

ADRIANA LOFRANO ALVES PORTO

**NOVOS ASPECTOS DO HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO
SELETIVO: AVALIAÇÃO DA ESTEROIDOGÊNESE GONADAL NA
DEFICIÊNCIA DE FSH E ANÁLISE DO GENE *LHB* NA DEFICIÊNCIA
DE LH**

Brasília, 2007

Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde

**NOVOS ASPECTOS DO HIPOGONADISMO HIPOGONADOTRÓFICO
SELETIVO: AVALIAÇÃO DA ESTEROIDOGÊNESE GONADAL NA
DEFICIÊNCIA DE FSH E ANÁLISE DO GENE *LHB* NA DEFICIÊNCIA
DE LH**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde – Área de concentração: Fisiopatologia médica.

Adriana Lofrano Alves Porto

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo da Motta

Trabalho realizado na Unidade de Endocrinologia do Hospital Universitário de Brasília. O estudo molecular apresentado na segunda parte deste trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Molecular - Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Dr. Francisco de Assis da Rocha Neves.

AGRADECIMENTOS AOS QUE PARTICIPARAM DIRETAMENTE DESTES TRABALHO

Ao meu orientador Prof. Dr. Luiz Augusto Casulari. Pelo espírito investigador. Pelos ensinamentos na prática. Por saber acalmar a minha agitação nos momentos de ansiedade... Por ter me dado a chance de começar de novo. Pela “mineiridade” do saber esperar a hora certa. Por nunca ter deixado de acreditar.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Francisco de Assis Rocha Neves. Antes de tudo, por ter aceitado, “de primeira”, a minha proposta de trabalho. Por abrir as portas do laboratório. Pelo entusiasmo contagiante! Pelos ensinamentos e a valorização do Brasil e dos brasileiros e suas realizações. Pelo espírito de justiça e de trabalho em equipe. Conseguimos!

Ao Gustavo (Gustavo Barcelos Barra). Pelos experimentos com o DNA. Pelo exemplo de inteligência, criatividade, dedicação, idealismo e integridade. Pela estratégia da RT-PCR. Pela tranquilidade. E acima de tudo, pela mais nova GRANDE amizade!

Aos alunos Leonardo Giacomini e Paula Nascimento ou “Paula e Leo”. Porque a ordem dos fatores não altera o resultado de uma soma de $10 + 10$. Pelos sonhos divididos. Pela amizade multiplicada. Pela determinação, perseverança, fidelidade e companheirismo. E pelo “serviço pesado”...

À Prof. Dra. Lucilia Domingues Casulari da Motta. Pelos inúmeros exemplos de altivez, ética, cuidado ao paciente e coerência, dignos de uma professora. Pelo aprendizado de vida.

À Prof. Dra. Luciana Naves, pelos ensinamentos e exemplos de determinação e busca pela qualidade acadêmica. Por seu incansável trabalho em prol da Unidade de Endocrinologia do HUB – UnB. Pelo ideal de estímulo à produção e apoio às iniciativas de pesquisa no HUB. Por ter viabilizado a conclusão desse trabalho. E finalmente pela compreensão e amizade que já vem de alguns anos...

Ao Dr. Lawrence Layman, pelo início de tudo. Pela simpática acolhida no laboratório de genética molecular e endocrinologia reprodutiva da Unidade de Ginecologia e Obstetrícia, na Universidade de Chicago. Pela orientação no protocolo de avaliação do ESTUDO A e pelo contato com a Dra. Rachel Leproult, que gentilmente realizou a análise da pulsatilidade do LH.

À Dra. Ceres Rezende, da Unidade de Ginecologia e Obstetrícia do HUB, pela realização das ecografias transvaginais da paciente com deficiência seletiva de LH.

Ao Dr. Marcelo Serra, do Centro de Diagnóstico por Imagem, Brasília, DF, pela realização das ecografias testiculares.

Ao Instituto e Laboratório Sabin de Análises Clínicas, pela cortesia da realização das dosagens hormonais e pelo constante incentivo à pesquisa.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

À minha avó, Myriam, uma mulher de respeito, e ao meu avô, Cleveland Lofrano (*in memoriam*), um especialista em viver. Pela força da sua presença, na dura realidade de nossas vidas. Pela alegria possível, ainda que sofrida. Pelos exemplos de integridade e dignidade.

Ao meu irmão, Eduardo. Pelas etapas vencidas. Por sua bondade intrínseca. Pela eterna confiança e companhia.

Aos meus tios, Junior e Renata e ao afilhado Fábio. Pela proximidade do coração.

À minha sogra, Stela, exemplo de mãe, mulher forte e profissional. Ao meu sogro, Sérgio, por sua sensibilidade e pelas mensagens do “Rosa”. Aos dois, pela extensão do amor de filha.

À Daniela, cunhada-irmãzinha mais que especial. Ao cunhado André, pelo eterno apoio na informática. E pelo carinho e preocupação. Ao Serginho, pelos exemplos de determinação, amizade e espírito crítico.

À Vó-diamante: Dona Stela. Vó de coração, de idéias, de luta e de rezas.

À Suely. Pelo mais profundo conhecimento da minha alma. Por me ensinar a andar para frente e a acreditar em mim mesma. Pelo carinho amoroso. Pelo encontro da razão nos meus sentimentos.

Às amigas do lado esquerdo do peito, Ana Paula, Daniele e Adriana Araújo. Pela compreensão das inúmeras ausências. Pela boa e velha companhia. Pelos problemas compartilhados. Pelo perdão dos meus erros...

À Toinha, por dar conta da casa e das crianças, com muita dedicação, nos dias e noites de trabalho infundável no computador. E pelo carinho e apoio de mais de 20 anos...

Ao Dr. Ricardo Martins, pelas eufóricas manifestações de estímulo, nos tempos mais difíceis. Funcionou! Continuei médica por sua causa.

À Dra. Mônica Tokarnia, a inspiração para ser mãe e médica. Por sua sempre tão doce torcida. Pelos primeiros conhecimentos na endocrinologia.

Aos Professores Doutores Joel Russomano Veiga, Luiz Fernando Junqueira, Tânia Torres Rosa, Carlos Alberto Viegas, Clarice Santos, Hervaldo Sampaio, Paulo César de Jesus, Ayres, Daniel Vasconcellos, Paulina Targino, Maria de Fátima Cardoso e demais professores da Unidade de Clínica Médica do HUB. Aos colegas da residência no HUB, principalmente Doutores Adriana Araújo, Carmen Déa, Neuton Dornelas e César Kozac. Pelo estímulo e apoio incondicionais desde os tempos difíceis da residência.

Aos residentes de endocrinologia do HUB. Pelo afeto diário e pelas perguntas no ambulatório...

Em especial, aos pacientes. Pela confiante entrega. Pelas experiências compartilhadas. Particularmente aos pacientes de Formosa-GO e Sagarana-MG, pela participação consciente nessa pesquisa e pela carinhosa acolhida em suas casas! Essa experiência jamais será esquecida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao amor da minha vida, Luiz Guilherme,

Pelos 21 anos de cumplicidade.

Por nossa complementaridade.

Pela mais pura felicidade.

Pela força da nossa verdade.

Por toda a sua bondade.

E pela multiplicidade....

Obrigada por ser o “LH do meu FSH”!

Essa realização é nossa!

Ao meu filho-irmão Rodrigo.

Por termos aprendido a crescer... juntos.

Aos meus filhos Bruno e Amanda,

Pela renovação da alegria. E pela capacidade de, simplesmente, acreditar...

DEDICATÓRIA

À minha mãe Ana Elizabeth.
Por sua saga.

Da Saga da Ana
Os rios da vida se formaram
E neles navegaram
Os sonhos
A dor
O luto

A embarcação
Frágil
Resiste

E os sopros de luz trazidos pelo vento
Clareiam o coração e a mente

A saga da Ana agora é uma história.
Vivida, sentida e ressentida
Que traz à tona
A margem do rio

Em terra firme
Renovam-se as sementes
De uma nova história...

Adriana Lofrano Porto

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 – Organização funcional e desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal	7
1.2 – Regulação da função gonadal no adulto – papel das gonadotrofinas.....	8
1.3 – Correlação estrutura-função das gonadotrofinas e seus respectivos genes.....	16
1.4 – Mutações nos genes das gonadotrofinas e seus receptores em seres humanos.....	20
2. OBJETIVOS	25
3. MÉTODOS	26
3.1 – Sujeitos do estudo	26
3.1.1 – Sujeitos do estudo A	26
3.1.2 – Sujeitos do estudo B	27
3.2 – Avaliação clínica	28
3.3 – Avaliação hormonal	29
3.3.1 – Avaliação hormonal no estudo A – protocolo do estudo.....	29
3.3.2 – Avaliação hormonal no estudo B – caracterização clínica da deficiência seletiva de LH	32
3.3.3 – Ensaio hormonal utilizados em ambos os estudos	32
3.4 – Análise molecular (estudo B)	33
3.4.1 – Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico	33
3.4.2 – Reação de polimerização em cadeia (PCR)	34
3.4.3 – Sequenciamento automático	35
3.4.4 – Digestão enzimática	35
3.4.5 – Extração de RNA de sangue total	36
3.4.6 – Síntese do cDNA ou transcrição reversa	37
3.4.7 – Amplificação do cDNA (<i>semi-nested</i> RT-PCR)	38
4 . RESULTADOS	41

4.1 – ESTUDO A.....	41
4.1.1 – Resultados do protocolo de estimulação hormonal na paciente com deficiência seletiva de FSH (sexo feminino).....	41
4.1.2 – Resultados do protocolo de estimulação hormonal no paciente com deficiência seletiva de FSH (sexo masculino).....	45
4.2 – ESTUDO B.....	51
4.2.1 – Avaliação clínica	51
4.2.2 – Avaliação molecular	63
5. DISCUSSÃO	72
5.1 – Estudo A	72
5.2 – Estudo B	78
6. CONCLUSÕES	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
8. ANEXOS	104
I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP	105
II - Termo de consentimento livre e esclarecido – ESTUDO A.....	106
III - Termo de consentimento livre e esclarecido – ESTUDO B.....	108
IV - Artigo referente aos resultados do ESTUDO A (<i>Fertility and Sterility</i>)..	110
V - Artigo referente aos resultados do ESTUDO B (<i>The New England Journal of Medicine</i>).....	131

LISTA DE ABREVIATURAS

17 β -HSD	17-beta-hidroxiesteróide desidrogenase tipo 1
17OHP	17hidróxi-progesterona
3 β -HSD	3-beta-hidroxiesteróide desidrogenase
α -livre	Subunidade alfa livre dos hormônios glicoproteicos
A	adenina
AD	androstenediona
AMPC	adenosina monofosfato cíclico
AR	receptor androgênico
Arg	arginina
Asp	asparagina
C	citossina
cDNA	ácido desoxirribonucléico - complementar
CV	coeficiente de variação
CYP11A1	enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
CYP19	gene da aromatase
Cys	cisteína
dNTP	desoxirribonucleotídeo
DHEA	deidroepiandrosterona
DHT	deidrotestosterona
DNA	ácido desoxirribonucléico
E ₂	estradiol
FSH	hormônio foliculoestimulante
FSHB	subunidade beta do hormônio foliculoestimulante ou seu gene
FSHR	receptor do hormônio foliculoestimulante
G	guanina
Gln	glutamina
GnRH	hormônio liberador de gonadotrofinas (<i>gonadotropin-releasing hormone</i>)
hCG	gonadotrofina coriônica humana
hCGB	subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana ou seu gene
HH	hipogonadismo hipogonadotrófico
HUB	Hospital Universitário de Brasília

IR	receptor da insulina
LH	hormônio luteinizante
LHB	subunidade beta do hormônio luteinizante ou seu gene
LHR	receptor do hormônio luteinizante ou seu gene
ND	não digerido
P	progesterona
PCR	reação de polymerase em cadeia
P450arom	aromatase
P450c17	17alfa-hidroxilase
P450scc	<i>P450 side chain cleavage</i>
pb	pares de bases
rFSH	hormônio foliculoestimulante recombinante
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico - mensageiro
RT-PCR	reação de polimerase em cadeia após transcrição reversa
SDHEA	sulfato de deidroepiandrosterona
StAR	<i>Steroid Acute Regulatory Protein</i>
T	testosterona
TSH	hormônio tireoestimulante
Tyr	Tirosina
VTT	volume testicular total
WT	<i>Wild-type</i>
X	Códon de parada (<i>stop</i>)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas de dois irmãos homozigotos para a mutação inativadora do gene <i>FSHB</i> Tyr76X.....	25
Tabela 2 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia.....	32
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados na <i>semi nested</i> RT-PCR.....	36
Tabela 4 - Valores de LH obtidos no período da noite, a cada 15 min, nos dois indivíduos com deficiência seletiva de FSH (pulsatilidade).....	40
Tabela 5 - Valores hormonais basais e após administração de hCG (teste 1), FSH e FSH seguido de hCG (FSH+hCG) (teste 2) na paciente com deficiência seletiva de FSH.....	42
Tabela 6 - Valores hormonais basais e após administração de hCG (teste 1), FSH e FSH seguido de hCG (FSH+hCG) (teste 2) no paciente com deficiência seletiva de FSH.....	44
Tabela 7 - Dados hormonais de três pacientes homozigotos para a mutação IVS2+1G>C no gene da subunidade beta do LH.....	56
Tabela 8 - Teste de estímulo com GnRH em três pacientes homozigotos para a mutação IVS2+1G>C no gene <i>LHB</i>	57
Tabela 9 - Características clínicas e hormonais de familiares dos pacientes com deficiência seletiva de LH, heterozigotos para a mutação IVS2+1G>C no gene <i>LHB</i>	59
Tabela 10 - Teste de estímulo com GnRH em três pacientes heterozigotos para a mutação IVS2+1G>C no gene <i>LHB</i>	60

