percurso académico.

À Fundação Portuguesa para a Ciência e Tecnologia (FCT) agradeço o apoio financeiro através da bolsa de doutoramento (SFRH/BD/76420/2011) e do financiamento do projecto (ref. PTDC/SAU-GMG/098419/2008) que permitiram a realização dos estudos referentes a este ciclo no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI).

Agradeço a todos os médicos que participaram neste projeto através do envio de amostras dos pacientes e dados clínicos: Ana Varela (Porto), António Garrão (Lisboa), Carla Baptista (Coimbra), Carla Meireles (Guimarães), Carolina Moreno (Coimbra), Cíntia Correia (Porto), Cláudia Nogueira (Porto), Eduardo Vinha (Porto), Filipe Cunha (Porto), Francisco Carrilho (Coimbra), Luísa Cortez (Lisboa), Maria João Oliveira (Porto), Mariana Martinho (Penafiel), Miguel Melo (Coimbra), Patrícia Oliveira (Coimbra), Paula Freitas (Porto), Raquel Martins (Porto), Selma Souto (Porto), Sofia Martins (Braga), Susana Gama (Famalicão), Teresa Martins (Coimbra), Margarida Bastos (Coimbra), Duarte Pignatelli (Porto), Teresa Borges (Porto), José Maria Aragués (Lisboa), Fernando Fonseca (Lisboa) e Bernardo Pereira (Almada).

Obrigada às técnicas Ana Sofia Duarte e Margarida Carrilho pela vossa contribuição na manutenção do CICS-UBI, graças a vocês consegui executar com maior facilidade as tarefas laboratoriais.

Agradeço aos meus colegas de laboratório Ângela Francisco, Joana Raimundo, e em especial Eduarda Coutinho pela partilha de conhecimento científico e por todos os momentos de diversão.

Agradeço aos amigos, Joana Valente, Adriana Afonso, Rita Gaspar, Lúcia Amorim, Ana Rita Quelhas, Luis Miguel, Gonçalo, Élia, Filipa Pires, Filipe Frias, Guilherme Espírito Santo, Filipa Ramilo, Cátia Batista, Mafalda Espírito Santo, Susana Ferreira, pelo conhecimento, incentivo e amizade em todos os momentos, sem dúvida que graças a vocês tudo se tornou mais fácil pois é possível conciliar trabalho com diversão.

Agradeço à Lena, Sofia, Beto, Rita e Mafalda tudo o que representam para mim.

Agradeço aos meus familiares, Domingos, Céu, Cesaltina, Zézinha, Vicente, Beatriz, Vasco, Guidinha e Manuel por todo o apoio e carinho e claro ao meu irmão Marcos, à Joana, Carla e Miguel pela amizade e por me terem dado os melhores sobrinhos do mundo, príncipe Eduardo e princesa Maria.

Finalmente gostaria de agradecer aos meus pais (Inês e Luis) e ao meu marido (André) pelo amor, confiança, encorajamento e apoio incondicional que sempre demonstraram. Obrigada pela paciência, colo e por estarem sempre presentes em todas as etapas da minha vida, sem vocês não teria conseguido chegar até aqui e é por isso que vos dedico esta tese.

## Resumo

O hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático (HHI) é definido pela falência completa ou parcial do desenvolvimento pubertário devido à deficiente secreção de gonadotrofinas (FSH e LH) e hormonas sexuais (testosterona e estradiol), na ausência de qualquer causa orgânica hipotalâmico-pituitária. As formas congénitas do HHI incluem a Síndrome de Kallmann (SK), caracterizada pela deficiência gonadotrófica e uma deficiência do sentido de olfato (anósmia ou hipósmia), e HHI sem defeitos olfactivos (HHI normósmico). Esta condição pode ser detetada na infância pela presença de micropénis e/ou criptorquidia, em associação com baixos níveis de gonadotrofinas ou, mais frequentemente, na adolescência ou na idade adulta, pela ausência do desenvolvimento pubertário. Podem, ainda, surgir outros fenótipos não-reprodutivos, como defeitos da linha média facial, agenesia dentária, surdez, agenesia renal, sincinesia e anomalias ósseas digitais. Cerca de um terço dos pacientes com HHI revela um defeito genético em genes que regulam o desenvolvimento embrionário ou a migração dos neurónios secretores da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH), ou a síntese, secreção ou ação da GnRH. Esta doença pode ter ainda um carácter oligogénico, uma vez que têm sido descritos casos de indivíduos com HHI e alterações genéticas em mais do que um gene. Embora raramente, existem pacientes, que após tratamento hormonal, evidenciam reversão espontânea do quadro de hipogonadismo.

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência de mutações e prever as suas consequências funcionais, numa coorte de pacientes com HHI. Neste sentido, 50 pacientes com HHI foram estudados por sequenciação de genes associados a esta doença: *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *CHD7*, *PROK2*, *PROKR2*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, *GNRH1* e *GNRHR*. As consequências funcionais das mutações foram previstas por análises estruturais e de conservação *in silico*.

Foram identificadas 43 variantes consideradas patogénicas (das quais 18 nunca foram descritas) em 30 dos 50 pacientes estudados, o que corresponde a uma frequência de causas genéticas de 60%. As variantes foram identificadas com diferentes frequências consoante o gene: *KAL1* (7%), *FGFR1* (25,6%), *FGF8* (2,3%), *CHD7* (39,5%), *PROK2* (2,3%), *PROKR2* (11,6%), *KISS1R* (2,3%) e *GNRHR* (9,3%). As análises *in silico* foram consistentes com um papel crítico das mutações na atividade das proteínas codificadas. Em sete famílias foram encontrados casos de oligogenia e num caso ocorreu reversão da doença, após interrupção do tratamento de reposição com testosterona. Não foi observada uma clara relação genótipo/fenótipo, no entanto, verificou-se que, tal como descrito na literatura existente, mutações no gene *KAL1* podem ocorrer em pacientes com problemas renais e mutações no *FGFR1* e *CHD7* podem estar associadas a surdez.

Em suma, neste estudo foi encontrada uma prevalência de 60% de mutações em casos de SK e de HHI normósmico. Identificaram-se 18 novas mutações patogénicas nos genes *KAL1*, *FGFR1*, *CHD7*, *KISS1R*, *GNRHR* e *PROKR2*, ampliando o espectro de mutações associadas ao HHI. O estudo possibilitou, ainda, confirmar o crescente carácter oligogénico que explica os casos de penetrância incompleta e variabilidade fenotípica, presentes em algumas famílias estudadas. Estes estudos poderão revelar-se de grande importância no aconselhamento genético, uma vez que pacientes em que foram identificadas mutações, podem ser alertados para a possível coexistência de outras malformações e para a probabilidade de outros familiares serem afetados pela mesma doença, podendo ser tomadas medidas que minimizem os seus efeitos nocivos.

## Palavras-chave

Endocrinologia, Reprodução, Hipogonadismo Hipogonadotrófico, Síndrome de Kallmann, Genética, Mutação.

# Abstract

Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH) is defined by complete or partial failure of pubertal development due to the compromised secretion of gonadotropins (FSH and LH) and sex hormones (testosterone and estradiol), in the absence of any hypothalamic-pituitary organic cause. Congenital forms of IHH include Kallmann Syndrome (KS), which is characterized by gonadotropin deficiency with a defective sense of smell (anosmia or hyposmia), and IHH without olfactory defects (normosmic IHH). This condition can be detected in childhood by the presence of micropenis and/or cryptorchidism, in combination with low levels of gonadotropins and sex hormones or, more frequently, in adults due to absent secondary sexual characteristics. Other non-reproductive phenotypes may be present, such as midline facial defects, tooth agenesis, hearing loss, renal agenesis, synkinesis and digital bone abnormalities. About one third of patients with IHH reveal a genetic defect in genes that regulate the embryonic development or migration of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons, or the synthesis, secretion or action of GnRH. This disease can have an oligogenic character, since there have been reports of individuals with IHH with genetic alterations in more than one gene. Although rarely, there are patients that show spontaneous reversal of hypogonadism after hormone treatment.

The aim of this study was to determine the prevalence of mutations and to predict their functional consequences in a cohort of patients with IHH. In this regard 50, unrelated patients with IHH were studied by sequencing genes associated with this disease: *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *CHD7*, *PROK2*, *PROKR2*, *KISS1R*, *TAC3*, *TACR3*, *GNRH1* and *GNRHR*. The functional consequences of mutations were predicted by in silico structural and conservation analysis.

A total of 43 variants considered pathogenic (of which 18 have never been described) were identified in 30 of the 50 studied patients, which correspond to a frequency of genetic causes of 60%. The variants were recognized with different frequencies depending on the gene: *KAL1* (7%), *FGFR1* (25,6%), *FGF8* (2,3%), *CHD7* (39,5%), *PROK2* (2,3%), *PROKR2* (11,6%), *KISS1R* (2,3%) and *GNRHR* (9,3%). *In silico* analyses were consistent with a critical role for the mutations in the activity of the encoded proteins. In addition oligogenic cases were found in seven families, as well as a case of reversal of the disease after interruption of testosterone replacement therapy. Although we did not observe a clear genotype/phenotype relationship, we observed that, in agreement to that described in the literature, mutations in the *KAL1* gene may occur in patients with kidney problems and mutations in *FGFR1* and *CHD7* may be associated with hearing loss.

In summary, this study identified 18 new pathogenic mutations in *KAL1*, *FGFR1*, *CHD7*, *KISS1R*, *GNRHR* and *PROKR2* genes, thereby expanding the spectrum of mutations associated with IHH.

It also confirmed the increasingly oligogenic character of this disease, that explains cases of incomplete penetrance and phenotypic variability, present in some studied families. These studies may prove to be of great importance for genetic counselling, since patients with known mutations can be alerted for the possible coexistence of other malformations and for the probability of recurrence in other family members, so that measures can be taken to minimize the harmful effects.

## Keywords

Endocrinology, Reproduction, Hypogonadotropic Hypogonadism, Kallmann syndrome, Genetics, Mutation.

# Índice

Lista de Figuras .....	xii
Lista de Tabelas .....	xiv
Lista de Abreviaturas .....	xv
<b>1. Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1 Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático.....	2
1.2 Síndrome de Kallmann.....	3
1.3 Causas de hipopituitarismo.....	4
1.4 Fatores genéticos associados ao HHI.....	5
1.4.1 Migração dos neurónios de GnRH até ao hipotálamo .....	6
1.4.1.1 Gene <i>KAL1</i> .....	6
1.4.1.2 Genes <i>FGFR1</i> e <i>FGF8</i> .....	7
1.4.1.3 Gene <i>CHD7</i> .....	10
1.4.1.4 Gene <i>PROK2</i> e <i>PROKR2</i> .....	11
1.4.2 Secreção da GnRH .....	14
1.4.2.1 Genes <i>KISS1</i> e <i>KISS1R (GPR54)</i> .....	14
1.4.2.2 Genes <i>TAC3</i> e <i>TACR3</i> .....	15
1.4.3 Ação da GnRH: genes <i>GNRH1</i> e <i>GNRHR</i> .....	16
1.5 Mutações oligogénicas .....	17
1.6 Análise <i>in silico</i> .....	17
1.6.1 <i>SIFT</i> .....	18
1.6.2 <i>Provean</i> .....	18
1.6.3 <i>Polyphen</i> .....	19
1.6.4 <i>Mutation Taster</i> .....	19
1.6.5 <i>Pymol</i> .....	20
1.6.6 <i>Human Splicing Finder</i> .....	20
1.7 Objetivos.....	20
<b>2. Materiais e Métodos.....</b>	<b>21</b>
2.1 Pacientes.....	22
2.2 Análise de mutações em pacientes com HHI .....	26
2.2.1 Extração e purificação do DNA a partir de sangue periférico .....	26
2.2.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR) .....	28
2.2.3 Sequenciação do DNA .....	28

2.2.4 Critérios de patogenicidade .....	30
2.2.5 Confirmação de mutações por endonucleases de restrição .....	31
2.2.6 Confirmação de mutações por <i>Allele-specific</i> PCR .....	32
2.2.7 Clonagem com o vetor pGEM-T .....	32
2.2.8 MLPA .....	34
2.2.9 Detecção dos limites da deleção completa do <i>KAL1</i> .....	35
2.2.10 Construção de uma base de dados de mutações no gene <i>FGFR1</i> .....	35
<b>3. Resultados .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Identificação de variantes patogénicas em pacientes com HHI.....</b>	<b>38</b>
3.1.1 Variantes patogénicas no gene <i>KAL1</i> .....	43
3.1.2 Variantes patogénicas no gene <i>FGFR1</i> .....	48
3.1.3 Construção de uma base de dados de mutações no gene <i>FGFR1</i> .....	55
3.1.4 Variantes patogénicas no gene <i>FGF8</i> .....	55
3.1.5 Variantes patogénicas no gene <i>CHD7</i> .....	57
3.1.6 Variantes patogénicas no gene <i>PROK2</i> .....	64
3.1.7 Variantes patogénicas no gene <i>PROKR2</i> .....	66
3.1.8 Variantes patogénicas no gene <i>KISS1R</i> .....	70
3.1.9 Variantes patogénicas no gene <i>TAC3</i> .....	72
3.1.10 Variantes patogénicas no gene <i>TACR3</i> .....	72
3.1.11 Variantes patogénicas no gene <i>GNRH1</i> .....	72
3.1.12 Variantes patogénicas no gene <i>GNRHR</i> .....	73
<b>3.2 Variantes privadas previstas como não patogénicas.....</b>	<b>76</b>
<b>3.3 Variantes oligogénicas.....</b>	<b>77</b>
<b>4. Discussão.....</b>	<b>78</b>
<b>4.1 Análise de mutações em pacientes com HHI .....</b>	<b>79</b>
4.1.1 Gene <i>KAL1</i> .....	81
4.1.2 Gene <i>FGFR1</i> .....	83
4.1.3 Gene <i>FGF8</i> .....	85
4.1.4 Gene <i>CHD7</i> .....	86
4.1.5 Genes <i>PROK2</i> e <i>PROKR2</i> .....	88
4.1.6 Gene <i>KISS1R</i> .....	89
4.1.7 Genes <i>TAC3</i> e <i>TACR3</i> .....	90
4.1.8 Genes <i>GNRH1</i> e <i>GNRHR</i> .....	90
<b>4.2 Penetrância incompleta e oligogenia .....</b>	<b>92</b>
<b>4.3 Relação genótipo/fenótipo.....</b>	<b>93</b>
<b>4.4 Reversão do hipogonadismo hipogonadotrófico .....</b>	<b>94</b>

4.5 Perspetivas futuras.....	95
5. Conclusões.....	98
Referências bibliográficas.....	101
Anexos .....	118
Anexo I- Primers para PCR e sequenciação .....	119
Anexo II- Primers usados para despiste de variantes em controlos usando diferentes técnicas. ....	125
Anexo III- Vetor de clonagem pGEM-T .....	129
Anexo IV- Listagem de todas as variantes genéticas identificadas .....	130
Anexo V- Mutações germinativas inativadoras do gene <i>FGFR1</i> no hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (2003-2014). ....	150
Anexo VI- Breve <i>Curriculum vitae</i> .....	160

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática da migração dos neurónios secretores de GnRH do epitélio nasal embrionário até ao hipotálamo. ....	3
<b>Figura 2.</b> Genes relacionados com o desenvolvimento e migração dos neurónios secretores de GnRH e com a síntese, secreção e ação da GnRH. ....	5
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática da estrutura proteica do FGFR1, mecanismo de ativação e vias de sinalização. ....	8
<b>Figura 4.</b> Cascata de sinalização típica de um recetor acoplado à proteína Gq. ....	13
<b>Figura 5.</b> Gene <i>KAL1</i> e proteína. ....	44
<b>Figura 6.</b> Identificação de mutações no gene <i>KAL1</i> em famílias afetadas. ....	44
<b>Figura 7.</b> Resultado da técnica de MLPA aplicada ao paciente com deleção no gene <i>KAL1</i> e restante família. ....	45
<b>Figura 8.</b> Localização dos genes deletados no paciente 6776 e microssatélites usados para deteção dos limites da deleção. ....	48
<b>Figura 9.</b> Gene <i>FGFR1</i> e proteína. ....	50
<b>Figura 10.</b> Identificação de variantes no gene <i>FGFR1</i> em famílias afetadas. ....	51
<b>Figura 11.</b> Mapeamento das mutações <i>missense</i> S96C e M719V na estrutura cristalina da proteína FGFR1-IIIc. ....	54
<b>Figura 12.</b> Localização das variantes no gene <i>FGF8</i> . ....	56
<b>Figura 13.</b> Identificação da variante T194T no gene <i>FGF8</i> na família afetada. ....	57
<b>Figura 14.</b> Localização das variantes na proteína codificada pelo gene <i>CHD7</i> . ....	60
<b>Figura 15.</b> Identificação de mutações no gene <i>CHD7</i> em famílias afetadas. ....	61
<b>Figura 16.</b> Localização da variante rara no gene <i>PROK2</i> . ....	65
<b>Figura 17.</b> Identificação da variante R81R no gene <i>PROK2</i> na família afetada. ....	66
<b>Figura 18.</b> Localização das variantes raras na proteína codificada pelo gene <i>PROKR2</i> . ....	68
<b>Figura 19.</b> Identificação de variantes no gene <i>PROKR2</i> em famílias afetadas. ....	68
<b>Figura 20.</b> Localização da variante rara R149C na proteína codificada pelo gene <i>KISS1R</i> . ....	70
<b>Figura 21.</b> Identificação da variante R149C no gene <i>KISS1R</i> . ....	71
<b>Figura 22.</b> Gene <i>GNRHR</i> e proteína. ....	74
<b>Figura 23.</b> Identificação de mutações no gene <i>GNRHR</i> em famílias afetadas. ....	75

**Figura 24.** Representação das sete famílias com mutações oligogénicas. .... 77

# Lista de Tabelas

Tabela I. Descrição clínica dos 50 pacientes englobados no presente estudo. ....	23
Tabela II. Resumo das variantes genómicas consideradas patogénicas, descritas ao nível do nucleótido e presentes em 30 dos 50 pacientes em estudo. ....	39
Tabela III. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>KAL1</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	43
Tabela IV. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>FGFR1</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	49
Tabela V. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no <i>FGFR1</i> em diferentes espécies, usando o <i>Mutation Taster</i> . ....	53
Tabela VI. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>FGF8</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	56
Tabela VII. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>CHD7</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	58
Tabela VIII. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no <i>CHD7</i> em diferentes espécies, usando o <i>Mutation Taster</i> . ....	63
Tabela IX. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>PROK2</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	65
Tabela X. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>PROKR2</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	67
Tabela XI. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no <i>PROKR2</i> em diferentes espécies, usando o <i>Mutation Taster</i> . ....	69
Tabela XII. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>KISS1R</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	70
Tabela XIII. Conservação evolutiva do aminoácido mutado no <i>KISS1R</i> em diferentes espécies, usando o <i>Mutation Taster</i> . ....	71
Tabela XIV. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>TACR3</i> usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	72
Tabela XV. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene <i>GNRHR</i> , usando diferentes ferramentas de bioinformática. ....	73
Tabela XVI. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no <i>GNRHR</i> em diferentes espécies, usando o <i>Mutation Taster</i> . ....	76

# Lista de Abreviaturas

<b>A<sub>260</sub></b>	Absorvância a 260 nanómetros
<b>A<sub>280</sub></b>	Absorvância a 280 nanómetros
<b>AKT</b>	Protein kinase B (proteína cinase B)
<b>BRK</b>	Domínios Brahma e Kismet
<b>CAM</b>	<i>Cell Adhesion Molecule</i> (molécula de adesão celular)
<b>cDNA</b>	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico complementar)
<b>CHARGE</b>	<i>Colobomata, Heart Anomalies, Choanal Atresia, Retardation, Genital and Ear anomalies</i>
<b>CHD</b>	<i>Chromodomain helicase DNA binding domain</i>
<b>CHD7</b>	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 gene</i>
<b>D1</b>	<i>Immunoglobulin like domain 1</i> (domínio de imunoglobulina 1)
<b>D2</b>	<i>Immunoglobulin like domain 2</i> (domínio de imunoglobulina 2)
<b>D3</b>	<i>Immunoglobulin like domain 3</i> (domínio de imunoglobulina 3)
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>ddNTP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato
<b>DEPC</b>	Dietil cianeto de fosforilo
<b>DEXHc</b>	<i>DEAD-like helicase superfamily</i>
<b>DNA</b>	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido trifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos América
<b>FGF8</b>	<i>Fibroblast Growth Factor 8 gene</i> (gene do fator de crescimento de fibroblasto 8)
<b>FGFR1</b>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1 gene</i> (gene do recetor tipo 1 do fator de crescimento do fibroblasto)
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (hibridização <i>in situ</i> por fluorescência)
<b>FNIII</b>	<i>Fibronectin type III</i> (fibronectina tipo III)
<b>FRS2</b>	Substrato 2 do FGFR
<b>FSH</b>	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (hormona estimuladora dos folículos)
<b>GAP</b>	<i>GnRH-Associated Peptide</i> (péptido associado à GnRH)
<b>GnRH</b>	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (hormona libertadora de gonadotrofinas)
<b>GNRH1</b>	<i>Gonadotropin Releasing Hormone 1 gene</i> (gene da hormona libertadora de gonadotrofinas)

<b>GNRHR1</b>	<i>Gonadotropin Releasing Hormone Receptor 1 gene</i> (gene do recetor da hormona libertadora de gonadotrofinas 1)
<b>GRB2</b>	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
<b>HDHD1</b>	<i>Haloacid dehalogenase-like hydrolase domain containing 1</i>
<b>HH</b>	Hipogonadismo Hipogonadotrófico
<b>HHA</b>	Hipogonadismo Hipogonadotrófico Adquirido
<b>HHI</b>	Hipogonadismo Hipogonadotrófico Idiopático
<b>HHIn</b>	Hipogonadismo Hipogonadotrófico Idiopático normósmico
<b>HPG</b>	<i>Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis</i> (eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas)
<b>Indel</b>	Inserção e deleção
<b>IP</b>	<i>Inositol phosphate</i> (fosfato de inositol)
<b>IP3</b>	<i>Inositol triphosphate</i> (trifosfato de inositol)
<b>KAL1</b>	<i>Kallmann 1 Gene</i> (gene do Kallmann 1)
<b>KISS1</b>	<i>Kisspeptin 1 gene</i> (gene da kisspeptina 1)
<b>KISS1R</b>	<i>Kisspeptin 1 receptor gene</i> (gene do recetor 1 da kisspeptina)
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LH</b>	<i>Luteinizing Hormone</i> (hormona luteinizante)
<b>LHRH</b>	<i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i> (hormona libertadora da hormona luteinizante)
<b>LZD</b>	<i>Leucine Zipper Domain</i>
<b>MAF</b>	<i>Minor Allele Frequency</i> (frequência do alelo menor)
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> (proteína cinase ativada por mitogénio)
<b>MEK</b>	<i>Protein kinase activator of MAP kinase</i> (proteína cinase ativadora da MAP cinase)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NCBI</b>	<i>National Center for Biotechnology and Information</i>
<b>NELF</b>	<i>Nasal Embryonic LHRH Factor gene</i> (gene do fator LHRH embrionário nasal)
<b>NKB</b>	<i>Neurokinin B</i> (neurocinina B)
<b>NLGN4X</b>	<i>Neurologin 4, X-linked</i> (neurologina 4, ligado ao X)
<b>OMIM</b>	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
<b>Pb</b>	Par de bases
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação de polimerização em cadeia)
<b>PI3K</b>	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> (fosfatidilinositol 3- cinase)
<b>PIP2</b>	<i>Fosfatil-inositol 4,5-bisphosphate</i> (fosfatil-inositol 4,5 bifosfato)
<b>PKC</b>	<i>Protein Kinase C</i> (proteína cinase C)
<b>PLC<math>\gamma</math></b>	<i>Phospholipase C<math>\gamma</math></i> (fosfolipase C $\gamma$ )
<b>PNPLA4</b>	<i>Patatin-like phospholipase domain containing 4</i>
<b>PROK2</b>	<i>Prokineticin 2 gene</i> (gene da procineticina tipo 2)

<b>PROKR2</b>	<i>Prokineticin receptor 2 gene</i> (gene do recetor da procineticina tipo 2)
<b>PSH</b>	Proteoglicanos de sulfato de heparina
<b>RAF</b>	<i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i>
<b>RAS</b>	<i>Rat Sarcoma Virus</i>
<b>RBC</b>	<i>Red blood cell</i>
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
<b>Rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	<i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i> (transcriptase reversa e reação de polimerização em cadeia)
<b>SANT</b>	<i>Switching-defective protein 3, adaptor 2, nuclear receptor corepressor, transcription factor IIIB</i>
<b>SDS</b>	<i>Sodium dodecylsulfate</i> (dodecilsulfato de sódio)
<b>SE</b>	Secondary extraction (extração secundária)
<b>SH</b>	Sulfato de heparina
<b>SK</b>	Síndrome de Kallmann
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SNF2</b>	<i>Sucrose non fermenting 2</i>
<b>SOS</b>	<i>Nucleotide guanine exchange factor</i> (fator de troca do nucleótido guanina)
<b>STS</b>	<i>Steroid sulphatase</i> (esteróide sulfatase)
<b>TAC</b>	Tomografia Axial Computorizada
<b>TAC3</b>	<i>Tachykinin 3 gene</i> (gene da taquicinina 3)
<b>TACR3</b>	<i>Tachykinin 3 receptor gene</i> (gene do recetor da taquicinina 3)
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>TRT</b>	Terapia de Reposição de Testosterona
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i> (região não traduzida)
<b>VCX</b>	<i>Variable charge, X-linked</i>
<b>VCX2</b>	<i>Variable charge, X-linked 2</i>
<b>VCX3A</b>	<i>Variable charge, X-linked 3A</i>
<b>VCX3B</b>	<i>Variable charge, X-linked 3B</i>
<b>WAP</b>	<i>Whey Acidic Protein</i>
<b>XLI</b>	<i>X-linked ichthyosis</i> (ictiose ligada ao X)

# 1.Introdução

---

## 1.1 Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático

A libertação pulsátil da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) é essencial para o correto funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas (HPG). Esta hormona é secretada para a circulação portal hipofisária da eminencia mediana e ativa o recetor 1 da GnRH (GNRHR1) na hipófise anterior, levando por sua vez à estimulação da expressão, síntese e secreção das gonadotrofinas: hormona luteinizante (LH) e hormona estimuladora dos folículos (FSH). Uma vez secretadas, as gonadotrofinas vão estimular em ambos os sexos a produção das hormonas sexuais e a gametogénese. Deste modo, a síntese de gonadotrofinas e consequentemente a função reprodutiva estão dependentes do correto funcionamento das células secretoras de GnRH no hipotálamo, assim como, das células secretoras de gonadotrofinas (gonadotrofos) na hipófise (1, 2).

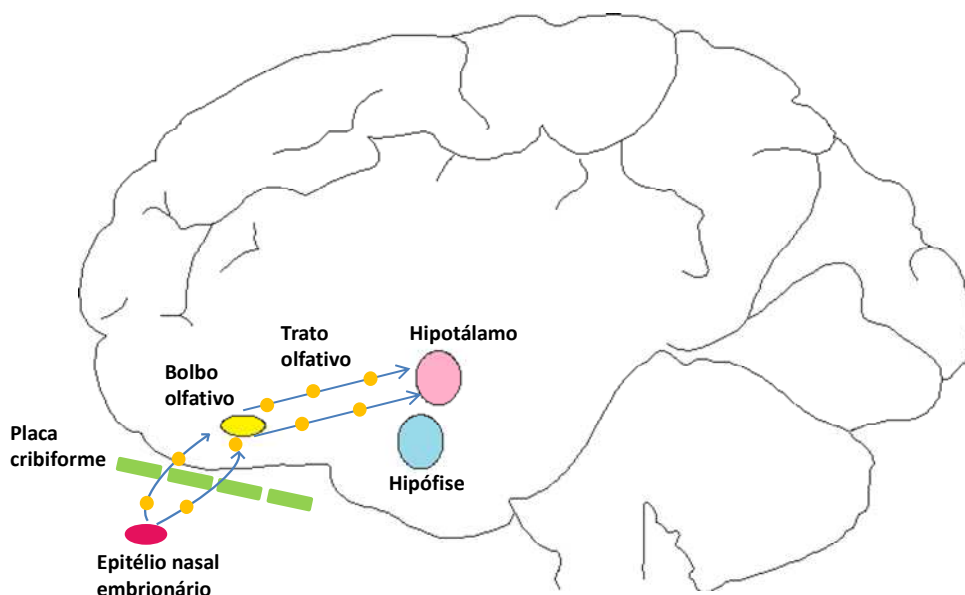
Disfunções ao longo do eixo HPG podem levar a diferentes graus de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH). Esta perturbação endócrina é caracterizada pela ausência completa ou parcial do desenvolvimento sexual, devido à secreção inadequada de gonadotrofinas e hormonas sexuais. A principal causa subjacente ao HH é a incapacidade de ativar a secreção pulsátil da GnRH durante a puberdade, uma fase de desenvolvimento caracterizada por um aumento substancial na frequência e amplitude dos pulsos secretórios desta hormona (3). O HH pode ser manifestado de forma isolada ou familiar por hereditariedade dominante, recessiva ou ligada ao cromossoma X (3, 4). As formas congénitas desta patologia incluem a Síndrome de Kallmann, que é caracterizada pela deficiência em gonadotrofinas e deficiência da capacidade olfativa (anósmia ou hipósmia) e HH sem defeitos olfativos (HH normósmico) (5). O HH é uma patologia rara com uma incidência descrita de 1 a 10 casos em 100.000 nascimentos (3), contudo, não existem dados epidemiológicos para a população portuguesa.

Relativamente ao diagnóstico, o HH pode ser detetado na infância pela presença de micropénis e/ou criptorquidia em associação com baixos níveis de gonadotrofinas e hormonas sexuais ou, com maior frequência, na idade adulta, pela ausência do desenvolvimento de caracteres sexuais secundários (4). Podem ainda surgir fenótipos não-reprodutivos, como defeitos da linha média facial, agenesia dentária, perda de audição, agenesia renal, sincinesia e anomalias ósseas digitais (5, 6). Embora raramente, existem pacientes que anos após o diagnóstico e após tratamento hormonal evidenciam reversão do quadro de hipogonadismo (7-9). Os casos de reversão demonstram, após suspensão do tratamento hormonal, valores normais de testosterona e gonadotrofinas, aumento do volume testicular, desenvolvimento espermatogénico normal e, consequentemente, recuperação da capacidade reprodutiva (10).

## 1.2 Síndrome de Kallmann

Há mais de 150 anos, Aureliano Maestre de San Juan, médico e professor de anatomia na Faculdade de Medicina de Granada, associou pela primeira vez hipogonadismo e anósmia aquando da autópsia realizada a um homem de 40 anos, que padecia de atrofia congénita do pênis e testículos e ausência de bolbos olfativos (11). Mais tarde, em 1944, Franz Joseph Kallmann, geneticista alemão, identificou em 3 famílias, 12 indivíduos com hipogonadismo, dos quais 2 possuíam deficiência mental e 9 eram portadores de anósmia. Provou não só o carácter genético da doença como a sua variedade fenotípica e a prevalência superior em homens (12). Mais tarde, De Morsier apelidou o termo displasia olfato-genital para descrever a associação de hipogonadismo com a ausência dos bolbos olfativos (13). Contudo, nos nossos dias, esta associação designa-se habitualmente por Síndrome de Kallmann (SK).

Durante a embriogénese, os neurónios secretores de GnRH e os neurónios olfativos têm origem no epitélio nasal embrionário. Os axónios dos neurónios olfativos passam através da placa cribiforme para formar o bolbo olfativo, e aí, estabelecem sinapses com as células mitraes cujos axónios irão formar o trato olfativo (14, 15). Os neurónios secretores de GnRH migram ao longo dos axónios olfativos, penetram na placa cribiforme seguindo a migração através do bolbo olfativo. Com a ajuda de fatores quimioatrativos e repulsivos, alcançam a área pré-ótica do hipotálamo onde iniciam a secreção pulsátil de GnRH (2) (Figura 1). Defeitos genéticos nos genes que regulam a migração dos neurónios olfativos e dos neurónios secretores de GnRH estão na base da SK.



**Figura 1.** Representação esquemática da migração dos neurónios secretores de GnRH do epitélio nasal embrionário até ao hipotálamo. Durante esta migração, os neurónios olfativos (●) passam a placa cribiforme para formarem o bolbo olfativo, e através do trato olfativo, atingem o seu destino final no hipotálamo (14, 15).

A SK tem uma prevalência de cerca de 1 em 8000 e é cinco vezes mais frequente em homens do que em mulheres. São observados padrões de hereditariedade recessiva ligada ao cromossoma X, autossômica dominante e autossômica recessiva (15).

## 1.3 Causas de hipopituitarismo

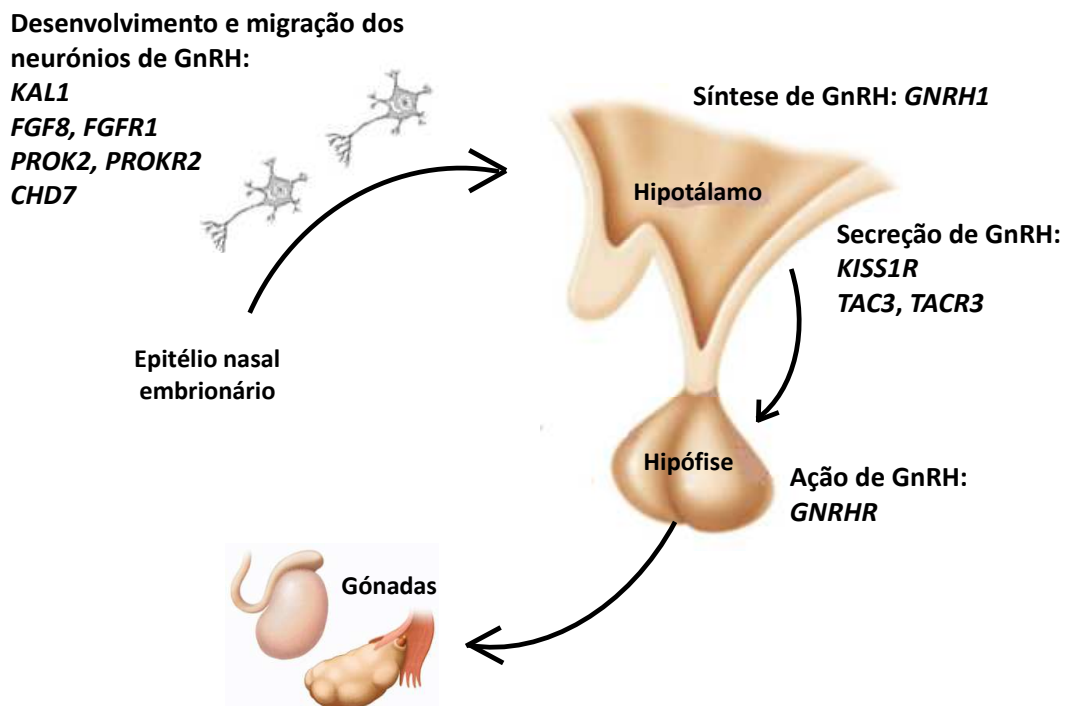
O hipopituitarismo manifesta-se pela diminuição ou ausência de secreção de uma ou mais hormonas hipofisárias. Pode ser primário, quando advém da disfunção da hipófise anterior, ou secundário, caso resulte da deficiência de fatores estimuladores do hipotálamo que atuam normalmente na hipófise. As causas do hipopituitarismo são diversas podendo causar disfunção hipofisária, hipotalâmica ou ambas e resumem-se na lista dos “nove Is”: *Invasive* (invasiva), *Infarction* (enfarte), *Infiltrative* (infiltrativa), *Injury* (traumatismo), *Immunologic* (imunológicas), *Iatrogenic* (iatrogénica), *Infectious* (infecciosa), *Isolated* (isolada) e *Idiopathic* (idiopática) (16). Segue-se um breve resumo de cada uma das causas mencionadas, tal como descrito previamente (16).

Na base da causa invasiva estão lesões que ocupam espaço e que levam ao hipopituitarismo pela lesão da glândula hipofisária, dos núcleos hipotalâmicos ou interrompendo o sistema porta hipotálamo-hipofisário. Como exemplo tem-se o craniofaringeoma, o tumor mais frequente na região hipotálamo-hipófise nas crianças, que impossibilita o funcionamento da hipófise pelo seu efeito compressivo. A causa de enfarte, como o próprio nome sugere, refere-se, por exemplo, ao enfarte hemorrágico espontâneo de um tumor hipofisário, que resulta frequentemente na insuficiência hipofisária parcial ou total. Por vezes o hipopituitarismo pode ser a manifestação clínica inicial de uma doença infiltrativa (causa infiltrativa), como sarcoidose (doença que se forma por acumulações anormais de células inflamatórias), hemocromatose (doença provocada pela absorção exagerada de ferro) e histiocitose das células de Langerhans (doença associada a proliferação e acumulação de células de Langerhans em vários tecidos). Relativamente à causa por traumatismo, um bom exemplo é o traumatismo craniano, quando causa insuficiência da hipófise anterior e diabetes insípida. Como causa imunológica, tem-se a hipofisite linfocítica que resulta em hipopituitarismo anterior, e ocorre mais frequentemente em mulheres durante a gravidez ou no período pós-parto. Pode apresentar-se como uma lesão de massa da sela turca parecida com um adenoma hipofisário. A radioterapia e a cirurgia da glândula hipofisária são exemplos de causa iatrogénica do hipopituitarismo. As causas infecciosas englobam um conjunto de infeções por agentes microbianos que podem comprometer a função hipofisária. Os restantes dois “Is” compreendem as causas de hipopituitarismo englobadas neste estudo, uma vez que os pacientes possuem Hipogonadismo Hipogonadotrófico Idiopático (HHI) Isolado. Idiopático por não ter causa conhecida, e isolado na medida em que existe apenas défice de

gonadotrofinas. A deficiência isolada pode ser associada a mutações em diversos genes, nomeadamente, nos que codificam as próprias hormonas em défice (16). Os casos idiopáticos incluem um grupo muito heterogénio de doentes, uns com causas adquiridas clinicamente não detetadas e outros com causas genéticas que são cada vez mais reconhecidas.

## 1.4 Fatores genéticos associados ao HHI

Dentro de cada espécie, os cromossomas homólogos são muito semelhantes entre si, contudo, em determinados locais (loci) pode existir variabilidade na sequência do DNA. Habitualmente, se a variação ocorre com uma frequência superior a 1% na população designa-se por polimorfismo, e caso seja inferior designa-se por mutação (17). A forma como se desencadeia esta variabilidade pode diferir, ocorrendo espontaneamente durante a replicação do DNA, causando alterações na sequência de nucleótidos, ou surgindo a partir de fatores externos (químicos ou físicos), que provocam danos à cadeia de DNA (18). Estes danos podem ocorrer em genes envolvidos no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas resultando em HHI. Os genes habitualmente afetados estão relacionados com a migração dos neurónios secretores de GnRH, e com a síntese, secreção e ação da hormona GnRH (3) (Figura 2).



**Figura 2.** Genes relacionados com o desenvolvimento e migração dos neurónios secretores de GnRH (*KAL1*, *FGF8*, *FGFR1*, *PROK2*, *PROKR2* e *CHD7*) e com a síntese (*GNRH1*), secreção (*KISS1R*, *TAC3* e *TACR3*) e ação da GnRH (*GNRHR*). As alterações genéticas nestes genes podem comprometer o correto funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas resultando em HHI (3).

## 1.4.1 Migração dos neurónios de GnRH até ao hipotálamo

### 1.4.1.1 Gene *KAL1*

O *locus* da ictiose X já tinha sido identificado no braço curto do cromossoma X, quando casos familiares com associação de HH, anósmia e ictiose X, levaram a que se investigasse o *locus* da SK nessa mesma região (19, 20). Em 1989, Bick et al. (21) detetaram numa criança com SK, ictiose X e condrodysplasia punctata ligada ao X, a existência de uma deleção na zona terminal do braço pequeno do cromossoma X, partindo da região 22.3. Mais tarde, após a morte da mesma criança, a autópsia revelou ausência de bolbos olfativos e do trato olfativo, e presença de malformações renais. A mãe desta mesma criança engravidou novamente, e abortou espontaneamente às 19 semanas de gestação. Através de estudos histológicos subsequentes, foi possível verificar que os neurónios secretores de GnRH se encontravam acumulados na região anterior do Sistema Nervoso Central (SNC), conseguindo passar a placa cribiforme, contudo, um erro migratório não permitiu que atingissem o hipotálamo (22).

O gene *KAL1* (Kallmann 1) (OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*): 300836- localização citogenética Xp22.31) é constituído por 14 exões, possui uma forma de hereditariedade ligada ao X e codifica uma glicoproteína extracelular formada por 680 aminoácidos, a anosmina (2). Esta proteína é constituída por diversos domínios; um peptídeo de sinalização no terminal N, uma região rica em cisteínas (cys-box), um domínio WAP (*whey acidic protein (WAP)-like domain*), quatro domínios de fibronectina tipo III (FnIII) e uma região rica em histidinas no terminal C (23, 24).

Uma vez que a anosmina é uma proteína secretada, atua na superfície da célula alvo através da sua interação com a membrana celular, o que por sua vez depende da ligação de um dos quatro domínios FNIII aos proteoglicanos de sulfato de heparina. A anosmina é necessária na formação da plataforma que guia a migração dos neurónios que secretam GnRH, contudo, a sua atividade biológica exata para desempenhar a sua função ainda não é clara. Estudos sugerem que o papel biológico da anosmina no bolbo olfativo, seja fundamental na atração dos axónios olfativos para o cérebro, dado que na ausência de anosmina este trajecto não ocorre e os neurónios secretores de GnRH não atingem o bolbo olfativo e conseqüentemente o hipotálamo (2). Durante o desenvolvimento embrionário, a expressão da anosmina é restrita a membranas basais e matriz intersticial de zonas embrionárias, que incluem o desenvolvimento do bolbo olfativo, rim e retina (25, 26). A expressão da anosmina no rim, a qual precede o desenvolvimento do glomérulo renal, pode explicar o porquê de pacientes com SK e mutações no *KAL1* apresentarem defeitos congénitos no rim, incluindo mesmo ausência renal (2).

O gene *KAL1* está mutado em cerca de 10 a 20% dos pacientes com SK (27), apresentando maioritariamente inserções ou deleções de nucleótidos que levam à formação de sequências *frameshift* e à introdução prematura de codões de terminação (3).

A descoberta de mutações no gene *KAL1* em indivíduos com SK e com HHI normósmico (28) prova que este gene deve ser estudado em qualquer paciente.

As alterações genéticas no *KAL1* provocam um fenótipo da SK mais severo e menos variável que o fenótipo causado por outros defeitos genéticos (29, 30). As mutações neste gene, em indivíduos com SK, podem ainda estar associadas a diversos fenótipos não reprodutivos nomeadamente, sincinesia e agenesia renal. A sincinesia ocorre em mais de 75% dos pacientes com SK e a agenesia renal unilateral em cerca de 35% (31).

#### 1.4.1.2 Genes *FGFR1* e *FGF8*

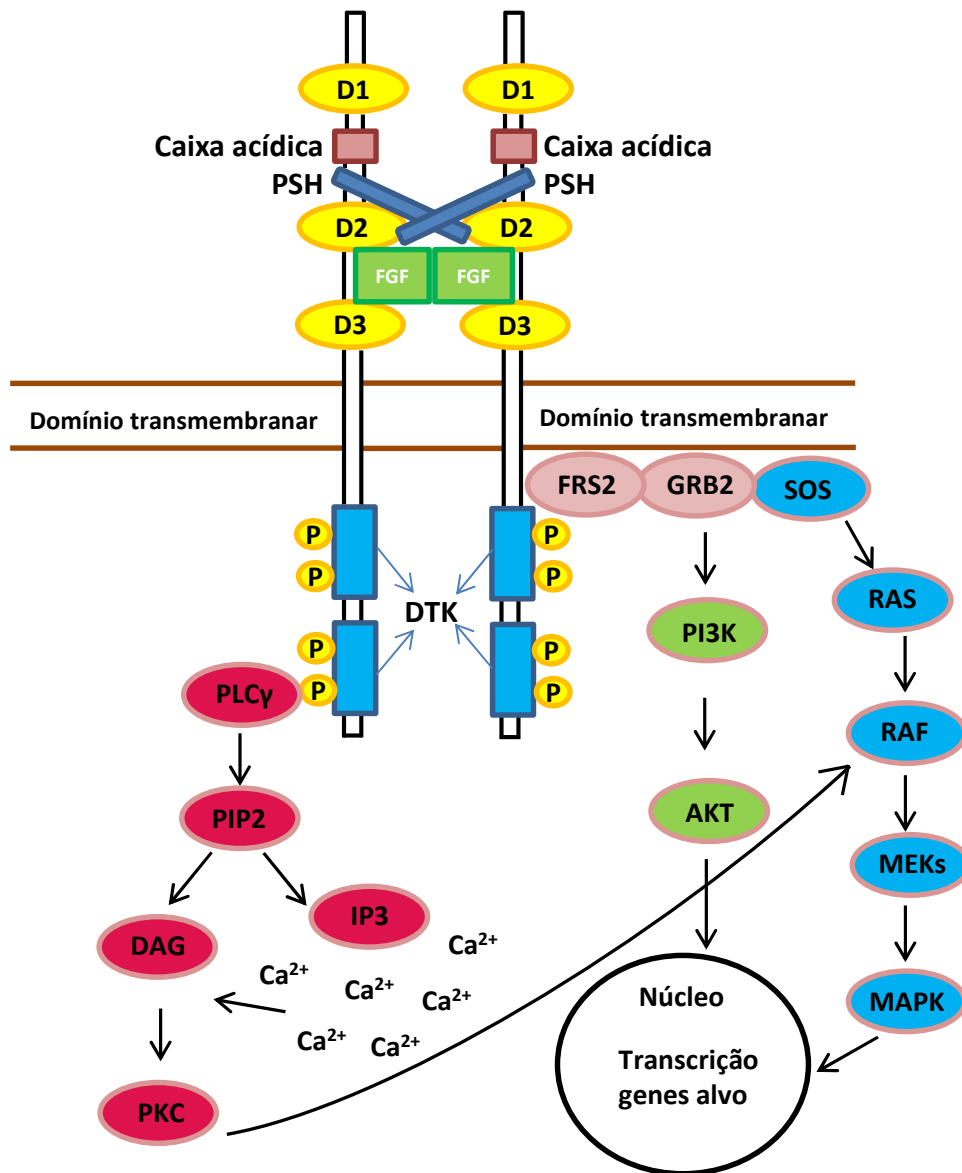
Em 2003 ocorreu um grande avanço no conhecimento das bases genéticas na SK, com a descoberta de deleções cromossômicas sobrepostas em dois pacientes portadores de uma síndrome de genes contíguos (SK e esferocitose), na região 8p11.2-p12. O intervalo da deleção reduziu a pesquisa a três genes dos quais o *FGFR1*, que codifica o recetor tipo 1 do fator de crescimento do fibroblasto, era o candidato mais provável (32).

O *FGFR1* codifica um dos quatro FGFRs, que são receptores de superfície celular da família dos recetores tirosina cinase, e tem como função a regulação da migração neuronal, diferenciação, e sobrevivência, assim como, a proliferação celular durante o desenvolvimento embrionário (33).

O gene *FGFR1* (também denominado *KAL2*) (OMIM: 136350- localização citogenética 8p11.23-p11.22) é composto por 18 exões e possui uma forma de hereditariedade autossômica dominante (32, 34). Este gene codifica a proteína FGFR1, um recetor transmembranar, que compreende uma região extracelular formada por três domínios semelhantes à imunoglobulina (D1, D2 e D3), uma hélice transmembranar e um domínio citoplasmático tirosina cinase (35). Os domínios D2 e D3 são responsáveis pela ligação ao ligando e especificidade de reconhecimento. A ativação do FGFR1 depende da sua dimerização, a qual é mediada pela ligação de Fatores de Crescimento de Fibroblastos (FGFs) e de proteoglicanos de sulfato de heparina (PSH) (Figura 3).

Após dimerização, ocorre a autofosforilação do domínio de tirosina cinase que, por sua vez, ativa uma cascata de sinalização intracelular (35). Esta cascata de sinalização compreende três vias de sinalização a jusante do FGFR1, as proteínas cinases ativadas por mitogénios (MAPK), a fosfolipase C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ) e a fosfatidilinositol 3- cinase (PI3K) (36) (Figura 3).

A anosmina exerce um duplo papel na formação do complexo de sinalização do FGFR1, que pode ser inibitório ou ativador. No primeiro caso a anosmina liga-se ao FGFR1 impossibilitando a ligação do FGF e, conseqüentemente, a formação do complexo de sinalização FGF/FGFR1/SH. No seu papel ativador, a anosmina liga-se ao SH ajudando na formação do complexo de sinalização FGF/FGFR1/SH (37).



**Figura 3.** Representação esquemática da estrutura proteica do FGFR1, mecanismo de ativação e vias de sinalização. Após formação do complexo FGF-PSH-FGFR1 ocorre dimerização do recetor e transfosforilação de várias tirosinas que se encontram na porção intracelular do FGFR1. Posteriormente ocorre a ativação de duas vias principais: a via do FRS2 e a via da PLCγ, que levam à regulação positiva da via MAPK e da via PI3K-AKT (38). D1, D2, e D3, domínios semelhantes à imunoglobulina; FGF, fator de crescimento de fibroblasto; PSH, proteoglicanos de sulfato de heparina; DTK, domínio tirosina cinase; PLCγ, fosfolipase Cγ; PIP2, fosfatil-inositol 4,5 bifosfato; DAG, diacilglicerol; IP3, trifosfato de inositol; PKC, proteína cinase C; FRS2, substrato 2 do FGFR; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; SOS, fator de troca do nucleótido guanina; RAS, rat sarcoma virus- proteína G; RAF, rapidly accelerated fibrosarcoma- proteína cinase serina/treonina; MEK, proteína cinase ativadora da MAP cinase; MAPK, proteína cinase ativada por mitogénio; PI3K, fosfatidilinositol 3- cinase; AKT, proteína cinase B.

O FGFR1 é expresso em múltiplos tecidos embrionários, incluindo esqueleto, ouvido interno e porção rostral do encéfalo (39, 40). O mecanismo de *splicing* dos transcritos do FGFR1 gera uma diversidade de isoformas de proteínas que são expressas diferencialmente em células e tecidos (41). O *splicing* alternativo de metade do terminal carboxilo do domínio D3, leva à inclusão do exão 8A ou do exão 8B, gerando as isoformas FGFR1-IIIb ou IIIc, respectivamente (42). Apesar destas isoformas apresentarem expressão diferencial nos tecidos e diferentes afinidades de ligação aos ligandos FGF (43), dados experimentais sugerem que a isoforma FGFR1-IIIc é a isoforma dominante, exercendo a maioria das funções biológicas do gene FGFR1, enquanto a isoforma IIIb desempenha um papel menor (44).

À semelhança do referido para o gene *KAL1*, também para o *FGFR1* foram efetuados estudos que revelaram a existência de mutações inativadoras, tanto em indivíduos com SK, como em indivíduos com HHI normósmico (45-47). Esta observação confirma a necessidade de pesquisar mutações neste gene, em doentes com e sem anósmia.

De entre as mutações descritas, existem ainda mutações ativadoras que estão na base da síndrome de Pfeiffer. Esta síndrome caracteriza-se por craniossinostose, anomalias craniofaciais, entre outros (48).

Os pacientes com SK e seus familiares, que possuem uma mutação no *FGFR1*, apresentam um amplo espectro de desenvolvimento pubertário, em contraste com o fenótipo clínico grave descrito em indivíduos com SK portadores de uma mutação no *KAL1* (49). A fenda palatina é o fenótipo não reprodutivo mais frequente associado a mutações no gene *FGFR1*, estando presente em 30% dos indivíduos com HHI, contudo, podem existir outras malformações nomeadamente, surdez, anomalias dentárias e ósseas e sincinesia (32).