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Representação esquemática das principais ações do FSH e do LH na regulação da esteroidogênese gonadal, durante a fase folicular do ciclo menstrual..... 9
- Figura 2** - Perfil hormonal na transição lúteo-folicular.....12
- Figura 3** - Representação esquemática do protocolo de avaliação hormonal.....29
- Figura 4** - Representação esquemática do mapa de restrição da enzima *NcoI*.....34
- Figura 5** - Representação esquemática do protocolo da *semi-nested* RT-PCR.....37
- Figura 6** - Representação esquemática da estratégia de amplificação utilizada na *semi nested* RT-PCR, mostrando as regiões de hibridização dos oligonucleotídeos (1F, 2F, 4F e LH23R) no cDNA.....38
- Figura 7** - Ultrassonografia pélvica abdominal da paciente homozigota para a mutação Tyr76X do *FSHB*.....39
- Figura 8** - Pulsatilidade noturna espontânea do LH na paciente com deficiência seletiva de FSH.....40
- Figura 9** - Pulsatilidade noturna espontânea do LH no paciente com deficiência seletiva de FSH.....43
- Figura 10** - Concentrações plasmáticas de inibina B no teste 2 do paciente masculino com deficiência isolada de FSH.....45
- Figura 11** - Concentrações plasmáticas de testosterona do paciente masculino com deficiência isolada de FSH.....46

Figura 12 - Concentrações plasmáticas de androstenediona do paciente masculino com deficiência isolada de FSH.....	46
Figura 13 - Concentrações plasmáticas de 17-hidroxiprogesterona do paciente masculino com deficiência isolada de FSH.....	47
Figura 14 - Concentrações plasmáticas de estradiol do paciente do sexo masculino com deficiência isolada de FSH.....	48
Figura 15 - Aspecto histopatológico do testículo do paciente (caso 2) com deficiência seletiva de LH.....	51
Figura 16 - Paciente de 29 anos com deficiência seletiva de LH.....	52
Figura 17 - Aspecto ultrassonográfico inicial do útero e ovários da paciente com deficiência seletiva de LH.....	53
Figura 18 - Aspecto ultrassonográfico do ovário direito da paciente com deficiência seletiva de LH após início do tratamento de reposição hormonal.....	54
Figura 19 - Seqüenciamento da junção éxon 2 – íntron 2 do gene <i>LHB</i> da mulher com deficiência seletiva de LH e do controle.....	61
Figura 20 - Representação esquemática do gene <i>LHB</i>	61
Figura 21 - Fotografia de um gel de acrilamida, visualizado sob luz ultravioleta, mostrando os produtos da digestão com a enzima <i>NcoI</i>	62
Figura 22 - Heredograma.....	64
Figura 23 - Produtos da <i>semi nested</i> RT-PCR do mRNA <i>LHB</i> , visualizados em gel de agarose.....	66

- Figura 24** - Seqüenciamento do produto da RT-PCR da paciente com deficiência seletiva de LH e do controle.....67
- Figura 25** - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos do *LHB* selvagem e mutante.....69
- Figura 26** - Simulação teórica da estrutura tridimensional do dímero subunidade alfa - proteína aberrante, resultante da mutação IVS2+1G>C.....81

RESUMO

Lofrano-Porto, A. Novos aspectos do hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo: avaliação da esteroidogênese gonadal na deficiência de FSH e análise do gene *LHB* na deficiência de LH. (tese) Brasília: Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília; 2007. 175p.

Mutações inativadoras dos genes das gonadotrofinas são raras e representam oportunidade única para estudo dos efeitos do FSH e do LH, separadamente, *in vivo*. Anteriormente, descrevemos uma família brasileira, na qual dois irmãos, um homem e uma mulher, apresentavam deficiência seletiva de FSH devido à mutação Tyr76X, em homozigose, no gene *FSHB*. Recentemente identificamos outra família, na qual três irmãos, dois homens e uma mulher, apresentavam deficiência seletiva de LH. Na primeira parte do presente estudo (ESTUDO A), foi aplicado protocolo de estimulação hormonal nos pacientes com deficiência de FSH, com o objetivo de analisar os efeitos da estimulação gonadotrófica seletiva na resposta esteroidogênica gonadal em ambos os sexos. Na segunda parte (ESTUDO B), descrevemos as características clínicas e aspectos fisiopatológicos da deficiência seletiva de LH em ambos os sexos e realizamos a análise do gene da subunidade beta do LH (*LHB*) nos indivíduos afetados e seus familiares. No ESTUDO A, o protocolo consistiu inicialmente de análise da pulsatilidade do LH, obtida por meio de coletas noturnas seriadas de amostras de sangue para dosagem de LH. Em seguida, após supressão adrenal com dexametasona dois dias antes e durante o protocolo, foram realizadas medidas de esteróides sexuais gonadais no estado basal e após administração de hCG apenas, FSH apenas, ou FSH seguido de hCG (FSH+hCG). Foram analisadas as seguintes variáveis: número de pulsos de LH, média \pm DP de suas amplitudes, média \pm DP dos valores de LH ao longo da noite, e concentrações séricas de testosterona (T), estradiol (E₂, SDHEA, 17hidroxiprogesterona (17OHP), androstenediona (AD) e inibina B (InB), antes e depois de cada estímulo. Foram obtidos os seguintes resultados, na mulher e no homem, respectivamente: a média \pm DP do LH ao longo da noite foi $49,2 \pm 5,7$ mIU/ml e $9,1 \pm 2,9$ mIU/ml; foram detectados 8 pulsos em 8 horas e 9 pulsos em 9 horas, com amplitudes de $53,4 \pm 6,5$ mIU/ml e $11,7 \pm 1,9$ mIU/ml. Não houve resposta esteroidogênica gonadal na mulher a nenhum dos estímulos utilizados, enquanto no homem, houve aumento de T e AD após hCG (55,2% e 125%, respectivamente), após FSH (76,3% e 40%) e após FSH+hCG (68% e 140%), houve aumento da 17OHP apenas após FSH+hCG (238,8%) e aumento do

E₂ após hCG (>116,1%) e após FSH+hCG (111,8%). A InB aumentou 480% após FSH. No ESTUDO B, a deficiência de LH caracterizou-se, nos homens, por ausência do desenvolvimento puberal e azoospermia e na mulher, por amenorréia secundária e infertilidade. As concentrações de séricas de LH foram indetectáveis e as de FSH, elevadas. O seqüenciamento do gene *LHB* revelou a presença da mutação IVS2+1G>C em homozigose nos indivíduos afetados. O rastreamento da mutação por digestão enzimática revelou que seis familiares férteis eram heterozigotos para a nova mutação, enquanto a mutação não foi identificada em nenhum dos 100 indivíduos normais, no grupo controle. A análise por RT-PCR do RNAm extraído de leucócitos dos indivíduos afetados demonstrou que a mutação resultou na inclusão do íntron 2 e, conseqüentemente, mudança da fase de leitura do éxon 3 do *LHB*. O alinhamento das seqüências da suposta proteína aberrante e do LH-beta normal evidenciou a perda de estruturas essenciais para a dimerização das subunidades e conseqüentemente comprometimento provável de sua secreção. Os resultados do ESTUDO A sugeriram que o FSH pode exercer efeito regulatório sobre a produção de andrógenos pelas células de Leydig normais, provavelmente agindo de forma parácrina, mediada por sua ação nas células de Sertoli. No ESTUDO B, a mutação identificada no gene *LHB* (IVS2+1G>C) resultou no fenótipo de deficiência seletiva de LH nos homozigotos, corroborando os efeitos fisiológicos principais do LH sobre a produção androgênica e fertilidade no sexo masculino e sobre a capacidade ovulatória e fertilidade, no sexo feminino.

Descritores: hipogonadismo, hormônio luteinizante subunidade beta/genética, hormônio folículoestimulante subunidade beta/genética, mutação, hormônios esteróides gonadais

ABSTRACT

Lofrano-Porto, A. Novel features of selective hypogonadotropic hypogonadism: evaluation of gonadal steroidogenesis in FSH deficiency and *LHB* gene analysis in LH deficiency. (thesis) Brasília: “Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília”; 2007. 175p.

Inactivating mutations of gonadotropins genes are rare and represent a unique opportunity to study FSH and LH effects, separately, *in vivo*. We previously described a Brazilian family including two siblings, a man and a woman, with selective FSH deficiency due to a mutation (Tyr76X) in *FSHB* gene. Recently, we identified another family including three siblings, two men and a woman, with selective LH deficiency. In the first part of this study (STUDY A), we performed a hormonal stimulation protocol in the FSH-deficient patients, in order to analyse the effects of selective gonadotropin stimulation on gonadal steroidogenic response in both sexes. In the second part (STUDY B), we described the clinical characteristics and physiopathologic features of selective LH deficiency in both sexes and performed the analysis of the *LHB* gene in the affected patients and their relatives. In STUDY A, the protocol started with overnight serial LH sampling for the analysis of LH pulsatility. After adrenal suppression with oral dexametasone given two days before and during the protocol, gonadal steroids levels were assessed at baseline and after hCG, FSH or FSH +hCG administration. The following variables were analysed: LH pulse number, mean \pm SD LH amplitude, mean \pm SD overnight LH level and baseline and stimulated serum levels of testosterone (T), estradiol (E2), dehidroepiandrosterone sulphate (SDHEA), 17hydroxi-progesterone (17OHP), androstenedione (AD) and inhibin B. The following results were obtained, for the woman and the man, respectively: the mean overnight LH levels were 49.2 ± 5.7 mIU/mL and 9.1 ± 2.9 mIU/mL; there were 8 pulses/8h and 9 pulses/9h, with mean amplitudes of 53.4 ± 6.5 mIU/mL and 11.7 ± 1.9 mIU/mL. There was no steroid response to rFSH, hCG or FSH+hCG in the woman. In the man, there was an increase in T and AD after hCG (55.2% and 125%, respectively), after FSH (76.3% and 40%) and after FSH+hCG (68% and 140%); an increase in 17OHP was observed only after FSH+hCG (238.8%); estradiol increased after hCG (>116%) and after FSH+hCG (111.8%), and inhibin B increased by 480% after FSH. In STUDY B, LH deficiency was characterized by absent pubertal development and azoospermia in the men, and by secondary amenorrhea and infertility in the woman. LH levels were undetectable, whereas FSH was elevated. *LHB* gene

sequencing revealed a mutation (IVS2+1G>C) in homozygous state in the affected subjects. Mutation screening by enzymatic digestion revealed that six fertile family members were heterozygotes for the new mutation, whereas the mutation was not found in any of the 100 normal subjects in the control group. RT-PCR analysis of the *LHB* mRNA extracted from leucocytes of the affected subjects demonstrated that the mutation resulted in the inclusion of intron 2 and, consequently, in an exon 3 frameshift. Sequence alignments of the supposed aberrant protein and wild-type LHB showed that the aberrant protein would lack structures essential for subunit dimerization, which would probably compromise its secretion. The results from STUDY A suggested that FSH may exert a regulatory role in androgen production by Leydig cells, probably acting in a paracrine way, mediated by its action on Sertoli cells. The *LHB* mutation identified in STUDY B (IVS2+1G>C) resulted in the phenotype of selective LH deficiency in homozygotes, reinforcing the main physiologic effects of LH on androgen production and fertility in men, and on ovulatory capacity and fertility in women.

Key words: hypogonadism, luteinizing hormone beta subunit/genetics, follicle stimulating hormone beta subunit/genetics, mutation, gonadal steroids

1. INTRODUÇÃO

A função reprodutiva depende da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o qual é fundamentalmente constituído pelos neurônios hipotalâmicos secretores de GnRH (*gonadotropin-releasing hormone*; hormônio liberador das gonadotropinas), os gonadotrofos na hipófise que secretam as gonadotrofinas FSH (*follicle-stimulating hormone*; hormônio foliculoestimulante) e LH (*luteinizing hormone*; hormônio luteinizante), e as gônadas (ovários e testículos) (MELMED e KLEINBERG, 2003).

Anormalidades no desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal podem resultar em prejuízo da função gonadal e conseqüente hipogonadismo, caracterizado por diminuição da produção de hormônios sexuais, ausência de desenvolvimento puberal e infertilidade. O hipogonadismo é dito hipogonadotrófico quando há secreção deficiente das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e/ou LH) e é decorrente de alterações no hipotálamo e/ou na hipófise (MELMED e KLEINBERG, 2003).

Nos últimos anos, vários defeitos genéticos que resultam em hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) vêm sendo identificados. Mutações em genes expressos no hipotálamo e/ou na hipófise e envolvidos no seu desenvolvimento vêm sendo detectadas em humanos e caracterizadas em modelos animais. Tais mutações, devido ao seu papel crítico no comprometimento da função reprodutiva e fertilidade, são compreensivelmente bastante raras. No entanto, o estudo dos fenótipos resultantes dessas mutações em humanos e em animais geneticamente modificados tem se mostrado uma ferramenta valiosa para o esclarecimento de vários aspectos ainda pouco compreendidos da função gonadal e do controle hormonal da reprodução (THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000; THEMMEN, 2005). Vários genes vêm sendo relacionados ao fenótipo de HH, os quais, em conjunto, são responsáveis pela base molecular de aproximadamente 10 a 20% dos pacientes com diagnóstico clínico de HH “idiopático” (BHAGAVATH et al., 2006). Além disso, raros casos foram descritos de HH seletivo, por deficiência isolada de LH ou FSH, causados por mutações nos genes da subunidade beta do FSH (*FSHB*) (MATTHEWS et al., 1993; LAYMAN et al., 1997; PHILLIP et al., 1998; LINDSTEDT et al., 1998; LAYMAN et al., 2002) e da subunidade beta do LH (*LHB*) (WEISS et al., 1992; VALDES-SOCIN et al., 2004). Esses casos, embora bastante raros, constituem-se em oportunidade ímpar para o entendimento das ações isoladas de cada hormônio, em seres humanos, e são o foco central do presente trabalho.

Dentre os pacientes portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) acompanhados no ambulatório de endocrinologia do Hospital Universitário de Brasília, de 1998 até os dias atuais, nosso grupo identificou dois casos de HH seletivo, isto é, deficiência isolada de FSH ou de LH. Embora sejam condições muito raras, a identificação e caracterização de mutações nos genes que codificam as subunidades das gonadotrofinas são de grande importância, pois os poucos relatos descritos na literatura muito têm contribuído para o avanço do conhecimento na área de fisiologia e fisiopatologia dos distúrbios da reprodução.

Em publicação anterior, apresentamos as características clínicas de uma família, na qual dois irmãos, um homem e uma mulher, são portadores de HH por deficiência seletiva de FSH (LAYMAN et al., 2002). A caracterização molecular da mutação encontrada no gene *FSHB* e a descrição da família foram apresentadas naquela ocasião. No presente trabalho, dando continuidade aos estudos sobre o HH seletivo, foi realizado um protocolo de estimulação gonadotrófica aguda nos dois irmãos deficientes de FSH, com o objetivo de avaliar as ações isoladas do FSH e LH (ou do hCG: *human chorionic gonadotropin*; gonadotrofina coriônica humana, semelhante ao LH) na produção de esteróides gonadais em ambos os sexos (ESTUDO A).

Recentemente, identificamos outro caso de HH seletivo, dessa vez, resultante de deficiência isolada de LH, que motivou a realização dos estudos na segunda parte do presente trabalho (ESTUDO B).

Dessa forma, motivados pela oportunidade de estudar em seres humanos, os aspectos clínicos, hormonais e genéticos da deficiência isolada de FSH, por um lado, e da deficiência isolada de LH, por outro, a pesquisa aqui apresentada foi dividida em duas etapas. Na primeira etapa (ESTUDO A), foi realizada a avaliação da resposta esteroidogênica gonadal a diferentes estímulos gonadotróficos, nos dois indivíduos homocigotos para a mutação Tyr76X identificada no gene *FSHB*. Na segunda etapa (ESTUDO B), procedeu-se ao estudo clínico e molecular do paciente com deficiência seletiva de LH, seu irmão e uma irmã também afetados, e demais familiares, resultando na identificação e caracterização de uma nova mutação no gene da subunidade beta do LH (*LHB*) nessa família.

A seguir, apresentamos o embasamento teórico sobre aspectos da fisiologia reprodutiva relevantes para o presente estudo, bem como uma revisão sobre o estado atual do conhecimento sobre a genética do hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo.

A. ORGANIZAÇÃO FUNCIONAL E DESENVOLVIMENTO DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-GONADAL

Em seres humanos, as aquisições da maturidade sexual e função reprodutiva dependem do desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, o qual compreende cinco estágios, caracterizados por diferentes graus de ativação: período fetal, primeira infância ou período pós-natal (primeiros meses do nascimento), infância, período pré-puberal e puberdade (GRUMBACH e STYNE, 2003; MELMED e KLEINBERG, 2003).

No período fetal, a diferenciação sexual e o desenvolvimento das gônadas independem da ativação das gonadotrofinas hipofisárias. Camundongos nocauteados para os receptores do LH e FSH são fenotipicamente normais ao nascimento (ZHANG et al., 2001; FISHER, 2003). No feto masculino, o crescimento e a diferenciação das células de Leydig, bem como a produção de esteróides sexuais no testículo em desenvolvimento, são estimulados pelo hCG proveniente da placenta. Assim, a testosterona fetal, induzida pela hCG, resulta na diferenciação da genitália externa masculina. Por outro lado, a presença de receptores para gonadotrofinas no ovário fetal e a produção de esteróides sexuais não foi confirmada, logo, sugere-se que o ovário permaneça inativo desde o período fetal até o início da puberdade (JAMNONGJIT e HAMMES, 2006).

No recém-nascido, a concentração sérica de gonadotrofinas encontra-se suprimida e, após um curto período de elevação significativa nos primeiros meses após o nascimento (até cerca de 4 meses nos meninos e 12 meses nas meninas) a concentração de gonadotrofinas séricas diminui acentuadamente e permanece suprimida durante toda a infância até o início da puberdade (THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000).

Na puberdade ocorre a reativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, quando as secreções de FSH e LH novamente aumentam e determinam estimulação das células-alvo nas gônadas, resultando no aumento da produção de esteróides sexuais e na maturação das células germinativas (gametogênese). Essa etapa do desenvolvimento caracteriza-se pelo aparecimento das características sexuais secundárias, aumento da velocidade de crescimento (estirão puberal do crescimento), aquisição da maturação sexual e fertilidade. Esse processo envolve estímulos mediados pelo sistema nervoso central e é iniciado pelo aumento na frequência e amplitude dos pulsos de GnRH, decapeptídeo produzido nos neurônios do hipotálamo, que regula a secreção das gonadotrofinas hipofisárias. Dessa forma, o início da puberdade é determinado pelo aumento da secreção pulsátil do GnRH, que resulta em aumento progressivo das secreções de FSH e LH, estimulando o início da síntese de

esteróides sexuais e o desenvolvimento das células germinativas (gametogênese) nas gônadas (THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000; GRUMBACH e STYNE, 2003; MELMED e KLEINBERG, 2003).

O padrão pulsátil de secreção de GnRH é fundamental para a manutenção do adequado perfil de secreção das gonadotrofinas, necessário para a estereoidogênese normal e gametogênese (COUNIS et al., 2005). A secreção de GnRH é influenciada por vários fatores neurais (sistema nervoso central), neurotransmissores e também está sujeita ao controle de retroalimentação (*feedback*) exercido por esteróides e peptídeos gonadais. Dessa forma, a pulsatilidade do GnRH resulta em secreção coordenada, sincronizada e também pulsátil de FSH e/ou LH, sendo essa mais evidente para o LH, devido a sua meia-vida mais curta na circulação (STYNE, 2001; GRUMBACH e STYNE, 2003; COUNIS et al., 2005).

Tanto a amplitude dos pulsos do GnRH quanto a sua frequência determinam os padrões fisiológicos de secreção de FSH e LH. Frequências de pulso mais baixas favorecem a secreção de LH, enquanto frequências mais rápidas a reduzem (MELMED e KLEINBERG, 2003; COUNIS et al., 2005). Em condições normais, no adulto, o intervalo entre os pulsos é em média de 55 min para o LH, e a amplitude do pulso, aproximadamente 40% acima da secreção tônica basal (MELMED e KLEINBERG, 2003). Dessa forma, os padrões de secreção de FSH e LH refletem a complexa interação entre os componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal.

B. REGULAÇÃO DA FUNÇÃO GONADAL NO ADULTO – PAPEL DAS GONADOTROFINAS

A função primordial das gonadotrofinas hipofisárias é regular a biossíntese de esteróides sexuais (esteroidogênese) e iniciar e manter o desenvolvimento das células germinativas (gametogênese). Para tal, o FSH e o LH agem de maneira complementar em diferentes células em seus órgãos-alvo, as gônadas (MELMED e KLEINBERG, 2003).

Ações do FSH no ovário

No ovário, os receptores para FSH estão presentes apenas nas células da granulosa. O FSH é responsável pela maturação e crescimento folicular e pela produção de estrógenos

na granulosa, a partir da aromatização dos andrógenos provenientes da teca (THEMMEN, 2005).

O FSH tem papel fundamental nos mecanismos de seleção e desenvolvimento do folículo dominante e é a gonadotrofina diretamente envolvida na seleção. Entretanto, embora o LH não seja essencial para a seleção, também é importante para regulação da formação do folículo dominante, devido a sua capacidade de estimular a produção de androstenediona, substrato para a aromatase, e conseqüentemente para a produção suficiente de estradiol (ERICKSON, 2003).

O FSH regula a síntese de estrógeno ao induzir a atividade das enzimas 17beta-hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD) e aromatase (P450arom) nas células da granulosa, na primeira fase do ciclo menstrual, e também induz crescimento folicular. Os estrógenos, por sua vez, têm papel permissivo para a ação do FSH e aumentam as concentrações de AMPc (adenosina monofosfato cíclico) induzidos pelo FSH nas células da granulosa, assim amplificando sua ação (BULUN e ADASHI, 2003; MELMED e KLEINBERG, 2003).

As ações do FSH envolvem ativação de genes nas células da granulosa e essa é a base para o processo de crescimento do folículo dominante até o estágio pré-ovulatório. Ao se ligar com grande afinidade ao seu receptor, o FSH desencadeia uma série de alterações conformacionais que levam à ativação de proteínas G e à cascata de sinalização intracelular, resultando na indução da expressão de genes, principalmente, da aromatase (*CYP19*) e dos receptores do LH/hCG (*LHR*). Além disso, induz a ativação da mitose das células da granulosa e formação do fluido folicular (ERICKSON, 2003).

Um resumo das ações específicas do FSH na regulação da função ovariana é sugerido por ERICKSON, 2003 e está adaptado a seguir:

1. Estímulo à mitose das células da granulosa.

O FSH é um estimulador da proliferação das células da granulosa do folículo dominante, durante a fase folicular do ciclo. Age sinergicamente com fatores de crescimento para regular essa proliferação (ERICKSON, 2003).

2. Expressão da aromatase.

O FSH induz a expressão do gene *CYP19*, que codifica a aromatase (P450arom), nas células da granulosa. A aromatase é responsável pela produção de quantidades progressivamente crescentes de estradiol pelo folículo dominante em crescimento, ao longo de toda a fase folicular. A P450arom é encontrada a partir de folículos de 1 mm, mas apenas no folículo dominante. Além disso, a enzima 17beta-

hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 1 (17β -HSD) também é expressa constitutivamente nas células da granulosa, desde os folículos primários até o estágio pré-ovulatório. A expressão da P450arom e da 17β -HSD permite que a granulosa se torne altamente eficiente na conversão de androstenediona (derivada da teca) para estradiol (OKTAY et al., 1997; ERICKSON e SHIMASAKI, 2001) (**Figura 1**).

3. Aquisição de potencial de luteinização da granulosa.

É também ao longo da fase folicular, sob regulação do FSH, que a granulosa progressivamente desenvolve a capacidade de produzir progesterona, isto é, a granulosa vai adquirindo potencial de luteinização. Uma vez luteinizadas, as células da granulosa expressam grandes quantidades de StAR (*Steroid Acute Regulatory Protein*; proteína de regulação aguda de esteróides) e das enzimas P450scc (*P450 side chain cleavage*; enzima de clivagem da cadeia lateral) e 3β -HSD (3beta-hidroxiesteróide desidrogenase). Embora esse processo progressivo de luteinização ocorra ao longo da fase folicular, a secreção de progesterona permanece suprimida até imediatamente antes da ovulação. Assim, atualmente, entende-se que o potencial de luteinização é mediado pela ação progressiva do FSH nas células da granulosa ao longo da fase folicular. Entretanto, os inibidores derivados do oócito controlam a expressão das enzimas e proteínas necessárias para a síntese de progesterona, durante a foliculogênese (OKTAY et al., 1997; ERICKSON e SHIMASAKI, 2001).

4. Expressão de receptores para LH.

No estágio pré-ovulatório, o folículo adquiriu competência para responder ao estímulo pelo LH, que ocorre no meio do ciclo. Ao longo da fase folicular, a ação do FSH também resulta em expressão de receptores para LH (LHR) nas células da granulosa, os quais, de maneira semelhante à StAR, P450scc e 3β -HSD, também permanecem suprimidos até o final dessa fase. Assim, observa-se um papel importante do oócito na inibição da expressão de LHR no folículo em desenvolvimento até o estágio pré-ovulatório (OKTAY et al., 1997).