Existem pelo menos 11 FGFs diferentes que podem ativar o *FGFR1* (50). Diversos dados apontam o *FGF8* (*Fibroblast Growth Factor 8*) como o ligando específico implicado na ontogenia dos neurónios secretores de GnRH. O gene é expresso nas mesmas áreas que o *FGFR1* e regula genes envolvidos na organização neuronal (51, 52). A mutação p.L342S presente no *FGFR1* e identificada num paciente com SK, evidenciou uma drástica redução da capacidade de ligação ao FGF8 (53). Ratinhos com menor expressão de FGF8 apresentaram disgenesia dos bolbos olfativos, assim como, alterações na cavidade nasal e perda de especificação do destino dos neurónios secretores de GnRH (54).

O gene *FGF8* (OMIM: 600483- localização citogenética 10q24.32) é formado por 6 exões codificantes (55) que levam à formação do FGF8 (56) e a forma de hereditariedade é autossômica dominante (3). Têm sido descritas mutações *missense* neste gene em pacientes com HHI e SK ao longo da sequência codificante (6, 28, 55). No estudo realizado por Falardeau et al. (55), foram identificadas seis novas mutações no gene *FGF8* em indivíduos

não aparentados com HHI, tendo sido provada a natureza patogénica das mesmas através da análise da estrutura cristalina do complexo FGF8b/FGFR2c/heparina e de estudos *in vitro*.

### 1.4.1.3 Gene *CHD7*

Em 2004, Vissers et al (57) identificaram dois pacientes com síndrome de CHARGE (Colobomata, Heart Anomalies, Choanal Atresia, Retardation, Genital and Ear anomalies) com novas microdeleções sobrepostas na região 8q12, incluindo um paciente previamente relatado com uma translocação no cromossoma 8 (58). Sequenciaram os nove genes conhecidos localizados na região de sobreposição das deleções e detetaram mutações no gene *CHD7* (*Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7 gene*) em 10 dos 17 pacientes. Foram ainda relatados um paciente com síndrome de CHARGE com uma deleção intersticial 8q11.2-13 (59) e gémeos afetados com a mesma patologia com uma translocação envolvendo a região 8q12 (60). Nos gémeos, o ponto de rutura da translocação ocorreu entre o exão 3 e o exão 8 do *CHD7*, levando a uma haploinsuficiência deste gene.

A síndrome de CHARGE é uma condição autossómica dominante rara, caracterizada por um conjunto de anomalias congénitas que conferem o acrónimo CHARGE (61). Diversos estudos revelaram que a anósmia, o desenvolvimento anormal do bolbo olfativo e o hipogonadismo hipogonadotrófico, são normalmente encontrados na síndrome de CHARGE, indicando que as principais características da SK também estão presentes na síndrome CHARGE. Por este motivo, tem sido sugerido que o gene *CHD7* pode ser considerado um locus candidato em casos suspeitos de SK sem mutações conhecidas (62).

O DNA eucariótico encontra-se associado a proteínas, maioritariamente histonas, sob a forma de cromatina. A forma primária de compactação da cromatina é o nucleossoma (63). Os processos, tais como, a replicação do DNA, a transcrição e a reparação do mesmo, requerem a remodelação da cromatina para que se tenha acesso ao DNA (63). Assim, as proteínas de ligação ao DNA, como a *Chromodomain Helicase DNA-binding*, desempenham um papel fundamental na activação ou repressão da transcrição através da remodelação da cromatina (64), que é realizada por grandes complexos multi-proteicos que contêm uma subunidade com um domínio SNF2/Helicase (65). Este processo é normalmente flanqueado por outros domínios, que são necessários para a montagem do complexo de remodelação, ou modulam a sua actividade através da interação com a cromatina, ou com componentes da maquinaria transcripcional. A família *chromodomain helicase DNA binding domain* (CHD) é caracterizada pela presença de cromodomínios no terminal N do domínio SNF2 (66).

O gene *CHD7* (OMIM: 608892- localização citogenética 8q12.1-q12.2) tem uma forma de hereditariedade autossómica dominante (56) e é composto por 37 exões codificantes que

levam à formação da *Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 7* (67). Esta proteína pertence a uma família de nove proteínas CHD que têm em comum a capacidade de utilizar a hidrólise de ATP para alterar a estrutura do nucleossoma (67).

Relativamente aos domínios funcionais que a constituem, a proteína CHD7 é composta por dois cromodomínios no terminal N (modificador de organização da cromatina), seguidos pelos domínios SNF2 e helicase localizados centralmente, um domínio SANT (*a switching-defective protein 3, adaptor 2, nuclear receptor corepressor, transcription factor IIIB (SANT) domain*), dois domínios Brahma e Kismet (BRK) (64) e, no terminal C, um domínio de *Leucine Zipper* (67).

Os cromodomínios medeiam as interações da cromatina e interagem com o DNA, RNA (ácido ribonucleico), e alvos de histona (67). O domínio SnF2 encontra-se em proteínas caracterizadas por actividade de ATPase dependente de DNA, envolvidas na manutenção, transmissão e expressão do genoma eucariota, regulando a estrutura da cromatina. O domínio helicase desempenha um papel na separação das cadeias de DNA durante a replicação, reparação, recombinação e transcrição (61). A função dos domínios BRK é desconhecida (67).

O *CHD7* é expresso em tecidos fetais e adultos que incluem epitélio olfativo, ouvido interno, olhos, sistema vascular (57), hipotálamo e hipófise (61), o que sugere uma associação deste gene com a migração dos neurónios secretores de GnRH. A função da proteína CHD7 ainda é desconhecida. Foi demonstrado que o *CHD7* codifica uma proteína nuclear fisicamente associada com a cromatina. Co-localiza-se com promotores especialmente marcados com metilação de lisina 4 em histonas H3, sugerindo que o CHD7 tem como alvo um grupo de genes ativos podendo atuar como um ativador da transcrição (68).

As mutações identificadas no CHD7 estão dispersas por todo o gene, não demonstrando a existência de *hot spots*, nem evidência clara de relação genótipo/fenótipo (61).

Relativamente ao impacto das mutações no sistema reprodutivo, existe uma variabilidade que vai desde a puberdade tardia à ausência de puberdade (61).

#### 1.4.1.4 Gene *PROK2* e *PROKR2*

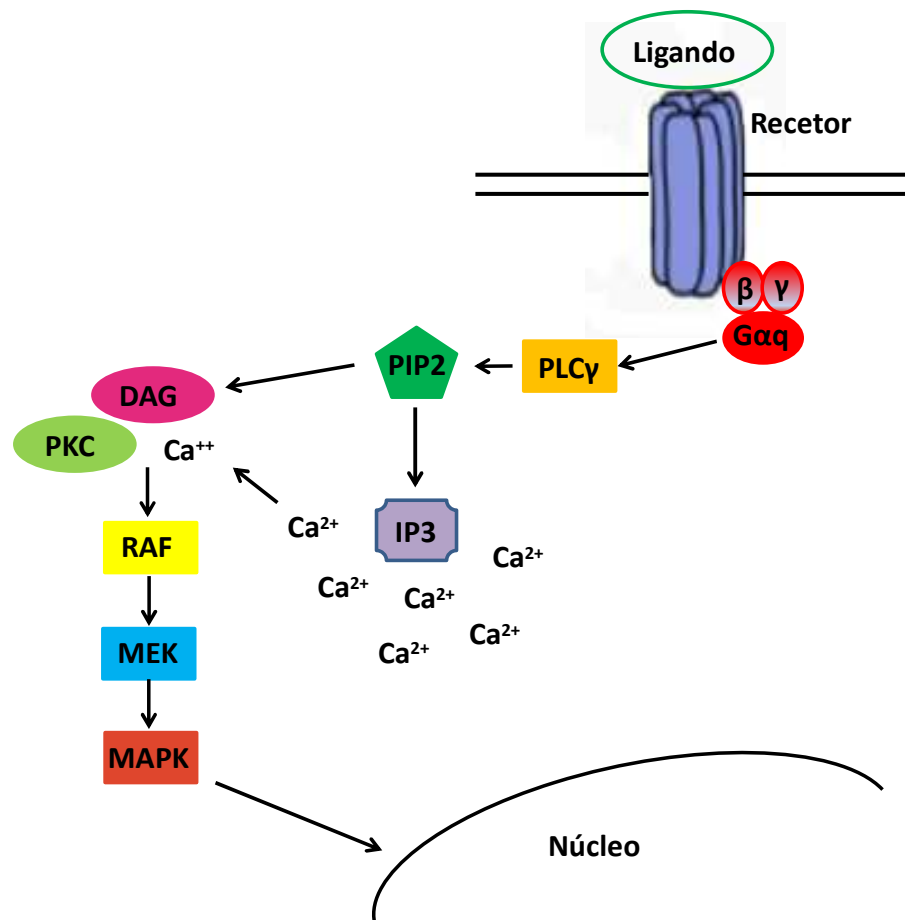
Em 2005, ratinhos com ablação do gene *PROK2* (*Prokineticin 2 gene*) apresentaram hipoplasia dos bolbos olfativos, contudo, não foi descrito o fenótipo reprodutivo dos mesmos (69). Mais tarde, estudou-se o sistema reprodutivo de ratinhos com ablação do gene *PROK2* tendo-se verificado que exibiam hipoplasia do sistema reprodutivo, assim como, um fenótipo idêntico ao da SK (46). Nos ratinhos *PROK2*<sup>-/-</sup> os neurónios secretores de GnRH conseguiram passar durante a embriogénese a placa cribiforme, contudo, não atingiram o hipotálamo (46).

Em 2006, Matsumoto et al. (70) demonstraram que ratinhos com ausência do gene *PROKR2* (*Prokineticin receptor 2 gene*) apresentaram um fenótipo idêntico ao da SK, com hipoplasia do sistema reprodutivo e bolbos olfativos. No mesmo estudo, a análise histopatológica dos testículos dos ratinhos com ablação do gene *PROKR2*, revelou redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, atrofia testicular, ausência de espermatídes e as células de Leydig, sendo poucas, ainda evidenciavam um tamanho reduzido. As fêmeas apresentaram atrofia das glândulas mamárias assim como do ovário, útero e vagina. Nos ovários, não se observou corpo lúteo e verificou-se a existência de folículos primários. A imunohistoquímica evidenciou que os ratinhos *PROKR2*<sup>-/-</sup> não apresentavam neurónios secretores de GnRH na região pré-ótica e na eminência mediana do hipotálamo, ao contrário dos ratinhos “*wild type*” (70).

O gene *PROK2* (OMIM: 607002- localização citogenética 3p13) codifica a procinetina 2, que possui na região N terminal o grupo de aminoácidos AVITGA (Alanina, Valina, Isoleucina, Treonina, Glicina, Alanina) conservados entre as espécies, evidenciando a sua importância ao nível da função proteica. A procinetina 2 é ainda constituída por dez cisteínas conservadas entre as espécies que formam 5 pontes disulfídicas (71). O gene *PROK2* é composto por quatro exões (72), em que o primeiro codifica o péptido sinalizador, assim como os primeiros 5 aminoácidos da região terminal N (AVITG). Este gene é traduzido numa proteína composta por 102 aminoácidos designada por *PROK2-L*, que após clivagem proteolítica dá origem à *PROK2*, proteína formada por 81 aminoácidos, que é a forma mais ativa da procinetina 2. Os 21 aminoácidos retirados são codificados pelo exão 3 que não possui nenhuma das 10 cisteínas conservadas (72). A forma de hereditariedade associada a este gene é autossómica recessiva (3) e é expresso na musculatura lisa intestinal, medula óssea, útero, coração, placenta, glândula suprarrenal e no testículo, mais propriamente nos espermatócitos primários. Ao nível do sistema nervoso central é expresso, entre outras áreas, no hipotálamo e no bolbo olfativo (73).

O gene *PROKR2* (OMIM: 607123- localização citogenética 20p12.3) é formado por 2 exões, codifica um receptor acoplado à proteína G, o receptor da procinetina 2, que é constituído por 384 aminoácidos (74). É expresso nas várias glândulas endócrinas, como testículos, ovários, hipófise, tiróide e suprarrenais, sendo também expresso ao nível do sistema nervoso central, no hipotálamo e bolbo olfativo (73). Estudos evidenciaram que a *PROKR2* e a GnRH não se colocizam nos neurónios de GnRH, sugerindo que a via da procinetina actua indirectamente para apoiar o desenvolvimento, a migração ou a função dos neurónios de GnRH (46).

As procinetinas estimulam o PROKR2, induzindo a cascata típica dos recetores acoplados à proteína  $G_{\alpha/11}$ . Nesta cascata ocorre a ativação da PLC $\gamma$ , com subsequente hidrólise de fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) em trifosfato de inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG). A acumulação de IP3 nas células provoca a mobilização das reservas de cálcio intracelular, acabando o DAG por ativar a proteína cinase-C (PKC) (75). A ativação do recetor pode ainda ativar outras vias de sinalização, como a das proteínas cinases ativadas por mitogénios que induzem a fosforilação das p44/p42MAPK (73, 75) (Figura 4) e a da adenilato ciclase (76). A ativação dos recetores de procinetinas regula diversos processos biológicos nomeadamente, a espermatogénese (77), o ritmo circadiano (78), assim como, o desenvolvimento normal dos bulbos olfativos e maturação sexual (70).



**Figura 4.** Cascata de sinalização típica de um recetor acoplado à proteína Gq. A ligação de um ligando a um recetor acoplado à proteína Gq, ativa a PLC $\gamma$  (fosfolipase C $\gamma$ ) que induz a hidrólise de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5 bifosfato) formando IP3 (trifosfato de inositol) e DAG (diacilglicerol), o que leva à mobilização de cálcio intracelular (Ca<sup>++</sup>) e ativação da PKC (proteína cinase C). Esta última leva por sua vez à ativação da RAF (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma- proteína cinase serina/treonina) que por sua vez fosforila a MEK (proteína cinase ativadora da MAP cinase) que acaba por fosforilar a MAPK (proteína cinase ativada por mitogénio) também conhecida por ERK (cinase regulada por sinal extracelular).

Apesar do gene *PROKR2* possuir uma forma de hereditariedade autossômica recessiva (3), têm sido encontradas mutações em heterozigotia, contudo, a análise de segregação e estudos

funcionais sugerem que a existência de mutações monoalélicas neste gene não é suficiente para causar HH (79, 80).

O fenótipo reprodutivo dos pacientes que possuem mutações nos genes *PROK2/PROKR2* heterozigóticas ou homozigóticas varia de HHI parcial a completo, incluindo casos de reversão completa da deficiência de GnRH. Relativamente aos fenótipos não-reprodutivos, têm sido descritos casos de displasia fibrosa, obesidade grave, distúrbio do sono, sincinesia e epilepsia (56).

## 1.4.2 Secreção da GnRH

### 1.4.2.1 Genes *KISS1* e *KISS1R (GPR54)*

Em 2003 foi descrita a ligação entre o gene *KISS1R (Kisspeptin receptor gene)* e o HHI, através de estudos de ligação génica em duas grandes famílias com HHIn (Hipogonadismo Hipogonadotrófico Idiopático normósmico) e história de consanguinidade (81, 82). Num destes estudos foi ainda provado que um ratinho com ablação do gene *KISS1R* apresentava um fenótipo idêntico ao de um indivíduo humano com HHIn (82). Mais tarde, foi descoberto que o gene *KISS1R* e o seu ligando são expressos em áreas do hipotálamo que controlam a reprodução (83).

O gene *KISS1R* (OMIM: 604161- localização citogenética 19p13.3) codifica um recetor acoplado à proteína G formado por 398 aminoácidos (84) e é constituído por 5 exões (82). Este gene é também designado por *GPR54* e o seu ligando é a kisspeptina que tem origem no gene *KISS1 (Kisspeptin 1 gene)* (85). Quando a kisspeptina se liga ao seu recetor ocorre o acionamento da via  $G_{\alpha q}$ , com ativação da PLC $\gamma$  que leva ao aumento de produção de IP3 e à mobilização intracelular de cálcio (56) (Figura 4). O recetor da kisspeptina, codificado pelo gene *KISS1R*, é constituído por sete domínios transmembranares e apresenta um terminal carboxilo intracelular (2).

As mutações presentes no gene *KISS1R* constituem 5% dos casos de HHIn e apresentam um padrão de hereditariedade autossómico recessivo (3). Estudos fisiológicos demonstraram que a kisspeptina é um potente estimulador da secreção de GnRH (86) que, juntamente com o seu recetor, formam um sistema neuroregulador excitatório para a secreção de GnRH (87). Foi identificada uma mutação ativadora no *KISS1R* numa menina com puberdade precoce central idiopática, salientando a importância deste sistema na maturação do eixo reprodutivo (87). Apesar de existirem com menor prevalência relativamente ao recetor *KISS1R*, têm sido também encontradas mutações no ligando *KISS1* (1, 88).

### 1.4.2.2 Genes *TAC3* e *TACR3*

Através de estudos de famílias consanguíneas foram identificadas mutações nos genes *TAC3* (*Tachykinin 3 gene*) e *TACR3* (*Tachykinin receptor 3 gene*) responsáveis pelo HHI. Topaloglu et al. (89) realizaram estudos em nove famílias consanguíneas com diversos membros afetados com HHIn, que foram submetidas a análise de polimorfismos por *microarrays*. Em três das famílias foram identificadas regiões em homozigotia comuns a todos os indivíduos afetados, mas que estavam ausentes nos indivíduos saudáveis. O locus comum às mesmas famílias encontrava-se no braço longo do cromossoma 4, abrangendo 20 genes. Destes, selecionaram o *TACR3* como alvo de estudo, por ser o gene que codifica o recetor da proteína neurocinina B, que é altamente expressa nos neurónios hipotalâmicos. A análise deste gene permitiu então descobrir duas mutações homozigóticas, em que uma delas era comum a duas das três famílias. No mesmo estudo, numa outra família, onde foram excluídas mutações no gene *TACR3*, foi identificada uma região homozigótica comum apenas a duas irmãs afetadas e não à irmã saudável. Dos genes presentes na região comum (cromossoma 12) o alvo de estudo foi o gene *TAC3*, por ser o ligando do gene *TACR3* (89).

O gene *TAC3* (OMIM: 162330- localização citogenética 12q13.3) codifica a neurocinina B (NKB) que é um membro da família das taquicininas, que por sua vez, são neurotransmissores excitatórios com expressão no sistema nervoso central e periférico dos mamíferos. O gene *TACR3* (OMIM: 162332- localização citogenética 4q24) codifica o recetor da neurocinina B, que é um recetor acoplado à proteína G (90). Ambos os genes possuem uma forma de hereditariedade autossómica recessiva (3).

O gene *TAC3* é constituído por sete exões, cinco dos quais são traduzidos para formar o péptido preprotaquicininina B. Este pré-pró-péptido sofre uma clivagem enzimática para formar a proneurocinina B e em seguida a NKB. A sequência de aminoácidos do péptido ativo final é codificada pelo exão 5. O gene *TACR3* é formado por cinco exões (91).

A NKB é expressa no núcleo arqueado e o seu recetor nos neurónios secretores de GnRH, o que sugere um papel desta dupla na secreção de GnRH (27).

Pacientes do sexo masculino que evidenciam mutações no gene *TACR3* possuem micropénis e não entram na puberdade durante a adolescência, salientando a importância da via *TAC3/TACR3* tanto na infância, como na ativação das gonadotrofinas, durante a puberdade (2). A recuperação neuroendócrina do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas foi observada num número considerável de pacientes de ambos os sexos, quando adultos, o que vem confirmar o papel fundamental destes genes nos períodos neonatal e adolescência, sendo menos crítico na fase adulta (92).

Pacientes com alterações no gene *TACR3* não manifestam outros fenótipos não reprodutivos, contudo, portadores de alterações no gene *TAC3* podem também ter associados problemas ao nível da aprendizagem, sugerindo que a NKB possa agir através de outros recetores sobre a função cognitiva (89, 92, 93).

### 1.4.3 Ação da GnRH: genes *GNRH1* e *GNRHR*

Apesar do gene que codifica a GnRH ser o candidato mais óbvio para a deficiência de GnRH, foi só em 2009 que os primeiros defeitos genéticos foram relatados no gene *GNRH1* (*Gonadotropin Releasing Hormone 1 gene*). As mutações neste gene representam uma causa rara de HHIn, com uma forma de hereditariedade autossómica recessiva (94, 95).

O gene *GNRH1* (OMIM: 152760- localização citogenética 8p21.2) é constituído por quatro exões (2) dos quais, três são codificantes e levam à formação de uma pré-pró-hormona de 92 aminoácidos, que é processada para produzir o decapeptídeo GnRH e o peptídeo associado à GnRH (GAP) (94). A primeira mutação encontrada neste gene foi relatada em dois irmãos com HHIn, uma adenina foi inserida em homozigotia na região terminal N (c.18-19insA) (96).

O *GNRHR* (OMIM: 138850- localização citogenética 4q13.2) é constituído por três exões que codificam uma proteína de 328 aminoácidos (2), expressa principalmente nos gonadotrofos da hipófise mas também nos ovários, testículos, placenta e próstata (97). Este gene codifica o recetor de GnRH, membro da família dos recetores acoplados à proteína G, e como tal, é constituído por sete domínios transmembranares, não apresentando um terminal carboxilo intracelular (98). Os domínios extracelulares, assim como, as regiões superficiais dos domínios transmembranares, estão envolvidos na ligação da GnRH. Pensa-se que os domínios transmembranares estão relacionados com a configuração do recetor e mudança conformacional associada à propagação do sinal, ou seja, estão relacionados com a ativação do recetor (99). Julga-se que estas modificações permitem mudanças conformacionais nos domínios intracelulares, envolvidos na interação com proteínas G e outras proteínas de transdução de sinal intracelular (99).

A activação do receptor de GnRH aumenta a mobilização de cálcio e estimula o influxo de cálcio extracelular. Este aumento de cálcio intracelular induz a secreção de LH e FSH pela hipófise (3).

A forma de hereditariedade do *GNRHR* é autossómica recessiva e a maioria dos pacientes possui mutações compostas em heterozigotia (100). As mutações neste gene estão entre as primeiras descritas em pacientes com HHIn (101), sendo que 3,5% a 16% encontram-se em casos esporádicos e até 40% em casos familiares (3).

## 1.5 Mutações oligogénicas

O HHI tem sido classificado em duas entidades clínicas distintas, a SK e o HHIn. Contudo, esta classificação tem sido posta em causa, uma vez que, as duas condições podem existir em diferentes membros de uma mesma família, indicando que podem constituir diferentes manifestações fenotípicas do mesmo defeito genético (32, 34, 49, 101-104). Deste modo, o HHI pode ser considerado como uma doença genética complexa, caracterizada pela variabilidade fenotípica, penetrância incompleta e modos de hereditariedade distintos. Acrescenta-se ainda que, na base do HHI pode existir a influência de fatores ambientais que poderão exercer efeitos epigenéticos na expressão dos genes, e ainda, a existência de polimorfismos ou defeitos genéticos em genes adicionais, que interagem levando ao desenvolvimento da doença (105).

Determinadas observações, nomeadamente em casos esporádicos, sugerem que o HHIn / SK nem sempre é uma doença mendeliana monogénica como se pensava anteriormente, mas poderá surgir como uma condição digénica ou potencialmente oligogénica (106). Um estudo efetuado com 397 pacientes com HHI, revelou a existência de 22% de pacientes com variações genéticas num *locus* e 2,5% de casos com variações genéticas em mais do que um *locus*, o que pode explicar a variabilidade fenotípica da deficiência isolada de GnRH (28).

## 1.6 Análise *in silico*

A identificação de alterações patogénicas na sequência de DNA de pacientes com doenças que poderão ser hereditárias, é uma das principais tarefas da genética médica. Os avanços da tecnologia têm permitido gerar grandes quantidades de dados de sequências do genoma. Por exemplo, os resultados do projeto 1000 Genomas sugerem que cada genoma humano contém aproximadamente 10.000-11.000 variações não-sinónimas e 10.000-12.000 variações sinónimas. Estima-se ainda, que um indivíduo possa possuir 200 inserções ou deleções *in-frame* e ser heterozigótico para 50 a 100 variantes associadas a doenças (107). Assim, têm sido desenvolvidas ferramentas de bioinformática que fornecem previsões sobre os efeitos funcionais de alterações genómicas (107). Vários algoritmos foram desenvolvidos para prever o efeito de variantes *missense* na estrutura e função das proteínas, nomeadamente o *Sift* (108), *Provean* (107), *Polyphen* (109), *Mutation Taster* (110), *Pymol* (111) e *Human Splicing Finder* (112).

### 1.6.1 SIFT

O programa *Sift* (*Sorting Intolerant From Tolerant*) prevê se uma substituição aminoacídica afeta a função da proteína e, conseqüentemente, se poderá alterar o fenótipo. O prognóstico é baseado no grau de conservação de resíduos de aminoácidos em sequências relacionadas, recolhidas através de *PSI-BLAST* (113). Este programa presume que os aminoácidos importantes estarão conservados na família proteica, de modo a que alterações em locais muito conservados tenham um prognóstico considerado prejudicial. Por exemplo, se uma determinada posição num alinhamento de uma família proteica tem sempre o aminoácido isoleucina, presume-se que a substituição deste aminoácido por qualquer outro tenha um papel prejudicial, assumindo que a isoleucina é necessária para a correta função da proteína. Se, pelo contrário, num alinhamento temos na mesma posição aminoácidos hidrofóbicos como isoleucina, valina e leucina, o *Sift* assume que naquela posição só podem existir aminoácidos hidrofóbicos, para que o resultado seja neutro. Este programa considera a posição em que a alteração ocorreu e o tipo de alteração de aminoácido. Dada uma sequência proteica, o *Sift* seleciona proteínas relacionadas com a mesma e alinha-as (108).

### 1.6.2 Provean

O programa *Provean* (*Protein Variation Effect Analyzer*) prevê o impacto funcional para todas as classes de variações na sequência proteica; alterações de aminoácidos, inserções, deleções e substituições múltiplas. Em alinhamentos de sequências emparelhadas, as pontuações de alinhamento podem ser usadas como uma medida de similaridade de sequências, para avaliar a probabilidade dos pares de sequências serem homólogas ou relacionadas. De acordo com este conceito, pode-se interpretar uma alteração na pontuação de alinhamento causada por uma variação de aminoácido, como o impacto da variação na função da proteína. Por exemplo, dada uma proteína A, vamos supor que existe uma proteína B homóloga que é funcional. Para medir o efeito de uma variação na proteína A, podemos medir a semelhança entre a proteína A e B, antes e depois da introdução da variação. Uma variação que reduz a semelhança de uma proteína para a proteína funcional homóloga B é mais suscetível de causar um efeito prejudicial. Assim, a pontuação de alinhamento é usada como uma medida de mudança na semelhança causada por uma variação (107). Este programa calcula uma pontuação delta que é usada para medir o efeito da variação. Pontuações baixas são interpretadas como variações de aminoácidos que conduzem a um efeito deletério sobre a função da proteína, enquanto pontuações elevadas são interpretadas como variações com efeito neutro sobre a função da proteína. No cálculo desta pontuação de alinhamento entra-se em conta com a posição do aminoácido, a frequência da substituição, as propriedades químicas dos 20 aminoácidos e o contexto da sequência (nucleótidos que rodeiam o local da variação). Como a pontuação delta considera pontuações de alinhamento derivadas das

regiões próximas, pode ser estendido a todas as classes de variantes de sequências incluindo *indels* e várias substituições de aminoácidos (107).

### 1.6.3 *Polyphen*

O programa *PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2)* é uma ferramenta que prevê os efeitos prejudiciais de mutações *missense*. Usa oito características baseadas na sequência e três características baseadas na estrutura, para prever o efeito das alterações de aminoácidos. A maioria destas características envolve a comparação de uma propriedade do tipo selvagem (ancestral, normal) e da correspondente propriedade do alelo mutante (causador de doença). O programa seleciona um conjunto de sequências homólogas usando um algoritmo de agrupamento e cria um alinhamento múltiplo. As características que usa qualificam: o grau de homologia entre dois alelos, dado o padrão de substituições de aminoácidos no alinhamento de várias sequências; quão distante a proteína que possui a variação é da proteína humana sem alteração; e se o alelo mutado se encontra num local com propensão para mutações (109). A importância funcional de uma substituição no alelo é prognosticada a partir das suas características individuais através de um classificador *Naive Bayes*, que utiliza informações obtidas a partir de alinhamentos de sequências e propriedades estruturais de proteínas (por exemplo, área de superfície acessível do resíduo de aminoácido, etc.) (109).

### 1.6.4 *Mutation Taster*

O *Mutation Taster* é uma aplicação que realiza uma rápida avaliação do potencial que uma alteração na sequência de DNA possui em causar doença. Integra informações de diferentes bases de dados biomédicos e usa ferramentas de análise que incluem conservação evolutiva, mudanças em locais de *splicing*, perda de características de proteínas e alterações que podem afetar a quantidade de mRNA. Os resultados do teste são avaliados por um classificador *Naive Bayes*, no qual se prevê o potencial de doença. Dependendo da natureza da alteração, o programa escolhe entre três modelos de previsão; alterações sinónimas ou intrónicas (*without aae*), alterações que afetam um único aminoácido (*simple aae*) ou alterações que causam mudanças complexas na sequência de aminoácidos (*complex aae*) (110).

### 1.6.5 Pymol

A complexidade da estrutura molecular faz com que a visualização seja essencial para a compreensão da biologia estrutural. O programa *Pymol* desempenha uma grande variedade de funções, incluindo a visualização em 3D da proteína em causa (111). Deste modo, pode observar-se a interação entre os diferentes aminoácidos numa molécula e assim, permite prognosticar o possível efeito de alterações aminoacídicas numa dada proteína.

### 1.6.6 Human Splicing Finder

O *splicing* do pré-RNA mensageiro é um processo essencial, altamente regulado, que ocorre após a transcrição do gene e antes da tradução do mRNA. Por forma a compreendermos se uma determinada variante exónica ou intrónica pode levar a um defeito no *splicing*, pode-se utilizar o programa informático *Human Splicing Finder*, cuja função destina-se a estudar o *splicing* do pré-mRNA (112). Este programa, por meio de algoritmos e matrizes, calcula valores consenso de potenciais locais de *splicing*, assim como, procura *branch points* e analisa possíveis alterações em locais de activação ou silenciamento de *splicing* (112).

## 1.7 Objetivos

O objetivo geral desta tese foi realizar um estudo de âmbito nacional, acerca da genética molecular e genómica funcional do HHI, em pacientes portugueses, de forma a ampliar o conhecimento acerca deste distúrbio e da complexidade do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas normal humano. Para dar cumprimento ao objetivo geral, estipularam-se os seguintes objetivos específicos: 1) Realizar análise mutacional em doentes portugueses com HHI e determinar a frequência de defeitos genéticos no eixo hipotálamo-hipófise-gónadas; 2) Avaliar as consequências funcionais das mutações identificadas; e 3) Analisar os resultados dos estudos genéticos em conjunto com as características clínicas dos pacientes, de modo a encontrar uma correlação genótipo-fenótipo que possa ser usada na prática clínica.

## **2. Materiais e Métodos**

---

## 2.1 Pacientes

A elaboração desta tese teve a colaboração de uma rede de 19 departamentos clínicos que incluem os principais centros de endocrinologia adulta e pediátrica do país: Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Santa Maria, Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santa Maria, Lisboa; Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Dona Estefânia, Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral, Lisboa; Consulta de Endocrinologia, Hospital da Luz, Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital Militar Principal, Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Instituto Português de Oncologia de Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospitais da Universidade de Coimbra; Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Pediátrico de Coimbra; Serviço de Endocrinologia, Instituto Português de Oncologia de Coimbra; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santo António, Porto; Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital de Santo António, Porto; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de São João, Porto; Unidade de Endocrinologia e Diabetologia Pediátrica, Hospital de São João, Porto; Serviço de Endocrinologia, Instituto Português de Oncologia do Porto; Serviço de Endocrinologia, Hospital de Braga; Serviço de Pediatria, Hospital de Braga; Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar do Alto Ave, Guimarães; Serviço de Endocrinologia, Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, Amarante, e Serviço de Endocrinologia, Hospital Garcia de Orta, Almada. Os médicos destes departamentos foram responsáveis pelo fornecimento dos dados clínicos, bem como das amostras de sangue dos pacientes. Os dados clínicos foram cuidadosamente analisados, pacientes com história de hipopituitarismo adquirido (por exemplo, tumores intracranianos, infecções como a meningite, entre outros) foram excluídos do estudo por ser improvável terem uma origem genética. Por outro lado, certas características clínicas forneceram pistas sobre o tipo de defeito genético envolvido, permitindo selecionar os genes a estudar prioritariamente em cada caso. Por exemplo, o HH associado a anósmia é indicativo de SK e permite que o estudo genético seja iniciado pelos genes *KAL1* e *FGFR1*. Outras características fenotípicas, tais como anomalias renais, esqueléticas ou neurológicas, bem como o modo de hereditariedade (autossómica recessiva, dominante ou recessiva ligada ao X) podem fornecer informações sobre o provável defeito genético subjacente.

Os critérios de inclusão foram pacientes de ambos os sexos com HHI que não alcançaram a puberdade espontaneamente até aos 18 anos ou que a atingiram abaixo desta idade por terapêutica médica ou com anósmia documentada. O estudo envolveu 50 pacientes de famílias distintas de nacionalidade portuguesa com HHI (42 homens e 8 mulheres), dos quais 22 tinham SK e 28 HHI normósmico. Sempre que possível, os membros da família, afetados ou não, foram também estudados. A população controlo foi constituída por 200 voluntários portugueses não relacionados e recrutados de entre dadores de sangue do Instituto Português

do Sangue. Foi obtido o consentimento informado de todos os participantes e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Instituição (Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Ref: CE-FCS-2012-012).

Na Tabela I encontra-se a descrição clínica dos pacientes englobados neste estudo.

**Tabela I.** Descrição clínica dos 50 pacientes englobados no presente estudo.

Paciente	Sexo	Idade diagnóstico	Diagnóstico	Descrição clínica	RM/TAC	Paciente
2520	M	21	SK	Atraso pubertário, escala de Tanner-2/3 (volume testicular 3 mL); ginecomastia leve bilateral; criptorquidia direita; atraso mental; surdez	RM crânio-encefálica: normal exceto um microadenoma na hipófise que foi considerado não-funcional	Não
2594	M		SK	Atraso pubertário; obesidade; dislipidemia	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não
2661	M	27	HHIn	Atraso pubertário; dislipidemia	RM crânio-encefálica: sela turca pequenas dimensões	Não
3329	M	16	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: revelou sulcos olfativos hipoplásicos e agenesia do trato e bolbos olfativos	Irmão (3328) com SK
5040	M	16	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: ausência de sulcos e bolbos olfativos, malformações dos hemisférios cerebrais	Não
5070	M	17	HHIn	Atraso pubertário, micropénis	RM crânio-encefálica: hipoplasia hipofisária	Não
5102	M	15	HHIn	Atraso pubertário, escala de Tanner-2 (volume testicular 1,5 cc); agenesia renal unilateral	Hipófise normal	Irmão (6999) com HHIn
5135	M	32	SK	Atraso pubertário		Não
5136	M		SK	Atraso pubertário, micropénis; criptorquidia; surdez		Não
5139	M	14	HHIn	Atraso pubertário	Hipófise normal	Não
5140	F	16	SK	Atraso pubertário, amenorreia primária	RM crânio-encefálica: hipoplasia da hipófise, bolbos olfativos indefinidos, possivelmente hipoplásicos	Não

Paciente	Sexo	Idade diagnóstico	Diagnóstico	Descrição clínica	RM/TAC	Paciente
5161	M	45	HHIn	Atraso pubertário	TAC crânio-encefálico: hipófise normal	Não
5163	M	18	SK	Atraso pubertário	TAC crânio-encefálico: hipófise normal	Não
5164	M	16	SK	Atraso pubertário		Não
5174	M	15.9	SK	Atraso pubertário, Escala de Tanner 1 (testicular volume 3 mL); criptorquidia bilateral	RM crânio-encefálica: revelou uma ligeira assimetria dos bolbos olfativos, com uma diminuição do tamanho e limites imprecisos à esquerda	Não
5178	M	14	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: hipoplasia hipofisária	Não
5182	M		HHIn	Atraso pubertário, barba escassa	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não
5183	M		SK	Atraso pubertário; criptorquidia bilateral		Não
5184	M	17.4	HHIn	Atraso pubertário, volume testicular esquerdo 3 mL; criptorquidismo direito; ginecomastia leve bilateral; distúrbio obsessivo-compulsivo	TAC crânio-encefálico: sem anomalias	Não
5185	M	36	HHIn	Atraso pubertário, hipogonadismo	TAC crânio-encefálico: hipófise normal	Não
5186	M	21	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não
5187	F		HHIn	Atraso pubertário, ausência de desenvolvimento caracteres sexuais secundários; diabetes mellitus tipo 2	Hipófise normal	Não
5189	M		HHIn	Atraso pubertário, azoospermia	TAC crânio-encefálico: hipófise normal	Não
5190	M		HHIn	Atraso pubertário; criptorquidia bilateral; surdez congênita	Hipoplasia hipofisária	Não
5191	M	21	SK	Atraso pubertário; surdez; estrabismo; osteoporose	RM crânio-encefálica: ausência dos sulcos e bolbos olfativos	Irmão (6896) com anósmia mas sem HHI
5192	M	16	HHIn	Atraso pubertário, testículos pequenos; ginecomastia bilateral	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não

Paciente	Sexo	Idade diagnóstico	Diagnóstico	Descrição clínica	RM/TAC	Paciente
5194	M		HHIn	Atraso pubertário; epilepsia	RM crânio-encefálica: hipoplasia hipofisária	? adotado
5195	M		HHIn	Atraso pubertário; criptorquidia bilateral; hipotireoidismo primário		Não
5196	M		HHIn	Atraso pubertário, azoospermia; criptorquidia		Não
5236	M	27	HHIn	Atraso pubertário; disfunção erétil; diminuição da libido		Não
5237	M	12	HHn	Atraso pubertário; criptorquidia unilateral	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não
5268	M		SK	Atraso pubertário	Hipoplasia hipofisária	Não
5406	F	18	HHIn	Amenorreia primária; ausência de desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários	Hipófise normal	Irmãos (5405 e 5404) com HHIn
5679	M	17	HHIn	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não
5915	F		HHIn	Atraso pubertário, diabetes	Hipoplasia hipofisária	Não
5943	M	15	HHIn	Atraso pubertário, Tanner 1, micropênis; obesidade; atraso mental; estrabismo; trombocitopenia crônica; alucinações auditivas	RM crânio-encefálica: hipófise normal	Não
6021	F	18	HHIn	Atraso pubertário, amenorreia primária	Hipófise normal	Não
6024	M	40	HHIn	Atraso pubertário, escala de Tanner 3 (volume testicular 2 mL)	TAC crânio-encefálico: sem anomalias	Não
6130	M	17	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: hipoplasia hipofisária, bolbos olfativos com espessura reduzida	Não
6178	F	24	SK	Atraso pubertário, amenorreia primária, fraco desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários	RM crânio-encefálica: hipófise normal, ausência de bolbos olfativos	Não
6263	F		HHIn	Atraso pubertário, amenorreia primária		Irmã com amenorreia primária
6776	M	17	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: indefinição dos bolbos olfativos	Irmão (6952) com SK

Paciente	Sexo	Idade diagnóstico	Diagnóstico	Descrição clínica	RM/TAC	Paciente
6889	M	19	HHIn	Atraso pubertário	Hipófise normal	Não
6980	M		HHIn			Irmã (6981) com HHn
7013	M	18	SK	Atraso pubertário, ausência dos caracteres sexuais secundários	Não se identificam bolbos olfativos	Não
7030	M	44	SK	Atraso pubertário, sem caracteres sexuais secundários	Hipófise normal	Não
7031	F		HHIn	Atraso pubertário, amenorreia primária	Hipófise normal	Não
7039	M	16	SK	Atraso pubertário	RM crânio-encefálica: hipófise normal, agenesia do trato e bolbos olfativos	Não
7074	M	35	SK	Atraso pubertário	Hipoplasia da hipófise, não se definem os contornos dos bolbos olfativos	Sobrinho (7344) com SK
7081	M	19.7	HHIn	Atraso pubertário, escala de Tanner 2 (volume testicular 6 mL)	RM crânio-encefálica: sem anomalias	Pai iniciou o desenvolvimento pubertário aos 14 anos e teve o surto de crescimento pubertário aos 15-16 anos.

M- Masculino; F- Feminino; RM- Ressonância Magnética; TAC- Tomografia Axial Computorizada, SK- Síndrome de Kallmann, HHIn- Hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático normósmico.

## 2.2 Análise de mutações em pacientes com HHI

### 2.2.1 Extração e purificação do DNA a partir de sangue periférico

O DNA genómico de cada paciente foi extraído de leucócitos de sangue periférico, usando o método de *salting-out* (adaptado de Miller et al.(114)). Resumidamente, para a lise de eritrócitos, num tubo de centrífuga de 50 mL, adicionaram-se a 10 mL de sangue e 30 mL de tampão de lise RBC (*Red blood cell*) a 4°C (RBC: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7,4). Após mistura no vortex (Velp Scientifica, Milan, Italy) a solução foi mantida no gelo durante 15 minutos fazendo inversões frequentes, seguindo-se centrifugação a 2500 rpm (rotações por minuto) durante 10 minutos a 4°C (Allegra<sub>TM</sub> X-22R, Beckman Coulter, Fullerton, Ca, EUA). Repetiu-se o mesmo procedimento de adição de tampão de lise, manutenção em gelo e centrifugação até que o sedimento de células ficasse branco.

Com vista à lise de leucócitos, após ressuspender por vortex o sedimento de células, adicionaram-se 5 mL de tampão SE (extração secundária) (75 mM NaCl; 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,0), 12,5 µL de proteinase K (20 mg/ml) e 500 µl de SDS 10% (dodecilsulfato de sódio) ficando a solução a incubar durante a noite a 55°C (ou no mínimo durante 6 horas) num bloco térmico (Star Lab, Chennai, Índia). Cada um dos reagentes tem uma função específica: o tampão SE contém agentes quelantes que se ligam a cofatores de nucleases para evitar a degradação do DNA por estas enzimas, o SDS é um detergente que dissolve a membrana celular e desnatura as proteínas e a proteinase K digere proteínas (115).

Para a precipitação de proteínas adicionaram-se 3 mL de NaCl saturado (6M) e incubou-se novamente a solução a 55°C durante 10 minutos. Em seguida agitou-se no vortex durante 25 segundos, aos quais se seguiu uma centrifugação a 4000 rpm, durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Com vista à precipitação do DNA, o sobrenadante foi descartado para um novo tubo de centrífuga de 50 mL tendo-se adicionado ao mesmo etanol a 100%, perfazendo duas vezes o volume do sobrenadante. Como o DNA é insolúvel no etanol, quando este reagente é adicionado e após diversas inversões ao tubo de centrífuga as moléculas de DNA agregam-se formando um novelo. Centrifugou-se a 4500 rpm, durante 5 minutos a 4°C e posteriormente rejeitou-se o sobrenadante observando sempre o sedimento de DNA no fundo do tubo de centrífuga. Seguidamente efetuou-se lavagem do DNA adicionando 10 mL de etanol a 70% e centrifugando a 4500 rpm, durante 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e transferiu-se com a ajuda de uma ponta estéril o sedimento de DNA para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL, ficando este a secar à temperatura ambiente durante 30 minutos. O sedimento de DNA foi reidratado com 1 mL de tampão TRIS-EDTA (TE) (ácido etilenodiamino tetra-acético de tris) e mantido em agitação lenta e permanente durante a noite à temperatura ambiente. A concentração e o grau de pureza do DNA foram determinados através da medição da densidade ótica de cada amostra por espectrofotometria ultravioleta, usando comprimentos de onda de 260 e 280 nm (NanoPhotometer Spectrophotometer B-80-3004-33, Impln GmbH, Munich, Germany). O DNA absorve a comprimentos de onda de 260 nm e as proteínas a 280 nm, assim, uma amostra de DNA puro (sem contaminação por proteínas ou RNA) tem um rácio  $A_{260}/A_{280}$  entre 1,8 e 2,0.

Finalmente, o DNA foi armazenado a -80°C. Para uso corrente, procedeu-se à diluição de parte do DNA em TE com uma concentração de 100 ng/µl num volume de 200 µl que ficou armazenado a -20°C.

## 2.2.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A obtenção de uma grande quantidade de fragmentos de DNA específicos é uma ferramenta indispensável em biologia molecular. A reação de polimerização em cadeia (PCR) é uma técnica de amplificação enzimática que pode ser utilizada, quando as sequências de nucleótidos nas extremidades de uma região particular de DNA são conhecidas, por forma a obter uma amplificação exponencial de um fragmento específico de DNA (116, 117).

Os pacientes foram rastreados para os principais genes relacionados com o eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, *KAL1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROK2*, *PROKR2*, *CHD7*, *GNRH1*, *GNRHR*, *KISS1R*, *TAC3* e *TACR3*. Foram amplificados os exões, os limites intrão/exão e as regiões promotoras de cada um dos genes mencionados, sendo que, os oligonucleotidos e as condições otimizadas de funcionamento se encontram descritos no Anexo I. Todos os exões foram amplificados com a Taq (*Thermus aquaticus*) polimerase (Dream Taq Green DNA, ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Numa reação de 25 µL foram adicionados cerca de 100 ng de DNA genómico, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Nzytech, Lisboa, Portugal), 0,25 µM de cada oligonucleótido, 1 U de enzima Taq (*Thermus aquaticus*) polimerase e respetivo tampão contendo 1,0, 1,5 ou 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, dependendo do exão e do gene (Anexo I).

A reação de PCR decorreu num termociclador (T100™, Bio RAD, Hercules, CA, EUA) com um período inicial de desnaturação de 5 minutos a 95 °C, seguidos de 34 ciclos em que cada um foi composto por 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 30 segundos de emparelhamento entre 53-60 °C (Anexo I) e 30 segundos de extensão a 72 °C. Decorridos os 34 ciclos, a reação de PCR terminou com um período de extensão final a 72 °C, durante 10 minutos.

## 2.2.3 Sequenciação do DNA

Para a análise mutacional dos genes em estudo recorreu-se à sequenciação. Em 1977, Sanger et al.(118) descreveram o método de terminação de cadeia didesoxi. A principal finalidade deste método consiste na síntese de cadeias a partir do fragmento de DNA de interesse, que são marcadas numa extremidade pela presença de um ddNTP (2', 3'-didesoxinucleótidos trifosfato) e diferem de comprimento em um nucleótido. A síntese de cadeias truncadas ocorre devido à utilização dos ddNTPs que, em contraste com os dNTPs normais, não possuem um grupo 3'-hidroxilo. A ausência deste grupo nos ddNTPs faz com que eles possam ser incorporados numa cadeia crescente de DNA através de uma polimerase de DNA, contudo, uma vez incorporados não podem formar uma ligação fosfodiéster com o nucleótido seguinte, levando à terminação da síntese da cadeia. Procedeu-se à electroforese destas cadeias para determinar a sequência de bases no DNA. Atualmente este processo está facilitado pela

utilização de equipamentos de sequenciação automática de DNA. Estes equipamentos possuem detetores de fluorescência que conseguem distinguir os quatro marcadores fluorescentes para timinas, adeninas, citosinas e guaninas (117).

A metodologia inicia-se com a desnaturação de uma amostra de DNA de cadeia dupla para gerar duas cadeias simples, onde um *primer* vai hibridar para se iniciar a reação de polimerização. Nestas reações, os ddNTPs, que se encontram em concentrações mais baixas quando comparando com os dNTPs, são incorporados aleatoriamente nas posições de dNTP correspondente, provocando a interrupção da síntese. Como cada um dos quatro ddNTPs tem incluído um fluorocromo específico, torna-se possível a identificação de cada fragmento truncado após a sua migração através do gel de electroforese e, como tal, a sequência de DNA pode ser determinada pela ordem em que cada fragmento passa através do detetor de fluorescência (117).

Antes de realizar a reação de sequenciação, para confirmar se ocorreu amplificação dos fragmentos de DNA que pretendíamos, efetuou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1%, tendo sido utilizados na corrida 5 µL do produto de PCR e 2 µL do marcador apropriado (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Os fragmentos foram visualizados num iluminador ultra violeta (Uvitec, Cambridge, Reino Unido) e fotografados usando o software *FireReader* (Version 15.15, Uvitec, Cambridge, Reino Unido). O restante produto foi purificado enzimaticamente utilizando-se as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina (EXO-SAP, Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA). Adicionou-se a cada amostra 0,5 µL de EXO e 1,0 µL de SAP e incubou-se durante 20 minutos a 37°C seguidos de 20 minutos a 80°C.

A preparação das amostras de DNA a sequenciar é composta por dois passos principais: realização da reação de sequenciação de DNA e precipitação com etanol.

Relativamente à reação de sequenciação de DNA, para cada amostra foram realizadas duas reações (correspondentes a cada uma das direções da cadeia). Cada reação de 11 µL foi preparada com cerca de 14 ng de amostra de DNA, 0,25 µM do primer e 0,5 a 2,5 µL de *DTCS Quick Start Master Mix* (GenomeLab, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA), dependendo do comprimento do fragmento. Os primers utilizados para a reação de sequenciação foram os mesmos utilizados na reação de PCR. A reação de sequenciação decorreu num termociclador, iniciou-se com um período de desnaturação de 5 minutos a 96°C, seguido de 30 ciclos em que cada um foi composto por 20 segundos de desnaturação a 96°C, 20 segundos de emparelhamento a 55°C e 40 segundos de extensão a 72°C. Após os 30 ciclos, decorreu um período de extensão final a 72°C, durante 8 minutos.

Para a precipitação de cada reação de sequenciação efetuada adicionou-se 1 µL de acetato de sódio (3 M, pH 5,2), 1 µL de EDTA (100 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 8,0), 0,5 µL de glicogénio (20

mg/mL) e 60 µL de etanol 95% a -20°C. Esta solução foi centrifugada a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Para lavagem do sedimento resultante adicionaram-se 200 µL de etanol a 70% e centrifugou-se novamente a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Retirou-se o etanol e deixou-se secar o sedimento à temperatura ambiente. Em seguida, ressuspendeu-se cada sedimento em 10 µL de SLS (Sample Loading Solution) e este produto foi submetido à eletroforese num sequenciador automático de DNA capilar (GenomeLab™ GeXP, Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). O método utilizado para sequenciar as amostras incluiu uma temperatura capilar de 50°C, uma temperatura de desnaturação de 90°C durante 120 segundos, uma voltagem de injeção de 2,0 kV durante 15 segundos e uma voltagem de separação de 4,0 kV durante um determinado período de tempo variável dependendo do comprimento do fragmento.

As sequências obtidas foram comparadas com as sequências de referência existentes no NCBI usando o programa de análise *GenomeLab Genetic Analysis System software* (Version 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA).

Todas as mutações identificadas foram confirmadas em dois produtos de PCR diferentes e sequenciadas nas duas direções do DNA *Forward* e *Reverse*. As variantes identificadas foram designadas tendo por base a nomenclatura padrão (119). Salienta-se, que quando encontrámos alteração genética num determinado gene não foi descartada a hipótese de existirem mais mutações oligogénicas, tendo-se sequenciado todos os pacientes para os principais genes envolvidos no funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas.