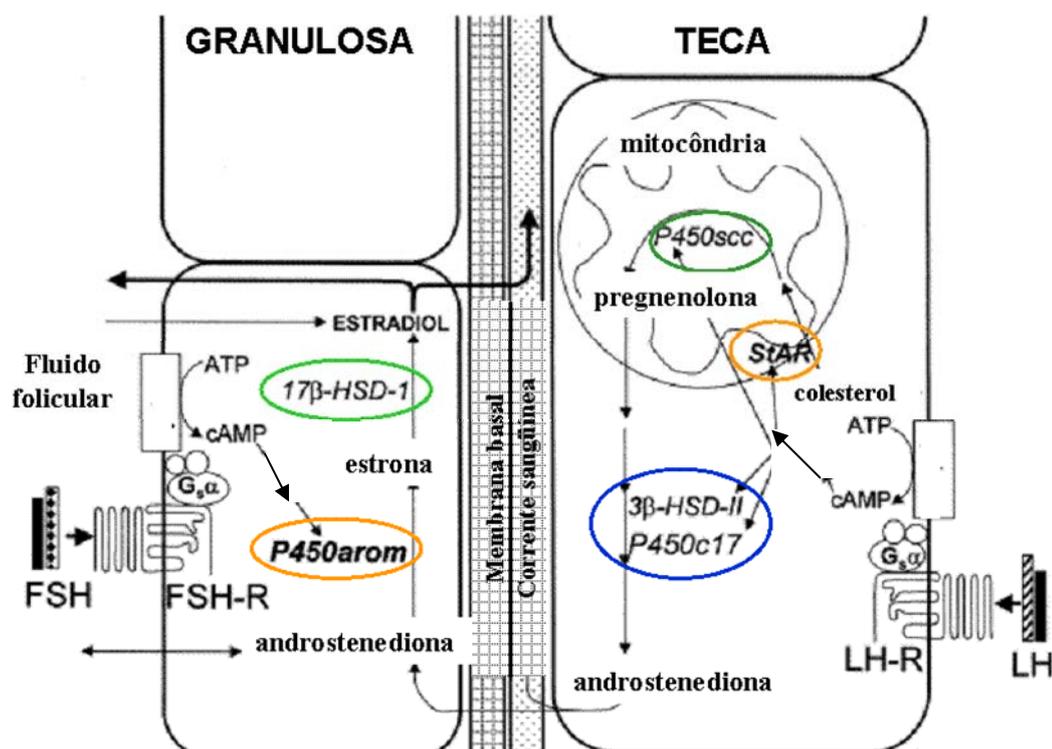


Figura 1. Representação esquemática das principais ações do FSH e do LH na regulação da esteroidogênese gonadal, durante a fase folicular do ciclo menstrual. O FSH estimula a expressão da aromatase e da 17β -HSD, o que favorece a produção de estradiol a partir da androstenediona proveniente da teca. Na teca, o LH estimula a expressão da StAR, P450scc, 3β -HSD e P450c17, resultando na produção de quantidades crescentes de androstenediona. Adaptado de Bulun S, Adashi E. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: Williams Textbook of Endocrinology, 2003).

Ações do LH no ovário

No ovário, os receptores para LH são expressos na teca, estroma, granulosa luteinizada e células do corpo lúteo (THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000). Dessa forma, o LH é responsável pelo estímulo à produção de andrógenos nas células tecais, fornecendo assim substrato para a granulosa produzir estrógenos na fase folicular do ciclo menstrual. Além disso, no meio do ciclo, o pico de LH induz a ovulação e, em seguida, o LH regula a produção de progesterona pelo corpo lúteo (BULUN e ADASHI, 2003).

O receptor para LH, de modo semelhante ao FSH, também é acoplado a proteína G. Ao se ligar com alta afinidade ao seu receptor, o LH induz mudanças conformacionais no receptor que ativam as proteínas G e a cascata de sinalização intracelular, resultando no aumento da concentração de AMPc e ativação de vias de fosforilação de proteínas. As

proteínas fosforiladas, por sua vez, ligam-se ao DNA e modulam a expressão de genes relacionados à biossíntese de androstenediona (ERICKSON, 2003).

O estímulo pelo LH nas células tecais resulta em ativação da StAR, que é responsável pelo transporte do colesterol para a membrana interna da mitocôndria, favorecendo o aumento da disponibilidade de colesterol para a esteroidogênese ovariana. O LH induz ainda a síntese de pregnenolona, bem como a síntese da 3beta-hidroxiesteróide desidrogenase, 17alfa-hidroxilase (P450c17) e 17,20 liase (BULUN e ADASHI, 2003; MELMED e KLEINBERG, 2003).

O LH age nas células da teca que já se diferenciam no momento da formação do antro (já no folículo secundário). A diferenciação da teca envolve a expressão de vários genes (LHR, receptores para insulina- IR, receptores para lipoproteínas, StAR, P450scc, 3β-HSD e P450c17), que permitem que as células da teca sejam capazes de produzir androstenediona. Folículos antrais de todos os tamanhos expressam a teca, logo todos têm potencial para produzir androstenediona. Na verdade, altas concentrações de androstenediona são encontradas no fluido folicular desses folículos em desenvolvimento (ERICKSON, 2003).

O LH é o principal efector da diferenciação da teca e age sinergicamente com insulina e lipoproteínas que amplificam esse processo. Existem outros reguladores da produção de androgênios pela teca que já foram identificados, porém seu papel fisiológico ou fisiopatológico ainda não está bem estabelecido (ERICKSON, 2003).

A representação esquemática simplificada das ações integradas do FSH e do LH na regulação da esteroidogênese ovariana está apresentada na **Figura 1**.

Regulação do ciclo menstrual

A regulação do ciclo menstrual envolve mecanismos complexos de sinalização entre os componentes do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, através da secreção regulada de hormônios esteróides e peptídicos. Os mecanismos envolvidos nessa regulação ainda não estão completamente elucidados (ERICKSON, 2003).

A fase folicular do ciclo menstrual é caracterizada pelo desenvolvimento do folículo dominante, o qual é regulado pela elevação progressiva da secreção das gonadotrofinas e estradiol, culminando com o pico de secreção de LH no meio do ciclo. Na fase lútea, a

formação do corpo lúteo e a produção de progesterona são os eventos principais (BULUN e ADASHI, 2003).

No início da fase folicular, predomina a secreção de FSH sobre a de LH, o que favorece a maturação dos folículos ovarianos. A frequência de pulsos de LH nessa fase é mais lenta, aproximadamente um pulso a cada 90 minutos. O FSH induz a expressão da aromatase e de receptores para LH nas células da granulosa, ambos necessários para a síntese de estradiol. No meio da fase folicular, a frequência de pulsos de LH aumenta para aproximadamente um a cada hora, resultando em aumento da concentração sérica de LH e significativo aumento na secreção de estradiol. Além disso, o FSH estimula a produção de inibina (predominante inibina B) pelos folículos em estágios iniciais de desenvolvimento. A inibina B, por sua vez, age sinergicamente com as elevadas concentrações de estradiol secretados no meio do ciclo, reduzindo a síntese de FSH (*feedback* negativo da inibina B e estradiol sobre o FSH, na fase folicular) (LAVEN e FAUSER, 2004). Dessa forma, o aumento do estradiol e a produção de inibina têm papel importante em limitar a maturação dos folículos não-dominantes (ERICKSON e SHIMASAKI, 2001; ERICKSON, 2003; LAVEN e FAUSER, 2004).

No final da fase folicular ou “meio do ciclo”, as concentrações crescentes de estradiol favorecem maior liberação de LH (*feedback* positivo para o LH), induzindo o “pico de LH”. Concomitantemente, as concentrações de progesterona começam a aumentar e podem amplificar essa resposta de secreção de LH ao GnRH. O LH permanece elevado durante 36 a 48 horas, período no qual ocorre a ovulação. A partir daí, as concentrações de estradiol diminuem e a luteinização do folículo resulta em produção crescente de progesterona, sob a fundamental regulação do LH. A progesterona, por sua vez, tem papel crítico na regulação da pulsatilidade do GnRH, reduzindo sua frequência (WELT et al., 1997; BULUN e ADASHI, 2003; ERICKSON, 2003;).

Na fase lútea, o corpo lúteo secreta também inibina (predominantemente inibina A) que causa maior redução na secreção de FSH, assim evitando o desenvolvimento de novos folículos. Na ausência de fertilização, com a regressão do corpo lúteo e a diminuição da produção de esteróides gonadais e inibina A, a secreção de FSH aumenta novamente no final da fase lútea e recomeça então o crescimento de um novo folículo dominante para o ciclo subsequente (WELT et al., 1997; BULUN e ADASHI, 2003; ERICKSON, 2003;) (**Figura 2**).

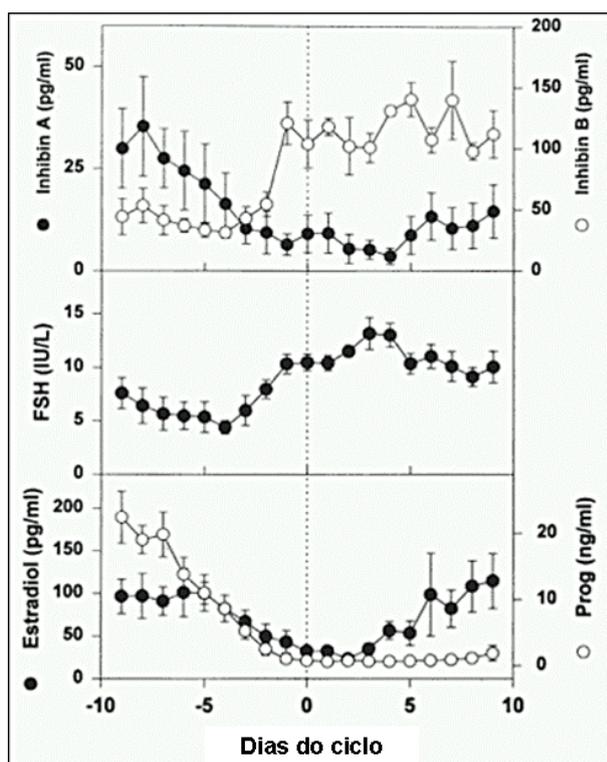


Figura 2. Perfil hormonal na transição lúteo-folicular. Média±SEM para medida diária de inibina A, inibina B, FSH, estradiol e progesterona. (Adaptado de Welt CK, Martin KA, Taylor AE et al. J Clin Endocrinol Metab 1997; 82: 2645-2652)

Normalmente, o ovário humano produz um único folículo dominante, que resulta em ovulação única a cada ciclo menstrual. É o folículo dominante o responsável pela produção de estradiol na fase folicular. Após a ovulação, esse folículo se transforma no corpo lúteo, que secreta grandes quantidades de progesterona durante a fase lútea (ERICKSON, 2003).

Outros fatores, além do LH e FSH participam da regulação da esteroidogênese e foliculogênese ovariana, porém estão além do escopo desse trabalho.

Ações do FSH no testículo

No testículo, o papel do FSH ainda não está completamente esclarecido. Os receptores para o FSH (FSHR) são expressos apenas nas células de Sertoli. No testículo imaturo, o FSH estimula a proliferação dessas células. No adulto, ele está envolvido de forma indireta na manutenção quantitativa e qualitativa da espermatogênese, por ação de fatores mediados pelas células de Sertoli (HUHTANIEMI, 2000; THEMEN e HUHTANIEMI, 2000; SAIRAM e KRISHNAMURTHY, 2001). Entretanto, se o FSH é essencial para a espermatogênese no adulto ainda é motivo de amplo debate, pois os dados

na literatura são controversos (MCLACHLAN et al., 2002; ZHANG et al., 2003). O FSH parece atuar na transformação de espermatídios para espermatozoides (espermiogênese), na presença de testosterona (MCLACHLAN et al., 2002). Defeitos primários na espermatogênese resultam em elevação do FSH (KRETSER, 2007).

A análise do fenótipo dos raros homens deficientes em FSH descritos até o momento não foi conclusiva, mas em geral, sugere que o fenótipo masculino parece ser menos severo do que o feminino (PHILLIP et al., 1998; LINDSTEDT et al., 1998; LAYMAN et al., 2002). Camundongos transgênicos com nocaute do gene da cadeia beta do FSH (*FSHB*) apresentam concentrações de testosterona normais ou pouco diminuídas, porém com algum grau de espermatogênese e fertilidade preservada, embora reduzida (KUMAR et al., 1997). Ao contrário, todos os homens com mutação no *FSHB* foram inférteis (azoospermia). Dois dos três homens deficientes em FSH descritos até o momento, e caracterizados a nível molecular (mutação Cys82Arg e mutação Tyr76X), apresentavam um fenótipo compatível com produção suficiente de andrógenos testiculares, isto é, com desenvolvimento puberal e virilização normal (LINDSTEDT et al., 1998; LAYMAN et al., 2002). O outro, portador da mutação Val61X, apresentou um fenótipo aparentemente mais severo, com comprometimento concomitante da produção de testosterona e ausência de desenvolvimento puberal (PHILLIP et al., 1998). Assim, até o presente o momento, não há consenso sobre o papel do FSH na regulação da produção de esteróides em seres humanos.

Em síntese, o estágio atual do conhecimento da fisiologia reprodutiva em seres humanos permite afirmar que tanto o FSH quanto a testosterona têm papel na iniciação da espermatogênese durante a puberdade, e ambos têm ações similares, porém independentes, que são essenciais para a espermatogênese quantitativamente normal em adultos. O FSH é então necessário para a espermatogênese quantitativamente e qualitativamente normal em seres humanos (SAIRAM e KRISHNAMURTHY, 2001; MATTHIESSON et al., 2006; KRETSER, 2007).

Ações do LH no testículo

Nos testículos, os receptores para LH situam-se exclusivamente nas células de Leydig. Sob estímulo do LH, após a puberdade, as células de Leydig produzem testosterona, a qual é encontrada em altas concentrações na região intertubular dos testículos. A testosterona é essencial para a promoção da espermatogênese e age de forma parácrina no

testículo, em seus receptores (*androgen receptors*; receptores androgênicos - AR) presentes nas células de Sertoli e células peritubulares. A testosterona tem ainda uma ação autócrina, sobre as próprias células de Leydig. As células germinativas não contêm receptores androgênicos (KRETSER, 2007).

Semelhante ao que ocorre nas células da teca, o LH age estimulando a transcrição de genes envolvidos nas vias esteroidogênicas das células de Leydig. Ele estimula a produção de androgênios (testosterona) por essas células, o que o torna fundamental para a manutenção dos efeitos da testosterona tanto nos tecidos extra-gonadais (manutenção dos caracteres sexuais secundários) quanto para sua ação parácrina, mediando a espermatogênese, após a puberdade (GRIFFIN e WILSON, 2003; ANDERSSON et al., 2004).

A reação limitante da síntese de testosterona é o transporte de colesterol (principal substrato para esteroidogênese) à membrana interna da mitocôndria. O LH aumenta agudamente a expressão do gene da StAR, que é a proteína responsável por esse transporte. Uma vez na mitocôndria, o colesterol é substrato para uma enzima que também é estimulada pelo LH (CYP11A1 – enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol) (GRIFFIN e WILSON, 2003).

A testosterona (T) é o principal andrógeno secretado pelo testículo, embora pequena quantidade de dihidrotestosterona (DHT) também seja produzida a partir da testosterona, pela ação da enzima 5 α -redutase. Andrógenos fracos, tais como androstenediona (AD) e deidroepiandrosterona (DHEA), também são produzidos em menor quantidade. Além disso, os testículos contribuem com aproximadamente 25% da produção diária total de estradiol, através da ação local da aromatase (KRETSER, 2007).

C. CORRELAÇÃO ESTRUTURA-FUNÇÃO DAS GONADOTROFINAS E SEUS RESPECTIVOS GENES

As gonadotrofinas LH e FSH pertencem à família de hormônios glicoproteicos, da qual também fazem parte o TSH (*thyroid-stimulating hormone*; hormônio tireostimulante) e o hCG. Esses hormônios são heterodímeros constituídos de duas subunidades: a subunidade alfa, que é comum a todos os membros da família, e a subunidade beta, que lhes confere especificidade. As duas subunidades são associadas por meio de ligações não-covalentes. A dimerização das duas cadeias intactas é essencial para a perfeita ligação com

o respectivo receptor e a expressão completa da atividade biológica dos hormônios glicoproteicos. As estruturas tridimensionais (cristalográficas) foram descritas, até o momento, apenas para o hCG e o FSH, e são bastante semelhantes (LAPTHORN et al., 1994; ULLOA-AGUIRRE e TIMOSSO, 1998; THEMME e HUHTANIEMI, 2000).

Vários estudos têm procurado identificar as regiões da molécula ou as seqüências de aminoácidos envolvidas na formação da estrutura terciária, incluindo as regiões necessárias para associação com a subunidade alfa e ligação com o receptor. Esses estudos empregam geralmente análogos ou moléculas quiméricas obtidas por mutagênese sítio dirigida, que não possuem todo ou parte de regiões a serem estudadas. Entretanto, embora grande avanço tenha ocorrido nos últimos anos, os resultados desses estudos ainda não são definitivos. Potencialmente, sabe-se que qualquer mutação que afete a interação entre as subunidades pode interferir na ligação com o receptor (MATZUK et al., 1989; HUHTANIEMI, 2000).

A subunidade alfa é uma proteína constituída por 92 aminoácidos, idêntica para todos os hormônios glicoproteicos. As subunidades beta de cada hormônio têm uma seqüência própria de aminoácidos, que confere especificidade ao heterodímero, porém também apresentam grande homologia (32% entre LH e TSH, e 83% entre LH e hCG). As subunidades beta do FSH, LH e CG humanos contêm 117, 121 e 145 aminoácidos, respectivamente (THEMME, 2005).

As subunidades beta são ricas em cisteínas (12 pares) e formam seis ligações (pontes) dissulfídicas entre esses resíduos, dentro de cada subunidade (intra-cadeia), que conferem a estabilização da estrutura tridimensional dessas proteínas. Contém ainda moléculas de carboidrato, uma (no LH) ou duas (no hCG e FSH) cadeias de oligossacarídeos ligadas a resíduos de asparagina (*Asp-linked* ou *N-linked*), que têm papel importante para a ação biológica e metabolismo desses hormônios. O conteúdo de carboidratos das moléculas de gonadotrofinas influencia suas taxas de secreção e meia-vida no soro. Quanto maior esse conteúdo, menor a taxa de metabolização e mais longa a meia-vida. Assim, o maior conteúdo de ácido siálico do FSH em relação ao LH determina sua eliminação mais lenta da circulação. O LH tem depuramento mais rápido e a meia-vida mais curta, enquanto o hCG tem a meia-vida mais longa (BULUN e ADASHI, 2003).

Outra característica importante das subunidades dos hormônios glicoproteicos, que também resulta da presença das várias pontes dissulfídicas entre os resíduos de cisteína, é a formação do nó de cisteínas (*cysteine knot*). Essa estrutura é composta por duas pontes dissulfídicas que formam uma espécie de anel, por onde uma terceira ponte passa, assim formando o “nó”. Além disso, essas proteínas possuem formato alongado, com duas alças

(*loop*) beta em forma de “grampo de cabelo” de um lado, e uma longa alça (*loop*) do outro lado, sendo o nó de cisteínas a região central. Existe ainda um segmento das subunidades beta que se estende como um “cinto de segurança” (*seat belt*), que envolve a subunidade alfa e é “fechado” por uma ponte dissulfídica. No hCG, o cinto de segurança é formado pelos resíduos 91-110. Essa estrutura é importante para a estabilização e manutenção da associação não-covalente entre as duas subunidades, sendo assim essencial para a heterodimerização. Tanto a associação das subunidades alfa e beta como a ligação do heterodímero ao receptor dependem da presença do cinto de segurança intacto (MATZUK et al., 1989; LAPHORN et al., 1994; ULLOA-AGUIRRE e TIMOSSI, 1998).

Após ligação do GnRH ao seu receptor nos gonadotrofos, a biossíntese das gonadotrofinas é ativada, resultando em transcrição dos genes das subunidades, tradução dos RNA mensageiros (RNAm), modificações pós-tradução, dobramento e associação das subunidades, empacotamento e secreção do hormônio maduro. A presença de ligações dissulfídicas confere a estrutura tridimensional da proteína (subunidade). Essa estrutura assim formada é essencial para garantir a atividade biológica do dímero alfa-beta (BULUN e ADASHI, 2003).

Os receptores para os hormônios glicoproteicos pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. Constituem-se de estrutura em forma de “serpentina”, composta de sete domínios transmembrana ou alfa-hélices, conectadas por três alças extracelulares e três intracelulares. Apresentam um grande domínio extracelular, em sua porção N-terminal, que é o domínio de ligação com seu respectivo hormônio. O domínio acoplado a proteína G, está situado na porção C-terminal do receptor, e é homólogo a todos os receptores de hormônios glicoproteicos (THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000).

O gene da subunidade beta do FSH está localizado no braço curto do cromossomo 11 e como os demais genes das subunidades beta, contém 3 exons e 2 introns. Já os genes das subunidades beta do LH e hCG (genes *LHB* e *hCGB*) estão localizados no braço longo do cromossomo 19 (cromossomo 19q13.3), o qual contém um agrupamento de sete seqüências relacionadas. Dessas seqüências, cinco são pseudogenes (não-codificantes), arranjados em grupos de pares invertidos (duplicados), um atrás do outro. Apenas os genes *LHB* e *hCGB* resultam em duas espécies distintas e funcionais de RNAm. Acredita-se que o gene *hCGB* represente a evolução de um gene *LHB* ancestral, devido a mutação *frameshift* (com mudança na fase de leitura) no último éxon desse gene, resultando na incorporação da região 3' não traduzida e conseqüente inclusão da extensão C-terminal no *hCG B* (TALMADGE et al., 1984). Na verdade, a proteína hCG-beta é maior que o LH-beta, devido a essa extensão

C-terminal de 29 aminoácidos, onde estão presentes mais 4 sítios de glicosilação que não existem no LH. O gene *LHB* é expresso na hipófise de várias espécies de animais. Ao contrário, o gene *CGB* é expresso apenas na placenta de alguns mamíferos e, por isso, o hCG é considerado o mais recente dos hormônios glicoproteicos. O gene *LHB* contém 1662 pares de base (pb), que constituem três éxons e dois íntrons (TALMADGE et al., 1984; THEMME, 2005).

O RNAm da subunidade beta do LH codifica uma proteína precursora de 145 aminoácidos, que é posteriormente clivada para produzir o peptídeo sinal (24 aminoácidos) e o peptídeo maduro (121 aminoácidos), biologicamente ativo. O RNAm da hCG-beta também codifica uma proteína de 145 aminoácidos, porém, esta não sofre processamento pós-tradução e corresponde à subunidade beta do hCG biologicamente ativo. As seqüências de aminoácidos da subunidade beta do LH humano e do hCG são 82% homólogas e têm atividade biológica idêntica, quando associadas à subunidade alfa (THEMME e HUHTANIEMI, 2000).

O DNA complementar (cDNA) que codifica FSH-beta, LH-beta e hCG-beta foi expresso em células de mamíferos em cultura, em combinação com o cDNA (DNA complementar) da subunidade alfa. Essas células podem sintetizar essas proteínas, realizar as modificações pós-tradução, a glicosilação e a associação das subunidades, sendo então capazes de secretar os hormônios ativos, constituindo-se ferramentas importantes para estudos funcionais *in vitro* nessa área. As gonadotrofinas humanas recombinantes são também usadas clinicamente para estimular a função gonadal (BULUN e ADASHI, 2003).

Normalmente a hipófise contém maior quantidade de RNAm da subunidade alfa, sendo que uma fração considerável de subunidade alfa livre é encontrada no soro. Ao contrário, RNAm das subunidades beta estão presentes em quantidades relativamente pequenas na hipófise, e raramente são encontrados na forma livre no soro ou urina (BULUN e ADASHI, 2003). Provavelmente, o fator limitante da taxa de síntese das gonadotrofinas é a síntese das subunidades beta específica, regulada pela secreção pulsátil de GnRH, além da retroalimentação por esteróides e peptídeos gonadais (BULUN e ADASHI, 2003).

D. MUTAÇÕES NOS GENES DAS GONADOTROFINAS E SEUS RECEPTORES EM HUMANOS

Embora sejam raras, algumas mutações, inativadoras e ativadoras, vêm sendo identificadas nos genes das gonadotrofinas e seus receptores desde 1993, e muito têm contribuído para a elucidação da fisiologia reprodutiva e fisiopatologia dos distúrbios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal em seres humanos (THEMMEN, 2005). Nessa seção serão apresentadas apenas as mutações que foram identificadas em seres humanos, correlacionando-as, quando necessário, com os fenótipos resultantes do nocaute de genes específicos em modelos animais.

Receptor do FSH (*FSHR*)

Apenas uma mutação ativadora no *FSHR* foi descrita, em um homem hipofisectomizado devido a um tumor de hipófise, o qual apresentava manutenção da espermatogênese apesar das concentrações indetectáveis de gonadotrofinas (GROMOLL et al., 1996). Foram também identificadas algumas mulheres com interessante mutação do *FSHR*, não constitutiva, porém resultando em especificidade alterada do receptor, o qual passou a ser estimulado por altas concentrações de hCG (SMITS et al., 2003; VASSEUR et al., 2003; MONTANELLI et al., 2004). Nesses casos, o fenótipo associado foi de síndrome de hiperestimulação ovariana durante a gestação. No entanto, até o momento, nenhuma mutação puramente ativadora (constitutiva) no *FSHR* foi identificada em mulheres (HUHTANIEMI, 2006).

Cinco homens com mutações inativadoras do *FSHR* em homozigose foram descritos, apresentando graus variáveis de oligospermia e subfertilidade, mas não azoospermia (TAPANAINEN et al., 1997). Em mulheres, o fenótipo de ausência de gonadarca, amenorréia primária e graus variáveis de supressão do desenvolvimento folicular foi associado à inativação do gene *FSHR* (AITTOMAKI et al., 1995; AITTOMAKI et al., 1996; BEAU et al., 1998).

Essas mutações corroboram o papel essencial do FSH sobre a maturação folicular no ovário e a manutenção da produção de estrógeno pela granulosa, em mulheres, e a perda dessa ação resulta sistematicamente em infertilidade. Em homens, essas mutações reforçam o papel permissivo do FSH sobre a manutenção da espermatogênese, pelos efeitos mediados pelas células de Sertoli.

Subunidade beta do FSH (*FSHB*)

Mulheres com mutações inativadoras do *FSHB* têm fenótipo semelhante àquelas com mutação no *FSHR*, caracterizado por amenorréia primária e infertilidade (MATTHEWS et al., 1993; LAYMAN et al., 1997; LAYMAN et al., 2002; BERGER et al., 2005). Essas pacientes têm adrenarca normal, mas não apresentam gonadarca espontânea. As concentrações de estradiol, progesterona e inibina são baixas, com LH alto e FSH indetectável. Pequenas diferenças em relação ao grau de desenvolvimento mamário foram observadas. Esse fenótipo é semelhante aos casos com inativação completa da atividade do *FSHR* (AITTOMAKI et al., 1995; AITTOMAKI et al., 1996).