## 2.2.4 Critérios de patogenicidade

Habitualmente, a designação de polimorfismo refere-se a uma alteração no DNA que está presente numa população com uma frequência igual ou superior a 1% (120). O limite que distingue variantes raras de variantes comuns difere na comunidade científica, principalmente depois do aparecimento de métodos de sequenciação maciça do DNA (*Next Generation Sequencing* - NGS), sendo um valor arbitrário. Por exemplo, Frazer et al. (121) sugerem que uma variante deverá ser considerada rara quando possuir uma frequência alélica <1%, enquanto que para Gorlov et al. (122), o limite são 5%. Bodmer e Bonilla (123) usam também um limite máximo de 1%, mas sugerem um limite inferior de 0,1% para distinguir variantes raras de uma terceira categoria de variantes, que incluem o que eles designam de “mutações claramente deletérias”. Cirulli e Goldstein (124) definem quatro categorias de variantes com base na sua frequência: “muito comum”, variantes com uma frequência entre 5 e 50%; “menos comum”, com uma frequência entre 1 e 5%; “rara (mas não privada)” com uma frequência <1%, mas que ainda são polimórficas em uma ou mais grandes populações humanas; e “privado”, que são restritos a pacientes e parentes imediatos.

Com o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciação, mutações que se pensava serem raras numa população foram encontradas em frequências superiores a 1%, existindo ainda uma falta de associação de algumas mutações raras com doenças humanas. Ao comparar populações separadas geograficamente, por vezes verifica-se que uma mutação causadora de doença numa população é inofensiva noutra e vice-versa (125). Deste modo, não devemos classificar uma variante de acordo apenas com a frequência na população, nem apenas com a sua capacidade em causar doença. Esta dificuldade na categorização das diferentes alterações encontradas no DNA tornou necessário estabelecer determinados critérios de classificação, de forma a manter um compromisso entre o pré e pós *Next Generation Sequencing*.

Para classificarmos uma variante como patogénica tivemos em conta alguns critérios. As variantes *nonsense* e *frameshift* exónica foram consideradas patogénicas, uma vez que levam à formação de codões de terminação prematuros que tornam a proteína disfuncional. Para as restantes variantes foram consideradas patogénicas as que possuíam uma MAF (*Minor allele frequency*) inferior ou igual a 1% e consideradas nefastas em pelo menos dois programas bioinformáticos. Sempre que possível recorreremos ao MAF obtido na nossa população de controlo Portuguesa ou, em alternativa, na base de dados internacional *Ensembl* (disponível em [www.ensembl.org/](http://www.ensembl.org/)). Às variantes *missense* e *in-frame* aplicaram-se os programas *Sift* (108), *Provean* (107), *Polyphen* (109), *Mutation Taster* (110) e *Human Splicing Finder* (112); às variantes sinónimas aplicaram-se os programas *Sift*, *Provean*, *Mutation Taster* e *Human Splicing Finder*; às variantes intrónicas e às que se encontram em regiões não codificantes aplicaram-se os programas *Mutation Taster* e *Human Splicing Finder*. Foram consideradas patogénicas as variantes que resultaram em nefastas em pelo menos dois programas. Nestes casos ainda verificámos, quando possível, através do *Mutation Taster*, a conservação dos aminoácidos entre espécies e mapeamos as variantes no programa *Pymol* (111).

## 2.2.5 Confirmação de mutações por endonucleases de restrição

A análise com endonucleases de restrição foi usada como um método independente para confirmação das mutações detetadas pela sequenciação de DNA. Esta análise permitiu pesquisar se as alterações encontradas estariam ou não presentes num painel de controlos saudáveis e, se existia segregação das mutações nos familiares dos pacientes. Foi determinado que, para detetar um polimorfismo presente em 1% da população, com um poder estatístico de 80%, seria necessário analisar um mínimo de 210 cromossomas (105 controlos).

Recorreu-se ao programa *Nebcutter* 2.0 disponível na internet (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) para verificar se uma determinada mutação resultou na introdução ou eliminação de um local de corte de uma enzima de restrição. Localizada a

enzima de interesse, o DNA foi amplificado por reação de PCR (como descrito no ponto 3.1.6) e seguidamente digerido com a enzima, de acordo com as condições recomendadas pelo fabricante (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EUA). Por fim, os fragmentos resultantes da restrição enzimática foram separados por eletroforese em gel de agarose entre 1 e 4% ou acrilamida 8% e visualizados num transiluminador ultra violeta (Uvitec, Cambridge, Reino Unido). Por vezes, não foi possível encontrar uma enzima que permitisse a realização de um corte, nesses casos, construímos um primer com uma alteração num nucleótido, de modo a formar um local de corte reconhecido por uma enzima de restrição. Ocorreram ainda casos em que para além do primer alterado tivemos que desenhar um novo primer no sentido inverso, para que as bandas produzidas pelo corte enzimático tivessem um tamanho que permitisse uma melhor visualização (no Anexo II encontram-se discriminados para cada alteração os primers utilizados com o nucleótido alterado sublinhado).

### 2.2.6 Confirmação de mutações por *Allele-specific* PCR

A técnica de *allele-specific* PCR foi usada como um método independente para confirmação das mutações detetadas pela sequenciação de DNA, quando não foi possível usar endonucleases de restrição. Para cada variante utilizou-se um par de primers que apenas amplificasse para o alelo mutado. Um dos primers foi desenhado ficando com o nucleótido mutado na extremidade 3' e para criar instabilidade alterou-se mais um nucleótido na antepenúltima posição, a contar da extremidade 3' (126).

Para garantir que os 200 controlos não amplificaram para o alelo com a variante por um defeito na reação de PCR, foram ainda utilizados na técnica de *allele-specific* PCR mais um ou dois primers cujo fragmento por eles produzido funcionasse como controlo interno da reação (no Anexo II encontram-se discriminados para cada alteração os primers utilizados para a técnica de *allele specific* PCR).

### 2.2.7 Clonagem com o vetor pGEM-T

Cada mutação *frameshift* heterozigótica foi confirmada por clonagem dos produtos de PCR utilizando o *Kit pGEM-T Easy Vector Systems* (Promega, Madison, WI, EUA) (ver Anexo III), seguindo-se a sequenciação de cada alelo.

O produto de PCR foi obtido de acordo com o ponto 3.1.6, contudo a purificação foi efetuada pelo método de colunas (GRS PCR & Gel Band Purification Kit, Grisp, Porto, Portugal). Juntaram-se a 20 µL de produto PCR, 100 µL de *Gel Solubilization Solution* (Grisp, Porto, Portugal). Verteu-se a mistura na coluna de sílica e centrifugou-se a 13000 rpm durante 1

minuto numa centrífuga (MIKRO 20 - Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Acrescentaram-se 300 µL de *Wash Buffer 2* (Grisp, Porto, Portugal), incubou-se durante um minuto à temperatura ambiente, realizou-se nova centrifugação a 13000 rpm durante um minuto, seguido de mais três minutos. Por fim, transferiu-se a coluna para um tubo de microcentrífuga de 1,5 µL estéril e adicionaram-se 30 µL de *Elution Buffer* (Grisp, Porto, Portugal) (previamente aquecido a 68°C). Após incubação de dois minutos à temperatura ambiente centrifugou-se a 13000 rpm, durante dois minutos.

Após a purificação do produto de PCR, realizou-se a reação de ligação numa proporção de 1:3 (1 de vetor para 3 de DNA a clonar) e obteve-se através da fórmula indicada pelo fabricante a quantidade de DNA a clonar. Para cada mutação frameshift foram testadas duas reações com diferentes proporções de reagentes: reação A (8 µL de tampão, 2 µL de pGEM-T, 5 µL de DNA a clonar e 1 µL de enzima ligase) e reação B (10 µL de tampão, 2 µL de pGEM-T, 7 µL de DNA a clonar e 1 µL de enzima ligase).

Ambas as reações ficaram a incubar à temperatura ambiente durante uma hora. De seguida, procedeu-se à transformação de células de *E.coli*. (*Escherichia coli*) (JM109), tendo-se usado uma alíquota (50 µL) de células competentes por cada transformação que se efetuou. Antes que as células estivessem completamente descongeladas, adicionou-se a cada uma das alíquotas de células a totalidade da reação A e B, respetivamente. As duas reações (A e B) foram incubadas no gelo durante 30 minutos, seguindo-se o choque térmico a 42°C durante 45 segundos. Posteriormente foram colocadas em gelo por dois minutos. Terminado o choque térmico, transferiram-se as reações A e B para dois tubos de centrífuga (25 mL-estéril), adicionaram-se 200 µL de LB (Luria-Bertani) sem antibiótico e colocaram-se os tubos num agitador orbital (Agitorb 200, Aralab, Rio de Mouro, Portugal) a 37°C, 250 rpm durante duas horas. Plaquearam-se 100 µL de cada reação em placas de LB com agar, ampicilina (100 mg/mL), IPTG (isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside) (0,1 M) e X-gal (40 mg/mL) e ficaram a incubar numa estufa (Binder, Tuttlingen, Germany) a 37°C, durante a noite. Procedeu-se à cultura em meio líquido, transferindo-se as colónias brancas para diferentes tubos de centrífuga esterilizados com 1 mL de LB sem agar e com 1 µL de ampicilina (100 mg/mL). Estas culturas ficaram num agitador orbital a 37°C, 250 rpm, durante a noite.

Uma vez obtidas as diferentes culturas em meio líquido, utilizou-se o *kit Wizard plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega, Madison, WI, EUA) para purificar o DNA de células em meio líquido. Centrifugaram-se 2 mL de cultura, durante 5 minutos, a 13.000 rpm para obtenção do sedimento de células, retirou-se o sobrenadante, adicionaram-se 250 µL de *cell resuspension solution* e ressuspendeu-se. Em seguida, misturaram-se 250 µL de *cell lysis solution* e depois de algumas inversões a solução ficou transparente. Juntaram-se 10 µL de *alkaline protease solution* e após incubação à temperatura ambiente, durante 5 minutos, adicionaram-se 350 µL de *neutralization solution*. Depois de centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante de cada tubo foi passado para a coluna que vem no *kit* e

centrifugou-se à mesma velocidade durante 1 minuto. Descartou-se o que ficou no tubo coletor e lavou-se a coluna com 750 µL de *wash solution*, colocou-se a centrifugar à velocidade máxima (13.000 rpm) durante 1 minuto e fez-se nova lavagem com 250 µL de *wash solution* com período de centrifugação de 2 minutos. Transferiu-se a coluna para um novo tubo de centrifuga de 1,5 mL e o DNA foi eluído com 100 µL de *nuclease-free water* por centrifugação a 13.000 rpm durante 1 minuto.

Para podermos observar o alelo normal e o alelo mutado das mutações *frameshift* procedemos à aplicação do protocolo de sequenciação (ver ponto 3.1.7) com ligeiras alterações: usaram-se 4 µL de *Master Mix*; os primers foram os que acompanhavam o *Kit* de clonagem, T7 e SP6; antes da reação de sequenciação o plasmídeo foi desnaturado durante 2 minutos a 96 °C e o período de extensão final também foi aumentado para 10 minutos.

## 2.2.8 MLPA

Nos pacientes em que não ocorreu amplificação do gene *KAL1* por PCR (quando repetida mais que uma vez), aplicou-se a técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) para confirmar a deleção do gene. Assim, a análise de dosagem do gene foi realizada utilizando o *Kit SALSA\_ MLPA\_ Probemix P018-F1 SHOX* (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda), concebido para detetar deleções ou amplificações em vários genes, incluindo o *KAL1* (exão 10). Como controlos, foram utilizadas amostras de dois homens e duas mulheres saudáveis. A análise foi realizada de acordo com as instruções do fabricante. O primeiro passo desta técnica consistiu na desnaturação de 5 µL de DNA genómico (50 a 250 ng) a 98 °C, durante 5 minutos. Na reação de hibridização adicionou-se ao DNA desnaturado 1,5 µL de tampão MLPA e 1,5 µL de MLPA *probemix*. A mistura foi incubada 1 minuto a 95 °C, 16 horas a 60 °C e mantida até ao próximo passo a 54 °C. Cada sonda é formada por dois oligonucleótidos que hibridizam a seqüências alvo de DNA adjacentes e que têm de ser ligadas através de uma reação de ligação. Nesta reação, adicionaram-se 25 µL de água destilada, 3 µL de *Ligase buffer A*, 3 µL *Ligase buffer B* e 1 µL de *Ligase-65 enzyme*. O programa do termociclador continuou com 15 minutos a 54 °C (para que ocorresse a ligação), seguidos de 5 minutos a 98 °C (para que a enzima Ligase-65 ficasse inativa), aos quais se seguiu uma pausa nos 20 °C. Para que ocorresse amplificação das sondas realizou-se um PCR com: 7,5 µL de água destilada, 2 µL de *Salsa PCR primer mix*, 0,5 µL de *Salsa polymerase* nas seguintes condições: 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e 1 minuto a 72 °C, seguidos de 20 minutos a 72 °C. Os produtos finais do PCR foram corridos em eletroforese capilar no sequenciador (GenomeLab TM GeXP, Genetic Analysis System, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) e injetou-se para cada amostra uma mistura de: 0,7 µL de produto PCR, 0,2 µL de *DNA size Standard Kit -400* (Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA) e 32 µL de formamida.

Inicialmente, por análise visual, compararam-se os eletroferogramas do paciente e dos controlos saudáveis através do programa de análise GenomeLab Genetic Analysis System software (Version 10.2, Beckman Coulter, Fullerton, CA, EUA). Os dados foram exportados num formato compatível com o Excel e analisados através do programa Coffalyser.Net (MRC-Holland, Amsterdam, Holanda), os quocientes de dosagem fornecidos iguais a 0 foram indicativos de deleção. As amostras de DNA que evidenciaram resultados anormais foram reanalisadas por MLPA, e apenas as que mostraram resultados consistentes nas duas avaliações foram consideradas positivas para a deleção.

### **2.2.9 Detecção dos limites da deleção completa do *KAL1***

Para determinar os limites de uma deleção foram realizadas reações de PCR utilizando sempre que possível *primers* que delimitam microssatélites ao longo da região de interesse (127). Quando na impossibilidade de o fazermos, foram desenhados *primers* no programa informático Primer3Plus (128) para amplificação de outras regiões de DNA.

Inicialmente foram pesquisados os microssatélites que flanqueavam o gene *KAL1* contudo, quando estes não se encontravam presentes, foram testados outros microssatélites em regiões sucessivamente mais afastadas até identificar os microssatélites presentes. As reações de PCR foram sendo efetuadas de modo a existir uma aproximação aos limites da deleção, dependendo se ocorria ou não amplificação das zonas flanqueadas pelos primers

### **2.2.10 Construção de uma base de dados de mutações no gene *FGFR1***

A base de dados com todas as mutações publicadas no gene *FGFR1*, desde a sua identificação como associado ao HHI em 2003 até ao presente, foi elaborada através da pesquisa na base de dados de literatura do NCBI (*National Center for Biotechnology and Information*) PubMed para artigos em Inglês, usando as palavras-chave “*FGFR1*” e “*mutation*”. No total, obtiveram-se 46 artigos com análise de mutações e com pelo menos uma mutação de linha germinativa. Estes artigos foram analisados com o intuito de verificar se haveria duplicação de dados, assim, famílias que haviam sido incluídas em estudos de mutações anteriores foram excluídas da análise. Cada mutação publicada foi verificada quanto à sua precisão por comparação com a sequência normal do gene *FGFR1*. Os erros devido à atribuição incorreta de números de nucleótidos, ou codões, ou erros de tradução entre codão e resíduos de aminoácidos, foram corrigidos sempre que possível. As mutações descritas na literatura apenas ao nível do aminoácido foram também descritas ao nível nucleotídico, sempre que foi possível prever a

base alterada usando o código genético. Ao existir mais que uma mudança de nucleótido possível para explicar a alteração de aminoácido, ou quando outras alterações foram ambíguas, a mutação precisa foi considerada não especificada. Sempre que necessário, a numeração de cada nucleótido foi alterada para cumprir as recomendações da nomenclatura de mutações (119), onde o nucleótido +1 foi considerado o A do codão de iniciação de tradução ATG. As variações encontradas foram descritas em relação à sequência de referência cDNA (DNA complementar) do *FGFR1* (número de acesso do GenBank NM\_023110.2). Para comprovar que a nomenclatura usada para designar as mutações estava correta utilizou-se o programa informático Mutalyzer (<https://mutalyzer.nl/>) (119).

## 3.Resultados

---

## **3.1 Identificação de variantes patogénicas em pacientes com HHI**

No decorrer do capítulo dos resultados a designação dada às diferentes famílias refere-se ao número do caso index da base de dados laboratorial.

Na Tabela II encontram-se apenas as alterações consideradas patogénicas detetadas no DNA de 30 das 50 famílias. No Anexo IV, estão descritas todas as alterações detetadas no DNA de 50 famílias, desde polimorfismos bastante comuns a variantes raras ou mesmo ainda não descritas. Dos pacientes presentes na Tabela II e no Anexo IV, os números 3329/3328; 5102/6999; 5191/6896; 6980/6981; 6776/6952 e 5404/5405/5406 representam conjuntos de irmãos.

Tabela II. Resumo das variantes genómicas consideradas patogénicas, descritas ao nível do nucleótido e presentes em 30 dos 50 pacientes em estudo.

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
2520		c.2155A>G (Het) (0/420 alelos PT)									
2594							c.307T>A (Het) MAF 0.9% (A);				
2661							c.2185A>G (Het) MAF 0.1% (G)				c.803G>A (Het) (0/402 alelos PT)
3329		c.1961dup A (Het) (0/418 alelos PT)									
3328	-	c.1961dup A (Het) (0/418 alelos PT)									
5070		c.600C>T (Het) MAF 0.4% (T)					c.8355C>T (Het) MAF 0.02% (T) (0/408 alelos PT)				c.528G>C (Het) (0/416 alelos PT);
5102	c.542-1G>C (Hem) (0/406 alelos PT)						c.7579A>C (Het) MAF 0.05% (C)				
6999	c.542-1G>C (Hem) (0/406 alelos PT)										
5136		c.177C>T (Het) MAF 0.02% (T) (0/414 alelos PT)					c.5561A>G (Het) (0/404 alelos PT)				
5139							c.307T>A (Het) MAF 0.9% (A); c.2708A>C (Het) (0/402 alelos PT)				
5140							c.5211-251C>A (Het) MAF 0.5% (A)				
5164							c.6194G>A (Het) (0/414 alelos PT)				

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5174		c.287C>G (Het) (0/406 alelos PT)									
5178							c.1163G>A (Het) (0/406 alelos PT);				
5184		c.95dupA (Het) (0/404 alelos PT)									
5185							c.6216C>G (Het) MAF 0.05% (G)				
5190		c.600C>T (Het) MAF 0.4% (T)									
5191											c.802C>T (Het) MAF 1.2% (T) (1/404 alelos PT - 0.25%)
6896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c.802C>T (Het) MAF 1.2% (T) (1/404 alelos PT - 0.25%)
5196				c.401T>G (Het) MAF 0.05% (G) (0/406 alelos PT)							c.238C>T (Het) (0/400 alelos PT)
5268		c.2262G>A (Het) MAF 0.8% (A)									
5406							c.1536A>G (Het) MAF 0.2% (G)				
5404											
5405											
5915							c.2067G>A (Het) MAF 0.2% (A) ; c.5404+40G>A				

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
							(Het) MAF 0.1% (A)				
5943							c.1677G>A (Het) (0/412 alelos PT)				
6024		c.1057G>A (Het) (0/402 alelos PT)*									
6130			c.582G>A (Het) MAF 0.14% (A) (0/420 alelos PT)								
6178							c.1018A>G (Het) MAF 0.3% (G)				
6263		c.2262G>A (Het) MAF 0.8% (A)		c.847T>C (Hom) (0/414 alelos PT)		c.445C>T (Het) (0/402 alelos PT)					
6776	Deleção completa <i>KAL1</i>										
6980				c.317A>G (Het) MAF 0.2% (G) (2/438 alelos PT – 0.5%); c.937_947delTT TTTAAACCC (Het) (0/414 alelos PT)							
6981				c.317A>G (Het) MAF 0.2% (G) (2/438 alelos PT – 0.5%); c.937_947delTT TTTAAACCC (Het) (0/414 alelos PT)							
7039										c.243G>A (Het) MAF	

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
										0.04% (A)	
7074	c.571C>T (Hem) (0/84 alelos PT)										
7081		c.12G>T (Het) (0/410 alelos PT)					c.3245C>T (Het) (0/412 alelos PT)				c.802C>T (Het) MAF 1.2% (T) (1/404 alelos PT - 0.25%)

Os nucleótidos foram numerados de acordo com as sequências de referência para cada gene: *KAL1* (NM\_000216.2); *FGFR1* (isoforma IIIc- NM\_023110.2, isoforma IIIb- FJ809917); *FGF8* (NM\_033163.3); *CHD7* (NM\_017780.3); *PROK2* (NM\_001126128.1); *PROKR2* (NM\_144773.2); *KISS1R* (NM\_032551.4); *TAC3* (NM\_013251.3); *TACR3* (NM\_001059.2); *GNRH1* (NM\_000825.3) e *GNRHR* (NM\_000406.2). Het- variante encontrada em heterozigotia; Hom- variante encontrada em homozigotia; Hem- variante encontrada em hemizigotia. MAF- Minor Allele Frequency disponível em [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (Ensembl Archive Release 79- Março 2015) para o total da população. As variantes c.2053\_2058dupGCAAAA, c.2239-109G>A, c.2614-14delT, c.5894+32C>G, c.8076+163\_8076+166dupATCA e c.\*127delA presentes no gene *CHD7*, possuem uma MAF disponível em [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (Ensembl Archive Release 80- Maio 2015). Quando possível, apresenta-se a frequência alélica para a população Portuguesa (PT), calculada neste trabalho a partir de controlos saudáveis. Nos casos em que a variante nunca foi descrita, apresenta-se, apenas quando possível, a frequência na população portuguesa. \*presente na isoforma IIIb.

### 3.1.1 Variantes patogénicas no gene *KAL1*

Foram identificadas quatro variantes raras no gene *KAL1* (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que incluem, uma deleção completa do gene, uma variante nonsense [c.571C>T (p.R191X)] e duas variantes intrónicas [c.542-1G>C, c.1449+98A>G].

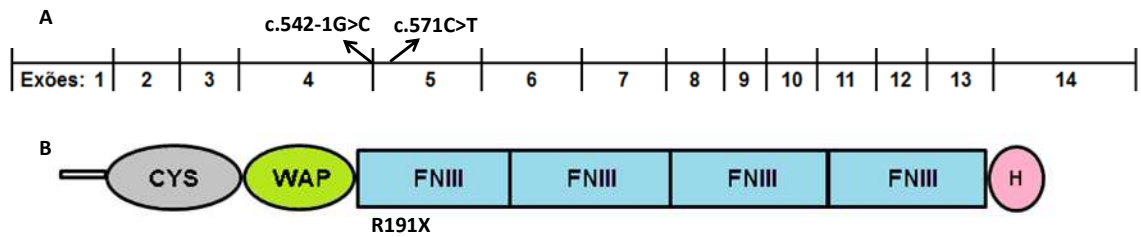
Como a deleção e a variante nonsense podem ser consideradas patogénicas, os programas bioinformáticos, para prognóstico do impacto funcional na proteína, foram aplicados apenas às variantes intrónicas. Deste modo, para a variante c.542-1G>A, evidenciaram efeito patogénico duas das ferramentas bioinformáticas aplicadas. Uma vez que esta variante se situa num *acceptor splice site*, prevê-se que promova alterações ao nível do *splicing* do RNA (Tabela III). No mesmo paciente, foi ainda identificada uma outra variante rara no intrão 10 (c.1449+98A>G) mas cujo impacto funcional não foi considerado significativo, uma vez que não foi previsto como nefasto por dois programas bioinformáticos.

**Tabela III.** Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *KAL1*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

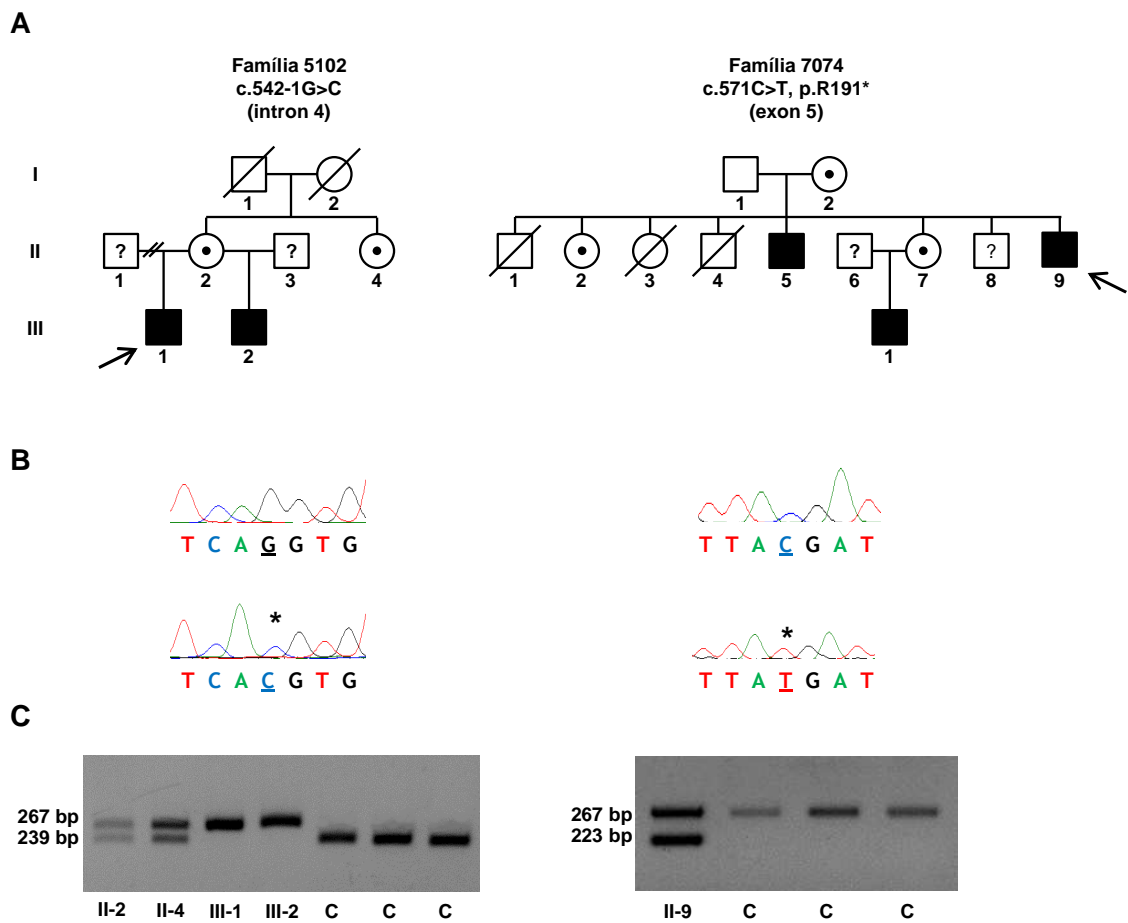
Mutação	Mutation Taster <sup>a</sup>	Human Splicing Finder
c.542-1G>C	Disease causing (1.000)	Alteration of the wild type acceptor site, most probably affecting splicing.
c.1449+98A>G	Polymorphism (0.999)	Activation of an intronic cryptic acceptor site. Activation of an intronic cryptic donor site. Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.

<sup>a</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.

Após aplicação dos critérios de patogenicidade, foram consideradas como nefastas três variantes, em pacientes distintos: a variante intrónica c.542-1G>C que se localiza no intrão 4, a mutação nonsense [c.571C>T (p.R191X)] no exão 5 e a deleção total deste gene (Figura 5). A variante c.542-1G>C é nova e a nonsense foi anteriormente descrita como mutação por Oliveira et al. (29). No despiste efetuado às variantes c.571C>T e c.542-1G>C, em controlos normais, não se detetaram mais indivíduos com esta alteração (0 alelos em 84 e 0 alelos em 406, respetivamente) (Figura 6).

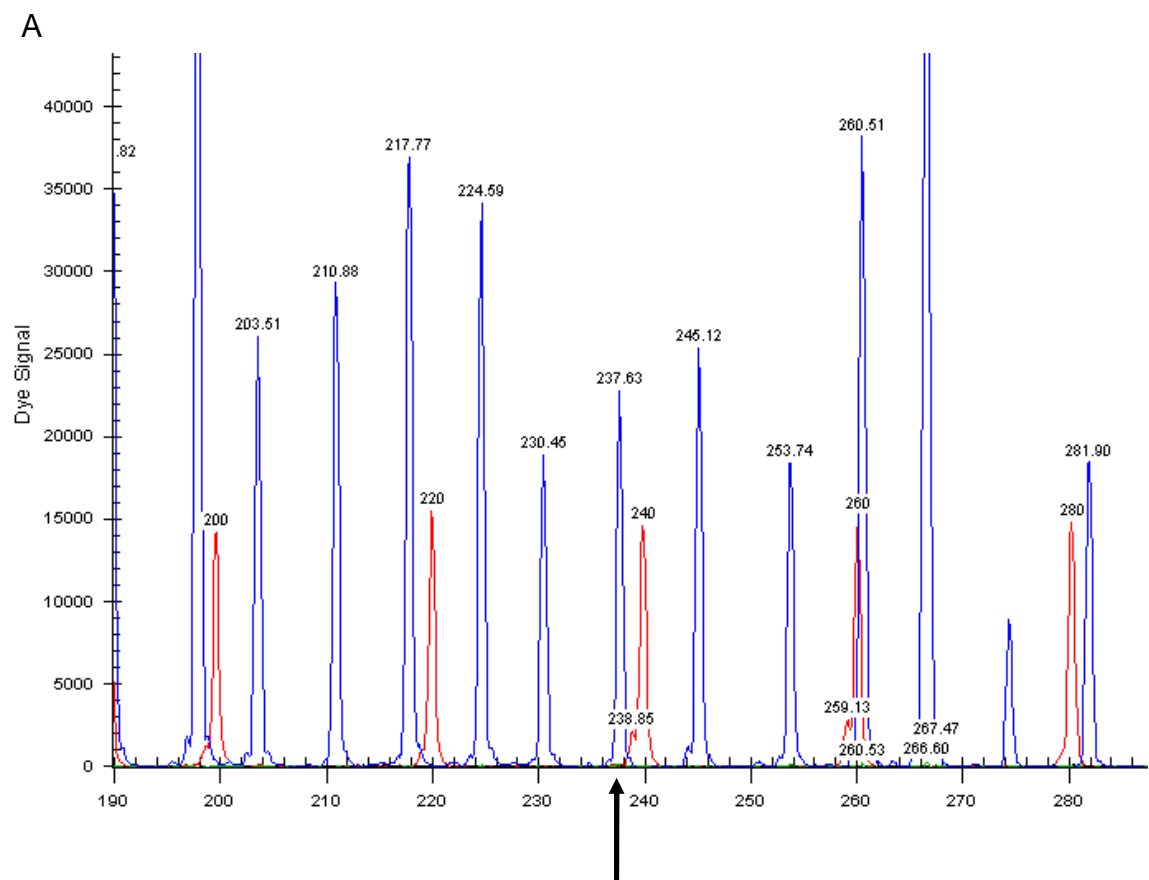


**Figura 5.** Gene *KAL1* e proteína. A, Localização das variantes no gene. B, Localização da mutação R191X na proteína. CYS- domínio rico em cisteínas no terminal amino; WAP- *whey acidic protein (WAP)-like domain*; FNIII- domínio de fibronectina tipo III e H- domínio rico em histidinas no terminal carboxilo.

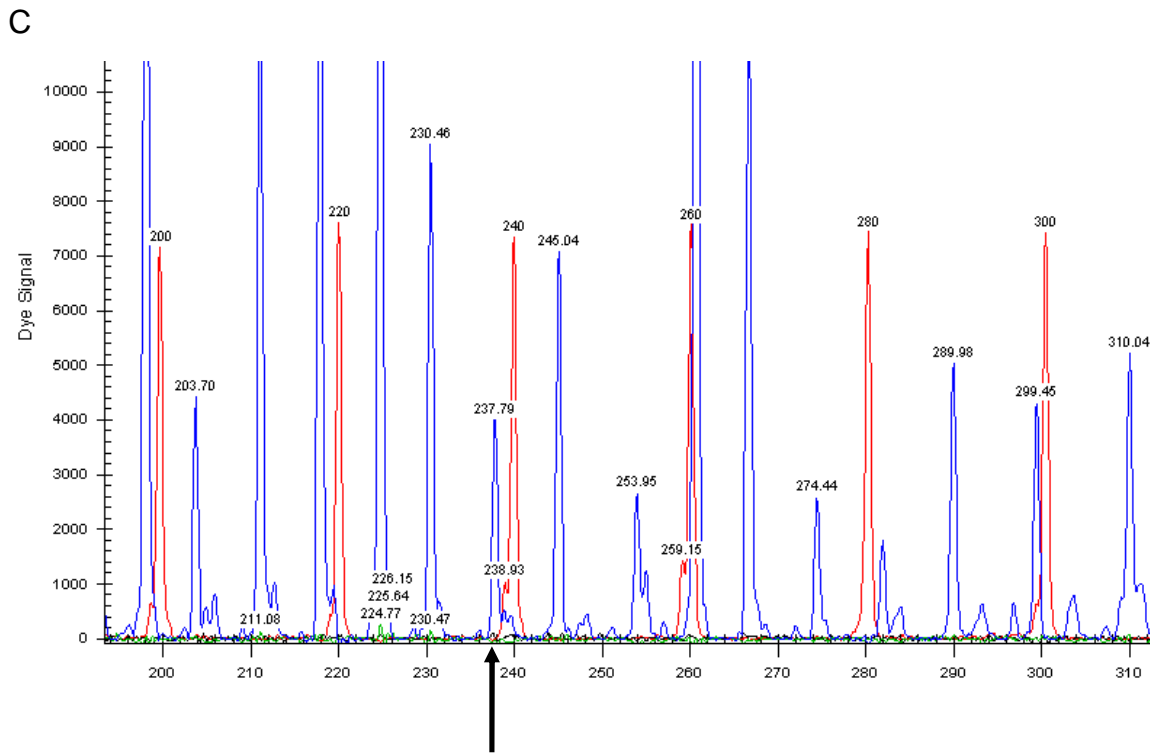
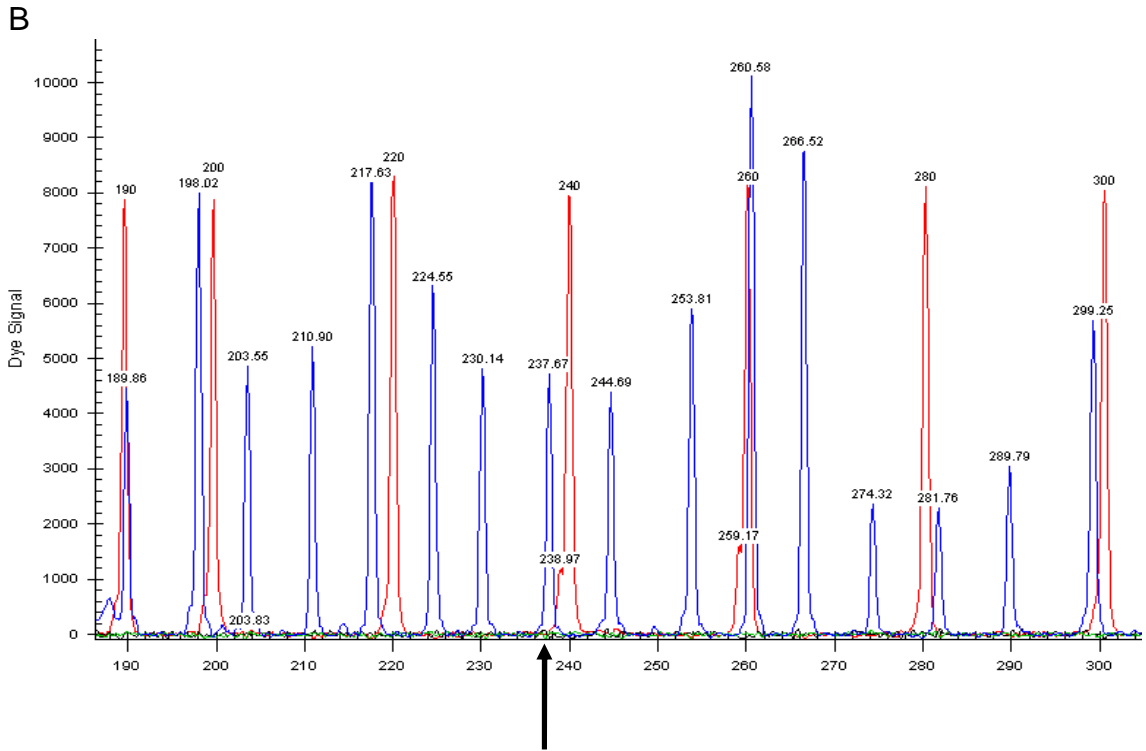


**Figura 6.** Identificação de mutações no gene *KAL1* em famílias afetadas. A- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com SK (família 7074) ou com HH normósmico (família 5102), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos não preenchidos com ponto negro representam familiares não afetados portadores da mutação, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens, círculos simbolizam mulheres e linhas oblíquas sobre os símbolos representam familiares falecidos. B- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. Todos os pacientes são hemizigóticos para os nucleótidos mutados. C- Confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (EcoNI) e *allele-specific* PCR, respetivamente. As bandas correspondem a familiares representados em A e controlos normais (C).

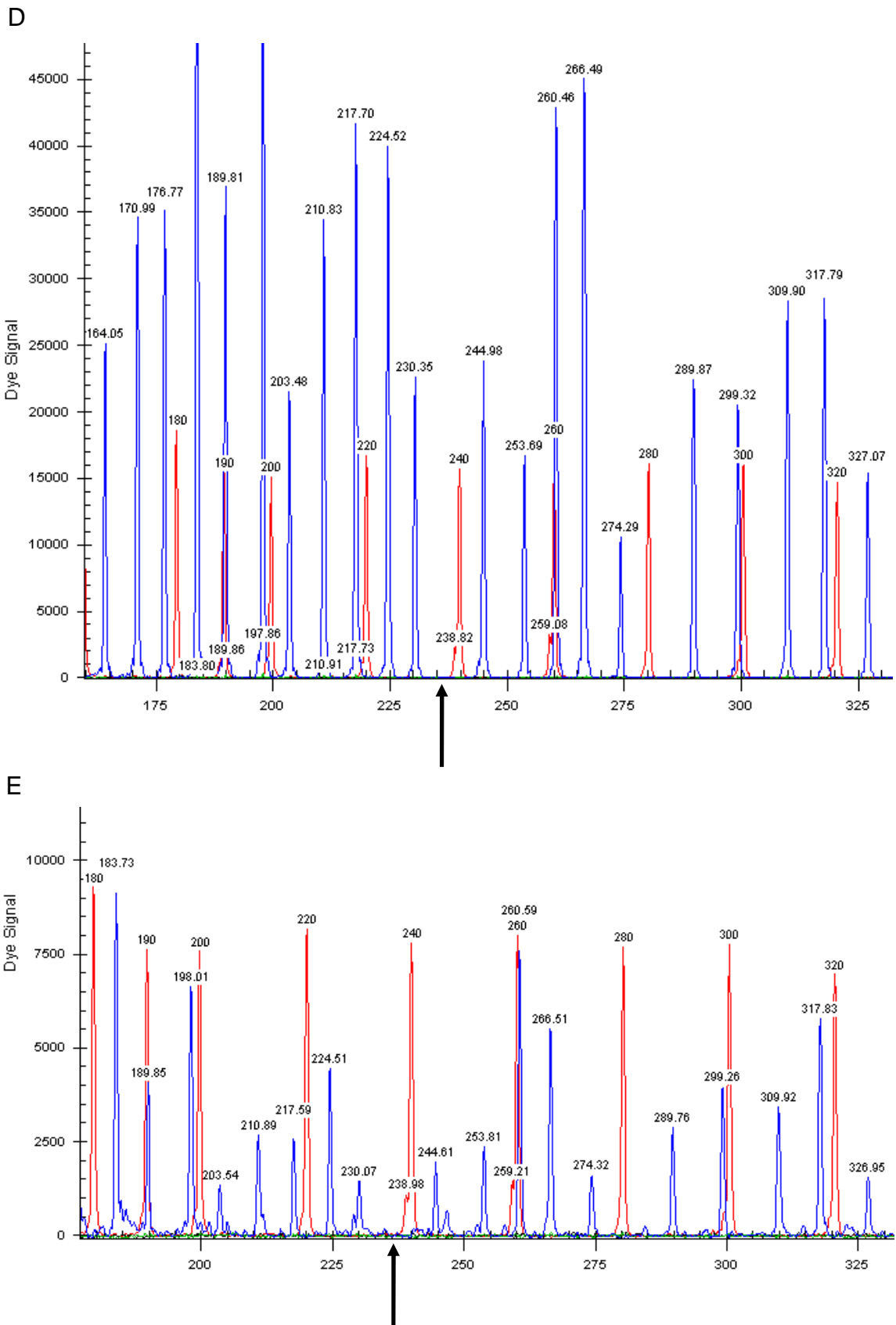
A ausência de amplificação dos 14 exões do *KAL1*, após diversas tentativas, em contraste com o DNA controle, fez-nos suspeitar de uma deleção total deste gene no paciente 6776. Assim, fomos confirmar esta deleção através da técnica de MLPA. Na figura 7, o pico de 237 pb corresponde à sonda do *KAL1*, e é possível observar que a altura do sinal do controlo feminino quase duplica a altura do marcador de 240 pb (pares de bases), indicando a presença de dois alelos. Por comparação visual verifica-se que a mãe possui apenas um alelo com o gene *KAL1*, pois a altura é de aproximadamente metade da que possui o marcador para 240 pb. Já o pai, por ser cariótipo XY possui uma altura de sinal idêntico ao da mãe. Os dois filhos revelaram deleção do gene *KAL1*, uma vez que não se observa qualquer pico correspondente à amostra.



**Figura 7.** Resultado da técnica de MLPA aplicada ao paciente com deleção no gene *KAL1* e restante família. As setas pretas indicam o sinal da amostra para os 237 pb que corresponde à sonda do *KAL1*. A- Controlo feminino, B- Mãe, C- Pai, D- Paciente e E- Irmão.

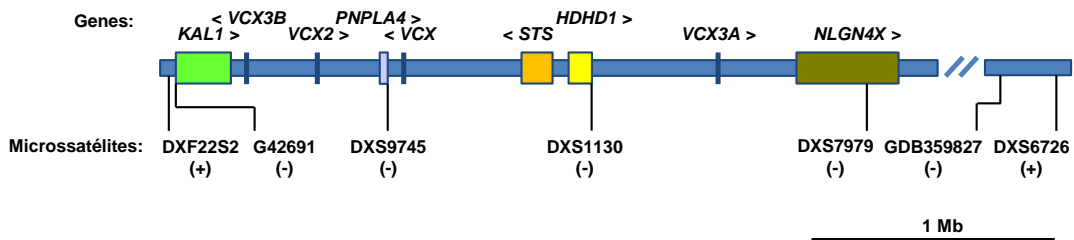


**Figura 7 (Cont.).** Resultado da técnica de MLPA aplicada ao paciente com deleção no gene *KAL1* e restante família. As setas pretas indicam o sinal da amostra para os 237 pb que corresponde à sonda do *KAL1*. A- Controle feminino, B- Mãe, C- Pai, D- Paciente e E- Irmão.



**Figura 7 (Cont.).** Resultado da técnica de MLPA aplicada ao paciente com deleção no gene *KAL1* e restante família. As setas pretas indicam o sinal da amostra para os 237 pb que corresponde à sonda do *KAL1*. A- Controlo feminino, B- Mãe, C- Pai, D- Paciente e E- Irmão.

Com vista à detecção dos limites da deleção, tentaram-se amplificar diversos microssatélites, assim como, outros fragmentos delimitados por *primers* ao longo do cromossoma X. Assumiu-se que, determinada região de DNA estava ausente sempre que não ocorria amplificação do microssatélite/fragmento de DNA e ocorria amplificação do controlo positivo. Deste modo, verificou-se a ausência de diversos genes a partir do *KAL1* em direção ao telómero, nomeadamente os genes *VCX3B*, *VCX2*, *PNPLA4*, *VCX*, *STS*, *HDHD1*, *VCX3A* e o *NLGN4X*, estimando-se um tamanho de deleção entre 4,7 e 5,0 Mb (Figura 8).



**Figura 8.** Localização dos genes deletados (*VCX3B*, *VCX2*, *PNPLA4*, *VCX*, *STS*, *HDHD1*, *VCX3A* e *NLGN4X*) no paciente 6776 e microssatélites usados (DXF22S2, G42691, DXS9745, DXS1130, DXS7979, GDB359827 e DXS6726) para detecção dos limites da deleção. +: presente; -: ausente; Mb: megabase.

### 3.1.2 Variantes patogénicas no gene *FGFR1*

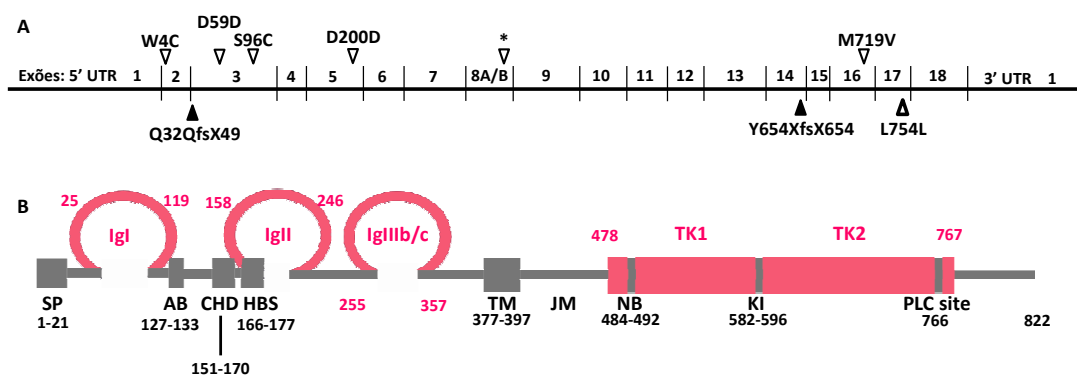
No gene *FGFR1* foram identificadas 12 variantes raras (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que incluem, duas mutações frameshift [c.95dupA (p.P33Afs\*17) e c.1961dupA (p.Y654\*)], quatro missense [c.12G>T (p.W4C); c.287C>G (p.S96C); c.1057G>A (p.A353T) e c.2155A>G (p.M719V)], três sinónimas [c.177C>T (p.D59D); c.600C>T (p.D200D) e c.2262G>A (p.L754L)] e três intrónicas [c.359-4A>G; c.449-25G>C e c.1082-13C>T]. Todas as variantes detetadas, com exceção das alterações *frameshift*, foram submetidas a análise bioinformática. Esta revelou alterações na função proteica em sete variantes, evidenciando efeito patogénico em pelo menos dois dos programas aplicados. Das sete variantes previstas como patogénicas, quatro são missense (W4C, S96C, A353T, M719V) e três são sinónimas (D59D, D200D e L754L). As duas mutações sinónimas D200D e L754L, estão presentes cada uma em dois doentes, o que juntamente com as duas mutações *frameshift* perfaz um total de 11 mutações patogénicas. Das nove variantes distintas, seis são passíveis de promover alterações no padrão de *splicing* (Tabela IV).

Tabela IV. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *FGFR1*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

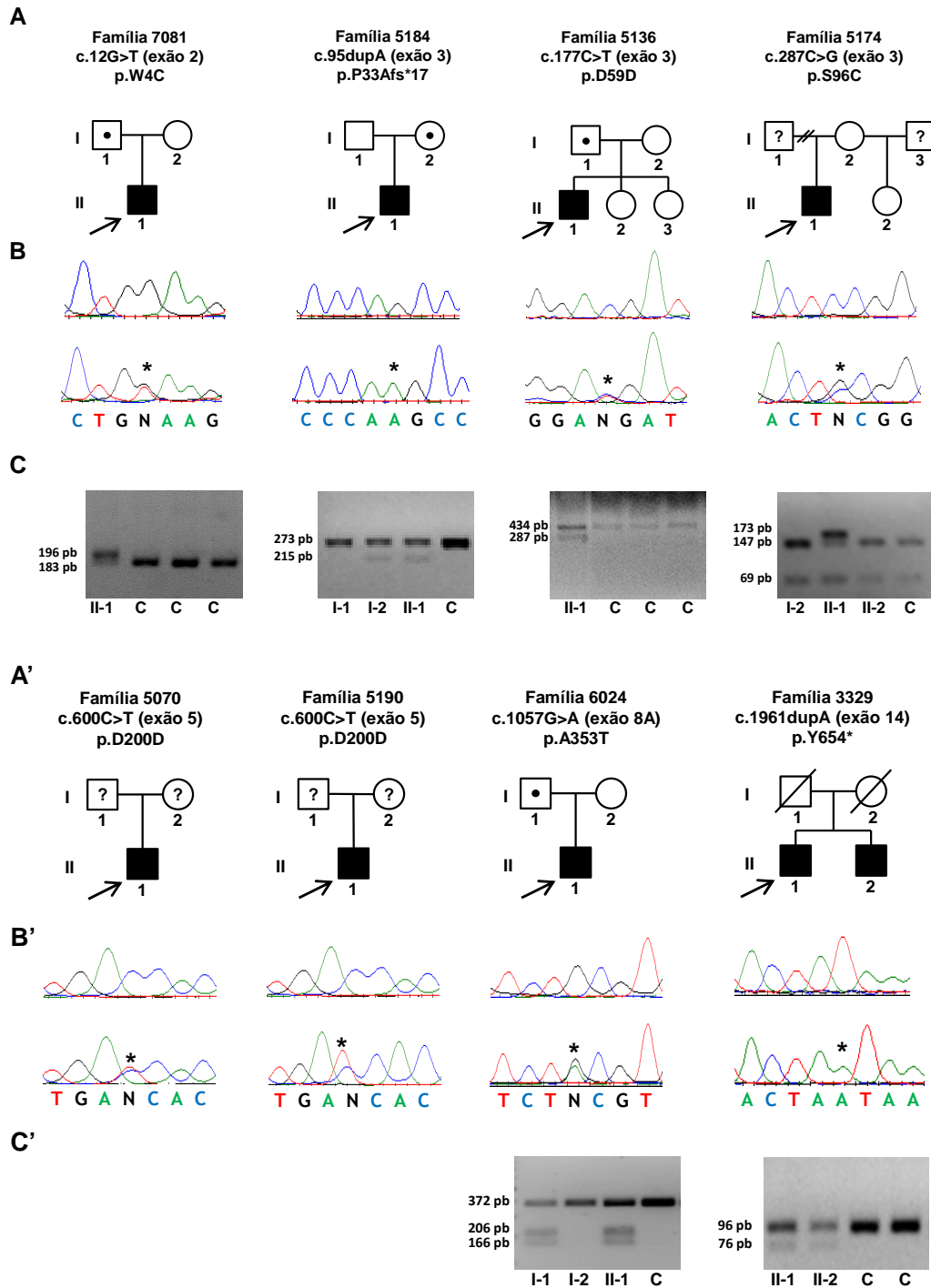
Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.12G>T p.W4C	Damaging (0.005)	Neutral (-1.100)	Possibly damaging (0.635)	Disease causing (0.999)	Activation of an exonic cryptic donor site. Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.177C>T p.D59D	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.287C>G p.S96C	Damaging (0.001)	Deleterious (-3.143)	Probably damaging (0.963)	Disease causing (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.359-4A>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.449-25G>C	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.600C>T p.D200D	Tolerated (0.461)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.1057G>A p.A353T	Damaging (0.004)	Deleterious (-2.808)	Probably damaging (0.999)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.1082-13C>T	-	-	-	Polymorphism (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.2155A>G p.M719V	Damaging (0.001)	Deleterious (-3.378)	Probably damaging (0.995)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.2262G>A p.L754L	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	Activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s). Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mutações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.

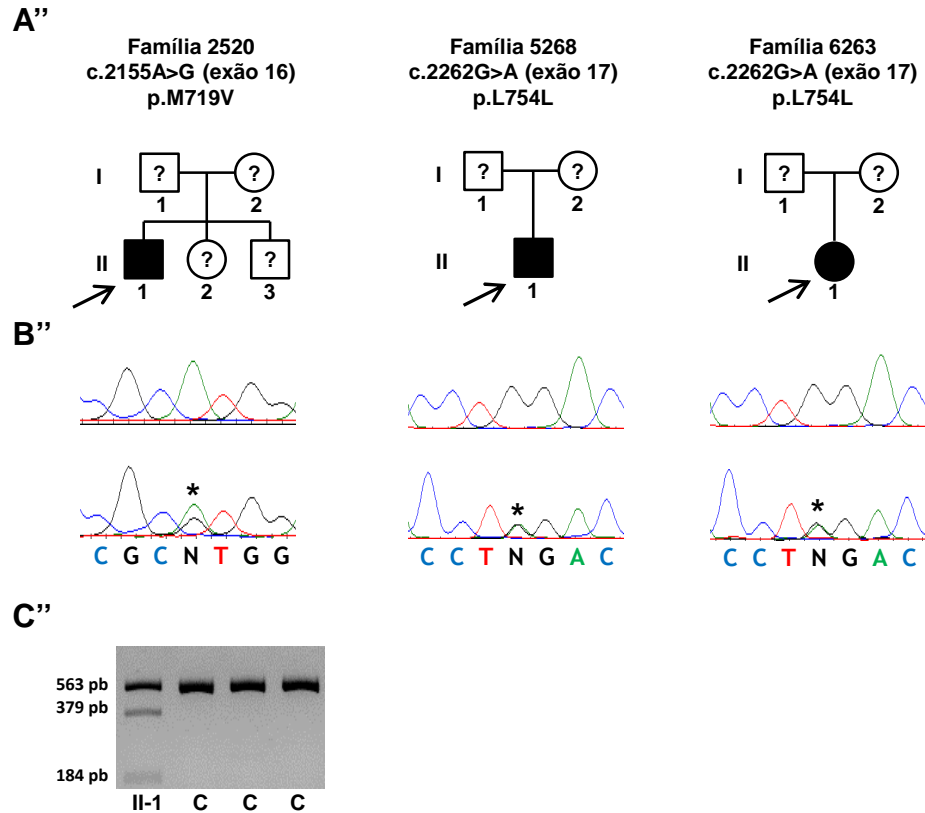
As variantes *frameshift* e *missense* são variantes novas. As variantes P33Afs\*17, S96C e D200D localizam-se no exão 3 e as variantes W4C, D200D, Y654\*, M719V e L754L localizam-se nos exões 2, 5, 14, 16 e 17, respetivamente (Figura 9). Salienta-se ainda que a alteração A353T está presente no exão 8A, resultante de *splicing alternativo*, sendo exclusiva da isoforma IIIb (Figura 9). Para as variantes em que se efetuou o despiste em aproximadamente 200 controlos normais (400 alelos), não foram encontrados mais indivíduos com as mesmas alterações. Verificou-se a existência de penetrância incompleta em pelo menos quatro famílias 7081, 5184, 6024 e 5136 (Figura 10), uma vez que os progenitores possuem a variante, apesar de, aparentemente possuírem um fenótipo normal.



**Figura 9.** Gene *FGFR1* (A) e proteína (B). O domínio extracelular apresenta o péptido sinalizador (SP- aminoácidos: 1-21), três domínios de imunoglobulina (Igl- aminoácidos: 25-119, IglII- aminoácidos: 158-246 e IglIII- aminoácidos: 255-357), uma caixa ácida (AB- aminoácidos: 127-133), domínio homólogo da molécula de adesão celular (CAM) (CHD- aminoácidos: 151-170) e um local de ligação para proteoglicanos de sulfato de heparina (HBS- aminoácidos: 166-177). O domínio intracelular compreende um domínio justamembranar (JM); um domínio tirosina cinase (aminoácidos: 478-767; dois domínios cinase TK1 e TK2- separados por uma pequena inserção cinase (KI- aminoácidos: 582-596), o domínio de ligação nuclear (NB- aminoácidos: 484-492), o local de interação com o PLC gama (PLC- aminoácidos: 766) e um terminal C. Entre os domínios extracelular e intracelular encontra-se o domínio transmembranar (TM- aminoácidos: 377-397). Os triângulos pretos correspondem a mutações *frameshift* enquanto os triângulos brancos correspondem a mutações *missense*. \* Mutação encontrada no exão 8A localizado na isoforma IIIb. Reprodução autorizada, com adaptação (129).



**Figura 10.** Identificação de variantes no gene *FGFR1* em famílias afetadas. A, A', A''- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com SK (famílias 5136, 5174, 3329, 2520, e 5268) ou com HH normósmico (famílias 7081, 5184, 5070, 5190, 6024, e 6263), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos não preenchidos com ponto negro representam familiares não afetados portadores da mutação, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens, círculos simbolizam mulheres e linhas oblíquas sobre os símbolos representam indivíduos falecidos. B, B', B''- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. Todos os pacientes são heterozigóticos para os nucleótidos mutados. No caso das mutações frameshift (famílias 5184 e 3329), apenas está representado o alelo mutado clonado. C, C', C''- Confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (BsrI, PflMI, FoKI, MspI, AclI, AseI e BstUI, respetivamente). As bandas correspondem a familiares representados em A, A' e A'' e controlos normais (C).



**Figura 10 (Cont.).** Identificação de variantes no gene *FGFR1* em famílias afetadas. A, A', A''- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com SK (famílias 5136, 5174, 3329, 2520, e 5268) ou com HH normósmico (famílias 7081, 5184, 5070, 5190, 6024, e 6263), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos não preenchidos com ponto negro representam familiares não afetados portadores da mutação, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens, círculos simbolizam mulheres e linhas oblíquas sobre os símbolos representam indivíduos falecidos. B, B', B''- Análise de sequencição de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. Todos os pacientes são heterozigóticos para os nucleótidos mutados. No caso das mutações frameshift (famílias 5184 e 3329), apenas está representado o alelo mutado clonado. C, C', C''- Confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (BsrI, PflMI, FokI, MspI, AclI, AseI e BstUI, respetivamente). As bandas correspondem a familiares representados em A, A' e A'' e controlos normais (C).

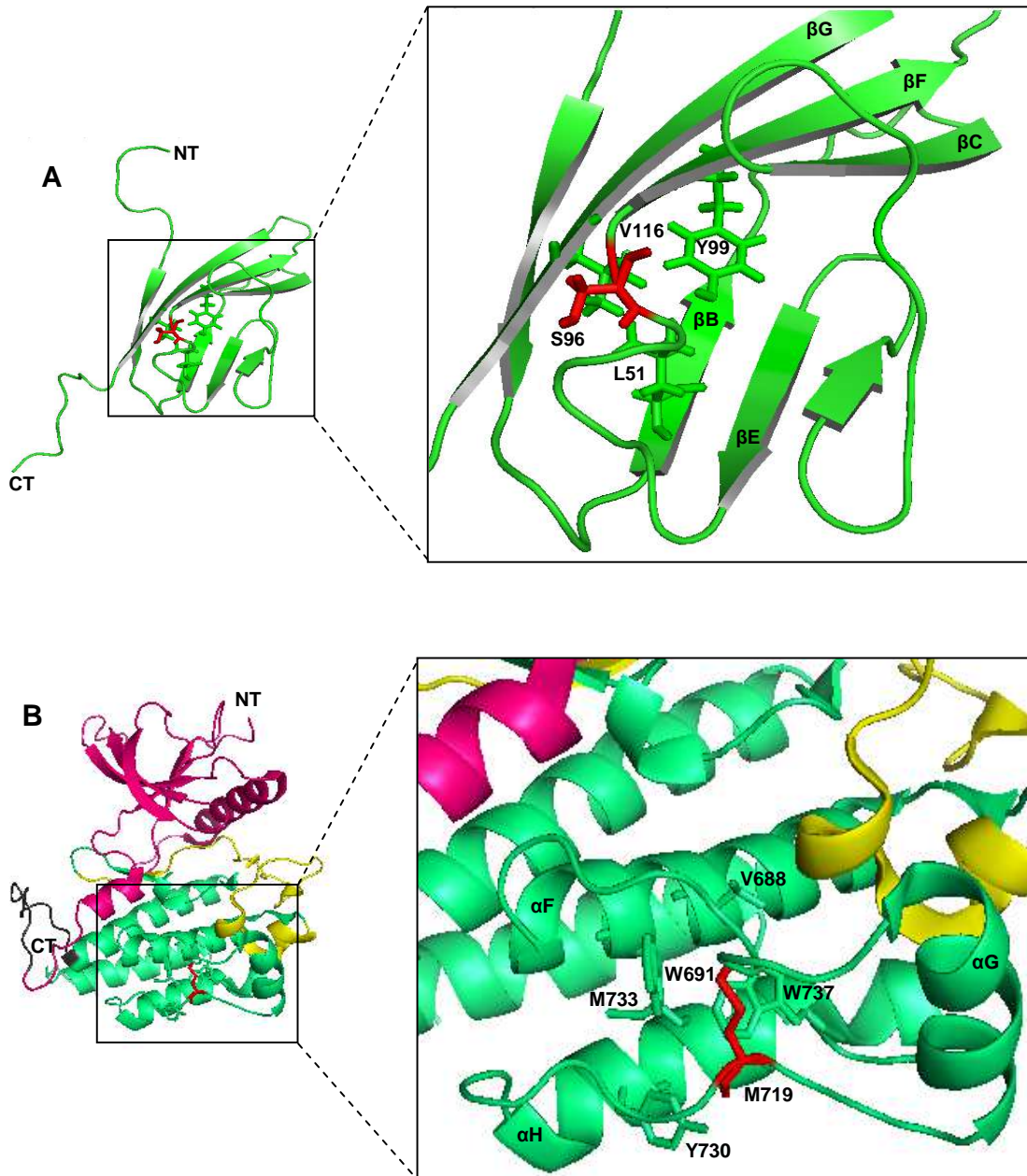
A análise de conservação de seqüências revelou que as variantes W4C, S96C, A353T e M719V ocorrem em aminoácidos que são altamente conservados em diferentes espécies de vertebrados e invertebrados (Tabela V).

Tabela V. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no FGFR1 em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Mutações					
	W4C		S96C		A353T	
	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento
Humano	4	M W S <b>W</b> K C L L F	96	S V P A D <b>S</b> G L Y A C	353	E A N Q S <b>A</b> W L T V T
Mutado	4	M W S <b>C</b> K C L L F	96	S V P A D <b>C</b> G L Y A C	353	E A N Q S <b>T</b> W L T V T
<i>P.troglodytes</i>	4	M W S <b>W</b> K C L L F	96	S V P A D <b>S</b> G L Y A C	353	L S H H S <b>A</b> W L
<i>M.mulatta</i>					263	L S H H S <b>A</b> W L T V L
<i>F.catus</i>	4	M W S <b>W</b> K Y L L L	95	S V P A D <b>S</b> G L Y A C	351	L S H H S <b>A</b> W L T
<i>M.musculus</i>	4	M W G <b>W</b> K C L L F	109	S I P A D <b>S</b> G L Y A C	365	L S H H S <b>A</b> W L T V L
<i>G.gallus</i>			91	A V P E D <b>S</b> G L Y A C	349	I S H H S <b>A</b> W L T V
<i>T.rubripes</i>	4	L W G <b>W</b> A G P V E	98	V E L S D <b>S</b> G L Y A C	349	F S H H S <b>A</b> W L
<i>D.rerio</i>			94	V E P T D <b>S</b> G L Y A C	341	H S H H S <b>A</b> W L T V Y
<i>D.melanogaster</i>					294	Q S N S T <b>A</b> Y L R V V
<i>C.elegans</i>					498	M S M A N <b>A</b> T L T V N
<i>X.tropicalis</i>	4	M F S <b>G</b> R S L L L	95	A G P E D <b>N</b> G V Y T C	348	I S H H S <b>A</b> W L T V

Espécies	Mutações	
	Codão	Alinhamento
		<b>M719V</b>
Humano	719	K E G H R <b>M</b> D K P S N
Mutado	719	K E G H R <b>V</b> D K P S N
<i>P.troglodytes</i>	720	K E G H R <b>M</b> D K P S N
<i>M.mulatta</i>	630	K E G H R <b>M</b> D K P S N
<i>F.catus</i>	718	K E G H R <b>M</b> D K P S N
<i>M.musculus</i>	730	K E G H R <b>M</b> D K P S N
<i>G.gallus</i>	714	K E G H R <b>M</b> D K P S N
<i>T.rubripes</i>	716	<b>M</b> D K P S T
<i>D.rerio</i>	706	K E G H R <b>M</b> D R P S T
<i>D.melanogaster</i>	652	M S G Q R <b>M</b> E K P A K
<i>C.elegans</i>	894	K E G Y R <b>M</b> E P P H L
<i>X.tropicalis</i>	715	K E G H R <b>M</b> D K P T T

As posições das variantes p.S96C e p.M719V foram avaliadas através da estrutura cristalina do FGFR1, respetivamente, do primeiro domínio de imunoglobulina (*Protein Data Bank ID: 2CR3*) e do domínio tirosina cinase (*Protein Data Bank ID: 3GQI*) (Figura 11). O resíduo Ser96 está localizado no interior da região hidrofóbica do domínio imunoglobulina 1 (D1) tendo uma função importante na sua conformação (Figura 11- A). O resíduo M719 está localizado na região da alça que liga as  $\alpha$ -hélices,  $\alpha$ H e  $\alpha$ G, e portanto mantendo a integridade estrutural do domínio tirosina cinase (Figura 11- B). Não foi possível realizar a análise estrutural da variante p.W4C, pois está localizada no péptido sinalizador que não faz parte da proteína madura, nem da variante p.A353T, dado que a estrutura cristalina do domínio imunoglobulina 3 (D3) da isoforma FGFR1-IIIb ainda não está disponível.



**Figura 11.** Mapeamento das mutações *missense* S96C e M719V na estrutura cristalina da proteína FGFR1-IIIc. A- O resíduo S96 (vermelho) está mapeado no domínio imunoglobulina I (D1) estrutura de solução (*Protein Data Bank ID: 2CR3*). D1 está representado a verde. O resíduo S96 situa-se no núcleo hidrofóbico do D1 estabelecendo ligações com os resíduos hidrofóbicos (V116, L51, Y99) e contribuindo para a conformação terciária deste domínio. B- O resíduo mutado M719 está mapeado no domínio tirosina cinase do FGFR1 (*Protein Data Bank ID: 3GQI*). O terminal N (NT) está representado a rosa, a *kinase hinge region* é cinzenta, a alça de ativação é amarela e o terminal C (CT) é verde. O resíduo M719 pertence à alça que conecta com as hélices  $\alpha$ H e  $\alpha$ G, mantendo contacto com aminoácidos hidrofóbicos das hélices  $\alpha$ H e  $\alpha$ F (M733, W691, V688, W737, M719, Y730).

### 3.1.3 Construção de uma base de dados de mutações no gene *FGFR1*

Até agora foram relatadas na literatura 222 mutações no *FGFR1* (incluindo as descobertas no presente estudo), que consistem em 145 mutações distintas e que estão dispersas pela sequência codificadora sem *hotspots* mutacionais. As 222 mutações identificadas no gene *FGFR1* correspondem a 69,4% mutações *missense*, 11,7% *frameshift* (deleções ou inserções), 9,0% mutações *nonsense*, 8,1% mutações que induzem alterações no padrão de *splicing*, 1,8% grandes deleções ou rearranjos, 0,5% deleções *in-frame* (Anexo V).

Aquando da utilização do programa informático *Mutalyzer* (<https://mutalyzer.nl/>) (119) verificámos que algumas mutações não se encontravam bem descritas na publicação original, pelo que procedemos à sua conversão para a nomenclatura correta. Contudo, por vezes, o artigo original não nos fornecia informação suficiente para conseguirmos determinar com exatidão a nomenclatura correta. Como exemplo tem-se a mutação identificada por Bailleul-Forestier et al. (130) c.2069T>G/L690P. Neste caso se a alteração nucleotídica for efetivamente c.2069T>G, então ao nível proteico teremos que ter a alteração de uma leucina no codão 690 para um triptofano (L690W) e não para uma prolina (L690P). No entanto, também podemos considerar que o erro não está no aminoácido mas sim no nucleótido e, desse modo, para obtermos uma prolina terá que existir a alteração no nucleótido 2069 de um T para um C. Esta dificuldade seria ultrapassada se tivéssemos no artigo original uma imagem, por exemplo, da sequenciação em que fosse visível a sequência nucleotídica que abrange a mutação. Nos casos em que não foi possível atribuir a nomenclatura correta, mencionámos que o codão se encontrava discordante relativamente ao número de nucleótido do artigo original e/ou a alteração exata não estava especificada.

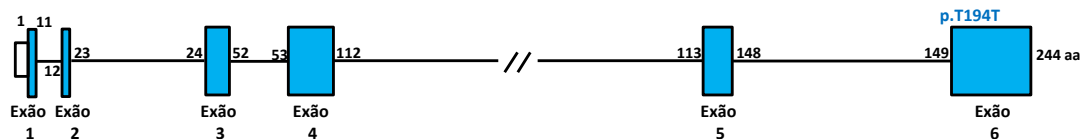
### 3.1.4 Variantes patogénicas no gene *FGF8*

Foram identificadas três variantes raras no gene *FGF8* (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que incluem duas alterações intrónicas [c.32+11C>T e c.445-35C>T] e uma sinónima [c.52G>A (p.T194T)]. Os programas bioinformáticos aplicados a estas variantes, para prognóstico do impacto funcional na proteína, revelaram alterações na função proteica na variante c.582G>A (p.T194T), evidenciando efeito patogénico em dois dos programas aplicados. Esta alteração está localizada no exão 6 e é passível de promover modificações do *splicing* (Tabela VI) (Figura 12). Não foram encontrados mais indivíduos com a mesma alteração no despiste efetuado em 200 controlos normais (Figura 13).

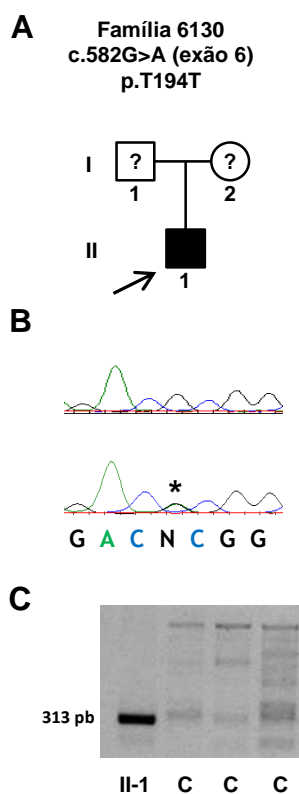
**Tabela VI.** Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *FGF8*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.32+11C>T	-	-	-	Disease causing (1.000)	No significant splicing alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing
c.445-35C>T	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Activation of an intronic cryptic donor site. Potential alteration of splicing.
c.582G>A p.T194T	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mtações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.



**Figura 12.** Localização das variantes no gene *FGF8*. Os exões estão representados com retângulos azuis e o retângulo branco indica uma região não codificante. Os intrões estão representados por linhas pretas.



**Figura 13.** Identificação da variante T194T no gene *FGF8* na família afetada. A- Heredograma da família afetada e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. O símbolo preenchido representa paciente com SK, seta indica caso index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens e círculos simbolizam mulheres. B- Análise de sequenciação de DNA de indivíduo normal (em cima) e paciente (em baixo). A posição da mutação é indicada por um asterisco. O paciente é heterozigótico para o nucleótido mutado. C- Confirmação da mutação por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de *allele-specific* PCR. As bandas correspondem ao paciente representado em A e controlos normais (C).

### 3.1.5 Variantes patogénicas no gene *CHD7*

No gene *CHD7* foram identificadas 27 variantes raras (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que incluem, dez mutações missense [c.307T>A (p.S103T); c.1018A>G (p.M340V\*); c.1163G>A (p.G388E); c.2185A>G (p.K729E); c.2708A>C (p.H903P); c.3245C>T (p.T1082I); c.4354G>T (p.V1452L); c.5561A>G (p.D1854G); c.6194G>A (p.R2065H) e c.7579A>C (p.M2527L)], sete sinónimas [c.1536A>G (p.P512P); c.1677G>A (p.S559S); c.2067G>A (p.T689T); c.4437G>A (p.G1479G); c.6111C>T (p.P2037P); c.6216C>G (p.P2072P) e c.8355C>T (p.A2785A)] e dez intrónicas [c.2239-109G>A; c.2498+70T>A; c.2613+4C>T; c.3523-67A>G; c.5051-4C>T; c.5211-251C>A; c.5404+40G>A; c.5894+32C>G; c.5895-78G>A e c.7830+57C>G].

Todas as variantes foram analisadas com recurso aos programas bioinformáticos. Estes revelaram alterações na função proteica em 16 variantes (p.S103T, p.M340V, p.G388E, p.P512P, p.S559S, p.T689T, p.K729E, p.H903P, p.T1082I, c.5211-251C>A, c.5404+40G>A,

p.D1854G, p.R2065H, p.P2072P, p.M2527L e p.A2785A), evidenciando efeito patogénico com pelo menos dois dos programas aplicados. A variante S103T existe em dois pacientes, o que perfaz um total de 17 variantes detetadas. Das 16 variantes distintas, 14 são passíveis de promover alteração no padrão de *splicing* (Tabela VII).

**Tabela VII.** Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *CHD7*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

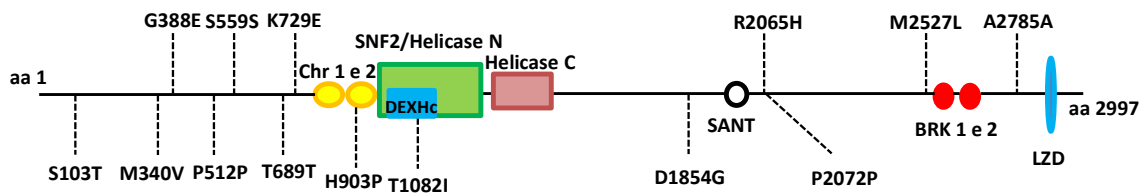
Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.307T>A p.S103T	Damaging (0.011)	Neutral (-1.07)	Benign (0.050)	Disease causing (0.997)	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.1018A>G p.M340V	Tolerated (0.080)	Neutral (-0.42)	Benign (0.000)	Disease causing (0.898)	Activation of an exonic cryptic donor site. Activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s). Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. alteration of splicing.
c.1163G>A p.G388E	Damaging (0.001)	Deleterious (-3.03)	Probably damaging (0.998)	Disease causing (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.1536A>G p.P512P	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.1677G>A p.S559S	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	Activation of an exonic cryptic acceptor site, with presence of one or more cryptic branch point(s). Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.2067G>A p.T689T	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.2185A>G p.K729E	Tolerated (0.333)	Neutral (-0.11)	Probably damaging (0.971)	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.2239-109G>A	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.2498+70T>A	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Alteration of an intronic ESS site. Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.2613+4C>T	-	-	-	Disease causing (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.2708A>C p.H903P	Damaging (0.003)	Deleterious (-6.59)	Probably damaging (0.845)	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.3245C>T p.T1082I	Damaging (0.000)	Deleterious (-5.74)	Probably damaging (1.000)	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.3523-67A>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Alteration of WT Branch Point. Alteration of an intronic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.4354G>T p.V1452L	Tolerated (0.120)	Neutral (-1.65)	Benign (0.053)	Disease causing (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.4437G>A p.G1479G	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.5051-4C>T	-	-	-	Polymorphism (0.906)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.5211- 251C>A	-	-	-	Disease causing (1.000)	Alteration of an intronic ESS site. Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.5404+40G>A	-	-	-	Disease causing (0.999)	Alteration of an intronic ESS site. Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.5561A>G p.D1854G	Damaging (0.007)	Deleterious (-4.09)	Possibly damaging (0.689)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.5894+32C>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.5895-78G>A	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Activation of an intronic cryptic acceptor site. Alteration of an intronic ESS site. Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.6111C>T p.P2037P	-	-	-	Disease causing (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.6194G>A p.R2065H	Damaging (0.011)	Deleterious (-4.67)	Probably damaging (0.990)	Disease causing (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.6216C>G p.P2072P	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.7579A>C p.M2527L	Tolerated (0.998)	Neutral (-0.09)	Benign (0.000)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.

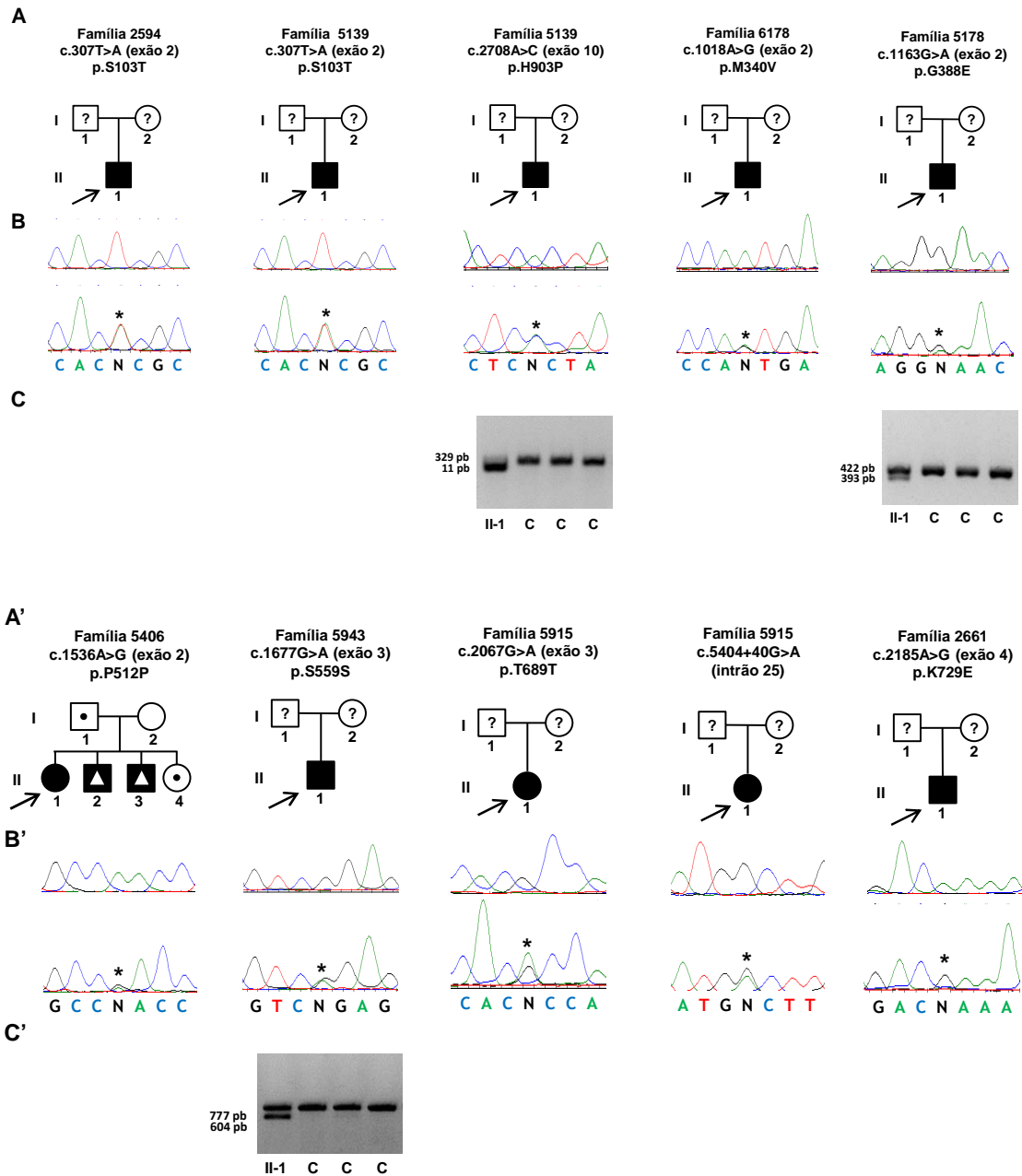
Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.7830+57C>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Creation of an intronic ESE site. Potencial alteration of splicing.
c.8355C>T p.A2785A	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (1.000)	Creation of an exonic ESS site. Potencial alteration of splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mtações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.

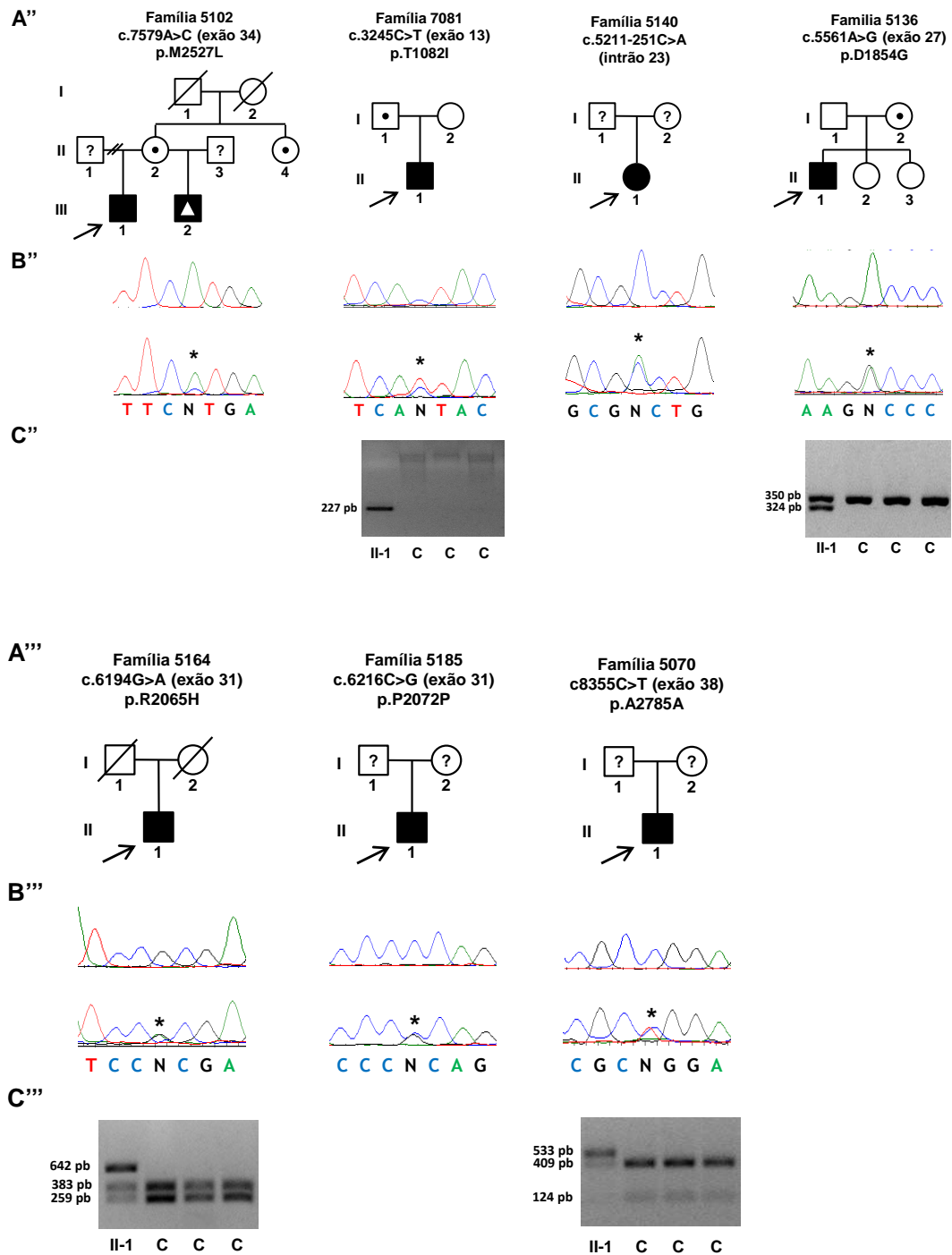
As alterações G388E, S559S, H903P, T1082I, D1854G e R2065H são novas, não estão presentes na população controlo e juntamente com as restantes variantes encontram-se distribuídas ao longo da proteína, não existindo *hot-spots* mutacionais (Figura 14). Também no *CHD7* ocorreram casos de penetrância incompleta nas famílias 5406, 7081 e 5136 (Figura 15).



**Figura 14.** Localização das variantes na proteína codificada pelo gene *CHD7*. Chr 1 e 2- cromodomínio 1 e 2; SNF2/Helicase N- Domínio formado por *Sucrose non fermenting 2* e o terminal N da helicase; DEXHc- *DEAD-like helicase superfamily* incluindo um domínio de ligação do ATP; Helicase C- terminal C da helicase; SANT- domínio de ligação ao DNA; BRK 1 e 2- domínios Brahma e Kismet 1 e 2; LZD- domínio *Leucine Zipper*.



**Figura 15.** Identificação de mutações no gene *CHD7* em famílias afetadas. A, A', A'', A'''- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com SK (famílias 2594, 6178, 5178, 5186, 5140, 5136 e 5164) ou com HH normósmico (famílias 5139, 5406, 5943, 5915, 2661, 5102, 7081, 5185, 5194 e 5070), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos não preenchidos com ponto negro representam familiares não afetados portadores da mutação, símbolos com triângulo no centro representam indivíduos afetados sem a mutação, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens, círculos simbolizam mulheres e linhas oblíquas sobre os símbolos representam indivíduos falecidos. B, B', B'', B'''- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. Todos os pacientes são heterozigóticos para os nucleótidos mutados. C, C', C'', C'''- Confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (HindIII-G388E, MnlI-H903P, RsaI-V1452L, ApaI-D1854G, BstUI-R2065H e MspI-A2785A) e *allele-specific* PCR (Ser559Ser, Thr1082Ile e c.7830+57C>G). As bandas correspondem a familiares representados em A e controles normais (C).



**Figura 15 (Cont.).** Identificação de mutações no gene *CHD7* em famílias afetadas. A, A', A'', A'''- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com SK (famílias 2594, 6178, 5178, 5186, 5140, 5136 e 5164) ou com HH normósmico (famílias 5139, 5406, 5943, 5915, 2661, 5102, 7081, 5185, 5194 e 5070), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos não preenchidos com ponto negro representam familiares não afetados portadores da mutação, símbolos com triângulo no centro representam indivíduos afetados sem a mutação, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens, círculos simbolizam mulheres e linhas oblíquas sobre os símbolos representam indivíduos falecidos. B, B', B'', B'''- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. Todos os pacientes são heterozigóticos para os nucleótidos mutados. C, C', C'', C'''- Confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (HindIII-G388E, MnlI-H903P, RsaI-V1452L, Apal-D1854G, BstUI-R2065H e MspI-A2785A) e *allele-specific* PCR (S559S, T1082I e c.7830+57C>G). As bandas correspondem a familiares representados em A e controlos normais (C).

A análise de conservação revelou que, à exceção da variante G388E, as restantes variantes *missense* ocorrem em aminoácidos que são altamente conservados nas diferentes espécies (Tabela VIII).

Tabela VIII. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no CHD7 em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Mutações					
	S103T		M340V		G388E	
	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento
Humano	103	L A S P H <b>S</b> Q Y H T P	340	T N N T P <b>M</b> N Q S V P	388	P S Q P Q <b>G</b> T Y A S P
Mutado	103	L A S P H <b>T</b> Q Y H T P	340	T N N T P <b>V</b> N Q S V P	388	P S Q P Q <b>E</b> T Y A S P
<i>P.troglodytes</i>	103	L A S P H <b>S</b> Q Y H T P	340	T N N T P <b>M</b> N Q S V P	388	P S Q P Q <b>E</b> T Y A S P
<i>M.mulatta</i>	103	L A S P H <b>S</b> Q Y H T P	340	T N N T P <b>M</b> N Q S V P	388	P S Q P Q <b>E</b> T Y A S P
<i>F.catus</i>						
<i>M.musculus</i>	103	L A S P H <b>S</b> Q Y H T P	334	T N S T P <b>M</b> N Q S V P	382	P S Q P Q <b>E</b> T Y A S P
<i>G.gallus</i>						
<i>T.rubripes</i>						
<i>D.rerio</i>	104	M S S P H <b>S</b> R Y H G A	349	T T S S N <b>S</b> N P N A P	402	A Q P Q <b>G</b> S Y S S P
<i>D.melanogaster</i>						
<i>C.elegans</i>	235	P H <b>S</b> Q Q Q	509	N P <b>Y</b> A Q Q Q Q	544	P H Q H Q <b>Q</b> P A S V P
<i>X.tropicalis</i>	43	I A S P H <b>S</b> Q Y H N T	275	T N N T P <b>M</b> T P S V P	323	P S Q P Q <b>G</b> T Y A S P

Tabela VIII (Cont.). Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no CHD7 em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Mutações					
	K729E		H903P		T1082I	
	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento
Humano	729	N S D L D <b>K</b> T P P P S	903	G E P V T <b>H</b> Y L V K W	1082	F H A I I <b>T</b> T F E M I
Mutado	729	N S D L D <b>E</b> T P P P S	903	G E P V T <b>P</b> Y L V K W	1082	F H A I I <b>I</b> T F E M I
<i>P.troglodytes</i>	729	N S D L D <b>K</b> T P P P S	903	V T <b>H</b> Y L V K W	1082	I <b>T</b> T F E M I
<i>M.mulatta</i>	729	N S D L D <b>K</b> T P P P S	903	V T <b>H</b> Y L V K W	1082	I <b>T</b> T F E M I
<i>F.catus</i>						
<i>M.musculus</i>	719	N S D L D <b>K</b> T P P P S	893	P V I <b>H</b> Y L V K W	1072	I I <b>T</b> T F E M I
<i>G.gallus</i>			141	P V T <b>H</b> Y L V K W	320	F H A I I <b>T</b> T F E M I
<i>T.rubripes</i>						
<i>D.rerio</i>	779	T S D V E <b>K</b> T P P Q S	947	G E L V T <b>L</b> Y L V K W	1126	F H A V I <b>T</b> T F E M I
<i>D.melanogaster</i>	1754	Q S E T V <b>K</b> T E E N S	1962	G E T T K <b>H</b> Y L V K W	2143	F N V L I <b>T</b> T F E M I
<i>C.elegans</i>	958	S D D E D <b>K</b> I D T P A	1135	G Q E F V - - L I K W	1311	I D A L I <b>T</b> T F E T V
<i>X.tropicalis</i>	655	P L D L D <b>K</b> T P P P S	830	G E P V C <b>H</b> Y L V K W	1009	F H A I I <b>T</b> T F E M I

Tabela VIII (Cont.). Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no CHD7 em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Mutações					
	D1854G		R2065H		M2527L	
	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento
Humano	1854	D R E D E <b>D</b> P E Y K P	2065	L L R K I <b>R</b> E Q V L H	2527	L D L L F <b>M</b> S H K R T
Mutado	1854	D R E D E <b>G</b> P E Y K P	2065	L L R K I <b>H</b> E Q V L H	2527	L D L L F <b>L</b> S H K R T
<i>P.troglodytes</i>	1854	D R E D E <b>D</b> P E Y K P	2065	L L R K I <b>R</b> E Q V L H	2527	L D L L F <b>M</b> S H K R T
<i>M.mulatta</i>	1856	D R E D E <b>D</b> P E	2067	L L R K I <b>R</b> E Q V L H	2529	L D L L F <b>M</b> S H K R T
<i>F.catus</i>						
<i>M.musculus</i>	1844	D R E D E <b>D</b> P E Y K P	2055	L L R K I <b>R</b> E Q V L H	2516	L D L L F <b>M</b> S H K R T
<i>G.gallus</i>	1092	D R E D E <b>D</b> P E Y K P	1302	L L R K I <b>R</b> E Q V L H	1766	L D L L F <b>M</b> S H K R T
<i>T.rubripes</i>						
<i>D.rerio</i>	1906	E E E <b>D</b> P E Y K P	2149	L L R R I <b>R</b> E Q V L P	2642	L E L L F <b>M</b> G N K R G
<i>D.melanogaster</i>	2991	K H D D G <b>D</b> E V D D D				
<i>C.elegans</i>						
<i>X.tropicalis</i>	1784	E <b>D</b> P E Y K P	1993	L L R K I <b>R</b> E Q V L N	2455	L D L L F <b>M</b> S N K R T

### 3.1.6 Variantes patogénicas no gene *PROK2*

No gene *PROK2* foram identificadas três variantes raras (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que incluem, duas alterações nas regiões 5' e 3' UTR [c.1-35A>G e c.\*19C>G] e uma sinónima [c.243G>A (p.R81R)]. Os programas bioinformáticos aplicados a estas variantes, para prognóstico do impacto funcional na proteína, revelaram alterações na função proteica da variante sinónima c.243G>A (p.R81R) (Tabela IX), evidenciando efeito patogénico em dois dos programas aplicados. Esta variante é passível de promover alteração no padrão de *splicing* (Tabela IX) e localiza-se no exão 3 (Figuras 16 e 17).

Tabela IX. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *PROK2*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.1-35A>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Activation of an intronic cryptic acceptor site. Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.243G>A p.R81R	Tolerated (1.000)	Neutral (0.00)	-	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.*19C>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Creation of an intronic ESE site. Potential alteration of splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual a ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual a ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mtações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.

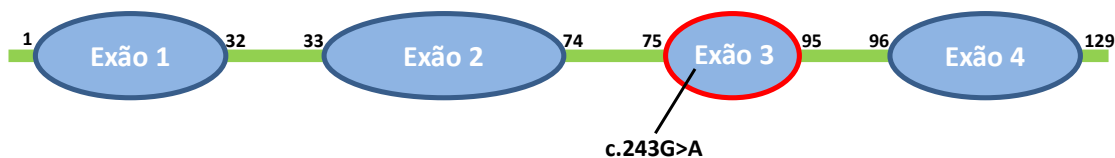
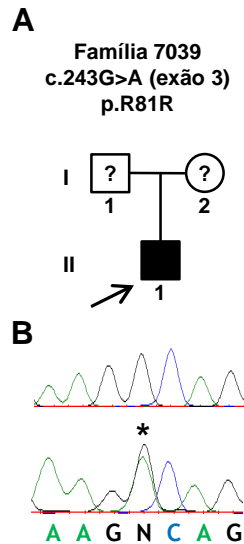


Figura 16. Localização da variante rara no gene *PROK2*. A região vermelha delimita o exão 3 que juntamente com os restantes exões codificam a proteína *PROK2-L*. Após clivagem proteolítica, os aminoácidos codificados pelo exão 3 são removidos, originando a proteína *PROK2*. Os exões 1, 2 e 4 estão representados a azul e a verde estão esquematizados os intrões.



**Figura 17.** Identificação da variante R81R no gene *PROKR2* na família afetada. A- Heredograma da família afetada e nomenclatura da mutação ao nível do nucleótido e da proteína. O símbolo preenchido representa um paciente com SK (família 7039), seta indica caso index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens e círculos simbolizam mulheres. B- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição da mutação é indicada pelo asterisco.

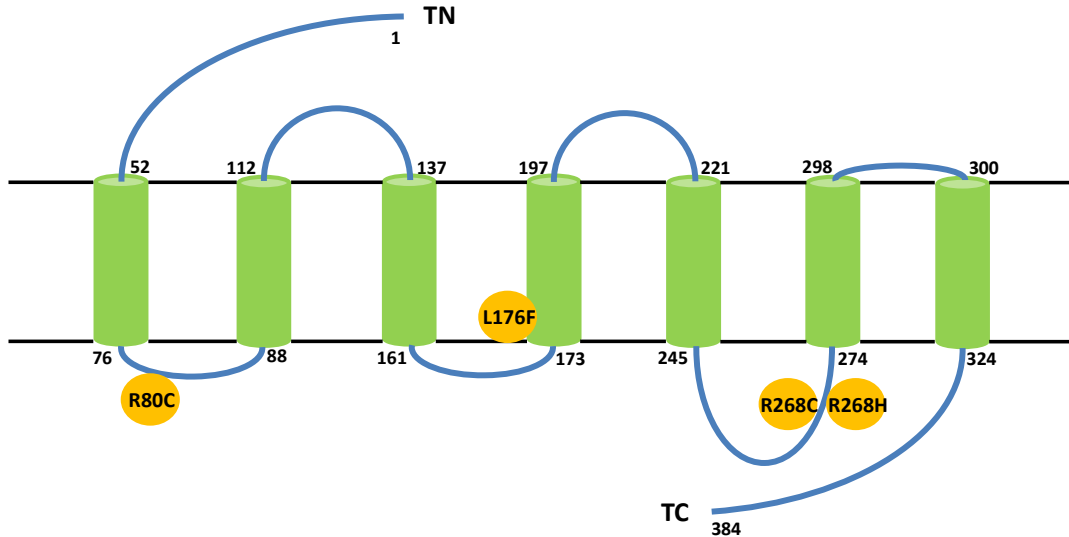
### 3.1.7 Variantes patogénicas no gene *PROKR2*

Foram identificadas no gene *PROKR2* quatro variantes raras (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que consistem em quatro alterações *missense* heterozigóticas: c.238C>T (p.R80C), c.528G>C (p.L176F), c.802C>T (p.R268C) e c.803G>A (p.R268H). Os programas bioinformáticos aplicados a estas variantes, para prognóstico do impacto funcional na proteína, revelaram alterações na função proteica de todas as variantes, evidenciando efeito patogénico em dois dos programas aplicados. A variante R268C existe em dois pacientes, o que perfaz um total de 5 variantes detetadas. Das quatro variantes distintas, três são passíveis de promover alterações no padrão de *splicing* (Tabela X). Localizam-se no primeiro laço intracelular (R80C), no quarto domínio transmembranar (L176F) e no terceiro laço intracelular (R268C e R268H) (Figura 18). As *missense* L176F e R268H são novas, a variante R80C foi descrita por Abreu et al. (79) e a variante R268C foi descrita por Dodé et al. (131). O despiste das variantes R80C, L176F e R268H em aproximadamente 200 controlos normais não revelou mais indivíduos com estas alterações (0 em 400 alelos), já a variante R268C foi detetada em um de 202 controlos saudáveis (Figura 19).

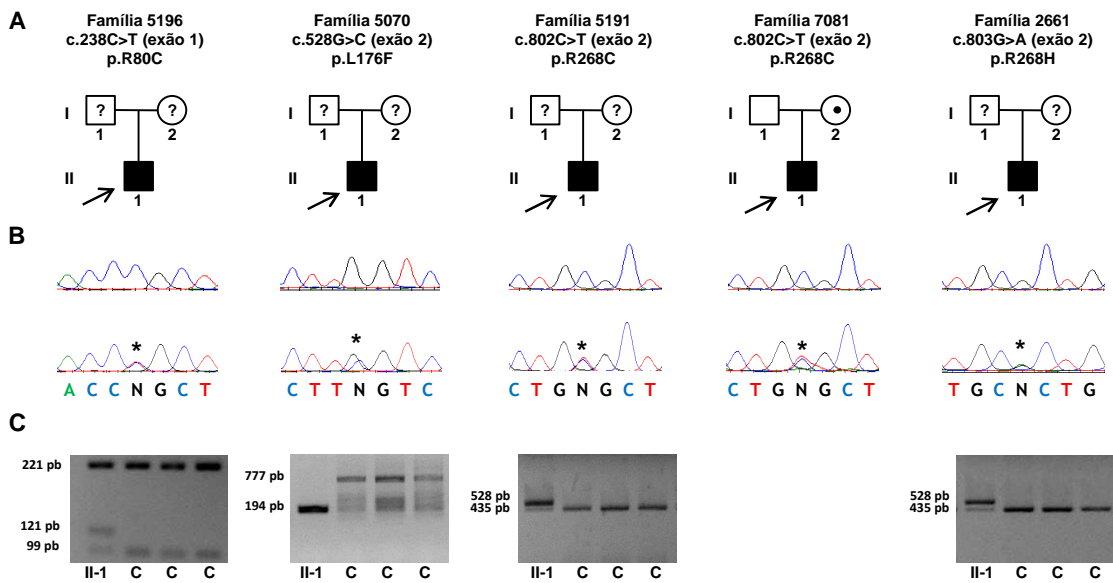
**Tabela X.** Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *PROKR2*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.238C>T p.R80C	Damaging (0.001)	Deleterious (-4.69)	Probably damaging (0.995)	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
c.528G>C p.L176F	Tolerated (0.344)	Neutral (-0.79)	Possibly damaging (0.702)	Disease causing (0.654)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
c.802C>T p.R268C	Damaging (0.001)	Deleterious (-4.55)	Probably damaging (0.956)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.803G>A p.R268H	Damaging (0.006)	Neutral (-1.85)	Possibly damaging (0.888)	Disease causing (0.999)	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mtações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.



**Figura 18.** Localização das variantes raras na proteína codificada pelo gene *PROKR2*. As linhas pretas delimitam a membrana citoplasmática na qual se encontram os sete domínios transmembranares da proteína. Os domínios intra e extracelulares estão representados a azul. TN - Terminal amino e TC - Terminal carboxilo.



**Figura 19.** Identificação de variantes no gene *PROKR2* em famílias afetadas. A- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com HH normósmico (famílias 5196, 5070, 2661 e 7081) ou com SK (família 5191), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos não preenchidos com ponto negro representam familiares não afetados portadores da mutação, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens e círculos simbolizam mulheres. B- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. Todos os pacientes são heterozigóticos para os nucleótidos mutados. C- Confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (*MspI* - R80C e *HhaI* - R268H) e *allele-specific* PCR (L176F). As bandas correspondem a familiares representados em A e controles normais (C).

A análise de conservação revelou que as variantes R80C, R268C e R268H ocorrem em aminoácidos que são altamente conservados entre as diferentes espécies, contudo, a leucina do codão 176, varia nas espécies *T.rubripes*, *D.rerio* e *X.tropicalis* (Tabela XI).

**Tabela XI.** Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no PROKR2 em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Mutações					
	R80C		L176F		R268C	
	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento
Humano	80	I A A L T <b>R</b> Y K K L R	176	S F L I A <b>L</b> V W M V S	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
Mutado	80	I A A L T <b>C</b> Y K K L R	176	S F L I A <b>F</b> V W M V S	268	I R K R L <b>C</b> C R R K T
<i>P.troglodytes</i>	80	I A A L T <b>R</b> Y K K L R	176	S F L I A <b>L</b> V W M V	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>M.mulatta</i>	80	I A A L T <b>R</b> Y K K L R	176	S F L I A <b>L</b> V W M V	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>F.catus</i>	80	I A A L A <b>R</b> C K K L R	176	X X X X X <b>X</b> X X X X	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>M.musculus</i>	77	I A A L A <b>R</b> Y K K L R	173	S F L I A <b>L</b> V W M V	265	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>G.gallus</i>						
<i>T.rubripes</i>	78	I A T L T <b>R</b> Y K K L R	174	Y C L I T <b>G</b> V W I F P	269	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>D.rerio</i>	84	I A T L A <b>R</b> Y K K L R	180	Y C L I T <b>G</b> V W V V P	272	I R K R L <b>R</b> C R R
<i>D.melanogaster</i>						
<i>C.elegans</i>						
<i>X.tropicalis</i>	74	<b>R</b> Y K K L R	170	S F L I G <b>S</b> V W I V S	262	I R K R L <b>R</b> C R R K T

**Tabela XI (Cont.).** Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no PROKR2 em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Mutação	
	Codão	Alinhamento
Humano	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
Mutado	268	I R K R L <b>H</b> C R R K T
<i>P.troglodytes</i>	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>M.mulatta</i>	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>F.catus</i>	268	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>M.musculus</i>	265	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>G.gallus</i>		
<i>T.rubripes</i>	269	I R K R L <b>R</b> C R R K T
<i>D.rerio</i>	272	I R K R L <b>R</b> C R R
<i>D.melanogaster</i>		
<i>C.elegans</i>		
<i>X.tropicalis</i>	262	I R K R L <b>R</b> C R R K T

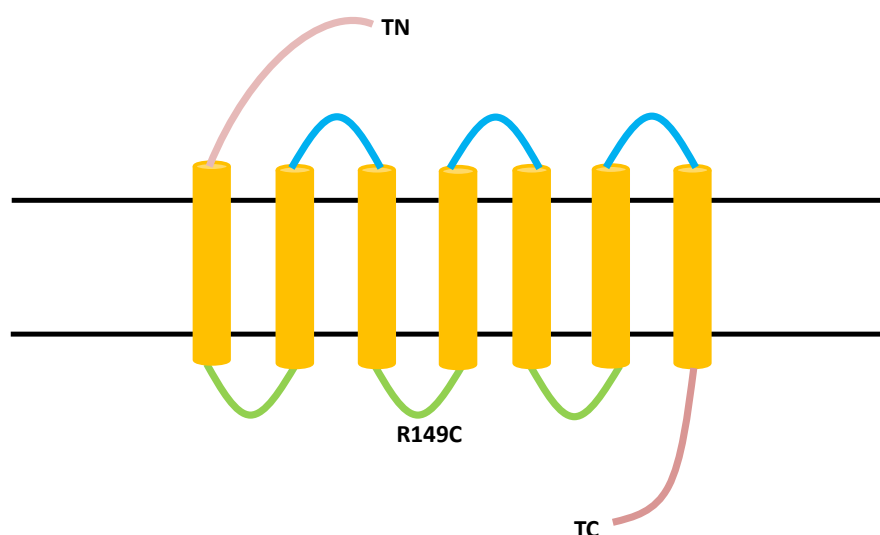
### 3.1.8 Variantes patogénicas no gene *KISS1R*

No gene *KISS1R* foi apenas identificada uma variante rara (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que consiste numa mutação *missense* heterozigótica c.445C>T (p.Arg149Cys). Os programas bioinformáticos aplicados a esta variante, para prognóstico do impacto funcional na proteína, revelaram alterações na função proteica da mesma, evidenciando efeito patogénico com quatro dos programas aplicados. Esta variante é passível de promover modificações no padrão de *splicing* (Tabela XII) (Figura 20), é nova e não foi detetada num grupo de controlos saudáveis (0 em 402 alelos) (Figura 21).