Apenas três homens com mutação inativadora do *FSHB* foram descritos na literatura (PHILLIP et al., 1998; LINDSTEDT et al., 1998; LAYMAN et al., 2002) e os fenótipos apresentados foram variáveis. Dois deles tinham puberdade normal (mutação Cys82Arg e mutação Tyr76X (LINDSTEDT et al., 1998; LAYMAN et al., 2002), o que era esperado já que a produção de testosterona na puberdade depende da ação do LH, porém o outro indivíduo apresentou ausência de virilização (PHILLIP et al., 1998). Todos apresentavam azoospermia, diferentemente dos cinco homens com mutação inativadora do *FSHR* que apresentavam graus variáveis de oligoespermia e subfertilidade (TAPANAINEN et al., 1997).

Os estudos em animais também não contribuíram para o esclarecimento dessas questões. Camundongos deficientes de FSH por nocaute dos genes *FSHB* ou *FSHR*, embora apresentem comprometimento parcial da espermatogênese e volume testicular diminuído, eram férteis (KUMAR et al., 1997; DIERICH, 1998). Em princípio, tanto as mutações inativadoras no receptor, quanto no *FSHB*, deveriam resultar no mesmo fenótipo, como no caso das mulheres. Sendo assim, sugere-se que as mutações no gene do ligante (FSH) parecem gerar um fenótipo mais severo do que as mutações no receptor (FSHR). As razões para essa aparente discrepância ainda não são completamente conhecidas.

Nosso grupo contribuiu com a descrição original da mutação Tyr76X no gene *FSHB* (LAYMAN et al., 2002). Foram estudados dois irmãos, de pais consangüíneos, uma mulher e um homem com fenótipo compatível com deficiência isolada de FSH, homozigotos para essa mutação. Familiares heterozigotos eram férteis e normais. O estudo *in vitro* dessa mutação mostrou ausência de imunoreatividade e bioatividade do hormônio (LAYMAN et al., 2002). A primeira parte do presente trabalho trata da continuação dos estudos nesses pacientes.

Receptor do LH (*LHR*)

Mutações ativadoras do *LHR* causam puberdade precoce em meninos (testotoxicose) e, interessantemente, mulheres carreadoras dessas mesmas mutações são normais, não havendo interferência sobre a fertilidade relacionada à ativação do LHR (LATRONICO et al., 1995; LATRONICO et al., 1998a; LATRONICO et al., 2000; THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000). Mutações somáticas ativadoras do *LHR* também foram descritas em tumores de células de Leydig em meninos pré-púberes (HUHTANIEMI, 2000).

Já mutações inativadoras resultam em hipogonadismo masculino, porém com graus variáveis de comprometimento da diferenciação sexual, desde micropênis e hipospádias até pseudohermafroditismo masculino (KREMER et al., 1995; LAUE et al., 1995; LATRONICO et al., 1996; LAUE et al., 1996; LATRONICO et al., 1998b; THEMMEM e HUHTANIEMI, 2000). O fenótipo de pseudohermafroditismo masculino, isto é, um indivíduo 46,XY com genitália externa feminina, é resultante da ausência de produção da testosterona durante o período fetal, crítico para a diferenciação sexual. Nesses casos não ocorre feminização na puberdade, uma vez que também não há produção de andrógenos pelos testículos hipoplásicos e, portanto, não há substrato para produção de estrógenos. Nas gônadas hipoplásicas, não se evidenciaram células de Leydig maduras, enquanto o número de células de Sertoli é preservado. Graus variados de inativação funcional do receptor justificam fenótipos mais leves, onde o defeito de virilização pode ser menor (micropenis e hipospádias) (HUHTANIEMI, 2000; HUHTANIEMI, 2006). As mutações inativadoras do *LHR* são responsáveis por manifestações clínicas apenas no estado de homozigose ou heterozigose composta.

Em mulheres, mutações inativadoras do *LHR* resultam em anovulação e amenorréia com desenvolvimento puberal normal, um fenótipo relativamente mais sutil do que o dos homens (LATRONICO et al., 1996; TOLEDO et al., 1996). Esse quadro é acompanhado de concentrações séricas elevadas de LH e FSH, estradiol e progesterona baixos e ausência de resposta ao hCG. O exame histológico do ovário de uma dessas pacientes mostrou folículos com maturação incompleta e ausência de corpo lúteo. Assim, pode-se concluir que o LH não é necessário para a diferenciação sexual feminina e o desenvolvimento puberal normal, porém é necessário para ovulação e luteinização dos folículos (HUHTANIEMI, 2000; HUHTANIEMI, 2006).

Subunidade beta do LH (*LHB*)

Apenas dois homens com deficiência seletiva de LH e mutação inativadora da subunidade beta do LH foram descritos na literatura. Ambos tinham virilização normal ao nascimento e se apresentaram com ausência de desenvolvimento puberal e azoospermia (WEISS et al., 1992; VALDES-SOCIN et al., 2004).

No primeiro caso, a biópsia testicular revelou parada de evolução da espermatogênese e não foram identificadas células de Leydig. As concentrações séricas de testosterona eram baixas, a dosagem de LH no soro era elevada e o FSH normal. O tratamento prolongado com hCG resultou em aumento do volume testicular, virilização e aumento da contagem de espermatozóides, embora a fertilidade não tenha sido evidenciada. O estudo genético da família revelou que o caso-índice era homocigoto para uma mutação *missense* (A→G) no códon 54 do *LHB*, onde uma glutamina foi substituída por uma arginina (Gln→Arg). A mãe, uma irmã e três tios foram heterocigotos para a mesma mutação. O gene mutado foi inserido num plasmídeo (vetor) simultaneamente com o gene normal (*wild-type*) da subunidade alfa. O vetor contendo ambos os genes (subunidade alfa *wild-type* e subunidade beta mutado) foi transfectado em células de ovário de hamster (CHO), as quais são capazes de secretar o hormônio maduro. Nesse ensaio, observou-se que o hormônio mutado era secretado, pois foi detectado pelo ensaio imunoradiométrico específico para o dímero, demonstrando que a subunidade beta mutada foi capaz de se dimerizar com a subunidade alfa. Entretanto, em ensaio de radioreceptor foi demonstrada ausência de atividade, isto é, ausência de ligação com o receptor. Assim, os autores concluíram que a mutação Gln54Arg não afetava a dimerização ou a imunoreatividade do hormônio, contudo eliminava sua ligação ao receptor (WEISS et al., 1992).

No segundo caso, a apresentação clínica foi semelhante, exceto pela concentração indetectável de LH sérico. Na análise histopatológica do testículo, foram visualizadas raras células de Leydig, além de redução da espermatogênese, em todos os estágios de maturação. O paciente afetado era homocigoto para uma mutação *missense* no códon 36 do gene da subunidade beta do LH (G→A), resultando na substituição de um aminoácido glicina por um ácido aspártico (Gly→Asp). Os genes das subunidades beta (WT e mutado) e alfa (WT) foram clonados em um vetor, sendo que um *tag* foi inserido logo após a sequência codificante da extremidade C-terminal da proteína (*LHB*), imediatamente antes do códon de parada (*stop*) natural: para as subunidades beta, um resíduo de histidina (6xHis), e para a subunidade alfa, a *V protein of simian virus 5* (V5). Em seguida, células HEK 293T (*human*

embryonic kidney; rim humano embrionário) foram transfectadas com o vetor e foram feitos estudos *western blot* e de imunoprecipitação, utilizando anticorpos anti-6xHis e anti-V5, para avaliar a síntese do hormônio por essas células, e a dimerização das subunidades. Os ensaios de imunoprecipitação mostraram que não havia associação entre as subunidades e, portanto, esse seria o motivo pelo qual a mutação aboliu a atividade imunológica e biológica do hormônio (VALDES-SOCIN et al., 2004).

Recentemente, foi apresentada uma terceira mutação no gene *LHB* em um homem hipogonádico com deficiência seletiva de LH e quadro clínico semelhante aos anteriores. O irmão, pré-púbere, assintomático, também era homozigoto para a deleção de 3 pares de bases (não-frameshift) no éxon 2 do gene *LHB* (dados não publicados; apresentados em comunicação no *Endocrine Society Meeting 2006*) (DALY et al., 2006).

Em resumo, os três casos de mutação inativadora do *LHB* em homens reforçam que o LH não é necessário para diferenciação sexual masculina no feto, mas é absolutamente necessário para o início da função testicular e desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários na puberdade. Antes do presente estudo, o fenótipo feminino de mutações inativadoras do *LHB* ainda não havia sido conhecido, pois nenhuma mulher havia sido identificada (HUHTANIEMI, 2006).

Com base na literatura apresentada e diante da oportunidade de analisar as ações isoladas do FSH e do LH, em seres humanos portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo, foram definidos os objetivos e o delineamento da pesquisa aqui apresentada. Como foi dito anteriormente, esse trabalho foi dividido em duas etapas. No ESTUDO A, apresentamos os resultados e a análise da resposta esteroidogênica gonadal a diferentes estímulos gonadotróficos, em dois irmãos, um homem e uma mulher, portadores de deficiência seletiva de FSH. No ESTUDO B, apresentamos as características clínicas e hormonais, bem como o estudo molecular, de três irmãos, dois homens e uma mulher, portadores de deficiência seletiva de LH e de seus familiares.

Apresentam-se a seguir os estudos realizados.

2. OBJETIVOS

2.1 Analisar e quantificar os efeitos da estimulação gonadotrófica seletiva sobre a resposta esteroideogênica ovariana e testicular em indivíduos portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo secundário à mutação inativadora no gene *FSHB* (ESTUDO A).

2.2 Descrever e analisar o quadro clínico e os aspectos fisiopatológicos da deficiência seletiva de LH em ambos os sexos (ESTUDO B)

2.3 Analisar o gene *LHB* em pacientes com quadro clínico de hipogonadismo hipogonadotrófico por deficiência seletiva de LH e em seus familiares, visando à identificação de mutações (ESTUDO B).

3. MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (Registro de projeto CEP-FM 062/2004 – **Anexo I**). Todos os sujeitos dos estudos participaram da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (**Anexos II e III**).

3.1. SUJEITOS DO ESTUDO

3.1.1 - Sujeitos do ESTUDO A:

Para o estudo dos efeitos de diferentes estímulos gonadotróficos sobre a esteroidogênese gonadal foram selecionados dois irmãos, uma mulher e um homem, filhos de pais consangüíneos, portadores da deficiência seletiva de FSH devido à mutação Tyr76X em homozigose no gene *FSHB*, anteriormente descritos por nosso grupo (LAYMAN et al., 2002). Esses indivíduos foram identificados dentre o grupo de portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico acompanhados no ambulatório de endocrinologia do Hospital Universitário de Brasília.

As características clínicas desses indivíduos à apresentação inicial foram publicadas anteriormente (LAYMAN et al., 2002) e estão resumidas na **Tabela 1**.

No momento da avaliação endocrinológica para o presente estudo, a paciente do sexo feminino tinha 41 anos de idade e vinha em uso regular de terapia combinada com estradiol (2 mg) e acetato de noretisterona (1 mg) (Trisequens, Medley), o qual foi descontinuado 30 dias antes dos testes e durante o protocolo hormonal. Não apresentava intercorrências clínicas. O irmão tinha 37 anos e não apresentava alterações ao exame clínico em relação à admissão, exceto discreta ginecomastia bilateral.

Tabela 1. Características clínicas de dois irmãos homocigotos para a mutação inativadora do gene *FSHB* Tyr76X.

SUJEITO (SEXO)	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	PERFIL HORMONAL	FENÓTIPO GONADAL
Feminino	- Amenorréia primária - Desenvolvimento mamário parcial - Infertilidade	- FSH indetectável - LH alto - Estradiol baixo	- Ovários diminuídos - Útero hipotrófico - Folículos antrais não visualizados
Masculino	- Puberdade normal - Azoospermia - Infertilidade	- FSH indetectável - LH alto - Testosterona Normal	- Testículos diminuídos - Hiperplasia de células de Leydig - Hipoplasia de túbulos seminíferos - Fibrose peritubular - Aplasia de células germinativas - Raras células de Sertoli

3.1.2 - Sujeitos do ESTUDO B:

Pacientes com deficiência seletiva de LH (três casos)

Para o rastreamento de mutações no gene *LHB*, foram estudados inicialmente três irmãos, dois homens e uma mulher, filhos de pais consanguíneos. Os três apresentavam características clínicas sugestivas de deficiência seletiva de LH e por esse motivo foram selecionados para o presente estudo. O detalhamento da apresentação clínica e a caracterização hormonal desses indivíduos estão descritos no capítulo RESULTADOS desse trabalho.

O diagnóstico da deficiência seletiva de LH nos pacientes do sexo masculino baseou-se na apresentação clínica e dosagens hormonais compatíveis. As características clínicas comuns ao hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático incluíram: desenvolvimento puberal ausente ou parcial, azoospermia, sinais de deficiência severa pós-natal de testosterona e ausência de anormalidade anatômica na região hipotálamo-hipofisária ou

anormalidades cromossômicas. A presença de volume testicular desproporcionalmente maior do que o esperado para o grau de deficiência androgênica direcionou a suspeita clínica. O achado de concentrações séricas indetectáveis de LH associado ao aumento de FSH foi considerado fortemente sugestivo de deficiência seletiva de LH, tendo sido o fator determinante para a inclusão dos indivíduos nessa pesquisa.