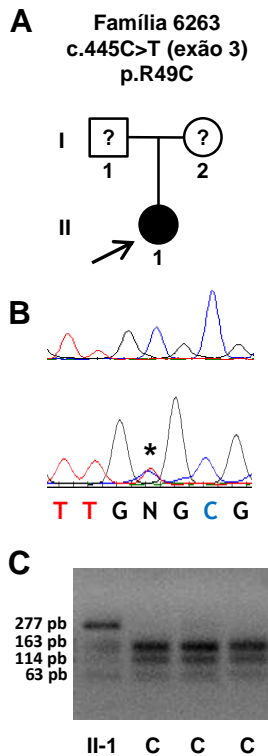
**Tabela XII.** Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *KISS1R*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.445C>T p.R149C	Damaging (0.002)	Deleterious (-5.99)	Benign (0.189)	Disease causing (0.999)	Activation of an exonic cryptic donor site. Potential alteration of splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “damaging” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “tolerated” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “deleterious”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “neutral”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “probably damaging” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “possibly damaging” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mtações são classificadas como “benign”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.



**Figura 20.** Localização da variante rara R149C na proteína codificada pelo gene *KISS1R*. As linhas pretas delimitam a membrana citoplasmática na qual se encontram a laranja os sete domínios transmembranares. A azul identificam-se os domínios extracelulares, a verde os domínios intracelulares e a rosa os terminais amino (TN) e carboxilo (TC).



**Figura 21.** Identificação da variante R149C no gene *KISS1R*. A- Heredograma da família afetada e nomenclatura da mutação ao nível do nucleótido e da proteína. O símbolo preenchido representa um paciente com HH normósico, seta indica caso index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens e círculos simbolizam mulheres. B- Análise de sequenciação de DNA de indivíduo normal (em cima) e paciente (em baixo). A posição da mutação é indicada por um asterisco. O paciente é heterozigótico para o nucleótido mutado. C- Confirmação da mutação por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de restrição enzimática com BstUI. As bandas correspondem ao paciente representado em A e controlos normais (C).

A análise de conservação revelou que a variante R149C ocorre num aminoácido que não é altamente conservado nas diferentes espécies (Tabela XIII).

**Tabela XIII.** Conservação evolutiva do aminoácido mutado no *KISS1R* em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

Espécies	Codão	Mutação
		R149C
		Alinhamento
Humano	149	T V F P L <b>R</b> A L H R R
Mutado	149	T V F P L <b>C</b> A L H R R
<i>P.troglodytes</i>	149	T V F P L <b>R</b> A L H R R
<i>M.mulatta</i>		
<i>F.catus</i>		
<i>M.musculus</i>	149	T V F P L <b>R</b> A L H R R
<i>G.gallus</i>		
<i>T.rubripes</i>	153	T V Y P L <b>K</b> S L R H R
<i>D.rerio</i>	149	T V Y P L <b>Q</b> S L H H R
<i>D.melanogaster</i>	145	V V H P I <b>R</b> S R M M R
<i>C.elegans</i>	149	V V Y P V <b>E</b> S M T L R
<i>X.tropicalis</i>	149	T V Y P L <b>Q</b> S L R Q R

### 3.1.9 Variantes patogénicas no gene *TAC3*

No gene *TAC3*, conforme é possível observar no Anexo IV, apenas foi detetada uma alteração no DNA, que se encontra descrita no *Ensembl* com uma frequência de 11,6% pelo que se considera não ter efeito patogénico.

### 3.1.10 Variantes patogénicas no gene *TACR3*

Os programas bioinformáticos aplicados às duas variantes raras no gene *TACR3* (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), para prognóstico do impacto funcional na proteína, não revelaram alterações na função proteica, tendo em conta a exigência de critérios definidos (patogenicidade em pelo menos dois programas) (Tabela XIV).

Tabela XIV. Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *TACR3*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.738-82A>G	-	-	-	Polymorphism (0.999)	Activation of an intronic cryptic donor site. Potential alteration of splicing.
c.1345G>A p.A449T	Tolerated (1.000)	Neutral (0.62)	Benign (0.000)	Polymorphism (0.999)	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.

<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mtações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.

### 3.1.11 Variantes patogénicas no gene *GNRH1*

As variantes encontradas no gene *GNRH1* [c.47G>C; c.141+40T>G e c.141+85A>G] estão descritas com uma frequência superior a 1% (Anexo IV) pelo que se considera não possuírem efeito patogénico.

### 3.1.12 Variantes patogénicas no gene *GNRHR*

No gene *GNRHR* foram identificadas quatro variantes raras (com uma frequência inferior a 1%- Anexo IV), que incluem uma missense [c.401T>G (p.V134G) em heterozigotia, uma missense [c.847T>C (p.Y283H)] em homozigotia e uma mutação heterozigótica composta constituída por uma missense [c.317A>G (p.Q106R)] e uma frameshift [c.937\_947delTTTTTAAACCC (p.F313Mfs\*3)]. Os programas bioinformáticos aplicados às três variantes missense, para prognóstico do impacto funcional na proteína, revelaram alterações na função proteica nas 3 variantes, evidenciando efeito patogénico com todos os programas aplicados (Tabela XV).

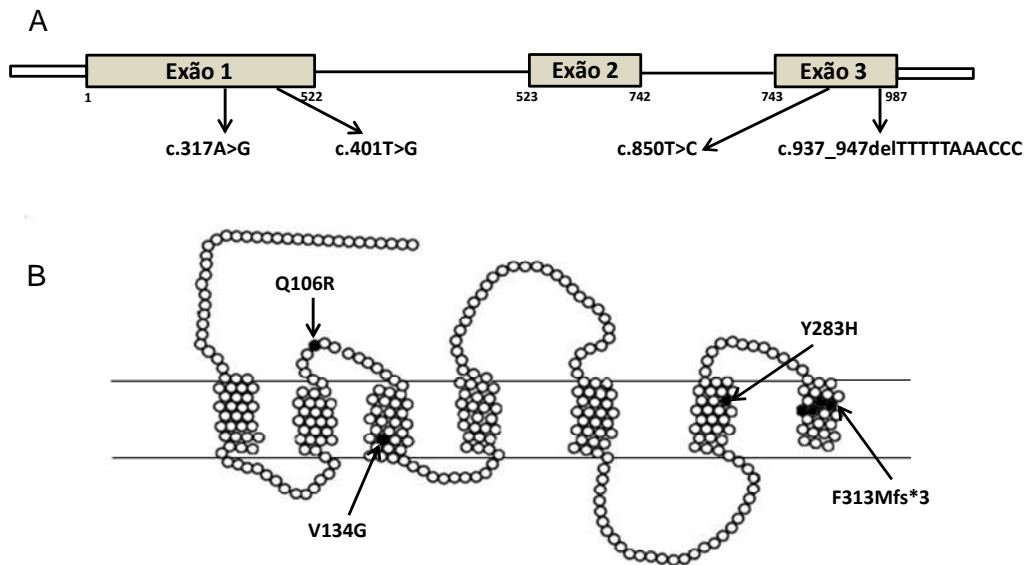
**Tabela XV.** Previsão do impacto funcional das variantes encontradas no gene *GNRHR*, usando diferentes ferramentas de bioinformática.

Mutação	Sift <sup>a</sup>	Provean <sup>b</sup>	PolyPhen <sup>c</sup>	Mutation Taster <sup>d</sup>	Human Splicing Finder
c.317A>G p.Q106R	Damaging (0.001)	Deleterious (-3.66)	Probably damaging (0.992)	Disease causing (0.999)	Activation of an exonic cryptic donor site. Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.401T>G p.V134G	Damaging (0.015)	Deleterious (-5.91)	Possibly damaging (0.666)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
c.847T>C p.Y283H	Damaging (0.000)	Deleterious (-4.373)	Probably damaging (0.999)	Disease causing (0.999)	Creation of an exonic ESS site. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.

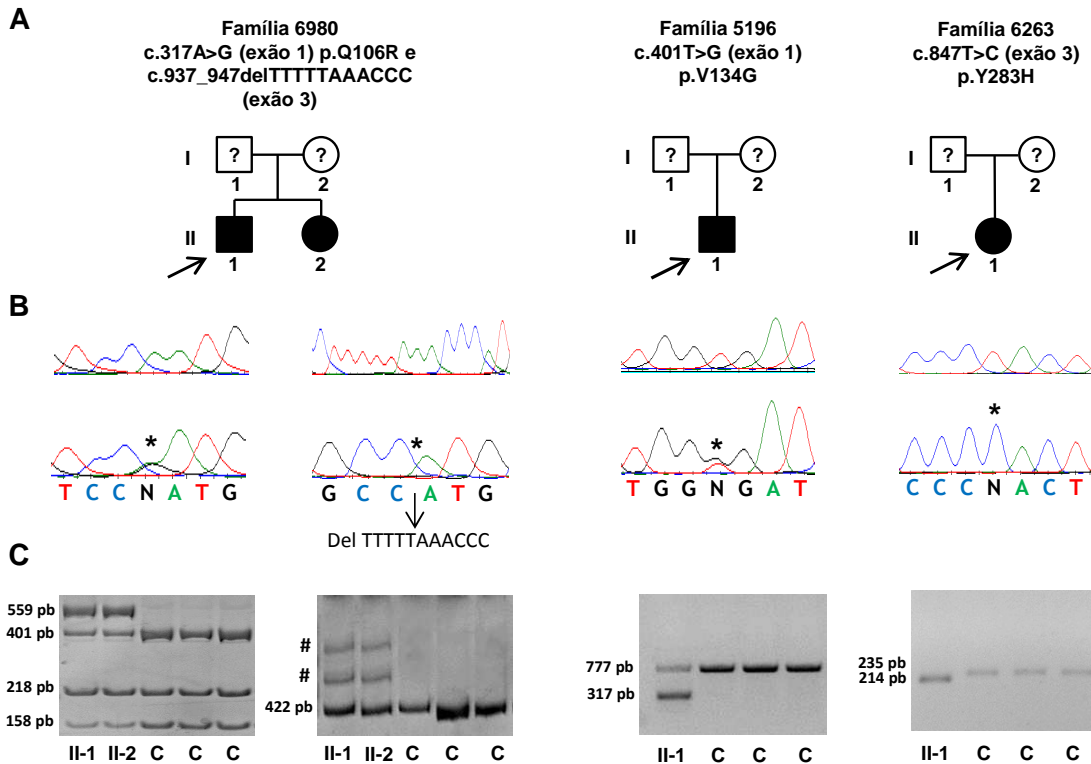
<sup>a</sup> O resultado do programa é um valor que varia de 0 a 1. A alteração do aminoácido tem uma previsão de “*damaging*” se o valor for igual ou inferior a 0.05, e “*tolerated*” se o valor for superior a 0.05; <sup>b</sup> Se o resultado for igual ou inferior a -2.5, prevê-se que a variante proteica tenha um efeito “*deleterious*”, se o valor for acima deste limite, prevê-se que a variante tenha um efeito “*neutral*”; <sup>c</sup> A mutação é classificada como “*probably damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.85, “*possibly damaging*” se o valor probabilístico for superior a 0.15 e as restantes mutações são classificadas como “*benign*”; <sup>d</sup> O valor de probabilidade é a probabilidade da previsão, um valor próximo de 1 indica um elevado grau de segurança da previsão.

As variantes localizam-se no primeiro laço extracelular (Q160R), no terceiro domínio transmembranar (V134G), no sexto domínio transmembranar (Y283H) e no sétimo domínio transmembranar (F313Mfs\*3) (Figura 22). A alteração Y283H detetada em homozigotia foi descrita anteriormente em heterozigotia por Beneduzzi et al. (132), e a variante Q106R foi detetada por de Roux et al. (101) também em heterozigotia. As quatro variantes foram

despistadas num grupo de aproximadamente 200 controlos saudáveis (400 alelos) e apenas a alteração Q106R surgiu em dois casos de 219 controlos (2 em 438 alelos- 0.5%) (Figura 23).



**Figura 22.** Gene *GNRHR* e proteína. A, Localização das mutações no gene, os retângulos brancos correspondem às regiões 5' e 3' UTR, retângulos cinzentos representam os exões e linhas pretas representam os intrões. B, Localização das mutações na proteína. Reprodução autorizada, com adaptação.(103).



**Figura 23.** Identificação de mutações no gene *GNRHR* em famílias afetadas. A- Heredogramas das famílias afetadas e nomenclatura das mutações ao nível do nucleótido e da proteína. Os símbolos preenchidos representam pacientes com HH normósico (famílias 6980, 5196 e 6263), setas indicam casos index, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens e círculos simbolizam mulheres. B- Análise de sequenciação de DNA de indivíduos normais (em cima) e pacientes (em baixo). A posição das mutações é indicada por asteriscos. A paciente da família 6263 é homocigótica para o nucleótido mutado e os restantes são heterocigóticos. No caso da mutação frameshift (família 6980), apenas está representado o alelo mutado clonado. C- Confirmação das mutações por electroforese em gel de acrilamida dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (*XcmI*-Q106R) e PCR (c.937\_947delTTTTTAAACCC) e confirmação das mutações por electroforese em gel de agarose dos fragmentos resultantes de digestão enzimática (*BsrI*-Y283H) e *allele-specific* PCR (V134G). As bandas correspondem a familiares representados em A e controlos normais (C). # Fragmento de heteroduplex.

A análise de conservação revelou que as variantes Q106R e Y283H ocorrem em aminoácidos que são altamente conservados entre as diferentes espécies, contudo, a valina do codão 134, varia nas espécies *D.melanogaster* e *C.elegans* (Tabela XVI).

Tabela XVI. Conservação evolutiva dos aminoácidos mutados no GNRHR em diferentes espécies, usando o *Mutation Taster*.

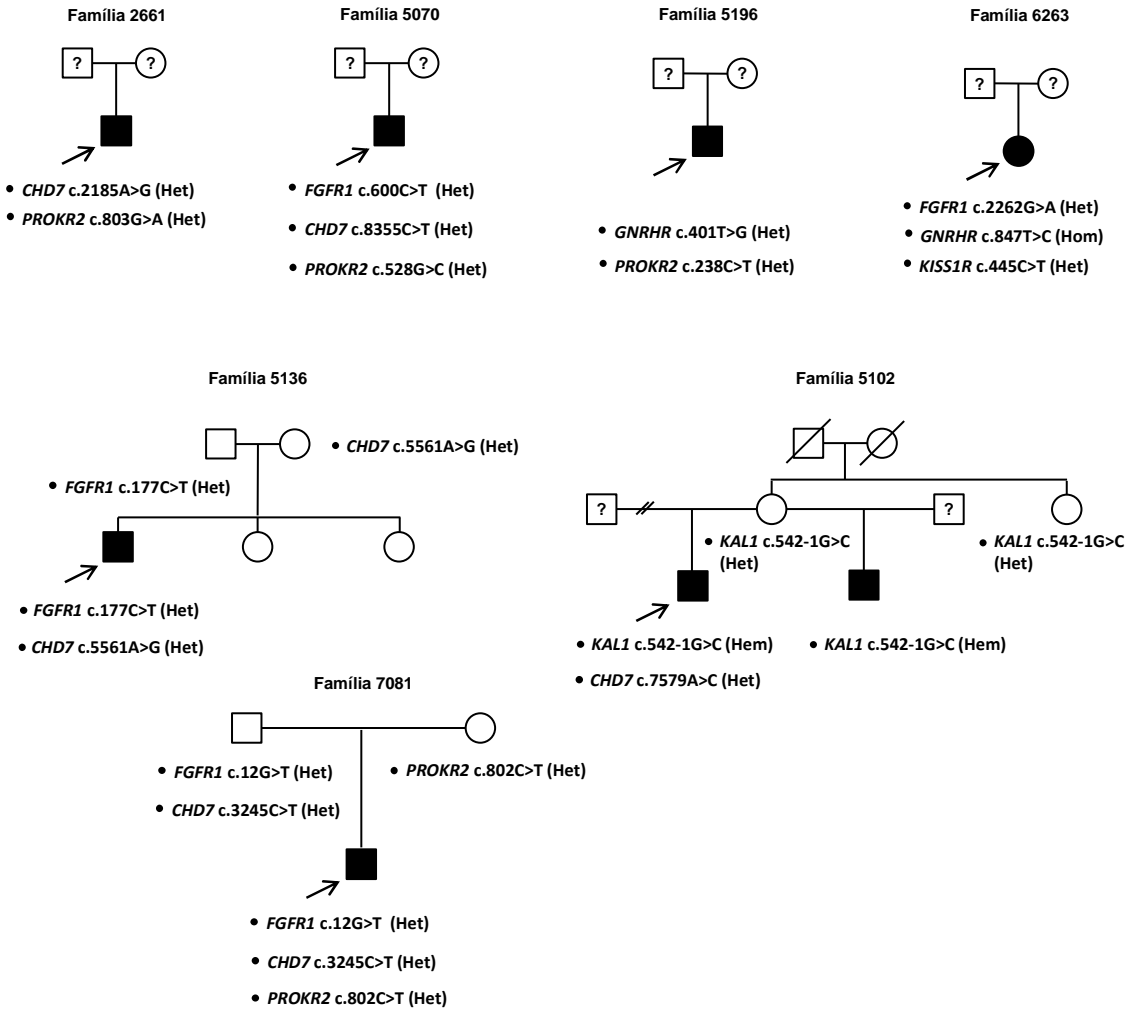
Espécies	Mutações					
	Q106R		V134G		Y283H	
	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento	Codão	Alinhamento
Humano	106	W N I T V <b>Q</b> W Y A G E	134	A F M M V <b>V</b> I S L D R	283	V C W T P <b>Y</b> Y V L G I
Mutado	106	W N I T V <b>R</b> W Y A G E	134	A F M M V <b>G</b> I S L D R	283	V C W T P <b>H</b> Y V L G I
<i>P.troglodytes</i>	106	W N I T V <b>Q</b> W Y A G E	134	A F M M V <b>V</b> I S L D R	283	V C W T P <b>Y</b> Y V L G I
<i>M.mulatta</i>	106	W N I T V <b>Q</b> W Y A G E	134	A F M M V <b>V</b> I S L D R	283	V C W T P <b>Y</b> Y V L G I
<i>F.catus</i>						
<i>M.musculus</i>	106	W N I T V <b>Q</b> W Y A G E	134	A F M M V <b>V</b> I S L D R	282	V C W T P <b>Y</b> Y V L G I
<i>G.gallus</i>						
<i>T.rubripes</i>						
<i>D.rerio</i>						
<i>D.melanogaster</i>	190	W C Y T V <b>Q</b> W L A N E	218	T Y V L V <b>L</b> I G V D R	373	I C W T P <b>Y</b> Y V M M I
<i>C.elegans</i>	86	H N Y M V <b>A</b> W F A G D	114	M N V L I <b>C</b> I T L D R	269	F C W T P <b>Y</b> S I L M F
<i>X.tropicalis</i>						

### 3.2 Variantes privadas previstas como não patogênicas

Para além das variantes patogênicas identificadas nos diversos genes e anteriormente mencionadas, foram detetadas outras variantes que apesar de não passarem nos critérios de patogenicidade estabelecidos, não foram ainda descritas na literatura existente ou nas bases de dados existentes (*FGF8*: c.32+11C>T; *CHD7*: V1452L, c.7830+57C>G e c.2613+14C>T; *PROK2*: c.1-35A>G).

### 3.3 Variantes oligogénicas

Dos 50 pacientes estudados sete (14%) exibem oligogenia, uma vez que possuem variantes raras em mais do que um gene. Destes sete pacientes, quatro possuem alterações em dois genes diferentes (digenia) e três em três genes diferentes (trigenia) (Figura 24).



**Figura 24.** Representação das sete famílias com mutações oligogénicas. Destas, as famílias 5070, 6263 e 7081 possuem variantes em três genes distintos. As setas indicam os casos index, símbolos com preenchimento representam indivíduos afetados, símbolos sem preenchimento representam familiares não afetados, símbolos sem preenchimento com um ponto de interrogação representam indivíduos não estudados, quadrados simbolizam homens, círculos simbolizam mulheres e linhas oblíquas sobre os símbolos representam familiares falecidos.

## 4. Discussão

---

## 4.1 Análise de mutações em pacientes com HHI

No presente trabalho identificaram-se 43 variantes consideradas patogênicas. Dado que alguns doentes partilhavam a mesma mutação, o total de variantes diferentes foi de 39. Destas 39, 18 são novas, uma vez que ainda não se encontram descritas na literatura. As variantes foram detetadas em 30 dos 50 pacientes em estudo, a que corresponde uma frequência de causas genéticas identificadas de 60%. Este valor é superior ao obtido em outros trabalhos, nos quais foram identificadas causas genéticas em aproximadamente 30% dos pacientes com HHI (28, 133-135). Esta discrepância de valores poderá dever-se ao fato de no presente estudo ter sido analisado um elevado número de genes, que possibilitou a descoberta de um maior número de mutações, incluindo o *CHD7*, que por ser um gene muito extenso (38 exões) nem sempre é alvo de estudo na investigação dos pacientes. Um outro motivo que poderá ter contribuído para a elevada percentagem de mutações encontradas foi o rigor na seleção dos doentes, reduzindo assim a probabilidade de inclusão de fenocópias.

As variantes foram identificadas com diferentes frequências dependendo do gene, *KAL1* (7%), *FGFR1* (25,6%), *FGF8* (2,3%), *CHD7* (39,5%), *PROK2* (2,3%), *PROKR2* (11,6%), *KISS1R* (2,3%) e *GNRHR* (9,3%). Das variantes identificadas, 23 são *missense* (53,5%) e 15 podem provocar alterações no padrão de *splicing* (34,9%). Detetámos ainda uma *nonsense* (2,3%), uma grande deleção (2,3%) e três *frameshift* (7%).

Desde sempre que o grande foco dos investigadores tem sido as mutações que alteram a sequência de aminoácidos (mutações *missense*), uma vez que permitem clarificar o papel de cada aminoácido na proteína. Contudo, outros tipos de alterações genéticas podem afetar gravemente a expressão ou estrutura da proteína codificada (136). São exemplos: as alterações sinónimas nas regiões codificantes, que não alteram a composição em aminoácidos das proteínas e por isso designadas como silenciosas; as mutações nas regiões intrónicas, e nas regiões 3' e 5' UTR (regiões não traduzidas); e mutações em outras regiões não codificadoras que também não alteram a sequência aminoacídica (136). Durante a última década, surgiram provas de que as mutações sinónimas podem resultar no *splicing* anormal de mRNA (137, 138); podem afetar a estabilidade do mRNA e logo a expressão da proteína e sua atividade (139); e podem afetar a conformação das proteínas com consequências funcionais e manifestações clínicas (140, 141). Existem diversos mecanismos que explicam como as mutações sinónimas podem alterar os níveis de proteínas e a sua conformação. A presença destas mutações no RNA transcrito pode inviabilizar o correto funcionamento de uma das proteínas de regulação do *splicing*, que não reconhece os limites exónicos, promovendo o "exon skipping". O *exon skipping* origina mRNAs truncados, que podem produzir proteínas não funcionais. As mutações sinónimas podem ainda influenciar os níveis proteicos alterando a degradação de mRNA, ou seja, produzem mRNA com estruturas secundárias menos estáveis que levam a uma degradação maior do mesmo e, conseqüentemente, a menores níveis

proteicos. Contudo, perto do codão de iniciação, a estabilidade local das estruturas do mRNA controla os níveis de proteína através da iniciação da tradução, ou seja, estruturas muito estáveis nesta região acabam por impedir a tradução, resultando em menores níveis proteicos. As alterações sinónimas podem também afetar a cinética da tradução levando, quer à diminuição da taxa de síntese da proteína, quer ao enrolamento incorreto desta, resultando em proteotoxicidade (136). De acordo com Tsai et al. (141), as mutações sinónimas, mesmo não apresentando alteração de aminoácido, podem afetar a conformação da proteína. As hélices- $\alpha$ , que adquirem uma conformação rápida na proteína, possuem menos codões raros que as folhas- $\beta$ , que adquirem uma conformação mais lenta. Do mesmo modo, os genes mais complexos, que codificam proteínas maiores, possuem uma maior proporção de codões raros, que por sua vez ocorrem em locais estratégicos (por exemplo entre domínios) (141). Neste sentido, a escolha dos codões pode limitar ou prolongar o tempo para os elementos estruturais secundários interagirem, o que, por sua vez, pode afetar a conformação final da proteína. Como exemplo, um local de pausa ribossomal que retarda a tradução entre dois domínios permite que estes adquiram as suas conformações independentemente, pelo que, caso uma mutação sinónima remova o local de pausa, os domínios poderão adquirir uma conformação conjunta, resultando numa estrutura alterada (141).

Para além do efeito das mutações sinónimas e de mutações que ocorrem em locais de *splicing*, também as mutações *missense* podem exercer efeito no processamento do RNA. Geralmente, quando se pretende determinar o efeito patogénico de uma variante *missense*, o foco principal são os defeitos que cria sobre a estrutura da proteína. Contudo, as substituições de um único nucleótido dentro de exões também podem ter um impacto significativo sobre o processamento do mRNA, logo sobre a função da proteína. Alguns estudos evidenciaram o efeito que mutações *missense* desempenham no *splicing* levando ao aparecimento de diversas doenças, nomeadamente, a doença renal poliquística (138) e o mesotelioma maligno da pleura (142). Tendo em conta que o *splicing* do mRNA é um passo essencial na expressão proteica, a possibilidade de alterar este mecanismo deve ser sempre testada para todos os tipos de mutações (137). Das variantes encontradas (Anexo IV), três intrónicas, uma exónica e uma localizada na região 5'ÚTR (*FGF8*: c.32+11C>T; *CHD7*: V1452L, c.7830+57C>G e c.2613+4C>T; *PROK2*: c.1-35A>G), apesar de serem variantes novas, não foram consideradas nefastas por pelo menos dois programas bioinformáticos. Grandes estudos de sequenciação, tal como, o Projeto 1000 Genomas, que caracterizou as sequências genómicas completas de mais de mil indivíduos que cobrem a diversidade mundial (143, 144), têm relatado variantes raras e privadas (variantes privadas são encontradas em apenas uma família ou numa pequena população) (145).

As mutações que detetámos como sendo privadas podem efetivamente possuir uma ausência de expressão fenotípica, ou podem ser de facto a causa da doença, dado que, os programas

bioinformáticos não são 100% fiáveis. Das 5 mutações privadas previstas como não patogénicas, 4 encontram-se em regiões não codificantes. As regiões 5' e 3' UTR e os intrões estão envolvidos na regulação da expressão do gene. Além disso, existe uma gama de transcritos não codificantes que interagem com estas regiões e contribuem para a regulação genética (146), nomeadamente, pequenos RNAs não codificantes, como micro RNAs, que podem regular diretamente a expressão de genes transcritos (146). As regiões não codificantes desempenham ainda papéis estruturais (mantendo o DNA em volta das histonas), na regulação da expressão genética por meio de acetilação e de-acetilação (147).

Os programas bioinformáticos também possuem as suas limitações, sendo que há uma possibilidade de uma previsão incorreta. Nomeadamente, o *Mutation Taster* evidencia uma incapacidade de analisar inserções-deleções maiores que 12 pares de bases e alterações que abrangem a fronteira intrão-exão. A análise de alterações não-exónicas está restrita à sequência de consenso Kozak, locais de *splicing* e à cadeia poli (A) do RNA, não entrando em conta, por exemplo, com os locais de ligação ao DNA de fatores de transcrição (110). Acrescenta-se ainda que os critérios em que se baseiam os diferentes programas variam, pelo que os resultados podem diferir, por exemplo o *Sift* (108) considera a posição em que a alteração ocorreu e o tipo de alteração de aminoácido, enquanto o *Polyphen* (109) baseia-se em oito características relacionadas com a sequência e três características relacionadas com a estrutura. Os programas bioinformáticos possuem uma sensibilidade e uma especificidade inferior a 100%, daí que para minimizar a margem de erro se tenha utilizado uma combinação de vários programas.

#### 4.1.1 Gene *KAL1*

As três mutações encontradas no gene *KAL1* explicam as causas genéticas de três dos 42 pacientes do sexo masculino (7,1%), valor este semelhante ao obtido em outros estudos (10-13%) (42, 148). As mutações neste gene são mais frequentes em indivíduos com SK (149) contudo, também são detetadas em pacientes com HHn (28). Das três mutações identificadas, uma pertence a um indivíduo com HHn (1 em 22- 4,5%). A prevalência de variantes no *KAL1* em indivíduos com SK foi de 10% (2 em 20), sendo este um valor expectável, uma vez que os defeitos genéticos neste gene encontram-se entre 10 a 20% dos pacientes com SK (27). Como exemplo, têm-se os estudos desenvolvidos por Izumi et al. (150) (3 em 18 homens com SK- 16,7%), Oliveira et al., (29) (7 em 59 pacientes com SK- 11,9%) e Montenegro et al.(151) (17 em 98 homens com SK- 17,3%). No entanto, a prevalência de mutações neste gene na população Japonesa parece ser superior (10 em 22 homens com SK- 50%) à população caucasiana (152).

No presente estudo, verificámos que alguns casos apresentaram resultados sugestivos de heterozigotia para este locus, mas cuja análise mais cuidadosa revelou tratar-se de casos de coamplificação do pseudogene *KALP* presente no cromossoma Y. Esta dificuldade na análise de sequenciação do *KAL1* pela amplificação tanto do gene como do pseudogene, já tinha sido descrita anteriormente (153). Pela primeira vez, foi descrito um caso de reversão de HHI associado a uma mutação no *KAL1*, no qual existiu a inserção de uma citosina na posição 75 do exão 2 (8). Curiosamente, este nucleótido é o mesmo que se encontra na posição correspondente no *KALP*. Esta situação faz com que se especule se efetivamente algumas variações *missense* relatadas na literatura poderão ser verdadeiras mutações no *KAL1* ou, se representam apenas o produto do pseudogene.

As diversas mutações do *KAL1* descritas na literatura estão distribuídas de forma dispersa por todo o gene, não existindo *hotspots* mutacionais (45, 104, 150, 152, 154-159), e interferem de forma distinta com a atividade da anosmina, dependendo do local onde se encontram. As mutações *frameshift* ou *nonsense* levam à ausência de síntese proteica ou à síntese de proteínas truncadas. As alterações *missense*, presentes nos domínios FNIII, podem interferir com a capacidade da anosmina interagir com a matriz extracelular (160, 161) e as que se encontram nos resíduos de cisteína da região WAP podem interromper as ligações disulfito levando a alterações na estrutura terciária da proteína, comprometendo a sua atividade (45). Foi ainda descrito um caso familiar, em que apesar de não existir qualquer mutação no gene *KAL1*, ocorreu uma deleção na zona adjacente à região codificadora deste gene (que compreende também o gene STS), sugerindo que elementos reguladores essenciais para a expressão do *KAL1* também tenham sido deletados (162).

Apesar de não termos efetuado o estudo genético do pai do paciente 5102, como o *KAL1* manifesta uma forma de hereditariedade ligada ao X, verifica-se que a variante c.542-1G>C foi herdada da mãe, uma vez que esta possui a alteração em heterozigotia e os filhos são homens e hemizigóticos para a variante em causa. A mutação c.542-1G>C, identificada no paciente 5102, tem como efeito mais provável uma alteração ao nível do *splicing*, uma vez que esta alteração se encontra num local de aceitação de *splicing*.

A mutação nonsense R191X foi anteriormente descrita por Oliveira et al. (29). Também neste caso, apesar de não termos efetuado o estudo genético ao pai do paciente 7074, podemos concluir que a alteração neste paciente foi herdada da mãe, dado que esta a possui em heterozigotia. As irmãs tal como a mãe não manifestam a doença pois são heterozigóticas para esta alteração, já o sobrinho do paciente é hemizigótico para a variante em causa, tendo sido diagnosticado com a mesma patologia do tio.

Através da técnica de MLPA, Pedersen-White et al. (163) demonstraram que 12% dos pacientes com SK possuíam deleções intragénicas. De acordo com Montenegro et al. (151), as deleções do *KAL1* foram o defeito genético mais frequentemente encontrado (29.4%). Num

dos pacientes englobados neste estudo (6776) não se conseguiu amplificar qualquer dos 14 exões deste gene, pelo que se procedeu à realização de MLPA para confirmar a deleção. Como era expectável, os resultados permitiram verificar que o paciente 6776 e o seu irmão têm uma deleção completa do gene *KAL1*, a mãe possui uma deleção num dos alelos, e o pai não apresenta deleção deste locus.

A deleção presente no paciente 6776 abrange cerca 4,7 a 5,0 Mb e abrange não só o *KAL1* mas também outros genes, *VCX3B*, *VCX2*, *PNPLA4*, *VCX*, *STS*, *HDHD1*, *VCX3A* e *NLGN4X*. Uma publicação recente descreveu uma deleção que abrange os genes ausentes no paciente 6776, com exceção do gene *NLGN4X* (164). A maioria dos pacientes com ictiose ligada ao X (XLI) possui deleção completa do gene *STS* e das sequências adjacentes (165). Um défice na enzima esteróide sulfatase (*STS*) é responsável pela XLI, esta patologia é uma doença genética de queratinização, caracterizada por uma descamação generalizada da pele (166). O gene *NLGN4X* codifica a neuroligina 4. As neuroliginas são moléculas de adesão celular pós-sinápticas que interagem com as neurexinas, para regular o bom equilíbrio entre a excitação e inibição de sinapses. Este gene está envolvido na patologia do autismo, um transtorno neurológico caracterizado clinicamente por ausência de interação social, défice na comunicação verbal, bem como comportamentos estereotipados e repetitivos (167). De acordo com Fukami et al. (168), o gene *VCX3A* está presente em pacientes com inteligência normal e ausente nos pacientes com atraso mental, sugerindo que o gene *VCX3A* é suficiente para manter o desenvolvimento mental normal. Por outro lado, um estudo revelou que não se pode relacionar a ausência do gene *VCX3A* com o atraso mental, uma vez que, em pacientes mexicanos com XLI (devido à deleção do gene *STS*) e atraso mental, o gene *VCX3A* não está deletado (165). Sendo assim, as características clínicas do paciente 6776 revelam ictiose ligada ao X (XLI) devido à deleção do gene *STS* e um ligeiro atraso mental que se poderá dever à deleção dos genes *VCX3A* e/ou *NLGN4X*.

#### **4.1.2 Gene *FGFR1***

A prevalência global de mutações no *FGFR1* nesta coorte foi de 22% (11 em 50), valor ligeiramente superior aos apresentados em outros estudos (9-12%) (27, 42, 102, 105). A frequência de mutações neste gene em pacientes com SK, de 22,7% (5 em 22), encontra-se dentro do intervalo de frequências relatadas (7-25%) (32, 42, 45, 49, 102, 105, 152) e em pacientes com HH normósmico, de 21,4% (6 em 28), é superior aos 3-7% descritos por outros autores (27, 42, 47, 102).

As mutações *frameshift* podem ser consideradas altamente disruptivas uma vez que, promovem a formação de codões *stop* prematuros, que resultam na produção de proteínas truncadas, ou ativam mecanismos de eliminação de RNA com codões *stop* (*nonsense-mediated mRNA decay*)(169).

Prevê-se que a mutação S96C, encontrada no paciente 5174, destabilize a conformação do domínio D1, uma vez que uma serina foi substituída por uma cisteína. Além disso, a diferença de tamanho entre os dois aminoácidos sugere que as ligações hidrofóbicas possam falhar. Num estudo (47), perto do codão 96, foi encontrada a alteração Y99C, na qual uma tirosina foi substituída por uma cisteína mais pequena. Esta variação causou uma redução nos níveis de expressão do FGFR1 na superfície das células e este não responde à estimulação pelo FGF, provando ser uma mutação patogénica (47). A mutação S96C está localizada no primeiro domínio de imunoglobulina, que está envolvido no modelo de auto-inibição do recetor, e interage com o segundo e o terceiro domínios (170). Foi proposto que mutações que se encontram no domínio D1 ou na caixa ácida, em pacientes com SK, possam promover uma maior auto-inibição do FGFR1, perturbando o equilíbrio e resultando na insuficiente sinalização do FGFR1 (35, 171).

A variante A353T, presente no exão 8A, encontra-se no terceiro domínio de imunoglobulina. Mutações presentes neste domínio podem influenciar a interação do recetor com o ligando uma vez que, estas regiões desempenham um papel estrutural importante na conformação e consequentemente na ligação ao ligando (35). A mutação que afeta o exão 8A é nova e sugere um papel importante da isoforma FGFR1-IIIb que resulta do splicing alternativo deste exão. Os transcritos do FGFR1 que contêm os exões 8A ou 8B, codificam as isoformas FGFR1-IIIb ou -IIIc, respectivamente. Foi demonstrado que estas duas isoformas têm características distintas de ligação ao ligando e padrões de expressão tecidual um pouco diferentes (43). Pensa-se que o FGFR1-IIIc representa a isoforma dominante para executar a maioria das funções biológicas do gene FGFR1, enquanto o FGFR1-IIIb desempenha provavelmente um papel menor. A importância relativa destas isoformas foi confirmada por experiências com ratinhos geneticamente modificados, nos quais mutações homozigóticas no exão 8B resultaram em letalidade embrionária devido a graves defeitos de desenvolvimento, enquanto mutações homozigóticas no exão 8A resultaram em ratinhos viáveis e férteis (44). Assim, a descoberta de um paciente com uma mutação no exão 8A que afeta selectivamente a isoforma FGFR1-IIIb, parece contradizer a função redundante desta isoforma. Até agora, só existiu uma publicação, um estudo de Miura et al. (172), identificando uma mutação no exão 8A (p.T358I) num doente com SK. Nenhuma outra mutação neste exão foi relatada, o que contrasta com as mutações do exão 8B, que estão presentes em 19 das 222 famílias relatadas na literatura (Anexo V). Em contraste com o paciente descrito por Miura et al. (172), o atual paciente em estudo com uma mutação no exão 8A carece de defeitos olfactivos, e, portanto, é o primeiro caso de HHI normósmico associado a um defeito na isoforma FGFR1-IIIb. Assim, este estudo

fornece evidência adicional para um papel da isoforma FGFR1-IIIb na patogénese do HHI, e indica a necessidade de incluir a sequenciação do exão 8A (além do exão 8B) no rastreio genético do SK e do HHI normósmico. Alguns laboratórios excluem ocasionalmente o exão 8A da sua análise genética (102, 176), correndo-se o risco de não identificar mutações nesta região do gene. Permanece por clarificar se a raridade relativa de mutações observadas no exão 8A é devida: à falta de rastreio adequado deste exão na análise da sequência de DNA; à ausência de expressão fenotípica da maioria das mutações neste exão; ou a um efeito severo da maioria das mutações neste exão, que seria incompatível com a vida.

A análise estrutural do domínio de tirosina cinase demonstrou que a mutação M719V pode prejudicar as ligações hidrofóbicas, induzindo alterações estruturais e conduzindo a uma redução na actividade da cinase. Estudos funcionais suportam esta evidência, uma vez que mutações localizadas no domínio de tirosina cinase promoveram uma diminuição na actividade da mesma (34, 47). Além disso, a substituição de um aminoácido maior (metionina) por um menor (valina) na proximidade da tirosina 730 pode perturbar a autofosforilação do domínio TK, impedindo a sua actividade que é essencial para a sinalização do *FGFR1*. A importância da tirosina 730 foi já descrita por Mohammadi et al. (173) como um substrato para a fosforilação, essencial para a atividade da cinase.

Para além das mutações descritas anteriormente, identificaram-se ainda três mutações sinónimas. De acordo com os programas bioinformáticos, *Mutation Taster* e *Human Splicing Finder*, estas mutações são consideradas patogénicas podendo provocar alterações no mecanismo de *splicing*.

Em suma, o efeito prejudicial destas mutações *missense* pode ser devido: à diminuição do tráfico intracelular da proteína FGFR1 traduzida (p.W4C); à disrupção da conformação do domínio D1 pela quebra das ligações hidrofóbicas, e/ou pela alteração do mecanismo de auto-inibição do receptor (p.S96C); à alteração da ligação ao domínio D3 (p.A353T); à diminuição da atividade da tirosina cinase resultante de alterações nas ligações hidrofóbicas (p.M719V) e ainda a modificações no mecanismo de *splicing* (p.W4C, p.A353T, p.M719V, p.D59D, p.D200D, p.L754L).

### 4.1.3 Gene *FGF8*

A prevalência global de mutações no *FGF8*, no presente estudo, foi de 2% (1 em 50), valor semelhante ao obtido por outros autores (1-2%) (28, 55). A frequência de mutações em indivíduos com SK de 4,5% (1 em 22), foi igualmente semelhante ao documentado em outros estudos (≈2%) (27, 28, 55). De acordo com os programas bioinformáticos, a variante sinónima p.T194T, presente no paciente 6130, promove alterações ao nível do *splicing*, pela

modificação de um local ativador de *splicing* exônico usado pelo fator de *splicing* SF2/ASF. Não é a primeira vez que é detetada uma mutação sinónima no *FGF8* que interfere com o mecanismo de *splicing* (174). A alteração T72T, encontrada numa paciente com deficiência múltipla hipofisária, foi igualmente prevista como patogénica pelo *Human Splicing Finder*, comprometendo de forma idêntica o mecanismo de *splicing*. Estudos funcionais com a referida mutação (T72T) comprovaram o efeito ao nível do *splicing* e constataram que esta é uma mutação ativadora, que promove um aumento da atividade do ligando (174).

Os resultados bioinformáticos e a frequência muito baixa em que ocorre na população são fortes indícios do efeito patogénico da mutação T194T, que pode por si só justificar a patologia, uma vez que este gene possui uma forma de hereditariedade autossómica dominante.

Uma falha na sinalização do ligando FGF pode resultar na perda do destino dos neurónios secretores de GnRH e/ou em defeitos migratórios dos mesmos, comprometendo a correta neurogénese do epitélio ou do bulbo olfativo, causando a SK. Através de mecanismos alternativos, uma falha na função do FGF pode ainda afetar a sobrevivência dos neurónios de GnRH após a neurogénese olfativa resultando em HHn [2]. Assim, mutações no *FGF8* estão subjacentes ao SK e ao HHn, confirmando que este gene é um locus para a deficiência de GnRH. As alterações do *FGF8* podem exercer um leque de efeitos variável, que vai desde a falência no início do desenvolvimento pubertário até a alterações da função reprodutiva, após a conclusão da maturação sexual (HHA- hipogonadismo hipogonadotrófico adquirido) (55).

#### 4.1.4 Gene *CHD7*

A prevalência global de mutações no *CHD7* nesta coorte foi de 34% (17 em 50 pacientes), a frequência de alterações em indivíduos com SK foi de 27,3% (6 em 22) e em indivíduos com HHn de 39,3% (11 em 28). Comparando estes valores com os resultados obtidos em outros estudos, observámos percentagens muito superiores de mutações neste gene, quer ao nível da prevalência global que varia entre os 5% e os 7% (27, 62, 67), quer apenas em indivíduos com SK (6 a 11%) (6, 67, 175, 176) ou HHn (8%) (67).

A síndrome CHARGE caracteriza-se por múltiplas anomalias congénitas incluindo: coloboma do olho, defeitos cardíacos, atresia de coanas, atraso de crescimento, anomalias genitais, anomalias auditivas internas e externas, bem como hipósquia e outras anomalias do nervo olfativo (177, 178). Uma vez que a incidência desta síndrome pode ser relativamente alta, variando de 1:8500 a 1:12000 nascimentos (179, 180), tem suscitado bastante interesse na comunidade científica, sendo o gene *CHD7* o foco de estudo. Apesar de não existirem pacientes neste estudo que cumpram os critérios da síndrome de CHARGE, é sabido que a

anósmia/hipósmia e o hipogonadismo hipogonadotrófico são um fenótipo encontrado nesta síndrome, pelo que se procedeu à sequenciação do gene *CHD7* neste trabalho.

Mutações heterozigóticas no gene *CHD7* explicam cerca de 60 a 70% das causas genéticas do Síndrome de CHARGE (57). Diversos tipos de mutações na região codificadora do *CHD7* têm sido identificadas em indivíduos com esta síndrome, incluindo mutações nonsense (44%), mutações *frameshift* causadas por inserções ou deleções (34%), mutações de *splicing* (11%), mutações *missense* (8%), grandes deleções e duplicações (2%), translocações (<1%) e pequenas deleções *in-frame* (<1%) (64).

Das 16 variantes diferentes, encontradas no presente estudo, seis não se encontram descritas na literatura (G388E, S559S, H903P, T1082I, D1854G e R2065H) pelo que são mutações novas. A patogenicidade prevista pelas ferramentas de bioinformática, a ausência destas variantes na população controlo de indivíduos saudáveis, e o fato de a maioria se localizarem em aminoácidos altamente conservados entre as diferentes espécies, permitem fundamentar o efeito nocivo que estas alterações produzem na atividade da proteína codificada pelo *CHD7*. Acrescenta-se ainda que as mutações H903P e T1082I localizam-se no cromodomínio 2 e no domínio SNF2/Helicase, respetivamente, e desempenham um papel fundamental na proteína, comprometendo a sua atividade de remodelação da cromatina. O primeiro (cromodomínio 2) medeia as interações da cromatina ligando-se às histonas (67) e o segundo (SNF2/Helicase) é responsável pela ligação do ATP; assim como pela separação das cadeias de DNA pela enzima helicase (61).

No que diz respeito às variantes S103T, M340V, K729E e M2527L, tudo indica que também tenham um efeito patogénico na proteína codificada pelo *CHD7*, na medida em que ocorreram em aminoácidos que são altamente conservados entre as espécies, são previstas como patogénicas em pelo menos dois programas bioinformáticos e embora já tenham sido descritas na população, ocorreram com uma frequência muito baixa (S103T- MAF 0,9%; M340V- MAF 0,3%, K729E- MAF 0,1% e M2527L- MAF 0,05%).

As variantes sinónimas P512P, T689T, P2072P, A2785A e as variantes intrónicas c.5211-21C>A e c.5404+40G>A são igualmente previstas como patogénicas pelos programas *Mutation Taster* e *Human Splicing Finder*, sendo que este último evidencia para todas elas alterações no mecanismo de *splicing*. De igual forma, outros estudos têm reportado a existência de mutações sinónimas neste gene, que originam possíveis alterações no padrão de *splicing* (181).

Verificaram-se ainda nos pacientes 5139 e 5915 casos de heterozigotia composta no *CHD7* (5139- p.S103T e p.H903P; 5915- p.T689T e c.5404+40G>A). O facto do gene ter uma hereditariedade autossómica dominante sugere que pelo menos uma das alterações possa não ter efeito patogénico.

#### 4.1.5 Genes *PROK2* e *PROKR2*

A frequência de indivíduos com variantes no *PROKR2* foi de 10% (5 em 50), sendo que uma das variantes estava presente em dois pacientes não relacionados. Este valor é semelhante ao descrito por outros grupos de investigação (3-8%) (74, 105). Foram identificadas mutações em 4,5% dos casos de SK (1 em 22) e em 14,3% dos casos de HHn (4 em 28). O valor obtido para pacientes com SK é semelhante ao reportado em estudos anteriores (4-11%) (27, 74, 105). No que se refere a pacientes com HHn a percentagem de mutações que identificámos é ligeiramente superior ao descrito, 1-5% (27, 74, 105). No que respeita ao gene *PROK2*, a frequência global de mutações detetadas de 2% (1 em 50) é igual à documentada (74, 105), contudo, as alterações ocorreram apenas em pacientes com SK, e apesar de outros autores terem detetado as variantes nas duas formas de HH, os valores que descreveram (2-5%) (27, 74, 105, 131) para SK não distam da frequência por nós observada (4,5%- 1 em 22).

A variante R80C no gene *PROKR2*, localizada na primeira alça intracelular, ocorre num aminoácido muito conservado entre as espécies, não foi detetada num painel de controlos saudáveis, foi prevista como patogénica por dois programas bioinformáticos e já foi anteriormente descrita por Abreu et al. (79). Os estudos funcionais revelaram que esta variante resulta em perda de função do recetor, por interferir no processo de maturação pós-translacional e na diminuição da expressão do *PROKR2*, contudo, esta variante não exerce um efeito dominante negativo (79), pelo que por si só não explica a patologia neste paciente. A variante L176F, localizada no quarto domínio transmembranar do *PROKR2*, ocorre num aminoácido que não é conservado entre as espécies, não foi detetada num grupo de controlos saudáveis e foi prevista como patogénica por dois programas bioinformáticos. As variantes L173R e W178S, identificadas por Monnier et al. (80) e Cole et al. (74), encontram-se no mesmo domínio e os estudos funcionais revelaram que a mobilização intracelular de cálcio foi prejudicada, comprometendo a atividade de sinalização. Os trabalhos de Monnier et al. (80) revelaram ainda que estas variantes apresentavam baixos níveis de expressão na superfície celular, sugerindo que tinham dificuldades de passagem no sistema de controlo de qualidade. No entanto, não se demonstrou qualquer efeito de dominância negativa.

As variantes R268C e R268H localizam-se na terceira alça intracelular do recetor da procinetina, ocorrem em aminoácidos muito conservados entre as espécies, são consideradas patogénicas pela maioria dos programas bioinformáticos e apenas foi detetado um indivíduo com a variante R268C, em 200 controlos saudáveis. Esta variante foi anteriormente identificada por Monnier et al. (80). Os estudos funcionais indicaram uma sinalização deficiente do receptor quando estimulado por um agonista da procinetina e a ausência de efeito dominante negativo, evidenciando mais uma vez, que a presença desta variante em heterozigotia não é suficiente para produzir a patologia(80).

No que respeita à alteração R81R presente no *PROK2*, foi sugerida como nociva por dois dos programas bioinformáticos utilizados, podendo promover alterações no *splicing*, e ocorre na população com uma frequência muito baixa (MAF 0,04%). O fato de ter sido detetada em heterozigotia não explica a patologia. Esta alteração foi detetada no exão 3, que não codifica a proteína madura, sugerindo um papel pouco significativo na sua atividade. Contudo, pode desempenhar uma função importante na conformação final da mesma, deixando em aberto o papel do exão 3 no *PROK2*. As mutações identificadas no *PROK2* ocorrem em menor número que no seu recetor e as presentes no exão 3 são raras, tendo sido anteriormente identificada uma duplicação (182).

Tal como acontece em indivíduos portadores de mutações no *FGF8/FGFR1*, também no *PROK2/PROKR2* é evidente uma variabilidade fenotípica em membros da mesma família, e alguns irmãos normais possuem mutações idênticas às de irmãos afetados (2). Esta expressividade variável e penetrância incompleta estão a emergir cada vez mais para vários genes que causam deficiência da hormona GnRH, o que sugere a existência de casos de digenia/oligogenia (74, 131, 183). Assim, pacientes com alterações heterozigóticas nestes dois genes sugerem um modelo de hereditariedade oligogénico.

As quatro mutações do gene *PROKR2*, identificadas no presente estudo, são heterozigóticas e encontram-se em indivíduos com alterações genéticas em outros genes. Na família 5196, identificaram-se duas variantes [p.R80C (*PROKR2*) e V134G (*GNRHR*)]; na família 5070, três variantes [L176F (*PROKR2*), D200D (*FGFR1*) e A2785A (*CHD7*)]; na família 2661, duas variantes [R268H (*PROKR2*) e K729E (*CHD7*)] e na família 7081, três variantes [R268C (*PROKR2*), W4C (*FGFR1*) e T1082I (*CHD7*)].

Apenas o paciente 5191 com a alteração R268C no *PROKR2* e o paciente 7039 com a alteração sinónima R81R no gene *PROK2*, não evidenciaram mais variantes nos genes estudados, pelo que é espectável que possam existir outras alterações em genes ainda não rastreados.

#### 4.1.6 Gene *KISS1R*

A mutação *missense* R149C, presente no exão 3, representou a causa genética de 2% (1 em 50) da totalidade de pacientes e de 3,6% (1 em 28) dos que possuem HHn, valores estes que estão de acordo com o documentado. Bonomi et al. (105) não relatou qualquer alteração neste gene, Semple e Topaloglu. (27) e Gurbuz et al. (184) descreveram mutações neste gene <3% e de 9%, respetivamente, em pacientes com HHn.

Embora a alteração R149C tenha sido considerada patogénica por quatro dos programas aplicados e de não estar presente em aproximadamente 200 controlos saudáveis, ocorre ainda

num aminoácido que não é muito conservado entre as espécies. A mutação L148S encontrada por Seminara et al. (82), em homozigotia, situa-se ao lado da alteração descoberta por nós no codão 149. Os estudos funcionais revelaram que a resposta máxima de fosfato de inositol, por parte de células transfetadas com a mutação (L148S), reduziu em 65%, quando comparadas com as células transfetadas com o gene *wild type*. Embora os estudos funcionais revelem que este laço intracelular da proteína desempenha um papel fundamental na atividade da mesma, a variante por nós detetada ocorre em heterozigotia, o que não explica isoladamente a patologia neste paciente, uma vez que a forma de hereditariedade é autossômica recessiva.

#### **4.1.7 Genes *TAC3* e *TACR3***

Tal como descrito por Bonomi et al. (105), também no presente estudo não foram detetadas mutações nos genes que codificam a neurocinina B (*TAC3*) e o seu recetor (*TACR3*). Contudo, Gianetti et al. (92) observaram 6% (19 em 345) de pacientes com HHn com alterações no gene *TACR3* e 0,3% (1 em 345) no gene *TAC3*. Da mesma forma, Gurbuz et al. (184) identificaram em indivíduos com HHn, uma prevalência de variantes no gene *TACR3* superior ao gene *TAC3*, 27% (6 em 22) e 5% (1 em 22), respetivamente.

As variantes identificadas no *TAC3* não foram previstas como patogénicas, na medida em que ocorreram na população com uma frequência superior a 1%. Já no gene *TACR3*, embora tenham sido identificadas variantes com uma frequência inferior a 1%, as mesmas não passaram no critério de terem sido previstas como patogénicas em pelo menos dois dos programas aplicados. A variante A449T foi mesmo considerada inócua pelos cinco programas em uso.

#### **4.1.8 Genes *GNRH1* e *GNRHR***

À semelhança do descrito por outros autores, como Bonomi et al. (105), não foram detetadas mutações no gene *GNRH1*. As alterações genéticas neste gene têm sido encontradas com uma frequência muito baixa, inferior a 1%, em indivíduos com HHn (27). Frequências superiores foram relatadas noutros estudos no *GNRHR*, em que mutações neste gene foram encontradas em 4 a 5% dos pacientes com HHI (105, 185). Tendo em conta apenas indivíduos com HHn, as alterações genéticas estão presentes entre 7 a 40% dos pacientes (105, 185, 27) no que respeita a casos de HHn. Desta forma, verifica-se que os valores observados neste estudo se enquadram na literatura existente, uma vez que identificámos, na globalidade, mutações no *GNRHR* em 8% (4 em 50) dos casos com HHI, sendo que estes ocorreram apenas em pacientes com HHn, correspondendo a 14,3% (4 em 28) destes.

As variantes Q106R, V134G e Y283H, observadas no *GNRHR*, foram consideradas patogénicas pelos cinco programas de análise, podendo todas promover alterações ao nível do *splicing*. Com exceção da alteração V134G, que ocorre num aminoácido que varia em duas das espécies, as restantes duas alterações surgiram em aminoácidos muito conservados. Estas evidências suportam o efeito nocivo que as variantes encontradas podem ter na actividade do recetor da GnRH.

A mutação presente no paciente 6263 (Y283H) encontra-se no sexto domínio transmembranar, que está relacionado com a configuração e mudança conformacional associada à propagação de sinal (99). Esta variante foi descrita anteriormente em heterozigotia composta por Beneduzzi et al. (132), contudo, o fato de ter sido encontrada neste caso em homozigotia, por si só, explica a existência da patologia, uma vez que a forma de transmissão associada a este gene é autossómica recessiva. Mais tarde, Beneduzzi et al. (186) desenvolveu estudos funcionais com esta variante e os ensaios com IP3 demonstraram uma perda completa da atividade do mutado. A mutação P282R, identificada por Tello et al. (187), também se encontra no sexto domínio transmembranar e, tal como a alteração Y283H, encontra-se num resíduo conservado. Os estudos funcionais demonstraram que esta arginina no codão 282 foi incapaz de se ligar a um análogo da GnRH. Como este resíduo conservado é importante na conformação do receptor, é provável que a mutação perturbe a ligação ao ligando e/ou afete o percurso do recetor para a superfície celular (187).

A mutação Q106R, presente no paciente 6980, ocorreu em heterozigotia composta com uma mutação *frameshift* (c.937\_947delTTTAAACCC) até agora não descrita. Embora a variante Q106R tenha sido detetada em dois dos 219 controlos saudáveis, não deixa de exercer um papel nefasto, uma vez que estudos funcionais confirmaram o seu potencial patogénico (101). A variante Q106R foi descrita anteriormente por de Roux et al. (101) também em heterozigotia composta, mas com a alteração R262Q. Os estudos funcionais que efetuaram demonstraram que a modificação de uma glutamina no codão 106 por uma arginina, diminui drasticamente a ligação da GnRH ao seu recetor. Esta diminuição era espectável, uma vez que, os domínios extracelulares do receptor de GnRH estão envolvidos na ligação da GnRH (99, 188). Surgiram ainda diversos pacientes com HHI, apresentando uma ampla gama de fenótipos, que eram portadores das mutações Q106R e R262Q em heterozigotia composta ou em combinação com outras mutações no *GNRHR* (103, 186, 189, 190). Bedecarrats et al. (191) analisaram os efeitos destas duas mutações na estimulação das subunidades de gonadotrofinas e na expressão do gene *GNRHR* pela GnRH. Para além dos dois recetores mutantes apresentarem uma redução na resposta do IP à GnRH, foram também observados diferentes efeitos nas subunidades de gonadotrofinas estimuladas pela GnRH e na expressão do *GNRHR*, sugerindo efeitos diferentes sobre uma via de sinalização comum ou, mais provavelmente, em diferentes vias de transdução de sinal. Deste modo, a variabilidade fenotípica observada nos pacientes com HHI, causada por mutações no *GNRHR*, poderá ser

explicada pelos diferentes efeitos produzidos na expressão genética das subunidades LHB, FSHB e  $\alpha$ GSU estimuladas pela GnRH. Casos como estes, de heterozigotia composta, são as mutações mais frequentemente detetadas neste gene (100).

A alteração genética V134G do exão 1, presente no paciente 5196, deixa algumas dúvidas quanto ao efeito patogénico. Se por um lado, a previsão dos programas bioinformáticos, a ocorrência num aminoácido que é conservado entre as espécies e a ausência em 203 controlos saudáveis, apoiam o efeito nocivo; por outro lado, ocorre em heterozigotia, o que por si só não explica a patologia, uma vez que a forma de hereditariedade neste gene é autossómica recessiva. Uma possível explicação para este caso é a existência de uma deleção dos restantes exões deste gene, no outro alelo, que não é detetada aquando da sequenciação. Esta mutação foi anteriormente identificada por Beneduzzi et al. (186) em heterozigotia com a variante R262Q (V134G/R262Q) e com a variante Q106R (V134G/Q106R). Os estudos funcionais realizados à variante V134G demonstraram uma perda de resposta ao nível da produção de IP3 quando estimulado com GnRH, ou seja, indicaram uma perda completa da atividade do mutado (186).

## 4.2 Penetrância incompleta e oligogenia

A hereditariedade oligogénica tornou-se evidente devido às grandes variações fenotípicas reprodutivas e não reprodutivas exibidas por diversas famílias (192). Uma descrição detalhada de indivíduos com mutações idênticas neste gene revelou uma grande gama de fenótipos (quer dentro, quer entre famílias), variando de aparentemente normal a anósmia, lábio leporino, fenda palatina, atraso pubertário, reversão do HHI e mesmo SK com malformações do esqueleto e craniofaciais (7, 34, 49). Mais tarde, Dodé et al. (131) encontraram as primeiras mutações no *PROKR2* e no seu ligando em pacientes com HHn e SK. Em 14 pacientes, não aparentados, detetaram mutações distintas no *PROKR2*, incluindo uma mutação digénica, em que um alelo mutado estava presente no *PROKR2* e outro no *KAL1*. Num paciente com SK e defeitos na linha média e no esqueleto foi detetada uma mutação no gene *NELF*, que resultou de uma deleção intrónica de 8 pares de bases e, mais tarde, foi encontrada no mesmo indivíduo uma alteração no *FGFR1* (53). Estas alterações genéticas explicaram que o fenótipo do paciente se deveu a ter herdado um alelo mutado de cada progenitor, explicando também a aparente ausência de segregação de qualquer gene com a doença (53). Outros estudos se seguiram nos quais se identificaram mais casos de digenia (193) e oligogenia (28).

Neste estudo, as análises genéticas efetuadas aos familiares dos pacientes, demonstraram a existência de casos em que as variantes foram herdadas de progenitores aparentemente normais, nomeadamente nas famílias 7081, 5184, 6024 e 5136 (Figura 10, 15 e 19). Esta

penetrância incompleta já foi descrita anteriormente em diversos genes associados ao HHI e sugere que outros fatores genéticos ou ambientais possam contribuir para a variabilidade do fenótipo (194). Em particular, como referido anteriormente, casos de mutações digênicas e oligogênicas têm sido descritos em indivíduos com HHI e poderão explicar alguns casos de expressão fenotípica variável e penetrância incompleta (28, 193).

O paciente 7081 possui três alterações genéticas nos genes *FGFR1* (p.W4C), *CHD7* (p.T1082I) e *PROKR2* (p.R268C). Neste caso duas variantes (*FGFR1* e *CHD7*) foram herdadas do pai, que teve atraso pubertário constitucional, e uma variante (*PROKR2*) foi herdada da mãe, aparentemente normal, sugerindo uma explicação para a variabilidade fenotípica desta família (Figura 24).

Um outro caso de mutações digênicas e penetrância incompleta está presente na família 5136. A variante do *FGFR1* (p.D59D) foi herdada do pai e a variante no gene *CHD7* (p.D1854G) foi herdada da mãe (Figura 24).

Nos pacientes 5184 (Figura 10) e 6024 (Figura 10), poderão existir, para além das alterações detetadas, outras alterações genéticas em genes ainda não rastreados, ou fatores externos que expliquem a penetrância incompleta nestas famílias.

Na família 5102 (Figura 24), como a mutação do *KAL1* por si só já desencadeia a doença, tudo leva a crer que a alteração no *CHD7* (M2527L) não exerça efeito patogénico. Dois fatores vêm apoiar esta hipótese, o irmão 6999 não possui a alteração no *CHD7* e evidencia características fenotípicas iguais às do irmão 5102, e o pai de ambos, saudável, mesmo não tendo sido efetuada a análise genética, deverá ter transmitido a alteração M2527L ao filho 5102, uma vez que a mãe não possui a alteração.

## 4.3 Relação genótipo/fenótipo

Quer o HH normósmico, quer o SK partilham uma etiopatogenia anatómica e genética com características comuns. Diversos estudos descrevem genes implicados no HH com diferentes expressões fenotípicas, mesmo quando a mesma mutação está presente em diferentes indivíduos dentro da mesma família (49, 102), suavizando a separação entre SK e HHn.

Os pacientes com SK não atingem geralmente a puberdade e o fenótipo reprodutivo pode variar desde hipogonadismo grave (criptorquidia ou micropénis em crianças do sexo masculino) à reversão completa na vida adulta (10, 47). Todos os pacientes no presente estudo apresentaram atraso pubertário devido aos baixos níveis de gonadotrofinas. A percentagem de indivíduos com criptorquidia é de 19% (8 em 42 homens). Dos pacientes com

SK, 15% possuem antecedentes de criptorquidia (3 em 20 homens) e dos pacientes com HHn, 23% possuem antecedentes de criptorquidia (5 em 22 homens). A percentagem semelhante de criptorquidia entre as duas formas congênitas de HHI não é exclusiva deste estudo. Bhagavath et al. (195) também verificaram que a frequência de criptorquidia não diferiu muito entre anósmicos e normósmicos. Embora a literatura evidencie que alterações no gene *KAL1* provocam fenótipos reprodutivos mais severos que o *FGFR1* (29, 30), neste estudo, nos casos com criptorquidia e/ou micropénis (21%, 9 dos 42 homens) a maioria das mutações ocorreu no gene *FGFR1*, isoladamente ou em oligogenia (56%, em 5 dos 9 indivíduos).

A anósmia/hipósmia estão significativamente relacionadas com anomalias anatômicas do trato e bolbos olfativos. A prevalência de outras anomalias, especialmente defeitos na linha média e surdez neurosensorial, é elevada e independente da presença de anósmia/hipósmia (5). Nos 22 pacientes com SK estudados, 10 (45 %) possuem anomalias anatômicas olfativas, na maioria com agenesia dos sulcos e bolbos olfativos, o que corrobora os resultados obtidos por Della Valle et al. (5).

Outras características fenotípicas associadas ao SK incluem lábio leporino e fenda palatina, deficiência auditiva, agenesia dentária, anomalias dos membros, agenesia renal e movimentos de espelho (sincinesia) (4). A agenesia renal unilateral ocorre em cerca de 30% dos pacientes com alterações no *KAL1* (159, 196), fenótipo presente nos irmãos da família 5102, que possuem uma mutação neste gene. Costa-Barbosa et al, (6) evidenciaram que certas características clínicas em homens e mulheres são altamente associados com causas genéticas de SK. A sincinesia (*KAL1*), a agenesia dentária (*FGF8/FGFR1*), anomalias ósseas digitais (*FGF8/FGFR1*) e surdez (*CHD7*) tornam-se úteis na prioridade a dar ao estudo genético (6). Dos 50 pacientes em estudo, quatro apresentavam surdez (8%, três SK-13,6% e um HHn-3,6%) e as alterações genéticas associadas aos mesmos ocorreram no *FGFR1* e *CHD7*, confirmando em parte a associação obtida por Costa-Barbosa et al. (6) relativamente ao gene *CHD7*.

## 4.4 Reversão do hipogonadismo hipogonadotrófico

O diagnóstico de HHI reversível inclui todos os pacientes, que se tornaram férteis sem terapia de gonadotrofinas ou GnRH e/ou que apresentaram melhoria na secreção de testosterona, após a interrupção do tratamento de reposição de gonadotrofinas, GnRH ou testosterona (8). Para induzir o desenvolvimento pubertário e para manter os níveis adultos de hormonas sexuais, a maioria dos pacientes do sexo masculino com HH precisa de terapia de reposição de testosterona (TRT) ao longo da vida (197). No entanto, até 10% dos doentes com HH pode sofrer reversão da doença e alguns deles podem mesmo produzir sémen normal (10).

Apesar de já terem sido descritos diversos casos de reversão no HH (7-10, 47, 92, 198-203), as características clínicas e de genética molecular, assim como, os mecanismos que conduzem à reversão do HH não são bem conhecidos. Os casos reportados possuíam mutações em genes distintos, no *KAL1* (8), *FGFR1* (7, 47), *PROK2* (9), *GNRHR* (199, 203), *TAC3/TACR3* (92), *CHD7*, *GNRHR*, *FGFR1* (198). De acordo com Laitinen et al. (198), uma proporção considerável de pacientes com HH (8% dos pacientes com SK) pode recuperar no início da idade adulta. Durante a TRT, o aumento testicular foi altamente sugestivo da reversão do HH.

Apesar da maioria dos casos de reversão no HH ocorrerem em homens, também têm sido documentados casos de reversão em mulheres. Em 2002, Dewailly et al. (204) descreveram uma gravidez espontânea numa mulher com HHn parcial e mutação no *GNRHR*, após a reposição de esteróides sexuais. Mais tarde, Raivio et al. (47) relataram um caso de reversão numa mulher diagnosticada com HHn severo e com alterações genéticas nos genes *FGFR1* e *PROKR2*.

Igualmente, no presente estudo ocorreu pelo menos um caso de reversão no HHn, o paciente da família 5943. Este possui a alteração sinónima no *CHD7* p.S559S, iniciou a TRT passando de um estágio de Tanner 1 para 4, em que 5 é considerado um desenvolvimento completo, e apresentando um volume testicular normal (15-20 cc). Após ter cessado a terapia de testosterona o paciente continuou a desenvolver a puberdade.

## 4.5 Perspetivas futuras

Em 20 famílias (40%) não se identificaram causas genéticas que explicassem o fenótipo. Esta situação poderá dever-se ao facto de estarmos na presença de uma causa adquirida, ou poderão ser outros os genes que explicam a doença. Estudos mais recentes têm permitido descobrir genes adicionais que estão relacionados com o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, nomeadamente o *NELF*, *HS6T1*, *FGF17*, *FGF18*, *IL17RD*, *DUSP6*, *SPRY2*, *SPRY4*, *FLRT3*, *Ebf2*, *NROB1*, *LEP*, *LEPR*, entre outros.

O gene *NELF* (OMIM: 608137) também conhecido por *NSMF* codifica o fator LHRH embrionário nasal (Hormona libertadora da hormona luteinizante). Este gene está relacionado com a migração dos neurónios olfativos e dos neurónios secretores de GnRH em ratinhos (205), tendo sido associado ao HHI em 2004 por Miura et al. (206). O gene *HS6ST1* (*Heparan sulfatase 6-O-sulfotransferase*) (OMIM: 604846) codifica a enzima sulfotransferase de heparina, necessária para a função da anosmina-1, tendo sido descobertas mutações em famílias com HHI (207). Miraoui et al. (208) efetuaram pesquisa de mutações em diversos genes e identificaram variantes em indivíduos com HH congénito nos genes *FGF17* (Fibroblast growth factor 17) (OMIM: 603725), *IL17RD* (*interleukin 17 receptor D* [OMIM 606807]), *DUSP6* (*dual*

*specificity phosphatase 6* [OMIM 602748]), *SPRY4* (*sprouty homolog 4 (Drosophila)*) [OMIM 607984] e *FLRT3* (*fibronectin leucine rich transmembrane protein 3*) [OMIM 604808]). Um outro gene que merece ser alvo de estudo é o *Ebf2* (*early B-cell factor 2*) (OMIM: 609934) que possui um papel chave no eixo neuroendócrino como proposto por Corradi et al. (209). Estes autores descreveram ratinhos nulos para o *Ebf2*, em que a migração dos neurónios de GnRH é defeituosa, levando ao HH. O *NROB1* (*Nuclear receptor subfamily 0, group B, Member 1*) (OMIM: 300473) codifica um novo membro da superfamília dos recetores nucleares e participa na formação da glândula supra-renal adulta, actuando como uma proteína co-reguladora que inibe a atividade da transcrição de outros recetores nucleares (210). Mutações neste gene foram descritas em pacientes com hipoplasia adrenal congénita ligada ao X e HHI normósmico (211). A leptina codificada pelo gene *LEP* (*Leptin*) (OMIM: 164160) é uma hormona que regula a ingestão de alimentos, o gasto de energia e reprodução ao nível do hipotálamo, sendo o seu recetor codificado pelo gene *LEPR* (*Leptin receptor*) (OMIM: 601007) (2). Mutações em ambos os genes estão associadas a obesidade e HH (212). Os genes anteriormente mencionados ficam para posterior estudo, uma vez que, as mutações nestes genes têm uma prevalência muito baixa ou estão associadas a características fenotípicas específicas e não muito frequentes nos pacientes.

Atendendo ao elevado e crescente número de genes envolvidos no HH, as técnicas de *Next Generation Sequencing* (NGS) poderão ser aplicadas nesta patologia, uma vez que permitem uma economia de tempo e custos relativamente à sequenciação pelo método de Sanger. Como exemplo tem-se a *targeted resequencing* que permite a análise simultânea de vários genes de interesse (213) e o *whole genome/exome sequencing*, que como o próprio nome indica, ao sequenciar todo o genoma ou exoma humano, permite não só detetar alterações genéticas em genes já relacionados com a patologia, como possibilita ainda a descoberta de novos genes até então não associados à doença (214).

Para além da sequenciação de genes adicionais, existem outros estudos que poderão ser úteis para completar os resultados obtidos neste trabalho. Quando na posse de amostras sanguíneas realizar-se-á o estudo genético dos familiares em falta, a fim de se analisar a existência de segregação familiar das alterações identificadas. Também será útil efetuar o estudo do RNA de familiares dos pacientes que possuem mutações previstas como modificadoras de *splicing*.

Uma limitação deste trabalho foi a ausência de estudos funcionais *in vitro*, para se confirmar ou não os resultados obtidos pelos diferentes programas de simulação. Assim, em futuros estudos, poderemos avaliar a atividade de sinalização e os níveis de expressão/maturação da proteína. As mutações que se encontram no domínio transmembranar de um recetor acoplado à proteína G são mais suscetíveis de prejudicar o tráfico do recetor e resultam em níveis reduzidos de recetores na membrana plasmática (215). Nestes casos poderá ser possível quantificar o recetor na membrana plasmática em células não-permeabilizadas e células permeabilizadas. As mutações que se encontram nas alças extracelulares podem

comprometer severamente a transdução de sinal. Estas mutações podem interferir com a ligação do ligando, pelo que poderá ser necessário realizar ensaios de ligação ao recetor (215).

As deleções completas de genes em heterozigotia não são detetadas pelos métodos de sequenciação utilizados, pelo que se poderão ainda realizar outras técnicas complementares para descartar esta hipótese, nomeadamente através de MLPA (anteriormente descrita), ou por *fluorescence in situ hybridisation* (FISH) ou por *microarrays*.

Falta ainda perceber de que forma as alterações heterozigóticas, em genes cuja forma de hereditariedade é autossómica recessiva, podem contribuir para o fenótipo. Estudos funcionais deverão ser realizados para avaliar um possível efeito dominante-negativo destas variantes.

Destaca-se que os estudos funcionais *in vitro* são muito laboriosos, dispendiosos e que por isso, nem sempre são realizados para demonstrarem o efeito patogénico das mutações. Convém salientar que a gravidade da perda de função *in vitro* nem sempre está correlacionada com a apresentação fenotípica (216). Na investigação elaborada por Koika et al. (216) no gene *FGFR1*, os estudos funcionais de duas mutações (R254W e R254Q) que foram detetadas em dois indivíduos distintos, indicaram uma redução nos níveis de expressão no geral e na superfície celular, em ambas as mutações. Embora a substituição de uma arginina por um triptofano no codão 254 (R254W) tenha demonstrado ser mais perturbadora do que a substituição por uma glutamina (R254Q), não existiu uma relação clara entre a apresentação fenotípica e a gravidade da perda de função detetada *in vitro*, revelando algumas limitações dos estudos funcionais das mutações.

## 5. Conclusões

---

Concluída a sequenciação dos principais genes relacionados com o HHI, e tendo sido aplicados critérios de patogenicidade muito exigentes, ainda assim, detetaram-se defeitos genéticos em 60% dos casos estudados. Nos restantes pacientes, em que ainda não foram identificadas as causas genéticas, a patologia poderá estar associada a alterações em outros genes que ainda não foram alvo de estudo, ou poderão ser indivíduos nos quais não existe efetivamente uma causa genética, mas sim adquirida.

O presente trabalho permitiu ampliar o espectro de defeitos genéticos associados ao HHI em diversos genes, identificando 18 novas mutações. Destas, seis foram identificadas no gene *FGFR1*, duas no *KAL1*, seis no *CHD7*, uma no *KISS1R*, duas no *PROKR2* e uma no *GNRHR*. À mutação A353T do *FGFR1* atribuiu-se especial importância, uma vez que foi detetada no exão 8A que codifica a isoforma IIIb. Pela primeira vez, foi detetada uma mutação num paciente com HHn nesta isoforma, o que sugere um papel da mesma na patologia do HHI, devendo incluir-se sempre o exão 8A no estudo genético. Foi possível atribuir uma causa genética a 30 dos 50 pacientes englobados no estudo, contudo, nenhuma das alterações foi detetada nos genes *GNRH1*, *TAC3* e *TACR3*.

Os casos de digenia/oligogenia detetados constituem uma possível explicação para a variabilidade fenotípica e penetrância incompleta presente em certas famílias. A tendência de encontrar este tipo de hereditariedade será cada vez maior, uma vez que, os avanços da ciência têm permitido encontrar cada vez mais genes, que estão de alguma forma relacionados com o funcionamento do eixo hipotálamo-hipófise-gónadas, e como tal com o HHI.

Os diferentes estudos reportados na literatura permitiram verificar que uma determinada mutação num gene pode alertar para a presença de outras malformações, nomeadamente, as mutações no *KAL1* poderão estar associadas a problemas renais e, alterações no *CHD7* poderão ser indicativas de malformações em outros órgãos. Apesar de não ter sido possível estabelecer uma efetiva relação genótipo/fenótipo, verificámos que dois irmãos com mutação no *KAL1* evidenciavam agenesia renal unilateral e os pacientes que apresentavam surdez eram portadores de mutações nos genes *FGFR1* e/ou *CHD7*. Considerando que a prevalência de mutações foi superior no *FGFR1* e no *CHD7*, estes genes são particularmente relevantes, devendo ser prioritários no rastreio de mutações em pacientes com HHI, especialmente se possuírem surdez. Em caso negativo, deverá ser procurada uma causa genética nos outros genes. Mesmo quando identificada uma mutação, há vantagens em alargar o estudo aos restantes genes dado que, tal como tem sido descrito, existem diversos casos de hereditariedade oligogénica.

A existência de casos com reversão no HHI após cessar a TRT foi também constatada em um dos pacientes em estudo. Assim, sugere-se um acompanhamento médico assíduo, na medida em que alguns casos têm reversão do HHI aquando do término do tratamento.

Os programas bioinformáticos são uma ferramenta muito útil para prognóstico do efeito funcional das mutações detetadas, sobretudo quando há restrições práticas à utilização sistemática de estudos funcionais *in vitro*. Porém, os programas de previsão bioinformáticos também têm as suas limitações, dado que não são 100% sensíveis, nem específicos.

Salienta-se ainda a importância deste estudo no aconselhamento genético. Sabendo quais os genes mutados, podemos inferir qual o risco dos descendentes ou outros familiares serem portadores das mutações e testar, para sabermos se herdaram efetivamente a mutação. Tomando conhecimento da existência de uma mutação patogénica é possível aplicar atempadamente os procedimentos necessários para que se consigam ultrapassar os efeitos nefastos, nomeadamente, fazer o tratamento de reposição de testosterona ou estrogénios na idade apropriada, assim como, identificar outras anomalias potencialmente associadas. Contudo, o carácter oligogénico e de penetrância incompleta associado a diversos casos, poderá dificultar o processo de aconselhamento genético.

A genética humana, através da contribuição dos estudos dos genes mutados, tem sido uma poderosa ferramenta para a descoberta de mecanismos moleculares envolvidos no controlo central da reprodução, levando à identificação de várias moléculas que são essenciais para a migração dos neurónios embrionários de GnRH, bem como, para a regulação e ação da GnRH hipotalâmica. Estudos adicionais em pacientes com SK e HHn isolado, poderão levar à identificação de novos genes e mecanismos envolvidos na regulação da reprodução, e identificar novos alvos terapêuticos com interesse clínico.

## Referências bibliográficas

---

1. Cadman SM, Kim S-H, Hu Y, Gonzalez-Martinez D, Bouloux P-M. Molecular pathogenesis of Kallmann's syndrome. *Hormone Research in Paediatrics* 2007;67:231-42.
2. Balasubramanian R, Dwyer A, Seminara SB, Pitteloud N, Kaiser UB, Crowley Jr WF. Human GnRH deficiency: a unique disease model to unravel the ontogeny of GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 2010;92:81-99.
3. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nature Reviews Endocrinology* 2009;5:569-76.
4. Seminara SB, Hayes FJ, Crowley Jr WF. Gonadotropin-releasing hormone deficiency in the human (idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann's syndrome): pathophysiological and genetic considerations. *Endocrine reviews* 1998;19:521-39.
5. Della Valle E, Vezzani S, Rochira V, Granata ARM, Madeo B, Genovese E *et al.* Prevalence of olfactory and other developmental anomalies in patients with central hypogonadotropic hypogonadism. *Frontiers in endocrinology* 2013;4:1-5.
6. Costa-Barbosa FA, Balasubramanian R, Keefe KW, Shaw ND, Al-Tassan N, Plummer L *et al.* Prioritizing genetic testing in patients with Kallmann syndrome using clinical phenotypes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2013;98:E943-E53.
7. Pitteloud N, Acierno Jr JS, Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley Jr WF. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005;90:1317-22.
8. Ribeiro RS, Vieira TC, Abucham J. Reversible Kallmann syndrome: report of the first case with a KAL1 mutation and literature review. *European journal of endocrinology* 2007;156:285-90.
9. Sinisi AA, Asci R, Bellastella G, Maione L, Esposito D, Elefante A *et al.* Homozygous mutation in the prokineticin-receptor2 gene (Val274Asp) presenting as reversible Kallmann syndrome and persistent oligozoospermia: case report. *Human reproduction* 2008;23:2380-4.
10. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA *et al.* Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *New England Journal of Medicine* 2007;357:863-73.
11. de San Juan AM. Falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existia una atrofia congénita de los testiculos y miembro viril. *Siglo Medico* 1856;131:211.
12. Kallmann F. The genetic aspects of primary eunuchoidism. *American journal of mental deficiency* 1944;48:203-36.
13. De Morsier G. [Studies in cranio-encephalic dysraphia. I. Agenesis of the olfactory lobe (lateral telencephaloschisis) and of the callous and anterior commissures (median telencephaloschisis); olfacto-genital dysplasia.]. *Schweizer Archiv fur Neurologie und*

- Psychiatrie Archives suisses de neurologie et de psychiatrie Archivio svizzero di neurologia e psichiatria 1953;74:309-61.
14. Rugarli EI. Kallmann syndrome and the link between olfactory and reproductive development. *The American Journal of Human Genetics* 1999;65:943-8.
  15. Ribeiro RS, Abucham J. Síndrome de Kallmann: uma revisão histórica, clínica e molecular. *Arq bras endocrinol metab* 2008;52:8-17.
  16. Aron DC, Findling JW, Tyrrell B. Hypothalamus & Pituitary Gland In: David G. Gardner DS, ed. *Basic & Clinical Endocrinology*. New York: McGraw-Hill Companies, Incorporated, 2007:134 - 6.
  17. Balasubramanian S, Cox A, Brown N, Reed M. Candidate gene polymorphisms in solid cancers. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)* 2004;30:593-601.
  18. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA, Krieger M., Scott MP *et al.* Life begins with cells. In: Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA, Krieger M., Scott MP *et al.*, eds. *Molecular Cell Biology*. USA: W.H. Freeman and Company, 2005.
  19. Ballabio A, Parenti G, Tippett P, Mondello C, Di Maio S, Tenore A *et al.* 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. *Human genetics* 1986;72:237-40.
  20. Meitinger T, Heye B, Petit C, Levilliers J, Golla A, Moraine C *et al.* Definitive localization of X-linked Kallman syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and anosmia) to Xp22. 3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI-S232. *American journal of human genetics* 1990;47:664.
  21. 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. *American journal of medical genetics* 1989;33:100-7.
  22. Schwanzel-Fukuda M, Bick D, Pfaff DW. Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-expressing cells do not migrate normally in an inherited hypogonadal (Kallmann) syndrome. *Molecular Brain Research* 1989;6:311-26.
  23. Soussi-Yanicostas N, Hardelin J-P, Arroyo-Jimenez M, Ardouin O, Legouis R, Levilliers J *et al.* Initial characterization of anosmin-1, a putative extracellular matrix protein synthesized by definite neuronal cell populations in the central nervous system. *Journal of cell science* 1996;109:1749-57.
  24. Legouis R, Hardelin J-P, Levilliers J, Claverie J-M, Compain S, Wunderle V *et al.* The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell* 1991;67:423-35.
  25. Lutz B, Kuratani S, Rugarli EI, Wawersik S, Wong C, Bieber FR *et al.* Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Human molecular genetics* 1994;3:1717-23.

26. Duke VM, Winyard PJ, Thorogood P, Soothill P, Bouloux PM, Woolf AS. KAL, a gene mutated in Kallmann's syndrome, is expressed in the first trimester of human development. *Molecular and cellular endocrinology* 1995;110:73-9.
27. Semple RK, Topaloglu AK. The recent genetics of hypogonadotrophic hypogonadism-novel insights and new questions. *Clinical endocrinology* 2010;72:427-35.
28. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S *et al.* Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:15140-4.
29. Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E *et al.* The Importance of Autosomal Genes in Kallmann Syndrome: Genotype-Phenotype Correlations and Neuroendocrine Characteristics 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86:1532-8.
30. Salenave S, Chanson P, Bry H, Pugeat M, Cabrol S, Carel JC *et al.* Kallmann's syndrome: a comparison of the reproductive phenotypes in men carrying KAL1 and FGFR1/KAL2 mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;93:758-63.
31. Tsai P-S, Gill JC. Mechanisms of disease: insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nature Reviews Endocrinology* 2006;2:160-71.
32. Dodé C, Levilliers J, Dupont J-M, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N *et al.* Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nature genetics* 2003;33:463-5.
33. Miraoui H, Dwyer A, Pitteloud N. Role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in the neuroendocrine control of human reproduction. *Molecular and cellular endocrinology* 2011;346:37-43.
34. Pitteloud N, Acierno JS, Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahimi OA *et al.* Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006;103:6281-6.
35. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA. Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine & growth factor reviews* 2005;16:107-37.
36. Eswarakumar V, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 2005;16:139-49.
37. Hu Y, Bouloux P-M. X-linked GnRH deficiency: Role of KAL-1 mutations in GnRH deficiency. *Molecular and cellular endocrinology* 2011;346:13-20.
38. Brooks AN, Kilgour E, Smith PD. Molecular pathways: fibroblast growth factor signaling: a new therapeutic opportunity in cancer. *Clinical Cancer Research* 2012;18:1855-62.
39. Rice D, Rice R, Thesleff I. Fgfr mRNA isoforms in craniofacial bone development. *Bone* 2003;33:14-27.
40. Pirvola U, Ylikoski J, Trokovic R, Hébert JM, McConnell SK, Partanen J. FGFR1 is required for the development of the auditory sensory epithelium. *Neuron* 2002;35:671-80.

41. Groth C, Lardelli M. The structure and function of vertebrate fibroblast growth factor receptor 1. *International Journal of Developmental Biology* 2002;46:393-400.
42. Tommiska J, Käsäkoski J, Christiansen P, Jørgensen N, Lawaetz JG, Juul A *et al.* Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism in Denmark. *European journal of medical genetics* 2014;57:345-8.
43. Beer H-D, Vindevoghel L, Gait MJ, Revest J-M, Duan DR, Mason I *et al.* Fibroblast growth factor (FGF) receptor 1-IIIb is a naturally occurring functional receptor for FGFs that is preferentially expressed in the skin and the brain. *Journal of Biological Chemistry* 2000;275:16091-7.
44. Partanen J, Schwartz L, Rossant J. Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes & development* 1998;12:2332-44.
45. Albuissou J, Pêcheux C, Carel JC, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P *et al.* Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Human mutation* 2005;25:98-9.
46. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li J-D, Raivio T, Cole LW *et al.* Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007;104:17447-52.
47. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A *et al.* Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2009;94:4380-90.
48. Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A *et al.* A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome. *Nature genetics* 1994;8:269-74.
49. Pitteloud N, Meysing A, Quinton R, Acierno JS, Dwyer AA, Plummer L *et al.* Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. *Molecular and cellular endocrinology* 2006;254:60-9.
50. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family The complete mammalian fgf family. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:15694-700.
51. Garel S, Huffman KJ, Rubenstein JL. Molecular regionalization of the neocortex is disrupted in Fgf8 hypomorphic mutants. *Development* 2003;130:1903-14.
52. Trainor PA, Ariza-McNaughton L, Krumlauf R. Role of the isthmus and FGFs in resolving the paradox of neural crest plasticity and pre patterning. *Science* 2002;295:1288-91.
53. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A *et al.* Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of Clinical Investigation* 2007;117:457.
54. Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR. An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre-and Flp-mediated recombination. *Nature genetics* 1998;18:136-41.

55. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y *et al.* Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *The Journal of clinical investigation* 2008;118:2822.
56. Silveira LFG, Trarbach EB, Latronico AC. Genetics basis for GnRH-dependent pubertal disorders in humans. *Molecular and cellular endocrinology* 2010;324:30-8.
57. Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM *et al.* Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nature genetics* 2004;36:955-7.
58. Hurst J, Meinecke P, Baraitser M. Balanced t (6; 8)(6p8p; 6q8q) and the CHARGE association. *Journal of medical genetics* 1991;28:54-5.
59. Arrington CB, Cowley BC, Nightingale DR, Zhou H, Brothman AR, Viskochil DH. Interstitial deletion 8q11. 2-q13 with congenital anomalies of CHARGE association. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2005;133:326-30.
60. Johnson D, Morrison N, Grant L, Turner T, Fantes J, Connor JM *et al.* Confirmation of CHD7 as a cause of CHARGE association identified by mapping a balanced chromosome translocation in affected monozygotic twins. *Journal of medical genetics* 2006;43:280-4.
61. Sanlaville D, Verloes A. CHARGE syndrome: an update. *European Journal of Human Genetics* 2007;15:389-99.
62. Jongmans M, Ravenswaaij-Arts V, Pitteloud N, Ogata T, Sato N, Claahsen-van der Grinten H *et al.* CHD7 mutations in patients initially diagnosed with Kallmann syndrome-the clinical overlap with CHARGE syndrome. *Clinical genetics* 2009;75:65-71.
63. Cabral A, Lima E. Regulação gênica por conformação da cromatina gene regulation by chromatin conformation. *Science* 2015;6:50-61.
64. Janssen N, Bergman JE, Swertz MA, Tranebjaerg L, Lodahl M, Schoots J *et al.* Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Human mutation* 2012;33:1149-60.
65. Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature reviews Molecular cell biology* 2006;7:437-47.
66. Flanagan JF, Blus BJ, Kim D, Clines KL, Rastinejad F, Khorasanizadeh S. Molecular implications of evolutionary differences in CHD double chromodomains. *Journal of molecular biology* 2007;369:334-42.
67. Kim H-G, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH *et al.* Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 2008;83:511-9.
68. Schachen PC TF, Lalani SR, Belmont JW, Collins FS. The CHD7 protein, mutated in CHARGE syndrome, binds to specific sites on chromatin (A19). *Am J Med Genet* 2006;79 (suppl. 1):20.
69. Ng KL, Li J-D, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou Q-Y. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science* 2005;308:1923-7.

70. Matsumoto S-i, Yamazaki C, Masumoto K-h, Nagano M, Naito M, Soga T *et al.* Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103:4140-5.
71. Kaser A, Winklmayr M, Lepperdinger G, Kreil G. The AVIT protein family. *EMBO reports* 2003;4:469-73.
72. Chen J, Kuei C, Sutton S, Wilson S, Yu J, Kamme F *et al.* Identification and pharmacological characterization of prokineticin 2B as a selective ligand for prokineticin receptor 1. *Molecular pharmacology* 2005;67:2070-6.
73. Ngan ES, Tam PK. Prokineticin-signaling pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology* 2008;40:1679-84.
74. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D *et al.* Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;93:3551-9.
75. Lin DC-H, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen J-L, Tian H, Zhou Q-Y. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry* 2002;277:19276-80.
76. de Moura PR, Vidal FAP. Transdução de sinais: uma revisão sobre proteína G. *Scientia Medica (Porto Alegre)* 2011;21:31-6.
77. Wechselberger C, Puglisi R, Engel E, Lepperdinger G, Boitani C, Kreil G. The mammalian homologues of frog Bv8 are mainly expressed in spermatocytes. *FEBS letters* 1999;462:177-81.
78. Li J-D, Hu W-P, Boehmer L, Cheng MY, Lee AG, Jilek A *et al.* Attenuated circadian rhythms in mice lacking the prokineticin 2 gene. *The Journal of neuroscience* 2006;26:11615-23.
79. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT *et al.* Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2008;93:4113-8.
80. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin J-P *et al.* PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Human molecular genetics* 2009;18:75-81.
81. de Roux N, Genin E, Carel J-C, Matsuda F, Chaussain J-L, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100:10972-6.
82. Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno Jr JS, Shagoury JK *et al.* The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine* 2003;349:1614-27.

83. Gottsch M, Cunningham M, Smith J, Popa S, Acohido B, Crowley W *et al.* A role for kisspeptins in the regulation of gonadotropin secretion in the mouse. *Endocrinology* 2004;145:4073-7.
84. Lee DK, Nguyen T, O'Neill GP, Cheng R, Liu Y, Howard AD *et al.* Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *Febs Letters* 1999;446:103-7.
85. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K *et al.* Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001;411:613-7.
86. Navarro VM, Castellano JM, García-Galiano D, Tena-Sempere M. Neuroendocrine factors in the initiation of puberty: the emergent role of kisspeptin. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 2007;8:11-20.
87. Teles MG, Bianco SD, Brito VN, Trarbach EB, Kuohung W, Xu S *et al.* A GPR54-activating mutation in a patient with central precocious puberty. *New England Journal of Medicine* 2008;358:709-15.
88. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S *et al.* Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *New England Journal of Medicine* 2012;366:629-35.
89. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM *et al.* TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nature genetics* 2009;41:354-8.
90. Pinto FM, Almeida TA, Hernandez M, Devillier P, Advenier C, Candenas ML. mRNA expression of tachykinins and tachykinin receptors in different human tissues. *European journal of pharmacology* 2004;494:233-9.
91. Rance NE, Krajewski SJ, Smith MA, Cholanian M, Dacks PA. Neurokinin B and the hypothalamic regulation of reproduction. *Brain research* 2010;1364:116-28.
92. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA *et al.* TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010;95:2857-67.
93. Young J, Bouligand J, Francou B, Raffin-Sanson M-L, Gaillez S, Jeanpierre M *et al.* TAC3 and TACR3 defects cause hypothalamic congenital hypogonadotropic hypogonadism in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010;95:2287-95.
94. Chan Y-M, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S *et al.* GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009;106:11703-8.
95. Bouligand J, Ghervan C, Trabado S, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A, Young J. Genetics defects in GNRH1: A paradigm of hypothalamic congenital gonadotropin deficiency. *Brain research* 2010;1364:3-9.

96. Bouligand J, Ghervan C, Tello JA, Brailly-Tabard S, Salenave S, Chanson P *et al.* Isolated familial hypogonadotropic hypogonadism and a GNRH1 mutation. *New England Journal of Medicine* 2009;360:2742-8.
97. Cheng CK, Leung PC. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocrine Reviews* 2005;26:283-306.
98. Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocrine Reviews* 1994;15:462-99.
99. Millar RP, Lu Z-L, Pawson AJ, Flanagan CA, Morgan K, Maudsley SR. Gonadotropin-releasing hormone receptors. *Endocrine Reviews* 2004;25:235-75.
100. de Roux N. GnRH receptor and GPR54 inactivation in isolated gonadotropic deficiency. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;20:515-28.
101. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G *et al.* A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *New England Journal of Medicine* 1997;337:1597-603.
102. Trarbach EB, Costa EMF, Versiani B, de Castro M, Baptista MTM, Garmes HM *et al.* Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;91:4006-12.
103. de Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E, Schaison G. The Same Molecular Defects of the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Determine a Variable Degree of Hypogonadism in Affected Kindred 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1999;84:567-72.
104. Massin N, Pécheux C, Eloit C, Bensimon J-L, Galey J, Kuttenn Fdr *et al.* X chromosome-linked Kallmann syndrome: clinical heterogeneity in three siblings carrying an intragenic deletion of the KAL-1 gene. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;88:2003-8.
105. Bonomi M, Libri DV, Guizzardi F, Guarducci E, Maiolo E, Pignatti E *et al.* New understandings of the genetic basis of isolated idiopathic central hypogonadism. *Asian J Androl* 2012;14:49-56.
106. Ghervan C, Young J. [Congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome in males]. *Presse medicale (Paris, France: 1983)* 2014;43:152-61.
107. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Plos One* 2012;7:1-13.
108. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic acids research* 2003;31:3812-4.
109. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 2010;7:248-9.
110. Schwarz JM, Rödelberger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nature methods* 2010;7:575-6.
111. DeLano WL, Bromberg S. *PyMOL User's Guide*. DeLano Scientific LLC 2004.

112. Desmet F-O, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic acids research* 2009;37:e67-e.
113. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 1997;25:3389-402.
114. Miller S, Dykes D, Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 1988;16:1215.
115. Nasiri H, Forouzandeh M, Rasaee M, Rahbarizadeh F. Modified salting-out method: high-yield, high-quality genomic DNA extraction from whole blood using laundry detergent. *Journal of clinical laboratory analysis* 2005;19:229-32.
116. Higuchi R, Krummel B, K.Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic acids research* 1988;16:7351-67.
117. Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA, Krieger M., Scott MP *et al.* Characterizing and Using Cloned DNA Fragments In: Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser CA, Krieger M., Scott MP *et al.*, eds. *Molecular Cell Biology*. USA: W.H. Freeman and Company, 2005.
118. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1977;74:5463-7.
119. Den Dunnen J, Antonarakis S. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Human genetics* 2001;109:121-4.
120. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene* 1999;234:177-86.
121. Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nature Reviews Genetics* 2009;10:241-51.
122. Gorlov IP, Gorlova OY, Frazier ML, Spitz MR, Amos CI. Evolutionary evidence of the effect of rare variants on disease etiology. *Clinical genetics* 2011;79:199-206.
123. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. *Nature genetics* 2008;40:695-701.
124. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nature Reviews Genetics* 2010;11:415-25.
125. Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Medical Genomics* 2015;8:37.
126. Liu J, Huang S, Sun M, Liu S, Liu Y, Wang W *et al.* An improved allele-specific PCR primer design method for SNP marker analysis and its application. *Plant Methods* 2012;8:34.
127. Schlötterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 2000;109:365-71.
128. Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic acids research* 2007;35:W71-W4.
129. Huret JL. FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology* 2009;13:821-40.

130. Bailleul-Forestier I, Gros C, Zenaty D, Bennaceur S, Leger J, de Roux N. Dental agenesis in Kallmann syndrome individuals with FGFR1 mutations. *International Journal of Paediatric Dentistry* 2010;20:305-12.
131. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler M-L *et al.* Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet* 2006;2:e175.
132. Beneduzzi D, Trarbach EB, Latronico AC, Mendonca BBd, Silveira LF. Novel mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR) gene in a patient with normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia* 2012;56:540-4.
133. Laitinen E-M, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L *et al.* Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2011;6:41.
134. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M *et al.* Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertility and sterility* 2014;102:1130-6. e3.
135. Shin S-J, Sul Y, Kim JH, Cho JH, Kim G-H, Kim JH *et al.* Clinical, endocrinological, and molecular characterization of Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: a single center experience. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 2015;20:27-33.
136. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nature Reviews Genetics* 2011;12:683-91.
137. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nature Reviews Genetics* 2002;3:285-98.
138. Claverie-Martin F, Gonzalez-Paredes FJ, Ramos-Trujillo E. Splicing defects caused by exonic mutations in PKD1 as a new mechanism of pathogenesis in autosomal dominant polycystic kidney disease. *RNA biology* 2015;12:369-74.
139. Nackley A, Shabalina S, Tchivileva I, Satterfield K, Korchynskiy O, Makarov S *et al.* Human catechol-O-methyltransferase haplotypes modulate protein expression by altering mRNA secondary structure. *Science* 2006;314:1930-3.
140. Kimchi-Sarfaty C, Oh JM, Kim I-W, Sauna ZE, Calcagno AM, Ambudkar SV *et al.* A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 2007;315:525-8.
141. Tsai C-J, Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C, Ambudkar SV, Gottesman MM, Nussinov R. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *Journal of molecular biology* 2008;383:281-91.
142. Morrison A, Chekaluk Y, Bacares R, Ladanyi M, Zhang L. BAP1 Missense Mutation c. 2054 A> T (p. E685V) Completely Disrupts Normal Splicing through Creation of a Novel 5'Splice Site in a Human Mesothelioma Cell Line. *PLoS one* 2015;10.
143. Consortium GP. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* 2010;467:1061-73.

144. Consortium GP. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 2012;491:56-65.
145. Nelson MR, Wegmann D, Ehm MG, Kessner D, Jean PS, Verzilli C *et al.* An abundance of rare functional variants in 202 drug target genes sequenced in 14,002 people. *Science* 2012;337:100-4.
146. Barrett LW, Fletcher S, Wilton SD. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements. *Cellular and molecular life sciences* 2012;69:3613-34.
147. Zentner GE, Henikoff S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* 2013;20:259-66.
148. Versiani BR, Trarbach E, Koenigkam-Santos M, Dos Santos AC, Elias LL, Moreira AC *et al.* Clinical assessment and molecular analysis of GnRHR and KAL1 genes in males with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Clinical endocrinology* 2007;66:173-9.
149. Xu N, Kim H-G, Bhagavath B, Cho S-G, Lee JH, Ha K *et al.* Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertility and sterility* 2011;95:1613-20. e7.
150. Izumi Y, Tatsumi K, Okamoto S, Ogawa T, Hosokawa A, Matsuo T *et al.* Analysis of the KAL Kallmann Syndrome 1 Gene in 19 Japanese Patients with. *Endocrine Journal* 2001;48:143-9.
151. Montenegro LR, Silveira LF, Tusset C, de Castro M, Versiani BR, Latronico AC *et al.* Combined use of multiplex ligation-dependent probe amplification and automatic sequencing for identification of KAL1 defects in patients with Kallmann syndrome. *Fertility and sterility* 2013;100:854-9.
152. Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S *et al.* 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004;89:1079-88.
153. Söderlund D, Vilchis F, Méndez J. Polymorphic changes in the KAL1 gene: not all of them should be classified as polymorphisms. *Journal of endocrinological investigation* 2004;27:765-9.
154. Quinton R, Duke V, De Zoysa P, Platts A, Valentine A, Kendall B *et al.* The neuroradiology of Kallmann's syndrome: a genotypic and phenotypic analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1996;81:3010-7.
155. Soderlund D, Canto P, Mendez J. Identification of three novel mutations in the KAL1 gene in patients with Kallmann syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002;87:2589-92.
156. Nagata K, Yamamoto T, Chikumi H, Ikeda T, Yamamoto H, Hashimoto K *et al.* A novel interstitial deletion of KAL1 in a Japanese family with Kallmann syndrome. *Journal of human genetics* 2000;45:237-40.