No sexo feminino, as características clínicas da deficiência seletiva de LH foram inferidas com base em estudos em animais nocauteados para o gene *LHB* (MA et al., 2004) e/ou por análise dos raros casos de resistência à ação do LH por anormalidades genéticas no seu receptor (LATRONICO et al., 1996). Essas condições se caracterizam predominantemente por anovulação crônica e infertilidade. Tais alterações associadas à evidência laboratorial de deficiência de LH com FSH alto ou normal sugeririam fortemente o diagnóstico clínico. Além disso, especificamente no caso da única paciente do sexo feminino estudada, a história familiar de hipogonadismo por deficiência seletiva de LH foi determinante para sua inclusão no estudo.

Familiares (consangüíneos) dos três indivíduos afetados (n=14)

Após a identificação da nova mutação nos três irmãos inicialmente selecionados, os familiares desses pacientes foram procurados para avaliação clínica e determinação do genótipo do *LHB*. Foram avaliados 14 indivíduos da família afetada, tendo-se incluído todos aqueles com idade superior a 18 anos e que puderam ser localizados pela equipe.

Grupo controle

O grupo controle foi composto por 100 indivíduos adultos, maiores de 18 anos, saudáveis, com desenvolvimento puberal completo. O critério de exclusão foi história de tratamento prévio ou atual por infertilidade ou história de distúrbios da puberdade.

3.2 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os sujeitos do ESTUDO A vinham sendo acompanhados no ambulatório de Endocrinologia do Hospital Universitário de Brasília e foram convidados a participar do protocolo de avaliação hormonal. A paciente do sexo feminino foi orientada a suspender a reposição de esteróides sexuais 30 dias antes do início do protocolo. No dia da admissão ao HUB para início dos testes, e já estando há 30 dias sem usar hormônios, a paciente foi

submetida à ultrassonografia pélvica. O paciente do sexo masculino não estava usando nenhuma medicação.

No ESTUDO B, os três pacientes com deficiência seletiva de LH, assim como seus pais e um irmão, foram avaliados no ambulatório de Endocrinologia (Gônadas e Adrenal) e Ginecologia do Hospital Universitário de Brasília. Os demais familiares residiam fora de Brasília e não puderam comparecer ao HUB para avaliação, por motivos diversos. Foram então contatados por telefone e após autorização expressa, foram avaliados pela equipe responsável pela pesquisa em seus domicílios, nas cidades de Taguatinga-DF, Unaí-MG, Riachinho-MG e Sagarana-MG, que distam entre 30 e 350 km de Brasília. Nessa ocasião, foi feita anamnese, exame físico e coleta de amostras de sangue.

A classificação do estágio de desenvolvimento puberal foi realizada segundo os critérios de Marshall e Tanner (MARSHALL e TANNER, 1969; MARSHALL e TANNER JM, 1970). O volume testicular foi determinado ao exame genital utilizando-se orquidômetro de Prader (PRADER, 1966 APUD SAKAMOTO et al., 2007b).

As ultrassonografias transvaginais e as ultrassonografias testiculares foram gentilmente realizadas pela Dra. Ceres Rezende, na Unidade de Ginecologia e Obstetrícia do HUB, e pelo Dr. Marcelo Serra, no Centro de Diagnóstico por Imagem de Brasília, respectivamente. Os demais exames de imagem, ressonância magnética nuclear de hipófise e região supra-selar e densitometria óssea foram realizados no HUB. Para medida do volume testicular por ultrassonografia foi adotada a fórmula da esferóide, onde: volume (cm³) = comprimento (cm) X largura (cm) X altura (cm) X 0,52. As biópsias testiculares foram realizadas no ambulatório de Urologia do HUB, sob analgesia.

3.3 AVALIAÇÃO HORMONAL

3.3.1 Avaliação hormonal no ESTUDO A – Protocolo do estudo

Os pacientes portadores de deficiência de FSH foram submetidos a um protocolo de avaliação hormonal, adaptado dos estudos de Barnes e colaboradores (2002; 2000), que se constituiu de 3 etapas: **1^a**) Ritmo noturno de LH; **2^a**) “Teste 1” de estimulação gonadotrófica (hCG); **3^a**) “Teste 2” de estimulação gonadotrófica (FSH e FSH+hCG). Nenhum dos

pacientes fez uso de qualquer tipo de medicamento durante o protocolo, à exceção daqueles próprios ao estudo. Segue-se abaixo a descrição detalhada do protocolo utilizado.

Primeira Etapa: Ritmo noturno de LH

A primeira etapa do protocolo consistiu na análise da pulsatilidade do LH por meio da avaliação do ritmo noturno de secreção desse hormônio. Os sujeitos foram admitidos na Unidade de Endocrinologia do HUB às 17 horas. Após a realização do exame clínico e hemograma completo, foi realizada punção de veias antecubitais bilateralmente para: a) infusão contínua de soro fisiológico a 15 gotas/min de um lado e b) instalação de cateter heparinizado para coletas de amostras de sangue do outro lado. Após verificação de um resultado normal do hemograma, às 21:00 horas iniciaram-se as coletas de 10 mL de sangue a cada 15 minutos, que prosseguiram até às 5:00 horas do dia seguinte (total: 8 horas). As amostras colhidas foram centrifugadas em grupos de quatro, a cada hora, e o soro foi separado e congelado a -20°C .

Ao final da coleta das amostras para análise do ritmo noturno do LH, às 6:00 horas da manhã seguinte, foi iniciado o uso de dexametasona 0,5 mg por via oral, a cada 6 horas, com a finalidade de suprimir a produção de esteróides adrenais. O uso da dexametasona se estendeu desde 48 horas antes dos testes de estimulação gonadotrófica até o final de cada etapa do protocolo, sendo suspensa nos 30 dias de intervalo entre as etapas.

Segunda Etapa: Teste de estímulo agudo com hCG (teste 1)

Quarenta e oito horas após o início da dexametasona, o primeiro teste de estimulação gonadotrófica foi iniciada. Foi colhida uma amostra basal de sangue para dosagem de esteróides. Em seguida, foi administrado hCG (Choragon, Ferring Pharmaceuticals) 5000 UI, por via intramuscular, e, 24 horas depois, foi feita nova coleta de sangue para dosagem dos esteróides.

Terceira Etapa: Teste de estímulo agudo com FSH apenas, seguido do estímulo com hCG (teste 2)

A terceira etapa do protocolo (teste 2) foi realizada um mês após a primeira e a segunda e se iniciou novamente com a supressão com dexametasona 48 horas antes dos

testes. Em seguida, uma amostra basal para dosagem de esteróides foi obtida, seguida da administração subcutânea de 300 UI de FSH recombinante (rFSH) (Puregon, Organon). Na manhã seguinte, 24 horas depois, foi colhida nova amostra de sangue, seguida da administração intramuscular de 5000 UI de hCG. A última coleta foi realizada 24 horas após essa aplicação de hCG (48 horas após rFSH). Para fins didáticos, nesse trabalho utilizou-se a denominação “FSH+hCG”, como referência a essa última amostra obtida no teste 2.

O protocolo de avaliação hormonal está esquematizado na **Figura 3**, a seguir:

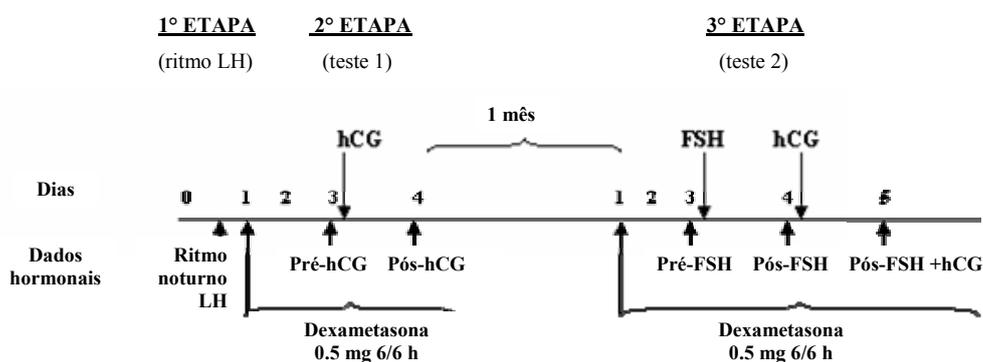


Figura 3. Representação esquemática do protocolo de avaliação hormonal.

Variáveis observadas e análise dos resultados

Nas amostras obtidas na etapa de avaliação do ritmo noturno de LH, foram observadas as concentrações plasmáticas de LH. A análise desses dados foi realizada pela aplicação do programa ULTRA e incluiu a determinação do número, amplitude e frequência dos pulsos de LH, em função do coeficiente de variação intraensaio do método (VAN CAUTER e COPINSCHI, 1981). Os valores das concentrações plasmáticas de LH e a amplitude dos pulsos foram expressos em média \pm desvio-padrão.

Nessa análise, o coeficiente de variação (CV) intraensaio determinado para o imunoensaio utilizado, para valores de LH maiores que 0,3 mIU/ml, foi abaixo de 5% (< 5%). Nesse estudo, o critério para definição de um pulso foi o incremento da concentração de LH maior que duas vezes o valor máximo do CV intraensaio (VAN CAUTER e COPINSCHI, 1981). A análise da pulsatilidade do LH foi gentilmente realizada pela Dra. Rachel Leproult, da Universidade de Chicago, Illinois, USA.

Nas etapas seguintes (testes 1 e 2 de estimulação gonadotrófica), foram avaliadas as concentrações plasmáticas dos seguintes esteróides: estradiol (E₂), progesterona (P), testosterona (T), androstenediona (AD), 17-hidroxiprogesterona (17OHP) e sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA). Na avaliação do paciente masculino, foi avaliada ainda a concentração plasmática de inibina B, pré e pós estimulação FSH e FSH+hCG (teste 2). Infelizmente, não foi possível dosar esse hormônio nas amostras da paciente do sexo feminino, pois na ocasião em que o ensaio específico foi disponibilizado para essa pesquisa, não havia soro remanescente.

Foram observados os valores absolutos das concentrações dos esteróides e inibina B antes e após a estimulação gonadotrófica, em cada etapa do protocolo, para cada indivíduo. A magnitude da resposta da concentração de esteróides após cada estímulo foi apresentada como percentual de incremento, para cada hormônio analisado, em cada indivíduo.

3.3.2 Avaliação hormonal no ESTUDO B – Caracterização clínica da deficiência seletiva de LH

Para a caracterização clínica do diagnóstico de deficiência de LH nos pacientes afetados, foram avaliados as concentrações plasmáticas basais de FSH, LH, estradiol, testosterona, progesterona, inibina B e subunidade alfa livre. O teste de estímulo com GnRH consistiu na obtenção da amostra basal e, em seguida, a aplicação endovenosa de 100 µg de GnRH exógeno (Relefact, Aventis Pharmaceutical) e coletas de amostras nos tempos 15, 30, 60 e 90 minutos.

Nos familiares heterozigotos para a nova mutação, as mesmas medidas de hormônios basais foram realizadas.

3.3.3 Ensaios hormonais utilizados em ambos os estudos

Nos ESTUDOS A e B, as concentrações séricas de LH e FSH foram determinadas inicialmente por meio de um ensaio imunométrico quimioluminescente (*Immulite 2000, Euro/DPC, UK*). As concentrações de estradiol, progesterona, testosterona, androstenediona, SDHEA e 17-hidroxiprogesterona foram medidos por um método imunoenzimático quimioluminescente, do mesmo fabricante. Esses ensaios foram realizados no Instituto e

Laboratório Sabin de Análises Clínicas, Brasília, DF, por gentileza do Núcleo de Apoio à Pesquisa.

A determinação das concentrações de inibina B foi realizada pelo método imunoenzimático (*Active Inhibin B ELISA, Diagnostics Systems Laboratories, Inc, Webster, Texas, USA*) e da subunidade alfa livre, utilizando ensaio imunofluorométrico (*autoDELFLIA, Perkin Elmer, Wallac Oy, Turku, Finland*), os quais foram gentilmente cedidos pelo laboratório de hormônios do Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP).

No ESTUDO B, as concentrações de LH, FSH, estradiol, progesterona e testosterona foram adicionalmente determinadas pelo método imunofluorométrico (*autoDELFLIA*). No caso específico da avaliação da concentração de LH, optou-se por esse método, para uma segunda medida confirmatória, por ser mais sensível e por utilizar dois anticorpos monoclonais dirigidos contra diferentes epítomos presentes, ambos, na molécula da subunidade beta do LH (MITCHELL et al., 1995). Os intervalos de normalidade para esse ensaio foram definidos previamente (BRITO et al., 1999).

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

3.4 ANÁLISE MOLECULAR (ESTUDO B)

3.4.1 Extração de DNA genômico de leucócitos do sangue periférico

O DNA dos sujeitos do estudo foi extraído de leucócitos do sangue periférico pelo método CHELEX-100[®] (WALSH et al., 1991), conforme descrito a seguir. Cinco mililitros de sangue venoso foram colhidos em tubos com ácido etileno diaminotetracético (EDTA). Para extração do DNA, 1 ml de água milliQ foi misturado a 50 µl de sangue total e em seguida a mistura foi centrifugada por 3 min. Após descarte do sobrenadante, esse procedimento foi repetido. Em seguida, adicionou-se 200 µl da suspensão CHELEX-100[®] 5%, homogeneizando. A amostra foi então incubada a 56°C por 30 min e a 100°C por 8 min. Após centrifugação, a amostra foi armazenada a -20°C para posterior utilização.