157. Hardelin J-P, Levilliers J, del Castillo I, Cohen-Salmon M, Legouis R, Blanchard S *et al.* X chromosome-linked Kallmann syndrome: stop mutations validate the candidate gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992;89:8190-4.
158. Georgopoulos NA, Pralong FP, Seidman CE, Seidman J, Crowley Jr WF, Vallejo M. Genetic Heterogeneity Evidenced by Low Incidence of KAL-1 Gene Mutations in Sporadic Cases of Gonadotropin-Releasing Hormone Deficiency 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1997;82:213-7.
159. Hardelin J-P, Levilliers J, Blanchard S, Carel J-C, Leutenegger M, Pinard-Bertelletto J-P *et al.* Heterogeneity in the mutations responsible for X chromosome-linked Kallmann syndrome. *Human molecular genetics* 1993;2:373-7.
160. Hu Y, González-Martínez D, Kim S, Bouloux P. Cross-talk of anosmin-1, the protein implicated in X-linked Kallmann's syndrome, with heparan sulphate and urokinase-type plasminogen activator. *Biochemical Journal* 2004;384:495-505.
161. Robertson A, MacColl G, Nash J, Boehm M, Perkins S, Bouloux P. Molecular modelling and experimental studies of mutation and cell-adhesion sites in the fibronectin type III and whey acidic protein domains of human anosmin-1. *Biochemical Journal* 2001;357:647-59.
162. Maya-Nuñez G, Torres L, Ulloa-Aguirre A, Carlos Zenteno J, Cuevas-Covarrubias S, Saavedra-Ontiveros D *et al.* An atypical contiguous gene syndrome: molecular studies in a family with X-linked Kallmann's syndrome and X-linked ichthyosis. *Clinical endocrinology* 1999;50:157-62.
163. Pedersen-White JR, Chorich LP, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. The prevalence of intragenic deletions in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Molecular human reproduction* 2008;14:367-70.
164. Xu H, Li Z, Wang T, Wang S, Liu J, Wang D. Novel homozygous deletion of segmental KAL1 and entire STS cause Kallmann syndrome and X-linked ichthyosis in a Chinese family. *Andrologia* 2015;(in press).
165. Cuevas-Covarrubias S, González-Huerta L. Analysis of the VCX3A, VCX2 and VCX3B genes shows that VCX3A gene deletion is not sufficient to result in mental retardation in X-linked ichthyosis. *British Journal of Dermatology* 2008;158:483-6.
166. Hernandez-Martin A, Gonzalez-Sarmiento R, De Unamuno P. X-linked ichthyosis: an update. *British Journal of Dermatology* 1999;141:617-27.
167. Xu X, Xiong Z, Zhang L, Liu Y, Lu L, Peng Y *et al.* Variations analysis of NLGN3 and NLGN4X gene in Chinese autism patients. *Molecular biology reports* 2014;41:4133-40.
168. Fukami M, Kirsch S, Schiller S, Richter A, Benes V, Franco B *et al.* A member of a gene family on Xp22.3, VCX-A, is deleted in patients with X-linked nonspecific mental retardation. *The American Journal of Human Genetics* 2000;67:563-73.
169. Baker KE, Parker R. Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression. *Current opinion in cell biology* 2004;16:293-9.
170. Olsen SK, Ibrahim OA, Raucci A, Zhang F, Eliseenkova AV, Yayon A *et al.* Insights into the molecular basis for fibroblast growth factor receptor autoinhibition and ligand-binding

- promiscuity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:935-40.
171. Schlessinger J. Autoinhibition control. *Science* 2003;300:750-2.
  172. Miura K, Miura S, Yoshiura K-i, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N *et al.* A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Human reproduction* 2010;25:1076-80.
  173. Mohammadi M, Dikic I, Sorokin A, Burgess W, Jaye M, Schlessinger J. Identification of six novel autophosphorylation sites on fibroblast growth factor receptor 1 and elucidation of their importance in receptor activation and signal transduction. *Molecular and Cellular Biology* 1996;16:977-89.
  174. Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, Dwyer AA, Tommiska J *et al.* Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012;97:E694-E9.
  175. Bergman JE, de Ronde W, Jongmans MC, Wolffenbuttel BH, Drop SL, Hermus A *et al.* The results of CHD7 analysis in clinically well-characterized patients with Kallmann syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2012;97:E858-E62.
  176. Marcos S, Sarfati J, Leroy C, Fouveaut C, Parent P, Metz C *et al.* The prevalence of CHD7 missense versus truncating mutations is higher in patients with Kallmann syndrome than in typical CHARGE patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2014;99:E2138-E43.
  177. Pagon RA, Graham JM, Zonana J, Yong S-L. Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *The Journal of pediatrics* 1981;99:223-7.
  178. Blake KD, Davenport SL, Hall BD, Hefner MA, Pagon RA, Williams MS *et al.* CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. *Clinical Pediatrics* 1998;37:159-73.
  179. Issekutz KA, Graham JM, Prasad C, Smith IM, Blake KD. An epidemiological analysis of CHARGE syndrome: preliminary results from a Canadian study. *American Journal of Medical Genetics Part A* 2005;133:309-17.
  180. Källén K, Robert E, Mastroiacovo P, Castilla EE, Källén B. CHARGE Association in newborns: a registry-based study. *Teratology* 1999;60:334-43.
  181. Bartels CF, Scacheri C, White L, Scacheri PC, Bale S. Mutations in the CHD7 gene: the experience of a commercial laboratory. *Genetic testing and molecular biomarkers* 2010;14:881-91.
  182. Basaran Y, Bolu E, Unal HU, Sagkan RI, Taslipinar A, Ozgurtas T *et al.* Multiplex ligation dependent probe amplification analysis of KAL1, GNRH1, GNRHR, PROK2 and PROKR2 in male patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Endokrynologia Polska* 2013;64:285-92.

183. Leroy C, Fouveaut C, Leclercq S, Jacquemont S, Du Boullay H, Lespinasse J *et al.* Biallelic mutations in the prokineticin-2 gene in two sporadic cases of Kallmann syndrome. *European Journal of Human Genetics* 2008;16:865-8.
184. Gürbüz F, Kotan LD, Mengen E, Şıklar Z, Berberoğlu M, Dökmetaş S *et al.* Distribution of gene mutations associated with familial normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology* 2012;4:121.
185. Beranova M, Oliveira L, Bedecarrats G, Schipani E, Vallejo M, Ammini A *et al.* Prevalence, Phenotypic Spectrum, and Modes of Inheritance of Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor Mutations in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86:1580-8.
186. Beneduzzi D, Trarbach EB, Min L, Jorge AA, Garmes HM, Renk AC *et al.* Role of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in patients with a wide spectrum of pubertal delay. *Fertility and sterility* 2014;102:838-46.
187. Tello JA, Newton CL, Bouligand J, Guiochon-Mantel A, Millar RP, Young J. Congenital hypogonadotropic hypogonadism due to GnRH receptor mutations in three brothers reveal sites affecting conformation and coupling. *PloS one* 2012;7:e38456.
188. Karges B, Karges W, de Roux N. Clinical and molecular genetics of the human GnRH receptor. *Human reproduction update* 2003;9:523-30.
189. Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH *et al.* Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nature genetics* 1998;18:14-5.
190. Kottler M-L, Chauvin Sp, Lahlou N, Harris CE, Johnston CJ, Lagarde J-P *et al.* A New Compound Heterozygous Mutation of the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor (L314X, Q106R) in a Woman with Complete Hypogonadotropic Hypogonadism: Chronic Estrogen Administration Amplifies the Gonadotropin Defect 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2000;85:3002-8.
191. Bedecarrats GY, Linher KD, Kaiser UB. Two common naturally occurring mutations in the human gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor have differential effects on gonadotropin gene expression and on GnRH-mediated signal transduction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003;88:834-43.
192. Quinton R, Duke VM, Robertson A, Kirk JM, Matfin G, De Zoysa PA *et al.* Idiopathic gonadotrophin deficiency: genetic questions addressed through phenotypic characterization\*. *Clinical endocrinology* 2001;55:163-74.
193. Quaynor SD, Kim H-G, Cappello EM, Williams T, Chorich LP, Bick DP *et al.* The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertility and sterility* 2011;96:1424-30. e6.
194. Mitchell AL, Dwyer A, Pitteloud N, Quinton R. Genetic basis and variable phenotypic expression of Kallmann syndrome: towards a unifying theory. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2011;22:249-58.

195. Bhagavath B, Podolsky RH, Ozata M, Bolu E, Bick DP, Kulharya A *et al.* Clinical and molecular characterization of a large sample of patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertility and sterility* 2006;85:706-13.
196. Kirk J, Grant D, Besser G, Shalet S, Quinton R, Smith C *et al.* Unilateral renal aplasia in X-linked Kallmann's syndrome. *Clinical genetics* 1994;46:260-2.
197. Han T, Bouloux P. What is the optimal therapy for young males with hypogonadotropic hypogonadism? *Clinical endocrinology* 2010;72:731-7.
198. Laitinen E-M, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, Toppari J, Raivio T. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PloS one* 2012;7:e39450.
199. Lin L, Conway GS, Hill NR, Dattani MT, Hindmarsh PC, Achermann JC. A homozygous R262Q mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor presenting as constitutional delay of growth and puberty with subsequent borderline oligospermia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;91:5117-21.
200. Rowe R, Schroeder M, Faiman C. Testosterone-induced fertility in a patient with previously untreated Kallmann's syndrome. *Fertility and sterility* 1983;40:400-1.
201. Bagatell C, Paulsen C, Bremner W. Preservation of fertility despite subnormal gonadotropin and testosterone levels after cessation of pulsatile gonadotropin-releasing hormone therapy in a man with Kallmann's syndrome. *Fertility and sterility* 1994;61:392-4.
202. Quinton R, Cheow H, Tymms D, Bouloux P, Wu F, Jacobs H. Kallmann's syndrome: is it always for life? *Clinical Endocrinology* 1999;50:481-6.
203. Pitteloud N, Boepple PA, DeCruz S, Valkenburgh SB, Crowley Jr WF, Hayes FJ. The Fertile Eunuch Variant of Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism: Spontaneous Reversal Associated with a Homozygous Mutation in the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor 1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2001;86:2470-5.
204. Dewailly D, Boucher A, Decanter C, Lagarde JP, Counis R, Kottler M-L. Spontaneous pregnancy in a patient who was homozygous for the Q106R mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Fertility and sterility* 2002;77:1288-91.
205. Kramer P, Wray S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes & development* 2000;14:1824-34.
206. Miura K, Acierno Jr JS, Seminara SB. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *Journal of human genetics* 2004;49:265-8.
207. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE *et al.* Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011;108:11524-9.

208. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B *et al.* Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *The American Journal of Human Genetics* 2013;92:725-43.
209. Corradi A, Croci L, Broccoli V, Zecchini S, Previtali S, Wurst W *et al.* Hypogonadotropic hypogonadism and peripheral neuropathy in Ebf2-null mice. *Development* 2003;130:401-10.
210. Niakan K, McCabe E. DAX1 origin, function, and novel role. *Molecular genetics and metabolism* 2005;86:70-83.
211. Richard NY, Achermann JC, Ito M, Jameson JL. The role of DAX-1 in reproduction. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 1998;9:169-75.
212. Farooqi IS, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocrine reviews* 2006;27:710-8.
213. Craig DW, Pearson JV, Szelinger S, Sekar A, Redman M, Corneveaux JJ *et al.* Identification of genetic variants using bar-coded multiplexed sequencing. *Nature methods* 2008;5:887-93.
214. Worthey EA. Analysis and Annotation of Whole-Genome or Whole-Exome Sequencing-Derived Variants for Clinical Diagnosis. *Current protocols in human genetics* 2013;9.24.: 1-9.
215. Abreu AP, Kaiser UB, Latronico AC. The role of prokineticins in the pathogenesis of hypogonadotropic hypogonadism. *Neuroendocrinology* 2010;91:283-90.
216. Koika V, Varnavas P, Valavani H, Sidis Y, Plummer L, Dwyer A *et al.* Comparative functional analysis of two fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) mutations affecting the same residue (R254W and R254Q) in isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *Gene* 2013;516:146-51.
217. Trarbach EB, Abreu AP, Silveira LFG, Garmes HM, Baptista MTM, Teles MG *et al.* Nonsense mutations in FGF8 gene causing different degrees of human gonadotropin-releasing deficiency. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2010;95:3491-6.
218. Antelli A, Baldazzi L, Balsamo A, Pirazzoli P, Nicoletti A, Gennari M *et al.* Two novel GnRHR gene mutations in two siblings with hypogonadotropic hypogonadism. *European journal of endocrinology* 2006;155:201-5.
219. Song MH, Cho H-J, Lee HK, Kwon TJ, Lee W-S, Oh S *et al.* CHD7 mutational analysis and clinical considerations for auditory rehabilitation in deaf patients with CHARGE syndrome 2011;6:1-9.

## Anexos

---

## Anexo I- Primers para PCR e sequenciação

Na amplificação dos produtos de PCR foi maioritariamente utilizada a enzima *Dream Taq* (*Dream Taq Green DNA*, ThermoScientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), as exceções encontram-se descritas nas tabelas seguintes. Os primers de PCR foram também usados para a sequenciação dos produtos amplificados.

Os primers usados na amplificação do gene *KAL1* foram publicados por Hardelin et al. (159), com exceção do primer forward do exão 1 e do primer reverse do exão 10 que foram desenhados por nós no programa *Primer 3 Plus* (128).

Nome do Primer <i>kal1</i>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F 1R	TGGGAGGGAGGTCGCGAGGAGGG GAACCTTTCGAGCCCCAGGCTGGGAG	2,0 mM Mg +10% DMSO + 60°C	1	462
2F 2R	TTGGAAGGGAAGGACAGCAGG GCACCATTCATACAGGTATAG	1,5 mM Mg + 56°C	2	230
3F 3R	TCTCAGCTTTGTTTGTTC CGTAAGCATAGTCAGATTTGG	2,0 mM Mg + 56°C	3	174
4F 4R	ATGTCTTGGAAATCAGACTTC ATGTGACACTGCATGTGTCTT	2,0 mM Mg + 56°C	4	334
5F 5R	CAGATTGTTTTAATTGATACG GCAGACACTACCTCCAGGATG	2,0 mM Mg + 56°C	5	267
6F 6R	AGTGACATGTTCCCTGTGCTC CTGGTAGCAAGGATAGTATTC	2,0 mM Mg + 60°C	6	218
7F 7R	ATGATGTGTCTTTGTACTGGG TGGGAATAACAATCCTTCCTC	2,0 mM Mg + 56°C	7	269
8F 8R	GACGTGGAAGGTTTGTAAACGC ATCATGTCAATCATCTTGA	2,0 mM Mg + 56°C	8	237
9F 9R	TGCCCAGGAATCTATAATTAC ACTATCTCTATATTACTGTGC	2,0 mM Mg + 56°C	9	269
10F 10R	ACCTGGAATGTAACATCCAGC GTGAATGGATAAAAGAATGAGTGA	2,0 mM Mg + 60°C	10	325
11F 11R	AATATGATTTCAATTCTTGCC GATGTAGAAGTCCTTCAGGTG	2,0 mM Mg + 56°C	11	283
12F 12R	TCTCCAGTCGCTAATCCTGG CCAATGACACAGACATAGTAC	2,0 mM Mg + 56°C	12	302
13F 13R	GTGCATTGCATGTTGTCTCTG TGACAGGATGGCTTAATGCC	1,5 mM Mg + 56°C	13	241
14F 14R	ATGTGACTGACATATTTTGTG GGCCGAAGTTCAACAAGCTTA	2,0 mM Mg + 56°C	14	147

Os primers usados na amplificação do gene *FGFR1* foram publicados por Sato et al. (152), com exceção dos primers dos exões 14 e 15 que foram publicados por Albuissou et al. (45).

Nome do Primer <i>FGFR1</i>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
2F 2R	CCTTCTGTTTTCTTTCCCC GAGCCTTCCCTGTTGACCA	1,5 mM Mg + 60°C	2	354
3F 3R	TCTTCTCTCTCGCCCTT AAGCAGAGTGGGGCAGAT	2,5 mM Mg + 60°C	3	434
4/5F 4/5R	AAATCTAGGGGTCCCTAGGAG TCCCCTGTTCCATTACTCTA	1,5 mM Mg + 60°C	4 e 5	611
6F 6R	GTCATGGGGCCTGCATTTT AAGTGCCAATCGCTATCTGA	1,5 mM Mg + 60°C	6	299

Nome do Primer FGFR1	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
7F	ATGGCAAGGTCCCATGA	1,5 mM Mg + 60°C	7	354
7R	AAGCGTGAGGAATGATCCCAT			
8AF	CCTGGGCCTGCCTGAAAG	1,5 mM Mg + 60°C	8A	372
8AR	TCCATGGCTCTGGGCACTA			
8BF	AGGTCTCATGTCCTGTGCTTG	1,5 mM Mg + 60°C	8B	355
8BR	AGGATTCAGCCCTCAAAGCT			
9F	CAGGAGACAGGTGTTGCTTTT	1,5 mM Mg + 60°C	9	403
9R	AGCCAGAAAATAAGGCCCAA			
10/11F	TTGGGAAGCCCTGACTAAGAA	1,5 mM Mg + 60°C	10 e 11	639
10/11R	TGTTTGCTTGAATGGGACA			
12F	AAAGCAGCCCTCGACACATA	1,5 mM Mg + 60°C	12	261
12R	ACCCAGCTCAGATCTTCTCC			
13F	AAACCTGCTCACCTGCTGCT	1,5 mM Mg + 60°C	13	354
13R	AGTGCTCAGTGCATCCACAA			
14F	GCAAGCAGTGTGGCAGAAGT	1,5 mM Mg + 60°C	14	300
14R	CCACTCCTTGCTTCTCAGAT			
15F	TTCCCACCTGTGCCCTCATG	1,5 mM Mg + 60°C	15	227
15R	AGAGGACTCCTCAGTCCAGG			
16/17F	TGCCCTGGGTAGAGGATTTGT	1,5 mM Mg + 60°C	16 e 17	563
16/17R	TGTGATGGGCGAGAGGAA			
18F	GTAAGGCTGCCCGTGCCAG	1,5 mM Mg + 60°C	18	634
18R	GCTCAGGAAGCTCTCACTTGC			

Os primers usados na amplificação do gene *FGF8* foram publicados por Ericka et al. (217), com exceção do primer forward dos exões 1/2 que foi desenhado por nós no programa *Primer 3 Plus* (128).

Nome do Primer FGF8	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1/2F	ACCCGCACCTCTCCGCTC	1,0 mM Mg +1% DMSO + 60°C	1 e 2	435
1/2R	TACCTCTGTGCCTCAGCTCC			
3/4F	AGGGGATGGATGTTTCGATG	1,5 mM Mg + 56°C	3 e 4	825
3/4R	CCCTCAAGACACCTTTCTGC			
5F	CAGTTGCTGCTGGGCTGT	2,0 mM Mg + 56°C	5	295
5R	GCCTACCTTGTGGGATCAG			
6F	TGCGAGTTGTGAGGGATTAG	2,0 mM Mg + 56°C	6	600
6R	CAATATCAACAACCGGAACC			

Os primers usados na amplificação do gene *GNRHR* foram publicados por Antelli et al. (218).

Nome do Primer GNRHR	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F	AACAGGACTTTAGATTCCGGT	2,0 mM Mg + 56°C	1	777
1R	GTAAAGAAGTTTGCCCAAG			
2F	AGATCTATTGACACTTACCC	2,0 mM Mg + 56°C	2	535
2R	ATGAGCTAATATATGCAAACCTG			
3F	ATTTTCTCCATTGATTAAGTTG	2,0 mM Mg + 56°C	3	433
3R	CATTTGTGTTAATCATTCCC			

Os primers usados na amplificação do gene *GNRH1* foram publicados por Chan et al. (94).

Nome do Primer <b>GNRH1</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F	CTCTGACTTCCATCTTCTGC	1,5 mM Mg + 56°C	1	392
1R	GCCTTATCTCACCTGGAGC			
2F	CTGCAACTTTCCCAATCTCC	1,5 mM Mg + 56°C	2	346
2R	GAGGAGTCAGGAATGTAAGC			
3F	CCTAGCACTAAGTAGAGC	1,5 mM Mg + 56°C	3	303
3R	GTGCAACTTGGTGAAGG			

Os primers usados na amplificação do gene *KISS1R* foram publicados por Seminara et al. (82), com exceção do primer reverse do exão 4 e dos primers do exão 5 que foram desenhados por nós no programa *Primer 3 Plus* (128).

Nome do Primer <b>KISS1R</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F	GCTGGGTGAATAGAGGGC	1,5 mM Mg + 60°C	1	722
1R	GGAGTTTGCGACCTCTAGC			
2F	CCATCCTGCTGGTCACTCG	1,5 mM Mg + 60°C	2	352
2R	CACTGCGGAGCGCACTCC			
3F	GCCTGAGTGTTCCGACACG	1,5 mM Mg + 60°C	3	340
3R	GCGCCCATTTCCAGATGC			
4F	GCATCTGGAAAATGGGCGC	1,5 mM Mg + 60°C	4	566
4R	GTGAAGGTGGTTAGACGAAAGGC			
5F	AGGAGGGGCGGTGCGAG	1,5 mM Mg + DMSO 5% + 55°C	5	611
5R	CTAATAACAGAAGAATAGCCGC			

Os primers usados na amplificação do gene *CHD7* foram publicados por Song et al. (219), com exceção dos primers dos exões 2.4 e 3 que foram desenhados por nós no programa *Primer 3 Plus* (128).

Nome do Primer <b>CHD7</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
2.1F	TGGGGACCAAATTCAGATGT	1,5 mM Mg + 60°C	2	669
2.1R	ATTCTGCATGCCAGGGTAGA			
2.2F	CCGAACAGAATGATGAGCAAC	1,5 mM Mg + 60°C	2	642
2.2R	GACTGTCTGGCTCCGAGAAC			
2.3F	TCACCACCCTCTACTGCTC	1,5 mM Mg + 60°C	2	630
2.3R	GCCGAGGACATGCCTATAAA			
2.4F	CTCTCCACCTCCCATGTAC	1,5 mM Mg + 60°C	2	606
2.4R	AGGCACTCATAATGAAAAAGC			
3F	ACATCAGCCACTAACTTTCAG	1,5 mM Mg + 60°C	3	678
3R	AATGCGTAAAAGCCTTAGC			
4F	TTGCCAGGAAAACCTTAATTGG	1,5 mM Mg + 57°C	4	361
4R	GCTAAAGTTACCCATGCCAAA			
5F	ATGGTCTCGATCTCCTGACCT	1,5 mM Mg + 60°C	5	636
5R	AAAATGCATCCATAAATCCC			
6F	ACCTAGGCTGGTCCACGTAA	1,5 mM Mg + 60°C	6	479
6R	CTGGGGTCAAATATCCCAAAG			
7F	TAGAAGCTCTCGACGTTGA	1,5 mM Mg + 60°C	7	401
7R	CCAGGCCATGATGACTAAAGA			
8F	GAGCTGGAGGCTTAGGACAG	1,5 mM Mg + 60°C	8	452
8R	CAAGTTGACAGCACCAAATGA			

Nome do Primer CHD7	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
9F	TCACAGTAAAAGGTTTCACACG	1,5 mM Mg + 60°C	9	426
9R	AAGGCTCTGACCAAGACCAG			
10/11F	TGTATGTGGTCAAATGAATCCAA	1,5 mM Mg + 60°C	10 e 11	469
10/11R	TCAATAACTAAAGGAAAGGAAGTACAG			
12F	TGCATTTGTGGGTACAATGG	1,5 mM Mg + 60°C	12	428
12R	CCTTCCAAGTCACCAAGAC			
13F	GATGCATGTGCTCTGTTAGGA	1,5 mM Mg + 60°C	13	482
13R	TCTGAGCAACGGGACTATCA			
14F	TGTCCATGGATCTGTCTACCTG	1,5 mM Mg + 60°C	14	489
14R	TGATGACCTGGAAAGTCCAA			
15F	CAACCTTCATGCACTGCTCT	1,5 mM Mg + 60°C	15	494
15R	AAGGGATTCTGGTGCTTCA			
16F	AATGCCTCAATGTGTTGTGC	1,5 mM Mg + 60°C	16	486
16R	GACCCCTGGGAAGGTAATTT			
17F	CGCCAATAAACCTATTTGCT	1,5 mM Mg + 60°C	17	457
17R	CTGAGTGACGACGCAACATT			
18F	ACATTGGAATGAGGGTTTCAG	1,5 mM Mg + 60°C	18	550
18R	GCCCCTTTTCGTAGAAGATCC			
19F	GCCTTTGATTATTTTCGACCTC	1,5 mM Mg + 60°C	19	478
19R	AGGGGTTCCACAGGGAGTTA			
20/21F	TGTCTGGCATAAGTGGAGGA	1,5 mM Mg + 60°C	20 e 21	596
20/21R	TTCTCTACCAGTTGGGAATTCTA			
22/23F	CACCCAGTGTGAATTGTTGC	1,5 mM Mg + 60°C	22 e 23	759
22/23R	CTGCATCTGCAGACGTGAAG			
24F	AGGCAATGGTAGGGTACGTG	1,5 mM Mg + 60°C	24	585
24R	ACAGCCTTTTCCTGATTCTCA			
25F	TGGCAGAGGGCTACTGACTC	1,5 mM Mg + 60°C	25	572
25R	CGCTGGAAGCAAAGTTTAGG			
26F	CCAGGCATCTTGCAATTATTC	1,5 mM Mg + 60°C	26	466
26R	GAACCCTGCCAATAGATGTGA			
27/28F	ATGTCATTTCCCGCAATCTCC	1,5 mM Mg + 60°C	27 e 28	554
27/28R	ACCACGTGAACAATGACTGC			
29F	TAAAAATGAGGGCACTGAGATG	1,5 mM Mg + 60°C	29	538
29R	CCCCAGACTTTATACATGGTAG			
30F	GGTAGTGACCACCAAAGAAAGG	1,5 mM Mg + 60°C	30	532
30R	CTCTGTGATCGGCTCAATTATG			
31.1F	GCCATGTGTAGGCGAGTATGT	1,5 mM Mg + 60°C	31	642
31.1R	CCTCTTCTTTGCCCTCACATT			
31.2F	CAAACAGAGGGGCAGTAATA	1,5 mM Mg + 60°C	31	552
31.2R	ATAAGGTGCGAGAGCAAACAC			
32F	GACAACAGTGCCCAATACCA	1,5 mM Mg + 60°C	32	578
32R	ATGGAGCCAAAGATCAATCC			
33F	CTAGGACCTTCTGCCAGAGC	1,5 mM Mg + 60°C	33	531
33R	TTTCTAAGCAAGGCCAGTGAA			
34F	CTCAGCTCTGTGCCAGTCAT	1,5 mM Mg + 60°C	34	689
34R	GGAAGCTGGCTTTTACACAATG			
35F	CCAGCCTCATTTTCTGACTTTT	1,5 mM Mg + 60°C	35	544
35R	AACAACAAAGACCTGGGAAATG			
36F	CCTTAATGGACGGGTAATAGG	1,5 mM Mg + 60°C	36	586
36R	CACCTGGGTAGATCCTTCATTG			
37F	TTTCTTAGCCAGAAGGAAGTG	1,5 mM Mg + 60°C	37	539
37R	CCCCTGGAGAAGTCTACCTCTAA			
38.1F	TGAGCTGTTAGGAGGGAAGAAC	1,5 mM Mg + 60°C	38	533
38.1R	GTTTCCAGTAGCAGCTGACAGAG			
38.2F	GAATCTCCAGAATCTCCAGTCG	1,5 mM Mg + 60°C	38	670
38.2R	GTCTAGCTTTCACCTGTGCT			
38.3F	TCCATGTTTCTACCTCCAGGAC	1,5 mM Mg + 60°C	38	630
38.3R	TGAGCAGCACTTTCTCCATTA			

Os primers usados na amplificação do gene *TAC3* foram publicados por Gianetti et al. (92).

Nome do Primer <b>TAC3</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
2F	CAAGCTGCTGGTAATGAATG	1,5 mM Mg + 60°C	2	326
2R	AAATGCCCTCTGACGGAC			
3/4F	GATTCAGGATGGGCTCAGG	1,5 mM Mg + 60°C	3 e 4	534
3/4R	GGGAGCTGGCATATTGTTTG			
5/6F	ACAGAGACCAGAAACCCAGTC	1,5 mM Mg + 60°C	5 e 6	692
5/6R	TTTAATACCTGTAGCATGGGAG			

Os primers usados na amplificação do gene *TACR3* foram publicados por Gianetti et al. (92).

Nome do Primer <b>TACR3</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1AF	CAGGACGCTCAGTTCTCCA	1,5 mM Mg + 60°C	1	629
1AR	ATTTCCAAAAGTCCACTG			
1BF	ACCAAGCTGGCAACCTCTC	1,5 mM Mg + 60°C	1	603
1BR	CCACGGAAGCAGAAAATTGT			
2F	GCCATGATTACCATTCTACG	1,5 mM Mg + 60°C	2	527
2R	TGACCACACACAAATCATACCA			
3F	CAACTGGCAGCATTTGAAAC	1,5 mM Mg + 60°C	3	529
3R	GATTACAGTATGTGGACAGCAGC			
4F	CTGTCCGTATATTGCTTCACC	1,5 mM Mg + 60°C	4	496
4R	AAAGCCTGTGCCTCTCTCAG			
5F	TGACATAAATTCTAAGAGTCTGG	1,5 mM Mg + 56°C	5	600
5R	CTTTCTCAATTTGACCATAGC			

Os primers usados na amplificação do gene *PROK2* foram publicados por Pitteloud et al. (46), com exceção dos primers do exão 1 que foram desenhados por nós no programa *Primer 3 Plus* (128).

Nome do Primer <b>PROK2</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F	GGCGGGGCTAGCCTTTAT	2,0 mM Mg + 10% DMSO + 53°C	1	393
1R	ATTTTCCCAAGTGACCAAG			
2F	GATTTTCATAATCCAGGGGC	1,5 mM Mg + 56°C	2	464
2R	TGTTTGTGCGAGCACGTTACC			
3F	GTATCTTGCTCCGCCAGTTC	2,0 mM Mg + 56°C	3	259
3R	AGGACAGACCCAACTCTATGG			
4F	TGAGCATATTGCCTAATGGG	2,0 mM Mg + 56°C	4	352
4R	TTGAGGAAGCAAGAGCATTTC			

Os primers usados na amplificação do exão 1 do gene *PROKR2* foram publicados por Dodé et al. (131), e os primers usados para o exão 2 foram desenhados por nós no programa *Primer 3 Plus* (128).

Nome do Primer <b>PROKR2</b>	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Exão	Tamanho do produto (pb)
1F	GGCTCACTGACCCTGAAAGA	1,5 mM Mg + 56°C	1	619
1R	TGTCAGCCTGTCAGAGCCTA			
2AF	TGAGGATTCACCTGTGCCACT	1,0 mM Mg + 55°C	2	488
2AR	AGAATGCACATGAGCACCAG			
2BF	CACCATGACCCTGTGCTATG	2,0 mM Mg + 55°C	2	528
2BR	CCCATGCAGCCTATGAACTT			

## Anexo II- Primers usados para despiste de variantes em controlos usando diferentes técnicas.

Os primers foram desenhados usando o programa Primer3Plus (128) e os nucleótidos sublinhados representam alterações nucleotídicas da cadeia original.

### Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *KAL1* para despiste de variantes em controlos.

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
c.542-1G>C	Restrição enzimática	F: CAGATTGTTTTAATTGATACG R: GCAGACACTACCTCCAGGATG	2,0 mM Mg + 56°C	EcoNI	Alelo normal: 239 e 28 Alelo mutado: 267
p.R191X	Allele específico	F: CAGATTGTTTTAATTGATACG R: GCAGACACTACCTCCAGGATG F: AAGCCCAGAAAAGAGT <u>GAT</u>	1,5 mM Mg + 55°C		Alelo normal: 267 Alelo mutado: 223

### Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *FGFR1* para despiste de variantes em controlos.

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
p.W4C	Restrição enzimática	F: AGAACTGGGATGTGGA <u>ACTG</u> R: GAGCCTTCCTGTTGACCA	1,5 mM Mg + 60°C	BsrI	Alelo normal: 183, 13, 9 Alelo mutado: 196, 9
c.95dupA	Restrição enzimática	F: TCTTCCTCTCTCGCCCTT R: TGCTGGTTACGCAAGCATAG	2,5 mM Mg + 60°C	PfIMI	Alelo normal: 273 Alelo mutado: 215, 59
p.D59D	Restrição enzimática	F: TCTTCCTCTCTCGCCCTT R: AAGCAGAGTGGGGGCAGAT	2,5 mM Mg + 60°C	FoKI	Alelo normal: 434 Alelo mutado: 287, 147
p.S96C	Restrição enzimática	F: TCTTCCTCTCTCGCCCTT R: TGCTGGTTACGCAAGCATAG	2,5 mM Mg + 60°C	MspI	Alelo normal: 147, 69, 31, 26 Alelo mutado: 173, 69, 31
c.359-4A>G	Restrição enzimática	F: CAGTGCCCTTCTTCTT <u>C</u> <u>G</u> R: TCCCTGTTCCCATTA <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u>	1,5 mM Mg + 60°C	BstUI	Alelo normal: 584 Alelo mutado: 565, 19
p.A353T	Restrição enzimática	F: CCTGGGCCTGCCTGAAAG R: TCCATGGCTCTGGGCACTA	1,5 mM Mg + 60°C	AccI	Alelo normal: 372 Alelo mutado: 206, 166
c.1961dupA:	Restrição enzimática	F: GACATTCACCACATCGACTATTA R: CCACTCCTTGCTTCTCAGAT	1,5 mM Mg + 60°C	AseI	Alelo normal: 96 Alelo mutado: 76 e 21
p.M719V	Restrição enzimática	F: TGCCCTGGGTAGAGGATTTGT R: TGTGATGGGCGAGAGGAA	1,5 mM Mg + 60°C	BstUI	Alelo normal: 563 Alelo mutado: 379, 184

**Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *FGF8* para despiste de variantes em controlos.**

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
p.T194T	Allele specific	F: GCAAGGGCTCCAAGCCA R: CAATATCAACAACCGGAACC F: TGCGAGTTGTGAGGGATTAG	2,0 mM Mg + 61°C	-	Alelo normal: bandas inespecíficas Alelo mutado: 313

**Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *GNRHR* para despiste de variantes em controlos.**

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
p.Q106R	Restrição enzimática	F: AACAGGACTTTAGATTCGGT R: GTTAAGAAGTTTGCCCAAG	2,0 mM Mg + 56°C	Xcml	Alelo normal: 401, 218, 158 Alelo mutado: 559, 218
p.V134G	Allele specific	F: CCAGCCTTCATGATGGTAGG R: GTTAAGAAGTTTGCCCAAG F: AACAGGACTTTAGATTCGGT	2,0 mM Mg + 56°C	-	Alelo normal: 777 Alelo mutado: 317
p.Y283H	Restrição enzimática	F: ATTTTCTCCATTGATTAAGTTG R: CCAAATTCCTAGGACATACT	2,0 mM Mg + 56°C	Bsrl	Alelo normal: 235 Alelo mutado: 214, 21
c.937_947delTTTAAACCC	PCR	F: ATTTTCTCCATTGATTAAGTTG R: CATTTGTGTTAATCATTCCC	2,0 mM Mg + 56°C	-	Alelo normal: 433 Alelo mutado: 422

**Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *KISS1R* para despiste de variantes em controlos.**

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
p.R149C	Restrição enzimática	F: GCCTGAGTGTTGCGACACG R: GCGCCCATTTCCAGATGC	1,5 mM Mg + 60°C	BstUI	Alelo normal: 163, 114, 63 Alelo mutado: 277, 63

**Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *CHD7* para despiste de variantes em controlos.**

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
p.G388E	Restrição enzimática	F: TCACCACCCCTCTACTGCTC R: GAGGTGGAGAGGCATAAGCT	1,5 mM Mg + 60°C	HindIII	Alelo normal: 422 Alelo mutado: 393, 29
p.S559S	Allele specific	F: TCTCAGCATTCCCCGCA R: AATGCGTAAAAGCCTTAGC F: AACAGGACTTTAGATTCGGT R: GTTAAGAAGTTTGCCCAAG	1,5 mM Mg + 55°C	-	Alelo normal: 777 Alelo mutado: 604
c.2049_2050ins AAAGCA	PCR	F: ACATCAGCCACTAACTTTTCAG R: AATGCGTAAAAGCCTTAGC	1,5 mM Mg + 60°C	-	Alelo normal: 678 Alelo mutado: 684
p.H903P	Restrição enzimática	F: GAGCATGCTTTTCCTTAATGTG R: GAACACCACTTACCAGAGAG	Taq supreme* + 1,5 mM Mg + 60°C	MnII	Alelo normal: 329 Alelo mutado: 318, 11
p.T1082I	Allele specific	F: TAAGTTTCATGCCATCAT <del>AA</del> T R: TCTGAGCAACGGGACTATCA	1,5 mM Mg + 55°C	-	Alelo normal: - Alelo mutado: 227
p.V1452 L	Restrição enzimática	F: GCCTTTGATTATTTTCGACCTC R: AGGGGTTCCACAGGGAGTTA	1,5 mM Mg + 60°C	RsaI	Alelo normal: 241, 166, 71 Alelo mutado: 407, 71
p.G1479 G	Allele specific	F: TGGATGAGGAGGATGAATGA R: AGGGGTTCCACAGGGAGTTA F: GCCTTTGATTATTTTCGACCTC	1,5 mM Mg + 55°C	-	Alelo normal: 478 Alelo mutado: 250
p.D1854 G	Restrição enzimática	F: AGAATTTGATAGAGAAGATGAGG R: ACCACGTGAACAATGACTGC	1,5 mM Mg + 60°C	Apal	Alelo normal: 350 Alelo mutado: 324, 26
c.5894+32C>G	Allele specific	F: AAGGTTTCCACTCAGCT <del>AC</del> G R: CCCCAGACTTTATACATGGTAG F: CCAGCCTCATTTTCTGACTTTT R: AACAAACAAGACCTGGGAAATG	1,5 mM Mg + 61°C	-	Alelo normal: 544 Alelo mutado: 164
p.R2065 H	Restrição enzimática	F: GCCATGTGTAGGCGAGTATGT R: CTCTTCTTGGCCTCACATT	1,5 mM Mg + 60°C	BstUI	Alelo normal: 383, 259 Alelo mutado: 642
c.7830+57C>G	Allele specific	F: AGGCCGGTCCACTTCAATG R: AACAAACAAGACCTGGGAAATG F: CCAGCCTCATTTTCTGACTTTT	1,5 mM Mg + 61°C	-	Alelo normal: 544 Alelo mutado: 109
p.A2785 A	Restrição enzimática	F: TGAGCTGTTAGGAGGGAAGAAC R: GTTCCAGTAGCAGCTGACAGAG	1,5 mM Mg + 60°C	MspI	Alelo normal: 409, 124 Alelo mutado: 533

\*Supreme Nzytaq (Nzytech, Lisboa, Portugal)

**Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *PROK2* para despiste de variantes em controlos.**

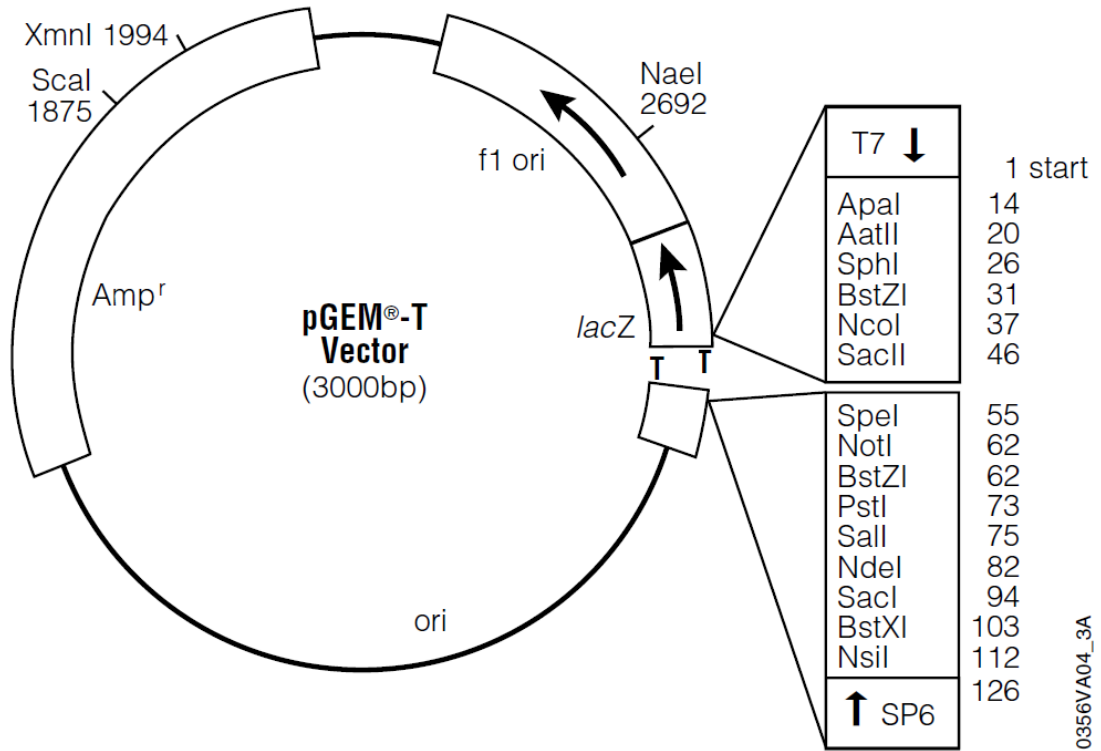
Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
c.1-35A>G	Restrição enzimática	F: GGCGGGGCTAGCCTTTAT R: TGCACCAAGGGGCGACAGG	2,5 mM Mg + 63°C + enzima HiFi*	AluI	Alelo normal: 382 Alelo mutado: 277, 105

\*HiFi DNA polymerase (High-Fidelity DNA Polymerase, Wilmington, MA, EUA)

**Primers usados em diferentes técnicas no gene humano *PROKR2* para despiste de variantes em controles.**

Variante	Técnica aplicada	Primer 5' para 3'	Condições otimizadas com temperatura de <i>annealing</i>	Enzima	Tamanho do produto (pb)
p.R80C	Restrição enzimática	F: GGCTCACTGACCCTGAAAGA R: GGTTGCGCAACTTCTTATA <u>CC</u>	1,5 mM Mg + 56°C	MspI	Alelo normal: 221, 99, 22 Alelo mutado: 221, 121
p.L176F	Allele specific	F: TGAGGATTCACTGTGCCACT R: AGAATGGACACCATCCAG <u>CCG</u> F: AACAGGACTTTAGATTCGGT R: GTTAAGAAGTTTGCCCAAG	1,5 mM Mg + 55°C	-	Alelo normal: diversas bandas Alelo mutado: 194
p.R268C	Restrição enzimática	F: CACCATGACCCTGTGCTATG R: CCCATGCAGCCTATGAACTT	2,0 mM Mg + 56°C	HhaI	Alelo normal: 435, 93 Alelo mutado: 528
p.R268H	Restrição enzimática	F: CACCATGACCCTGTGCTATG R: CCCATGCAGCCTATGAACTT	2,0 mM Mg + 56°C	HhaI	Alelo normal: 435, 93 Alelo mutado: 528

# Anexo III- Vetor de clonagem pGEM-T



## **Anexo IV- Listagem de todas as variantes genéticas identificadas**

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
2520	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)	c.2155A>G (Het) (0/420 alelos PT)			c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614- 45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.5894+32C>G (Het) MAF 0.5% (G) (3/414 alelos PT - 0.7%); c.6103+8C>T (Het) MAF 12% (T); c.6111C>T (Het) MAF 0.3% (T); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
2594	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.307T>A (Het) MAF 0.9% (A); c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2498+70T>A (Het) MAF 0.9% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)				c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
2661	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2185A>G (Het) MAF 0.1% (G); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)				c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G); c.803G>A (Het) (0/402 alelos PT)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
3329	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.1961dup A (Het) (0/418 alelos PT)		c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.3523-35C>G (Het) MAF 5.6% (G); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.6103+8C>T (Het) MAF 12% (T); c.6738G>A (Het) MAF 1.4% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
3328	-	c.1961dup A (Het) (0/418 alelos PT)	-	-	-	-		-	-	-	-
5040	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.244+128C>T (Het) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2124T>C (Het) MAF 1.1% (A); c.2377-3dupT (Het) MAF 1.3% (TT); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delIT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.6103+8C>T (Het) MAF 12% (T); c.6276G>A (Het) MAF 10.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A); c.1345G>A (Het) MAF 0.8% (A); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5070	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.600C>T (Het) MAF 0.4% (T)			c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.8355C>T (Het) MAF 0.02% (T) (0/408 alelos PT); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.738-82A>G (Het) MAF 0.3% (G)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.528G>C (Het) (0/416 alelos PT); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5102	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.542-1G>C (Hem) (0/406 alelos PT); c.1449+98A>G (Hem) MAF 0.3% (G)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.245-34G>A (Het) MAF 9% (A); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.2613+4C>T (Het); c.7579A>C (Het) MAF 0.05% (C); ; c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
6999	c.542-1G>C (Hem) (0/406 alelos PT)										
5135	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)		c.445-62G>A (Het) MAF 1.9% (A)		c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.5894+102C>G (Het) MAF 1.4% (G); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)			c.*19C>G (Het) MAF 0.03% (G)	c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5136		c.177C>T (Het) MAF 0.02% (T) (0/414 alelos PT)	c.32+11C >T (Het)		c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)		c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.5561A>G (Het) (0/404 alelos PT); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A)		c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
5139	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.1082-13C>T (Het) MAF 0.05% (T)		c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.307T>A (Het) MAF 0.9% (A); c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2708A>C (Het) (0/402 alelos PT); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		
5140	c.1600G>A (Het) MAF 45% (G); c.1833C>T (Het) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.5211-251C>A (Het) MAF 0.5% (A); c.5895-78G>A (Het) MAF 0.2% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5161	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)		c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5163	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.6103+8C>T (Hom) MAF 12% (T); c.6111C>T (Het) MAF 0.3% (T); c.6276G>A (Het) MAF 10.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)				c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
5164	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)			c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.6194G>A (Het) (0/414 alelos PT); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)	c.285+14G>A (Het) MAF 15.9% (A)	c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5174		c.287C>G (Het) (0/406 alelos PT)		c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.245-34G>A (Het) MAF 9% (A); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.4354-104A>G (Het) MAF 1.1% (G); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
5178	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1163G>A (Het) (0/406 alelos PT); c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.1-232C>G (Het) MAF 3.6% (G)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5182	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.5051-4C>T (Het) MAF 0.5% (T); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Hom) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5183	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5184	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G)	c.95dupA (Het) (0/404 alelos PT)		c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5185					c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.5051-4C>T (Het) MAF 0.5% (T); c.6216C>G (Het) MAF 0.05% (G); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5186			c.445-62G>A (Het) MAF 1.9% (A)		c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4354G>T (Het) (0/404 alelos PT); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5187	c.1600G>A (Hom) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hom) MAF 45.8% (C)		c.445- 35C>T (Het) MAF 0.1% (T)		c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.5405-176C>G (Het) MAF 4.1% (G); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.7356A>G (Het) MAF 4.1% (G); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5189	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.5307C>T (Het) MAF 1.5% (T); c.5404+67A>G (Het) MAF 1.7% (G); c.8076+163_8076+166du pATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5190	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.600C>T (Het) MAF 0.4% (T)			c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Het) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)				c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
5191	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)		c.445- 62G>A (Het) MAF 1.9% (A)		c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.5405- 176C>G (Het) MAF 4.1% (G); c.5894+102C>G (Het) MAF 1.4% (G); c.7356A>G (Het) MAF 4.1% (G); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.285+14 G>A (Het) MAF 15.9% (A)	c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G); c.802C>T (Het) MAF 1.2% (T) (1/404 alelos PT - 0.25%)
6896	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	c.802C>T (Het) MAF 1.2% (T) (1/404 alelos PT - 0.25%)
5192	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614- 45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-232C>G (Het) MAF 3.6% (G); c.1- 103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Hom) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
5194	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)		c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c2053_2058dupGCAAAA (Het) MAF 0.3% (dupGCAAAA) (4/214 alelos PT - 1.9%); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614- 45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.7830+57C>G (Het) (0/402 alelos PT); c.8076+163_8076+166du pATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-232C>G (Het) MAF 3.6% (G); c.1- 103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.549- 114C>A (Het) MAF 11.1% (A); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5195	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614- 45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5196	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)			c.401T>G (Het) MAF 0.05% (G) (0/406 alelos PT)	c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)				c.238C>T (Het) (0/400 alelos PT); c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
5236	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Hom) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)	c.292+16A>G (Het) MAF 11.6% (G)	c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.285+14G>A (Het) MAF 15.9% (A)	c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5237	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)	c.292+16A>G (Het) MAF 11.6% (G)	c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5268	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.2262G>A (Het) MAF 0.8% (A)			c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.5405-176C>G (Het) MAF 4.1% (G); c.7356A>G (Het) MAF 4.1% (G); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)			c.285+14G>A (Het) MAF 15.9% (A)	c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
5406	c.1600G>A (Het) MAF 45% (G)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T); c.141+85A>G (Het) MAF 5% (G)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.687C>T (Het) MAF 1.2% (T); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1536A>G (Het) MAF 0.2% (G); c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.3523-67A>G (Het) MAF 0.9% (G); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.6103+8C>T (Het) MAF 12% (T); c.6276G>A (Het) MAF 10.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.1-35A>G (Hom) (0/408 alelos PT)	c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5404					c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T); c.141+85A>G (Hom) MAF 5% (G)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (hom) MAF 20.3% (G); c.2239-109G>A (Het) MAF 0.4% (A); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5405					c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T); c.141+85A>G (Hom) MAF 5% (G)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2239-109G>A (Het) MAF 0.4% (A); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.1-35A>G (Hom) (0/408 alelos PT)	c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5679				c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Het) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)	c.292+ 16A>G (Het) MAF 11.6% (G)	c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.1- 232C>G (Het) MAF 3.6% (G)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
5915	c.1-91T>G (Het) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hom) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hom) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2067G>A (Het) MAF 0.2% (A); c.2442+93A>G (Het) MAF 13% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.5404+40G>A (Het) MAF 0.1% (A); c.6103+8C>T (Hom) MAF 12% (T); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.6276G>A (Het) MAF 10.3% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.285+14 G>A (Het) MAF 15.9% (A)	c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
5943	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G)	c.449- 25G>C (Het) MAF 0.3% (C)			c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Het) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.1677G>A (Het) (0/412 alelos PT); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
6021	c.1600G>A (Het) MAF 45% (G); c.1833C>T (Het) MAF 45.8% (C)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614- 45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)				
6024	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.1057G>A (Het) (0/402 alelos PT)*			c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166du pATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	KAL1	FGFR1	FGF8	GNRHR	GNRH1	KISS1R	CHD7	TAC3	TACR3	PROK2	PROKR2
6130			c.582G>A (Het) MAF 0.14% (A) (0/420 alelos PT)		c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
6178	c.1-91T>G (Hom) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Het) MAF 45% (G); c.1833C>T (Het) MAF 45.8% (C)				c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1018A>G (Het) MAF 0.3% (G); c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Hom) MAF 36.2% (G); c.549-114C>A (Het) MAF 11.1% (A); c.857A>G (Het) MAF 1.5% (G)		c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
6263	c.1-91T>G (Het) MAF 49.4% (T)	c.359-4A>G (Het) MAF 0.09% (G) (0/416 alelos PT); c.2262G>A (Het) MAF 0.8% (A)		c.847T>C (Hom) (0/414 alelos PT)	c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.244+128C>T (Hom) MAF 43% (C); c.445C>T (Het) (0/402 alelos PT); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4437G>A MAF 0.05% (A) (Het) (1/398 alelos PT – 0.3%); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
6776	Deleção completa <i>KAL1</i>				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA)	c.292+16A>G (Het) MAF 11.6% (G)	c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
6889					c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
6980	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.449-25G>C (Het) MAF 0.3% (C)		c.317A>G (Het) MAF 0.2% (G) (2/438 alelos PT – 0.5%); c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T); c.937_947delTTTAAACCC (Het) (0/414 alelos PT)	c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.245-34G>A (Het) MAF 9% (A); c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-232C>G (Het) MAF 3.6% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
6981	c.1-91T>G (Het) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Hom) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hom) MAF 45.8% (C)	c.449-25G>C (Het) MAF 0.3% (C)	c.445-62G>A (Het) MAF 1.9% (A)	c.317A>G (Het) MAF 0.2% (G) (2/438 alelos PT- 0.5%); c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T); c.937_947delTT TTTAAACCC (Het) (0/414 alelos PT)	c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G)	c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-232C>G (Het) MAF 3.6% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.525C>G (Het) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
7013	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)		c.445-62G>A (Het) MAF 1.9% (A)		c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Hom) MAF 36.2% (G); c.1-232C>G (Het) MAF 3.6% (G); c.1-103T>C (Hom) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
7030					c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Hom) MAF 39.2% (C)		c.525C>G (Hom) MAF 10.8% (G); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
7031	c.1-91T>G (Het) MAF 49.4% (T); c.1600G>A (Het) MAF 45% (G); c.1833C>T (Het) MAF 45.8% (C)			c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.738+64G>T (Het) MAF 46.6% (G); c.1091T>A (Hom) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4354-104A>G (Het) MAF 1.1% (G); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Hom) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Hom) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Hom) MAF 36.2% (C); c.1085+16C>T (Het) MAF 2.3% (T); c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)		c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G)
7039	c.1-91T>G (Hem) MAF 49.4% (T)				c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)		c.1665+34G>A (Hom) MAF 20.3% (G); c.2442+93A>G (Hom) MAF 13% (A); c.2614-45A>G (Hom) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Hom) MAF 19.3% (A); c.6103+8C>T (Het) MAF 12% (T); c.6276G>A (Het) MAF 10.3% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.243G>A (Het) MAF 0.04% (A)	c.465C>T (Hom) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)
7074	c.571C>T (Hem) (0/84 alelos PT)			c.453C>T (Het) MAF 6.5% (T)	c.47G>C (Hom) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.24A>G (Het) MAF 16.3% (G); c.1091T>A (Het) MAF 23.3% (T)	c.1665+34G>A (Het) MAF 20.3% (G); c.2614-45A>G (Het) MAF 17.9% (A); c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.4533+46A>G (Het) MAF 19.3% (A); c.6135G>A (Het) MAF 2.1% (A); c.8076+163_8076+166dupATCA (Het) MAF 49.6% (dupATCA); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.*73C>T (Het) MAF 39.2% (C)	c.285+14G>A (Hom) MAF 15.9% (A)	c.465C>T (Het) MAF 42.1% (T); c.585G>C (Hom) MAF 27.4% (G)

**Tabela (Anexo IV). Listagem de todas as variantes genéticas identificadas.**

Doente	<i>KAL1</i>	<i>FGFR1</i>	<i>FGF8</i>	<i>GNRHR</i>	<i>GNRH1</i>	<i>KISS1R</i>	<i>CHD7</i>	<i>TAC3</i>	<i>TACR3</i>	<i>PROK2</i>	<i>PROKR2</i>
7081	c.1600G>A (Hem) MAF 45% (G); c.1833C>T (Hem) MAF 45.8% (C)	c.12G>T (Het) (0/410 alelos PT)			c.47G>C (Het) MAF 27.2% (C); c.141+40T>G (Hom) MAF 3.4% (T)	c.738+64G>T (Hom) MAF 46.6% (G)	c.2614-14delT (Het) MAF 5.2% (-); c.3245C>T (Het) (0/412 alelos PT); c.5051- 4C>T (Het) MAF 0.5% (T) (0/412 alelos PT); c.*127delA (Het) MAF (15.1%) (-)		c.1-271C>G (Het) MAF 36.2% (G); c.1-103T>C (Het) MAF 36.2% (C); c.*73C>T (Hom) MAF 39.2% (C)		c.585G>C (Het) MAF 27.4% (G); c.802C>T (Het) MAF 1.2% (T) (1/404 alelos PT - 0.25%)

Os nucleótidos foram numerados de acordo com as sequências de referência para cada gene: *KAL1* (NM\_000216.2); *FGFR1* (isoforma IIIc- NM\_023110.2, isoforma IIIb- FJ809917); *FGF8* (NM\_033163.3); *CHD7* (NM\_017780.3); *PROK2* (NM\_001126128.1); *PROKR2* (NM\_144773.2); *KISS1R* (NM\_032551.4); *TAC3* (NM\_013251.3); *TACR3* (NM\_001059.2); *GNRH1* (NM\_000825.3) e *GNRHR* (NM\_000406.2). Het- variante encontrada em heterozigotia; Hom- variante encontrada em homozigotia; Hem- variante encontrada em hemizigotia. MAF- Minor Allele Frequency disponível em [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (Ensembl Archive Release 79- Março 2015) para o total da população. As variantes c.2053\_2058dupGCAAAA, c.2239-109G>A, c.2614-14delT, c.5894+32C>G, c.8076+163\_8076+166dupATCA e c.\*127delA presentes no gene *CHD7*, possuem uma MAF disponível em [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org) (Ensembl Archive Release 80- Maio 2015). Quando possível, apresenta-se a frequência alélica para a população Portuguesa (PT), calculada neste trabalho a partir de controlos saudáveis. Nos casos em que a variante nunca foi descrita, apresenta-se, apenas quando possível, a frequência na população portuguesa. \*presente na isoforma IIIb.

## Anexo V- Mutações germinativas inativadoras do gene *FGFR1* no hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático (2003-2014).

Mutação <sup>(a)</sup>	Codão	Efeito previsto <sup>(b)</sup>	Referência	Designação original
<b>Exon 2</b>				
c.11G>A	4	ns, p.W4X	Laitinen et al., 2011 (1)	c.11G > A
c.12G>A	4	ns, p.W4X	Dode & Hardelin 2009 (2)	12G>A
c.12G>T	12	ms, p.W4C	Presente estudo	
c.47C>G	16	ms, p.A16G	Dode & Hardelin 2009 (2)	47C>G
<b>Intron 2</b>				
c.91+2T>A	-	sp	Laitinen et al., 2012 (3)	c.91+2T>A
<b>Exon 3</b>				
c.95dupA	32	fs	Presente estudo	
c.142G>A	48	ms, p.G48S	Laitinen et al., 2011 (1)	c.142G > A
c.142G>A	48	ms, p.G48S	Trarbach et al., 2006 (4)	142G>A
c.165_171delTCGGCTG <sup>(c)</sup>	55-57	fs	Shaw et al., 2011 (5)	c165_171 deletion
c.177C>T	59	sp, p.D59D	Presente estudo	
c.231C>G <sup>(d)</sup>	77	ms, p.N77K	Dode et al., 2007 (6)	c.231C>G
c.232C>G	78	ms, p.R78G <sup>(e)</sup>	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.232 C>G, p.R78C
c.232C>G	78	ms, p.R78G <sup>(e)</sup>	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.232 C>G, p.R78C
c.232C>T	78	ms, p.R78C	Sykitotis et al., 2010 (8)	c.232C>T
c.246_247delAG	82-83	fs	Laitinen et al., 2011 (1)	c.246_247delAG
c.246_247delAG	82-83	fs	Entrala-Bernal et al., 2014 (9)	c. 246_247delAG
c.246_247delAG	82-83	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	246_247del
c.287C>G	96	ms, p.S96C	Presente estudo	
c.289G>A	97	ms, p.G97S	Dode & Hardelin 2009 (2)	289G>A
c.289G>A	97	ms, p.G97S	Jarzabek et al., 2012 (10)	c.289G>A
c.289G>A <sup>(f)</sup>	97	ms, p.G97S	Tommiska et al., 2014 (11)	c.289G>A
c.290G>A	97	ms, p.G97D	Dode et al., 2003 (12)	G97D
c.296A>G	99	ms, p.Y99C	Dode et al., 2003 (12)	Y99C
c.296A>G	99	ms, p.Y99C	Raivio et al., 2007 (13)	c.296 A>G
c.296A>G	99	ms, p.Y99C	Sykitotis et al., 2010 (8)	c.296 A>G
c.301T>G	101	ms, p.C101G	Quaynor et al., 2011 (14)	c.301T>G
c.302G>T	101	ms, p.C101F	Dode et al., 2007 (6)	c.302G>T
c.303_304insCC	102	fs	Dode et al., 2003 (12)	303-304insCC
c.304G>A <sup>(g)</sup>	102	ms, p.V102I	Albuisson et al., 2005 (15)	c.303G>A /p.V102I
c.304G>A	102	ms, p.V102I	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.304G>A
c.304G>A	102	ms, p.V102I	Sykitotis et al., 2010 (8)	c.304G>A
c.304G>A <sup>(w)</sup>	102	ms, p.V102I	Fukami et al., 2013 (16)	c.304G>A
c.304G>A	102	ms, p.V102I	Izumi et al., 2014 (17)	p.V102I
c.319T>A	107	ms, p.S107T	Izumi et al., 2014 (17)	p.S107T
c.320C>A	107	ns, p.S107X	Sato et al., 2004 (18)	320C>A
c.320C>T	107	ms, p.S107L	Sykitotis et al., 2010 (8)	c.320C>T
c.320C>T <sup>(s)</sup>	107	ms, p.S107L	Fukami et al., 2013 (16)	c.320C>T
c.326dupG	109	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	325_326insG
c.327delT	109	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	327del
c.336C>T	112	sp, (p.T112T)	Raivio et al., 2012 (19)	c.336C>T
c.347T>G	116	ms, p.V116G	Dode & Hardelin 2009 (2)	347T>G
c.350A>G <sup>(g)</sup>	117	ms, p.N117S	Raivio et al., 2009 (20)	c.350A>G

Mutação <sup>(a)</sup>	Codão	Efeito previsto <sup>(b)</sup>	Referência	Designação original
c.350A>G <sup>(g)</sup>	117	ms, p.N117S	Miraoui et al., 2013 (21)	c.350A>G
c.350A>G <sup>(g)</sup>	117	ms, p.N117S	Shaw et al., 2011 (5)	c.350A>G
<b>Exon 4</b>				
c.386A>C <sup>(e)</sup>	129	ms, p.D129A	Albuisson et al., 2005 (15)	C.385A>C / p.D129A
c.424_427delGATA	142-143	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	424_427del
c.424_427delGATA	142-143	fs	Sarfati et al., 2013 (22)	c.424_427del
c.482T>C	161	ms, p.M161T	Jarzabek et al., 2012 (10)	c.482T>C
<b>Exon 5</b>				
c.[499G>T];[499G>T] <sup>(h)</sup>	167	ms, p.A167S	Dode et al., 2003 (12)	A167S
c.533G>C <sup>(e)</sup>	178	ms, p.C178S	Zenaty et al., 2006 (23)	c.535G>C / Cys178Ser
c.570G>A	190	ns, p.W190X	Doknic et al., 2012 (24)	c.570G>A
c.591C>A	197	ms, p.F197L	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.591C>A
c.600C>T	200	sp, .D200D	Presente estudo	
<b>Exon 6</b>				
c.625C>T	209	ms, p.R209C	Dode & Hardelin 2009 (2)	625C>T
c.625C>T	209	ms, p.R209C	Tommiska et al., 2014 (11)	c.625C>T
c.626G>A	209	ms, p.R209H	Laitinen et al., 2011 (1)	c.626 G > A
c.670G>C	224	ms, p.D224H	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.670G>C
c.682T>G	228	ms, p.Y228D	Raivio et al., 2009 (20)	c.682 T>G
c.682T>G <sup>(i)</sup>	228	ms, p.Y228D	Miraoui et al., 2013 (21)	c.682T>G
c.682T>G <sup>(i)</sup>	228	ms, p.Y228D	Shaw et al., 2011 (5)	c.682T>G
c.709G>A	237	ms, p.G237S	Pitteloud et al., 2006 (25)	c.709 G→A
c.710G>A	237	ms, p.G237D	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.710G>A
c.716T>C <sup>(c)</sup>	239	ms, p.I239T	Raivio et al., 2009 (20)	c.716 T>C
c.716T>C <sup>(j)</sup>	239	ms, p.I239T	Chan et al., 2009 (26)	p.I239T
c.716T>C <sup>(c)</sup>	239	ms, p.I239T	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.716T>C
c.716T>C <sup>(j)</sup>	239	ms, p.I239T	Shaw et al., 2011 (5)	c.716T>C
c.716T>C <sup>(j)</sup>	239	ms, p.I239T	Miraoui et al., 2013 (21)	c.716T>C
c.734T>C	245	ms, p.L245P	Trarbach et al., 2006 (4)	734T>C
<b>Exon 7</b>				
c.748C>T	250	ms, p.R250W	Trarbach et al., 2006 (4)	748C>T
c.748C>T	250	ms, p.R250W	Trarbach et al., 2006 (4)	748C>T
c.748C>T	250	ms, p.R250W	Dode et al., 2007 (6)	c.748C>T
c.749G>A <sup>(k)</sup>	250	ms, p.R250Q	Falardeau et al., 2008 (27)	c.794 G>A
c.749G>A <sup>(k)</sup>	250	ms, p.R250Q	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.749G>A
c.749G>A <sup>(k)</sup>	250	ms, p.R250Q	Miraoui et al., 2013 (21)	c.749G>A
c.749G>A	250	ms, p.R250Q	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.749G>A
c.749G>A	250	ms, p.R250Q	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.749G>A
c.749G>A <sup>(l)</sup>	250	ms, p.R250Q	Miraoui et al., 2013 (21)	c.749G>A
c.760C>T	254	ms, p.R254W	Dode & Hardelin 2009 (2)	760C>T
c.760C>T	254	ms, p.R254W	Koika et al., 2013 (28)	c.760C>T
c.761G>A	254	ms, p.R254Q	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.761G>A
c.761G>A	254	ms, p.R254Q	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.761G>A
c.779G>A	260	ms, p.G260E	Caronia et al., 2011 (29)	G260E
c.809G>A	270	ms, p.G270D	Dode et al., 2007 (6)	c.809G>A
c.809G>A	270	ms, p.G270D	Jarzabek et al., 2012 (10)	c.809G>A
c.817G>A <sup>(e)</sup>	273	ms, p.V273M	Albuisson et al., 2005 (15)	c.810G>A
c.817G>A	273	ms, p.V273M	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.817G>A
c.817G>A	273	ms, p.V273M	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.817G>A
c.821A>G <sup>(e)</sup>	274	ms, p.E274G	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.821G>A
c.821A>G	274	ms, p.E274G	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.821A>G

Mutação <sup>(a)</sup>	Codão	Efeito previsto <sup>(b)</sup>	Referência	Designação original
c.830G>A	277	ms, p.C277Y	Dode et al., 2003 (12)	C277Y
c.841_846delAGTGAC	281-282	if, p.S281_D282del	Bailleul-Forestier et al., 2010 (30)	c.841del6
c.848C>G	283	ms, p.P283R	Dode et al., 2007 (6)	c.848C>G
c.854C>G <sup>(m)</sup>	285	ms, p.P285R	Shaw et al., 2011 (5)	c.854C>G
c.854C>G	285	ms, p.P285R	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.854C>G
c.936G>A	312	sp, (p.K312K)	Dode et al., 2003 (12)	936G→A
<b>Exon 8A <sup>(n)</sup></b>				
c.1057G>A	-	ms	Presente estudo	
c.1073G>A <sup>(e)</sup>	-	ms	Miura et al, 2010 (31)	c.1072C>T
<b>Exon 8B</b>				
c.962_963delAA	321	fs	Laitinen et al., 2011 (1)	c.961_962delAA
c.962_963delAA	321	fs	Laitinen et al., 2011 (1)	c.961_962delAA
c.962_965delAAGA	321-322	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	961_964del
c.970G>T	324	ns, p.E324X	Dode et al., 2007 (6)	c.967G>T
c.995C>G	332	ms, p.S332C	Dode et al., 2007 (6)	c.995C>G
c.1016A>G	339	ms, p.Y339C	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.1016A>G
c.1016A>G	339	ms, p.Y339C	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1016A>G
c.1019C>T	340	ms, p.T340M	Dode & Hardelin 2009 (2)	1019C>T
c.1019C>T	340	ms, p.T340M	Sarfati et al., 2013 (22)	c.1019C>T
c.1023C>G	341	ms, p.C341W	Bailleul-Forestier et al., 2010 (30)	c.1023C>G
c.1025T>C <sup>(o)</sup>	342	ms, p.L342S	Pitteloud et al., 2007 (32)	c.1025T→C
c.1025T>C <sup>(o)</sup>	342	ms, p.L342S	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1025T>C
c.1025T>C <sup>(o)</sup>	342	ms, p.L342S	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1025T>C
c.1028C>T	343	ms, p.A343V	Trarbach et al., 2006 (4)	1028C>T
c.1037C>G	346	ms, p.S346C	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.1037C>G
c.1038dupT	347	fs	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1039insT
c.1042G>A	348	ms, p.G348R	Bailleul-Forestier et al., 2010	c.1042 G>A
c.1042G>A <sup>(p)</sup>	348	ms, p.G348R	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1042G>A
c.1081G>C	361	sp, (p.A361P)	Dode et al., 2007 (6)	c.1081G>C
<b>Exon 9</b>				
c.1093_1094delAG	365	fs	Albuissou et al., 2005 (15)	c.1093_1094delAG
c.1097C>T	366	ms, p.P366L	Trarbach et al., 2006 (4)	1097C>T
c.1151C>A	384	ms, p.A384D	Dode & Hardelin 2009 (2)	1151C>A
c.1279G>T	427	ms, p.V427L	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1279G>T
<b>Exon 10</b>				
c.1286T>A	429	ms, p.V429E	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1286T>A
c.1305_1306dupAT	436	fs	Laitinen et al., 2011 (1)	c.1305_1306dupAT
c.1317_1318delTG	439-440	fs	Sato et al., 2006 (33)	1317_1318delTG
c.1317_1318delTG	439-440	fs	Dode et al., 2007 (6)	c.1317_1318delTG
c.1349C>T	450	ms, p.S450F	Raivio et al., 2012 (19)	c.1349C>T
c.1377_1378insA	460	fs	Novo et al., 2012 (34)	c.1377_1378insA
c.1383_1384insTT	462	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	1383_1384insTT
<b>Exon 11</b>				
c.1409G>T <sup>(s)</sup>	470	ms, p.R470L	Pitteloud et al., 2007 (32)	c.1409 G→T
c.1409G>T <sup>(s)</sup>	470	ms, p.R470L	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1409G>T
c.1409G>T <sup>(s)</sup>	470	ms, p.R470L	Shaw et al., 2011 (5)	c.1409G>T
c.1409G>T <sup>(s)</sup>	470	ms, p.R470L	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1409G>T
c.1428C>G <sup>(e)</sup>	476	ms, p.D476E	Wang et al., 2014 (35)	c.1422 C>G
c.1447C>A <sup>(r)</sup>	483	ms, p.P483T	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1447C>A
c.1447C>T	483	ms, p.P483S	Raivio et al., 2012 (19)	c.1447C>T

Mutação <sup>(a)</sup>	Codão	Efeito previsto <sup>(b)</sup>	Referência	Designação original
c.1535C>T	512	ms, p.A512V	Tommiska et al., 2014 (11)	c.1535C>T
<b>Intron 11</b>				
c.1553-2A>G <sup>(m)</sup>	-	sp	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1549-2A>G
c.1553-2A>G <sup>(m)</sup>	-	sp	Shaw et al., 2011 (5)	c.1549-2A>G
c.1553-2A>G <sup>(m)</sup>	-	sp	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1553-2A>G
c.1553-2A>G	-	sp	Sarfati et al., 2013 (22)	IVS12-2A>G
<b>Exon 12</b>				
c.1558G>A <sup>(e)</sup>	520	ms, p.A520T	Albuisson et al., 2005 (15)	c.1561G>A /p.A520T
c.1612A>G	538	ms, p.I538V	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.1612A>G
c.1614C>T	538	sp, (p.I538I)	Tommiska et al., 2014 (11)	c.1614C>T
<b>Exon 13</b>				
c.1708C>T	570	ms, p.R570W	Izumi et al., 2014 (17)	p.R570W
c.1755C>A	585	ns, p.Y585X	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.1755C>A
c.1755C>A	585	ns, p.Y585X	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1755C>A
c.1755C>A <sup>(s)</sup>	585	ns, p.Y585X	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1755C>A
c.1810G>A <sup>(c)</sup>	604	ms, p.A604T	Sarfati et al., 2010 (36)	c.1810G>A
c.1819G>A	607	ms, p.V607M	Dode et al., 2003 (12)	V607M
c.1825C>T	609	ns, p.R609X	Laitinen et al., 2011 (1)	c.1825C > T
c.1837dupT	613	fs	Albuisson et al., 2005 (15)	c.1836_1837insT
c.1852_1853delAA	618	fs	Trarbach et al., 2006 (4)	1852-1853delAA
c.1854G>T <sup>(g)</sup>	618	ms, p.K618N	Raivio et al., 2009 (20)	c.1854 G>T
c.1854G>T <sup>(g)</sup>	618	ms, p.K618N	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1854G>T
c.1854G>T <sup>(g)</sup>	618	ms, p.K618N	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1854G>T
<b>Exon 14</b>				
c.1862A>G	621	ms, p.H621R	Dode et al., 2007 (6)	c.1862A>G
c.1864C>T	622	ns, p.R622X	Dode et al., 2003 (12)	R622X
c.1864C>T	622	ns, p.R622X	Pitteloud et al., 2005 (37)	c.1864C>T
c.1864C>T	622	ns, p.R622X	Xu et al., 2007 (38)	C1864T
c.1864C>T	622	ns, p.R622X	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1864C>T
c.1864C>T <sup>(o)</sup>	622	ns, p.R622X	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.1864C>T
c.1864C>T <sup>(o)</sup>	622	ns, p.R622X	Miraoui et al., 2013 (21)	c.1864C>T
c.1864C>G	622	ms, p.R622G	Zenaty et al., 2006 (23)	c.1864C>G
c.1865G>A	622	ms, p.R622Q	Zenaty et al., 2006 (23)	c.1865 G>A
c.1865G>A	622	ms, p.R622Q	Bailleul-Forestier et al., 2010 (30)	c.1865 G>A
c.1867G>T	623	ms, p.D623Y	Simonis et al., 2013 (39)	c.1867G>T
c.1884T>G	628	ms, p.N628K	Simonis et al., 2013 (39)	c.1884T>G
c.1907_1908delTG	636	fs	Sarfati et al., 2013 (22)	c.1907_1908del
c.1936C>T	646	ms, p.R646W	Tommiska et al., 2014 (11)	c.1936C>T
c.1961dupA	654	fs	Presente estudo	
c.1970_1971delCA	657	fs	Dode et al., 2003 (12)	1970-1971delCA
<b>Intron 14</b>				
c.1977+1G>A	-	sp	Dode et al., 2007 (6)	c.1977+1G>A
c.1977+1G>A	-	sp	Dallago et al., 2008 (40)	IVS14 + 1G > A
c.1977+1G>A	-	sp	Sarfati et al., 2013 (22)	IVS14+1G>A
<b>Exon 15</b>				
c.1981C>T	661	ns, p.R661X	Dode et al., 2007 (6)	c.1981C>T
c.1981C>T	661	ns, p.R661X	Dode et al., 2007 (6)	c.1981C>T
<sup>(q)</sup>	666	ms, p.W666R	Dode et al., 2003 (12)	W666R
c.2008G>A <sup>(t)</sup>	670	ms, p.E670K	Miraoui et al., 2013 (21)	c.2008G>A

Mutação <sup>(a)</sup>	Codão	Efeito previsto <sup>(b)</sup>	Referência	Designação original
c.2009A > C	670	ms, p.E670A	Laitinen et al., 2011 (1)	c.2009A > C
c.2011G>C	671	ms, p.A671P	Raivio et al., 2009 (20)	c.2011 G>C
c.2011G>C	671	ms, p.A671P	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2011G>C
c.2038C>T	680	ns, p.Q680X	Pitteloud et al., 2006 (25)	c.2038C→T
c.2038C>T	680	ns, p.Q680X	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2038C>T
<b>Intron 15</b>				
c.2048+1G>A	-	sp	Dode et al., 2003 (12)	IVS15+1G→A
c.2049-1G>C	-	sp	Laitinen et al., 2010 (41)	c.2049-1 G→C
<b>Exon 16</b>				
c.2054C>T	685	ms, p.S685F	Dode et al., 2007 (6)	c.2054C>T
c.2059G>A	687	ms, p.G687R	Sato et al., 2005 (42)	2059G→A
c.2059G>A	687	ms, p.G687R	Maione et al., 2013 (43)	G687R
c.2059G>A	687	ms, p.G687R	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2059G>A
<sup>(e)(q)</sup>	690	ms	Bailleul-Forestier et al., 2010 (30)	c.2069T>G /Leu690Pro
c.2075A>G	692	ms, p.E692G	Cadman et al., 2007 (44)	2075A>G
c.2075A>G <sup>(u)</sup>	692	ms, p.E692G	Miraoui et al., 2013 (21)	c.2075A>G
c.2077A>T	693	ms, p.I693F	Dode et al., 2007 (6)	c.2077A>T
c.2099C>T	700	ms, p.P700L	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2099C>T
c.2107G>C	703	ms, p.G703R	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.2107G>C
c.2107G>C	703	ms, p.G703R	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2107G>C
c.2107G>A	703	ms, p.G703S	Pitteloud et al., 2006 (7)	c.2107G>A
c.2155A>G	719	ms, p.M719V	Presente estudo	
c.2156T>G	719	ms, p.M719R	Dode et al., 2003 (12)	M719R
c.2164C>T	722	ms, p.P722S	Trarbach et al., 2006 (4)	2164C>T
c.2165_2172delCCAGTAAC insACAGTAAG	722-724	ms, p.P722H; p.N724K	Pitteloud et al., 2006 (25)	c.2165 C →A + c.2172 C → G
c.2165_2172delCCAGTAAC insACAGTAAG <sup>(s)</sup>	722-724	ms, p.P722H; p.N724K	Miraoui et al., 2013 (21)	c.2165C>A + c.2172C>G
c.2174G>A	725	ms, p.C725Y	Simonis et al., 2013 (39)	c.2174G>A
<b>Intron 16</b>				
c.2187-5C>A <sup>(e)</sup>	-	sp	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2188-5C>A
<b>Exon 17</b>				
c.2190C>G	730	ns, p.Y730X	Albuisson et al., 2005 (15)	c.2190C>G
c.2203delG	735	fs	Dode & Hardelin 2009 (2)	2203del
c.2233C>T	745	ms, p.P745S	Sato et al., 2004 (18)	2233C>T
c.2233C>T	745	ms, p.P745S	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2233C>T; p.P745R
c.2262G>A	754	sp, p.L754L	Presente estudo	
c.2267G>A	756	ms, p.R756H	Caronia et al., 2011 (29)	R756H
c.[2292G>T];[2302G>T] <sup>(k)(v)</sup>	764	ms, p.Q764H; p.D768Y	Falardeau et al., 2008	c.2292G>T + c.2302G>T
c.[2292G>T];[2302G>T] <sup>(k)(v)</sup>	764	ms, p.Q764H; p.D768Y	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2292G>T + c.2302G>T
<b>Exon 18</b>				
c.2302G>T <sup>(k)</sup>	768	ms, p.D768Y	Miraoui et al., 2013 (21)	c.2302G>T
c.2302G>C	768	ms, p.D768H	Sykiotis et al., 2010 (8)	c.2302 G>C; p.D768H
c.2314C>T	772	ms, p.P772S	Dode et al., 2003 (12)	P772S
c.2314C>T	772	ms, p.P772S	Dode et al., 2007 (6)	c.2314C>T
c.2383G>A	795	ms, p.V795I	Trarbach et al., 2006 (4)	2383G>A
c.2399C>T	800	ms, p.P800L	Sarfati et al., 2013 (22)	c.2399C>T
c.2464C>T <sup>(d)</sup>	822	ms,p.R822C	Dode et al., 2007 (6)	c.2464C>T

Mutação <sup>(a)</sup>	Codão	Efeito previsto <sup>(b)</sup>	Referência	Designação original
Whole gene deletion			Trarbach et al., 2010 (45)	Complete gene deletion
Whole gene deletion			Fukami et al., 2013 (16)	Submicroscopic deletion involving FGFR1~8.5 Mb
Whole gene deletion			Izumi et al., 2014 (17)	Submicroscopic deletion involving FGFR1
Translocation t(7;8)(p12.3;p11.2)			Kim et al., 2005 (46)	t(7;8)(p12.3;p11.2) with disruption between FGFR1 exons 2 and 3

(a) As mutações estão numeradas em relação à sequência de referência do cDNA do FGFR1 (GenBank accession NM\_023110.2, ou GenBank accession FJ809917, no caso do exão 8A do splicing alternativo). O nucleótido +1 corresponde ao A do codão de iniciação ATG. A numeração e nomenclatura de cada mutação foi alterada sempre que necessário de forma a seguir as recomendações padrão (47). (b) Efeito previsto: fs, mutação frameshift; ns, mutação nonsense; ms, mutação missense; if, inserção ou deleção in-frame; sp, mutação splice site; (c) Mutação digênica (com mutação no *PROKR2*). (d) Foi ainda encontrada em dois de 150 controles normais. (e) Códão/ número de nucleótido discordante no artigo original. (f) Mutação digênica (com mutação no *TAC3*). (g) Mutação digênica (com mutação no *GNRHR*). (h) Mutação homozigótica. (i) Mutação digênica (com mutação no *KISS1R*). (j) Mutação trigênica (com mutações no *GNRH1* e *PROKR2*). (k) Mutação digênica (com mutação no *FGF8*). (l) Mutação oligogênica (com *FGF17*, *FRLT3* (bialélica) e *HS6ST1*). (m) Mutação digênica (com mutação no *KAL1*). (n) Exão 8A do splicing alternativo (número dos nucleótidos de acordo com GenBank accession FJ809917). (o) Mutação digênica (com mutação no *NELF*). (p) Mutação digênica (com mutação no *IL17RD*). (q) Alteração exata não especificada. (r) Mutação digênica (com mutação no *SPRY4*). (s) Mutação digênica (com mutação no *TACR3*). (t) Mutação digênica (com mutação no *FLRT3*). (u) Mutação digênica (com mutação no *DUSP6*). (v) Mutação dupla-heterozigótica. (w) Foi ainda encontrada em dois de 100 controles normais. (x) Foi ainda encontrada em um de 100 controles normais.

## Referências para Anexo V

- Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L, Raivio T. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. *Orphanet J Rare Dis*. 2011;6:41.
- Dode C, Hardelin JP. Kallmann syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009;17:139-146.
- Laitinen EM, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, Toppari J, Raivio T. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PLoS One*. 2012;7:e39450.
- Trarbach EB, Costa EM, Versiani B, de Castro M, Baptista MT, Garmes HM, de Mendonca BB, Latronico AC. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:4006-4012.
- Shaw ND, Seminara SB, Welt CK, Au MG, Plummer L, Hughes VA, Dwyer AA, Martin KA, Quinton R, Mericq V, Merino PM, Gusella JF, Crowley WF, Jr., Pitteloud N, Hall JE. Expanding the phenotype and genotype of female GnRH deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E566-576.
- Dode C, Fouveaut C, Mortier G, Janssens S, Bertherat J, Mahoudeau J, Kottler ML, Chabrolle C, Gancel A, Francois I, Devriendt K, Wolczynski S, Pugeat M, Pineiro-Garcia A, Murat A, Bouchard P, Young J, Delpech M, Hardelin JP. Novel FGFR1 sequence variants in Kallmann syndrome, and genetic evidence that the FGFR1c isoform is required in olfactory bulb and palate morphogenesis. *Hum Mutat*. 2007;28:97-98.

7. Pitteloud N, Meysing A, Quinton R, Acierno JS, Jr., Dwyer AA, Plummer L, Fliers E, Boepple P, Hayes F, Seminara S, Hughes VA, Ma J, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley WF, Jr. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause Kallmann syndrome with a wide spectrum of reproductive phenotypes. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254-255:60-69.
8. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, Dwyer AA, Quinton R, Hall JE, Gusella JF, Seminara SB, Crowley WF, Jr., Pitteloud N. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:15140-15144.
9. Entrala-Bernal C, Montes-Castillo C, Alvarez-Cubero MJ, Gutierrez-Alcantara C, Fernandez-Rosado F, Martinez-Espiotan E, Sanchez-Malo C, Santiago-Fernandez P. Genetic diagnosis of idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism: a new point mutation in the KAL2 gene. *Hormones (Athens).* 2014;13:280-285.
10. Jarzabek K, Wolczynski S, Lesniewicz R, Plessis G, Kottler ML. Evidence that FGFR1 loss-of-function mutations may cause variable skeletal malformations in patients with Kallmann syndrome. *Adv Med Sci.* 2012;57:314-321.
11. Tommiska J, Kansakoski J, Christiansen P, Jorgensen N, Lawaetz JG, Juul A, Raivio T. Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism in Denmark. *Eur J Med Genet.* 2014;57:345-348.
12. Dode C, Levilliers J, Dupont JM, De Paepe A, Le Du N, Soussi-Yanicostas N, Coimbra RS, Delmaghani S, Compain-Nouaille S, Baverel F, Pecheux C, Le Tessier D, Cruaud C, Delpech M, Speleman F, Vermeulen S, Amalfitano A, Bachelot Y, Bouchard P, Cabrol S, Carel JC, Delemarre-van de Waal H, Goulet-Salmon B, Kottler ML, Richard O, Sanchez-Franco F, Saura R, Young J, Petit C, Hardelin JP. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet.* 2003;33:463-465.
13. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, Cole LW, Pearce SH, Lee H, Boepple P, Crowley WF, Jr., Pitteloud N. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2007;357:863-873.
14. Quaynor SD, Kim HG, Cappello EM, Williams T, Chorich LP, Bick DP, Sherins RJ, Layman LC. The prevalence of digenic mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 2011;96:1424-1430 e1426.
15. Albuisson J, Pecheux C, Carel JC, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, Bouchard P, Legius E, Matthijs G, Wasniewska M, Delpech M, Young J, Hardelin JP, Dode C. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Hum Mutat.* 2005;25:98-99.
16. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, Kinoshita E, Dateki S, Ogata T. Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J.* 2013;60:1013-1020.
17. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, Maruyama T, Sano S, Horikawa R, Sato N, Nakabayashi K, Hata K, Umezawa A, Ogata T, Yoshimura Y, Fukami M. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril.* 2014;102:1130-1136 e1133.
18. Sato N, Katsumata N, Kagami M, Hasegawa T, Hori N, Kawakita S, Minowada S, Shimotsuka A, Shishiba 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.* 2004;89:1079-1088.

19. Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, Dwyer AA, Tommiska J, Sykiotis GP, Gregory LC, Diaczok D, Tziaferi V, Elting MW, Padidela R, Plummer L, Martin C, Feng B, Zhang C, Zhou QY, Chen H, Mohammadi M, Quinton R, Sidis Y, Radovick S, Dattani MT, Pitteloud N. Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E694-699.
20. Raivio T, Sidis Y, Plummer L, Chen H, Ma J, Mukherjee A, Jacobson-Dickman E, Quinton R, Van Vliet G, Lavoie H, Hughes VA, Dwyer A, Hayes FJ, Xu S, Sparks S, Kaiser UB, Mohammadi M, Pitteloud N. Impaired fibroblast growth factor receptor 1 signaling as a cause of normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4380-4390.
21. Miraoui H, Dwyer AA, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, Beenken A, Clarke J, Pers TH, Dworzynski P, Keefe K, Niedziela M, Raivio T, Crowley WF, Jr., Seminara SB, Quinton R, Hughes VA, Kumanov P, Young J, Yialamas MA, Hall JE, Van Vliet G, Chanoine JP, Rubenstein J, Mohammadi M, Tsai PS, Sidis Y, Lage K, Pitteloud N. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2013;92:725-743.
22. Sarfati J, Fouveau C, Leroy C, Jeanpierre M, Hardelin JP, Dode C. Greater prevalence of PROKR2 mutations in Kallmann syndrome patients from the Maghreb than in European patients. *Eur J Endocrinol.* 2013;169:805-809.
23. Zenaty D, Bretones P, Lambe C, Guemas I, David M, Leger J, de Roux N. Paediatric phenotype of Kallmann syndrome due to mutations of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1). *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254-255:78-83.
24. Doknic M, Pekic S, Covic M, Popovic V. Clinical Case Seminar. Peculiar prolactinomas in patients with pituitary developmental gene mutations: from an adult endocrinologist perspective. *Hormones (Athens).* 2012;11:189-198.
25. Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing A, Eliseenkova AV, Ma J, Ibrahim OA, Metzger DL, Hayes FJ, Dwyer AA, Hughes VA, Yialamas M, Hall JE, Grant E, Mohammadi M, Crowley WF, Jr. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:6281-6286.
26. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, Gaspert A, Lavoie HB, Wu CH, Crowley WF, Jr., Amory JK, Pitteloud N, Seminara SB. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:11703-11708.
27. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, Jacobson-Dickman EE, Eliseenkova AV, Ma J, Dwyer A, Quinton R, Na S, Hall JE, Huot C, Alois N, Pearce SH, Cole LW, Hughes V, Mohammadi M, Tsai P, Pitteloud N. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest.* 2008;118:2822-2831.
28. Koika V, Varnavas P, Valavani H, Sidis Y, Plummer L, Dwyer A, Quinton R, Kanaka-Gantenbein C, Pitteloud N, Sertedaki A, Dacou-Voutetakis C, Georgopoulos NA. Comparative functional analysis of two fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) mutations affecting the same residue (R254W and R254Q) in isolated hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *Gene.* 2013;516:146-151.
29. Caronia LM, Martin C, Welt CK, Sykiotis GP, Quinton R, Thambundit A, Avbelj M, Dhruvakumar S, Plummer L, Hughes VA, Seminara SB, Boepple PA, Sidis Y, Crowley WF, Jr., Martin KA, Hall JE, Pitteloud N. A genetic basis for functional hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med.* 2011;364:215-225.
30. Bailleul-Forestier I, Gros C, Zenaty D, Bennaceur S, Leger J, de Roux N. Dental agenesis in Kallmann syndrome individuals with FGFR1 mutations. *Int J Paediatr Dent.* 2010;20:305-312.

31. Miura K, Miura S, Yoshiura K, Seminara S, Hamaguchi D, Niikawa N, Masuzaki H. A case of Kallmann syndrome carrying a missense mutation in alternatively spliced exon 8A encoding the immunoglobulin-like domain IIIb of fibroblast growth factor receptor 1. *Hum Reprod.* 2010;25:1076-1080.
32. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, Plummer L, Hughes V, Seminara S, Cheng YZ, Li WP, Maccoll G, Eliseenkova AV, Olsen SK, Ibrahim OA, Hayes FJ, Boepple P, Hall JE, Bouloux P, Mohammadi M, Crowley W. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest.* 2007;117:457-463.
33. Sato N, Ohyama K, Fukami M, Okada M, Ogata T. Kallmann syndrome: somatic and germline mutations of the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a mother and the son. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:1415-1418.
34. Novo A, Guerra IC, Rocha F, Gama-de-Sousa S, Borges T, Cerqueira R, Tavares P, Fonseca P. Kallmann syndrome in a female adolescent: a new mutation in the FGFR1 gene. *BMJ Case Rep.* 2012;2012
35. Wang XL, Wang DD, Gu JQ, Zhang N, Shan ZY. A female patient with normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism carrying a novel mutation in FGFR1. *Genet Mol Res.* 2014;13:9472-9476.
36. Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Pinero A, Wolczynski S, Brailly-Tabard S, Bidet M, Ramos-Arroyo M, Mathieu M, Lienhardt-Roussie A, Morgan G, Turki Z, Bremont C, Lespinasse J, Du Boullay H, Chabbert-Buffet N, Jacquemont S, Reach G, De Talence N, Tonella P, Conrad B, Despert F, Delobel B, Brue T, Bouvattier C, Cabrol S, Pugeat M, Murat A, Bouchard P, Hardelin JP, Dode C, Young J. A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:659-669.
37. Pitteloud N, Acierno JS, Jr., Meysing AU, Dwyer AA, Hayes FJ, Crowley WF, Jr. Reversible kallmann syndrome, delayed puberty, and isolated anosmia occurring in a single family with a mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:1317-1322.
38. Xu N, Qin Y, Reindollar RH, Tho SP, McDonough PG, Layman LC. A mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene causes fully penetrant normosmic isolated hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92:1155-1158.
39. Simonis N, Migeotte I, Lambert N, Perazzolo C, de Silva DC, Dimitrov B, Heinrichs C, Janssens S, Kerr B, Mortier G, Van Vliet G, Lepage P, Casimir G, Abramowicz M, Smits G, Vilain C. FGFR1 mutations cause Hartsfield syndrome, the unique association of holoprosencephaly and ectrodactyly. *J Med Genet.* 2013;50:585-592.
40. Dallago CM, Abech DD, Pereira-Lima JF, Leaes CG, Batista RL, Trarbach EB, Oliveira Mda C. Two cases of Kallmann syndrome associated with empty sella. *Pituitary.* 2008;11:109-112.
41. Laitinen EM, Tommiska J, Dunkel L, Sankilampi U, Vaaralahti K, Raivio T. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in a mother and her monozygotic twins born after a single embryo transfer. *Fertil Steril.* 2010;93:2074 e2013-2076.
42. Sato N, Hasegawa T, Hori N, Fukami M, Yoshimura Y, Ogata T. Gonadotrophin therapy in Kallmann syndrome caused by heterozygous mutations of the gene for fibroblast growth factor receptor 1: report of three families: case report. *Hum Reprod.* 2005;20:2173-2178.
43. Maione L, Benadjaoud S, Eloit C, Sinisi AA, Colao A, Chanson P, Ducreux D, Benoudiba F, Young J. Computed tomography of the anterior skull base in Kallmann syndrome reveals specific ethmoid bone abnormalities associated with olfactory bulb defects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98:E537-546.

44. Cadman SM, Kim SH, Hu Y, Gonzalez-Martinez D, Bouloux PM. Molecular pathogenesis of Kallmann's syndrome. *Horm Res.* 2007;67:231-242.
45. Trarbach EB, Teles MG, Costa EM, Abreu AP, Garmes HM, Guerra G, Jr., Baptista MT, de Castro M, Mendonca BB, Latronico AC. Screening of autosomal gene deletions in patients with hypogonadotropic hypogonadism using multiplex ligation-dependent probe amplification: detection of a hemizygosity for the fibroblast growth factor receptor 1. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2010;72:371-376.
46. Kim HG, Herrick SR, Lemyre E, Kishikawa S, Salisz JA, Seminara S, MacDonald ME, Bruns GA, Morton CC, Quade BJ, Gusella JF. Hypogonadotropic hypogonadism and cleft lip and palate caused by a balanced translocation producing haploinsufficiency for FGFR1. *J Med Genet.* 2005;42:666-672.
47. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet.* 2001;109:121-124.

## Anexo VI- Breve *Curriculum vitae*

Catarina Inês Nunes Pires Gonçalves, 34 anos, licenciada em Biologia de Investigação pela Universidade de Aveiro (Julho de 2004 - 15 valores). Da dissertação de licenciatura foi publicado o artigo:

- Barroso, C.M., Gonçalves, C., Moreira, M.H., 2007. *Growth, reproductive cycle and penis shedding of Littorina littorea in the Ria de Aveiro (north-west Portugal)*. Journal of Marine Biological Association of the United Kingdom, 87: 547-550.

Mestre em Ecologia pela Universidade de Coimbra com a dissertação “Alterações das reservas lipídicas na glândula digestiva de *Nucella lapillus* (Mollusca, Neogastropoda)” sob orientação do Professor Doutor Alexandre Lobo-da-Cunha (Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar). Aprovada com Muito Bom (18-20 valores) por unanimidade do júri em Fevereiro de 2008. Da dissertação de mestrado resultou o artigo:

- C.I. Gonçalves, Lobo-da-cunha, A., 2013. *Seasonal and starvation-induced changes on gonads and lipid reserves of the digestive gland of Nucella lapillus (Caenogastropoda)*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 93(3): 817-824.

Bolseira de investigação (12/04/2010 a 12/12/2011) no Instituto do Mar (IMAR) e Centro de Oceanografia da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (CO-FCUL), no projeto EEMA- Avaliação do estado ecológico das masas de água costeiras e de transição e do potencial ecológico das massas de água fortemente modificadas. Neste projeto foram produzidas algumas publicações:

- Gonçalves, C.I., Gamito, R., Fonseca, V.F., Costa, J.L., Cabral, H.N., Erzini, K., Gonçalves, J., Martins, J., Leite, L., Andrade, J.P., Ramos, S., Bordalo, A., Amorim, E., Neto, J.M., Marques, J.C., Castro, N., Costa, M.J., 2012. *Robustness of the Estuarine Fish Assessment Index (EFAI) regarding water body definition criteria*. Ecological Indicators, 20: 1-8.
- Gamito, R., Gonçalves, C.I., Fonseca, V.F., Costa, J.L., Cabral, H.N., Costa, M.J., 2012. *Influence of sampling effort on metrics of fish-based indices for the assessment of estuarine ecological quality*. Ecological Indicators, 23:9-18.
- Cabral, H.N., Fonseca, V.F., Gamito, R., Gonçalves, C.I., Costa, J.L., Erzini, K., Gonçalves, J., Martins, J., Leite, L., Andrade, J.P., Ramos, S., Bordalo, A., Amorim, E., Neto, J.M., Marques, J.C., Rebelo, J.E., Silva, C., Castro, N., Almeida, P.R., Domingos, I., Gordo, L.S., Costa, M.J., 2012. *Ecological quality assessment of transitional waters based on fish assemblages in Portuguese estuaries: The Estuarine Fish Assessment Index (EFAI)*. Ecological Indicators, 19:144-153.

- Costa, J.L., Marques, J.F., Alves, J., Gamito, R., Fonseca, V.F., Gonçalves, C.I., Cabral, H.N., Costa, M.J., 2012. Is parasitism of fish a good metric to assess ecological water quality in transitional waters? What can be learned from two estuarine resident species? *Ecological indicators*, 19:154-160.

- Fonseca, V.F., Vasconcelos, R.P., Gamito, R., Pasquaud, S., Gonçalves, C.I., Costa, J.L., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2013. *Fish community-based measures of estuarine ecological quality and pressure-impact relationships*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 134: 128-137.

- Pasquaud, S., Courrat, A., Fonseca, V.F., Gamito, R., Gonçalves, C.I., Lobry, J., Lepage, M., Costa, M.J., Cabral, H.N., 2013. *Strength and time lag of relationships between human pressures and fish-based metrics used to assess ecological quality of estuarine systems*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 134: 119-127.

Comunicações científicas efetuadas no decorrer do percurso académico:

- Participação na XXXVII Reunião da Sociedade Portuguesa de Microscopia Electrónica e Biologia Celular, Madeira, Portugal com uma comunicação em painel (poster): "Estratégias de controlo da transpiração em espécies portuguesas de Festuca L. (Poaceae) - primeiros resultados". Autores: Galante-Oliveira, S., Gonçalves, C.I., Filipe, L.T., Marques, S.M., Silveira, P., Gomes, V., 2002.

- Participação no Congresso Português de Malacologia, Lisboa, Portugal com comunicação oral intitulada: "Variação sazonal das reservas lipídicas na glândula digestiva de machos e fêmeas de *Nucella lapillus* (Neogastropoda)". Autores: Catarina Gonçalves e Alexandre Lobo da Cunha, 2007.

- Co-autora de uma comunicação em painel (poster) apresentado no congresso mundial de malacologia em Antuérpia, Bélgica: "Growth of *Donax vittatus* in the north-west coast of Portugal. Biological data for the management of a new fishery". Autores: Francisco Maia, Joana Pimenta e Catarina Gonçalves, 2007.

- Co-autora de duas comunicações orais apresentadas no 47th Simpósio Internacional da associação de ciências marinhas e costeiras, Figueira da foz, Portugal:

- "*Estuarine Fish Assessment Index (EFAI): a multimetric tool for the assessment of the ecological status of transitional waters*". Autores: Cabral, H., Fonseca, V., Gamito, R., Gonçalves, C.I., Costa, J.L., Erzini, K., Gonçalves, J., Martins, J., Leite, L., Andrade, J.P., Ramos, S., Bordalo, A., Amorim, E., Neto, J.M., Marques, J.C., Rebelo, J.E., Silva, C., Castro, N., Almeida, P.R., Domingos, I., Gordo, L.S., Costa, M.J., 2010.

- “Is parasitism of fishes a good metric to assess ecological water quality in transitional waters? What can be learned from two estuarine resident species?”. Autores: Costa, J.L., Marques, J., Alves, J., Gamito, R., Fonseca, V., Gonçalves, C., Cabral, H., Costa, M.J., 2010.

Como aluna de doutoramento do terceiro ciclo de Biomedicina na Universidade da Beira Interior (iniciado no ano letivo 2011/2012 e a finalizar no ano letivo 2014/2015, com bolsa da FCT: SFRH/BD/76420/2011) foi publicado o seguinte artigo:

- Gonçalves, C., Bastos, M, Pignatelli, D., Borges, T., Aragüés, J.M., Fonseca, F., Pereira, B., Socorro, S., Lemos, M.C, 2015. Novel FGFR1 mutations in Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: evidence for the involvement of an alternatively spliced isoform. *Fertility and Sterility*, doi: 10.1016/j.fertnstert.2015.07.1142.

No decurso do projeto de doutoramento foram apresentadas as seguintes comunicações:

- Apresentação oral em Abril de 2014 na reunião do grupo de estudo da hipófise- GEH da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo intitulada “*Caracterização clínica e molecular de um grupo de pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico*”. 2014, Autores: Catarina Gonçalves, Sílvia Socorro e Manuel Lemos.

- Apresentação oral no Congresso Português de Endocrinologia Janeiro 2015/66ª reunião anual da Sociedade Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo intitulada “*Hipogonadismo Hipogonaditrófico: identificação de 6 novas mutações do gene FGFR1*”, premiada com o prémio de casuística. Autores: Catarina Gonçalves, Margarida Bastos, Duarte Pignatelli, Teresa Borges, José Maria Araguês, Fernando Fonseca, Bernardo Pereira, Sílvia Socorro e Manuel Lemos.

- Apresentação de poster no COST Action BM1105 Scientific Meeting and Training School, Prato-Italy Abril de 2015, intitulado “*Novel FGFR1 mutations in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: involvement of an alternatively spliced isoform*”. Autores: Catarina Gonçalves, Margarida Bastos, Duarte Pignatelli, Teresa Borges, José Maria Araguês, Fernando Fonseca, Bernardo Pereira, Sílvia Socorro e Manuel Lemos.

- Apresentação oral no X Annual CICS-UBI Symposium Julho 2015, intitulada “*Prevalence of genetic mutations in patients with Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism*”. Autores: Catarina Gonçalves, Sílvia Socorro e Manuel Lemos.