3.4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

O DNA genômico foi utilizado como substrato para amplificação do gene *LHB*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores previamente descritos (SHIRAISHI e NAITO, 2003), aqui representados por LH23F e LH23R (**Tabela 2**). Esses iniciadores se anelam no íntron 1 e na região 3' não traduzida do gene, respectivamente, e portanto amplificam um fragmento contendo o éxon 2, íntron 2 e éxon 3, que inclui toda a seqüência codificante da proteína madura. A extremidade 3' do oligonucleotídeo LH23R contém nucleotídeos que são complementares exclusivamente ao gene *LHB*, possibilitando assim sua amplificação específica a despeito dos altamente homólogos genes e pseudogenes da subunidade beta do hCG. Na reação de amplificação foram utilizados 5 μ L de DNA genômico, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 1,25 U da enzima Taq DNA polimerase (Fermentas), tampão de reação e sulfato de magnésio fornecido e usado de acordo com o sugerido pelo fabricante, resultando em um volume final de 50 μ L. A amplificação foi realizada em um termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc. Waltham, MA), em condições previamente descritas: 35 ciclos de 1 min a 94°C (desnaturação), 40 s a 65°C (anelamento) e 1 min a 72°C (extensão) (SHIRAISHI e NAITO, 2003).

Tabela 2. Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na reação de polimerase em cadeia.

Nome	Orientação	Seqüência (5'>3')	Posição no <i>LHB</i>	Tamanho do fragmento
LH23F	<i>Sense</i>	GGGAATTCTCTTTGTGGGTGGTGTACCAC GC	íntron 1	806 pb
LH23 R	<i>Antisense</i>	GGAGGATCCGGGTGTCAGGGCTCCA	3' não- traduzida	

Para confirmação da amplificação do fragmento de interesse (806 pares de base), os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e/ou acrilamida 5%, corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), visualizados em luz ultravioleta e fotografados.

3.4.3 Sequenciamento automático

Os produtos da amplificação foram purificados por meio enzimático (sistema “EXO-SAP”). Num volume de 10 µl do produto de PCR foram acrescentados 1 U de exonuclease I (Biolabs) e 1 U de *shrimp alkaline phosphatase* (fosfatase alcalina de camarão - Promega). Em seguida, o produto foi incubado a 37°C por 30 min e depois a 80°C por 20 min.

Aos produtos de PCR purificados foram acrescentados 50 ng do oligonucleotídeo de interesse (*sense* ou *antisense*) e em seguida o material foi enviado para o serviço de sequenciamento da Universidade Católica de Brasília.

A análise, alinhamentos e comparações entre as seqüências foram realizadas com o auxílio de softwares especializados: clustalw (CHENNA et al., 2003), pDRAW32 (AcaClone Software), chromas (Technelysium Pty LTD) e sequencher (Gene Codes corporation).

3.4.4 Digestão enzimática

O rastreamento para a presença da nova mutação (IVS2+1G>C) no gene *LHB* nos demais familiares dos pacientes afetados e em 100 indivíduos normais (grupo controle) foi realizado pela técnica de digestão enzimática, utilizando-se a enzima de restrição *NcoI* (Fermentas Inc., Hanover, MD). Concomitantemente, nessa mesma análise, foi verificada a presença de um polimorfismo comum no *LHB* (Ile15Thr), localizado no éxon 2.

O fragmento do gene *LHB* (éxon 2, íntron 2 e éxon 3) desses indivíduos foi amplificado e submetido à digestão enzimática. A reação de digestão constituiu-se de 20 µL do produto de PCR, 0,5U da enzima *NcoI* e tampão de reação fornecido pelo fabricante, num volume final de 30 µl, com posterior incubação a 37°C de um dia para o outro. Os produtos dessa digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% ou acrilamida 5%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografados sob luz ultravioleta.

A digestão do fragmento de 806 pb do gene *LHB* que possui a seqüência do alelo selvagem (X00264) com a enzima *NcoI* resulta na formação de 3 fragmentos de 542, 164 e 100 pb, devido à presença de dois sítios de restrição para essa enzima. A substituição de um nucleotídeo C ao invés de um G na posição +1 do íntron 2 do gene *LHB* mutante (IVS2+1G>C) resulta em perda de um dos dois sítios de restrição para a enzima *NcoI* (**Figura 4**). Dessa forma, o DNA mutante, quando digerido pela enzima *NcoI*, gera apenas 2

fragmentos: de 642 e 164 pb. Indivíduos heterozigotos para a nova mutação apresentam 4 fragmentos: de 642, 542, 164 e 100 pb.

Além disso, uma variante alélica comum do gene *LHB* (Ile15Thr, onde ATC>ACC), localizado no éxon 2, também pode ser detectada pela enzima *NcoI*, o que permitiu a identificação concomitante dessa variante no DNA dos indivíduos estudados. O DNA contendo o polimorfismo apresenta um nucleotídeo C ao invés do T no códon 15, o que resulta na perda do outro sítio de restrição da *NcoI*, gerando assim 2 fragmentos de 542 e 264 pb após a digestão enzimática. Indivíduos heterozigotos para a variante alélica apresentam 4 fragmentos: 542, 264, 164 e 100 pb. (**Figura 4**)

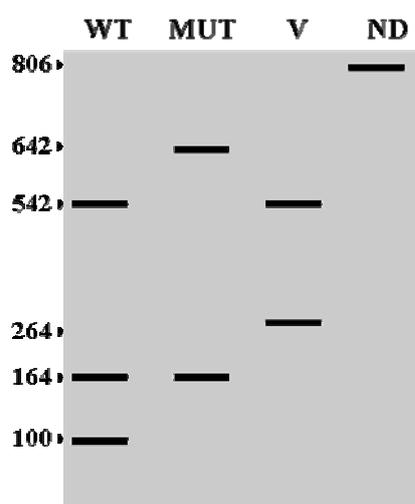


Figura 4. Representação esquemática do mapa de restrição da enzima *NcoI*, mostrando o padrão esperado de bandas após digestão enzimática do fragmento amplificado do gene *LHB*. O alelo selvagem (WT) apresenta 3 fragmentos: 542, 164 e 100 pb. Um indivíduo homocigoto para a mutação IVS2+1G>C (MUT) apresenta 2 fragmentos (642 e 164 pb) e um heterocigoto, 4 fragmentos (642, 542, 164 e 100 pb). Um indivíduo homocigoto para variante alélica (V) apresenta 2 fragmentos (542 e 264 pb) e um heterocigoto, 4 fragmentos (542, 264, 164 e 100 pb). Um indivíduo heterocigoto composto para a mutação IVS2+1G>C e para o polimorfismo Ile15Thr apresenta 4 fragmentos: 642, 542, 264 e 164. ND: não digerido.

3.4.5 Extração de RNA de sangue total

Com a hipótese de que a nova mutação encontrada, por estar localizada no sítio doador de *splicing* do *LHB*, possivelmente resultaria em anormalidade no processamento do

RNA_m, buscou-se então analisar o RNA_m dos indivíduos afetados por meio de RT-PCR (RT : transcrição reversa), conforme demonstrado por Hotakainen e colaboradores (2000). Utilizando a técnica de *nested* RT-PCR, esses autores demonstraram a expressão de *LHB* RNA_m em leucócitos de sangue periférico de seres humanos normais, enquanto a expressão não estimulada de *CGB* RNA_m não foi detectada (HOTAKAINEN et al., 2000).

Inicialmente, procedeu-se à extração do RNA total com utilização do reagente Trizol[®] (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, à camada leucoplaquetária obtida após centrifugação de 5 ml de sangue total foi adicionado 1 ml de Trizol, seguido de homogeneização e incubação por 5 min à temperatura ambiente. O Trizol (fenol-isotiocianato de guanidina) funciona como tampão para proteção das moléculas de RNA durante as etapas subseqüentes da extração. Em seguida adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio para separação do RNA dos demais constituintes celulares, seguido de centrifugação a 12,000× *g* por 15 minutos entre 2 e 8°C. À fase aquosa foi adicionado 0,5 ml de isopropanol para precipitação do RNA, seguido de centrifugação a 12,000 × *g* por 10 minutos entre 2 e 8°C. Posteriormente foi realizada lavagem do precipitado com etanol 70% e re-suspensão em água livre de RNase (água DEPC). O material obtido foi armazenado à temperatura de -80°C para posterior análise.

As amostras de RNA isolado foram tratadas com a enzima DNase I livre de RNase (Fermentas Inc., Hannover, MD) seguindo as orientações do fabricante, a fim de reduzir ao máximo o conteúdo de DNA genômico contaminante, antes dos experimentos de RT-PCR. Como controle para confirmação da ausência de contaminação por DNA, todas as amostras foram submetidas às reações sem a etapa de transcrição reversa.

3.4.6 Síntese do cDNA ou transcrição reversa

O primeiro molde de cDNA foi sintetizado a partir de 2 µg do RNA isolado e 0,5 ng do oligonucleotídeo iniciador LH23R, num volume total de 30 µl. Após incubação a 70°C por 5 min e resfriamento em gelo, a amostra foi centrifugada e a solução presente no fundo do tubo foi coletada. Em seguida foram adicionados 200 U da enzima M-MLV transcriptase reversa (Promega, Madison, WI, USA), 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP) e 10 µl de tampão de reação fornecido pelo fabricante. O produto dessa reação foi incubado por 90 minutos a 42°C.

3.4.7 Amplificação do cDNA (*semi-nested* RT-PCR)

Pré-amplificação

As amostras de cDNA obtidas foram subsequentemente pré-amplificadas utilizando-se um oligonucleotídeo *sense* que foi denominado 3F (**Tabela 3**) e o *antisense* LH23R. Para um volume total de reação de 50 μ L, foram adicionados 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 50 ng de cada oligonucleotídeo iniciador, 5 μ L da solução contendo o cDNA e 1,25 U da enzima Go Taq polimerase (Promega, Madison, WI, USA). O programa da pré-amplificação consistiu de um ciclo de desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 60°C (temperatura de anelamento), 1 min a 72°C (extensão), seguido de uma etapa final de extensão de 5 min a 72°C. (**Figura 5**)

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na *semi nested* RT-PCR.

	Seqüência	Sítios de hibridização
1F	GGCGGGGCATGGGCATCCAG	Início éxon 2
2F	CCGGCTACTGCCCCACCATGA	Final do éxon 2 e 2 nucleotídeos do éxon 3
3F	GCACCAAGGATGGAGATGCTCCAG	Éxon 1
4F	GGTGGTCTGCCTCTCTGGCCT	Íntron 2

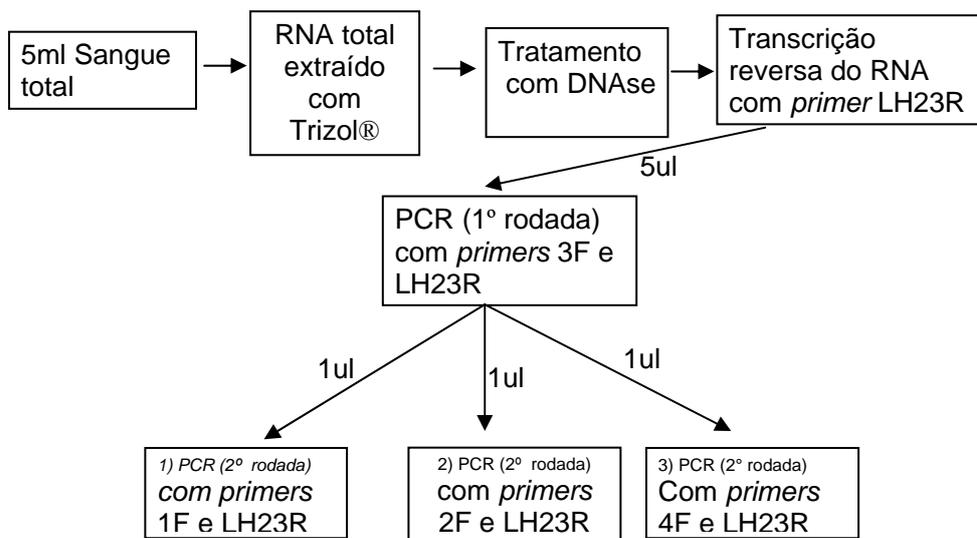


Figura 5. Representação esquemática do protocolo utilizado na *semi-nested* RT-PCR para amplificação do mRNA *LHB* de leucócitos de sangue periférico humano.

Semi nested RT-PCR

Um microlitro dos produtos da pré-amplificação foram subsequentemente amplificados por meio de *semi-nested* PCR utilizando-se pares de oligonucleotídeos iniciadores (1F/LH23R, 2F/LH23R e 4F/LH23R) especificamente desenhados para esse estudo, em condições idênticas às da primeira etapa. As seqüências desses oligonucleotídeos estão descritas na **Tabela 3**.

A estratégia utilizada nessa RT-PCR e os sítios de hibridização dos oligonucleotídeos encontram-se esquematizados na **Figura 6**. Essa estratégia foi definida com o objetivo de detectar anormalidades pós-transcricionais no RNAm *LHB*. A forma *nested* proporciona maior sensibilidade e especificidade na amplificação do cDNA e a escolha de oligonucleotídeos que se anelam em posições estratégicas permite a diferenciação de formas de RNAm com alguma alteração no processamento.

O oligonucleotídeo LH23R foi o iniciador reverso (*antisense*) escolhido para todas as reações, devido ao seu sítio de hibridização localizado na região 3' não traduzida do gene e à sua seqüência altamente específica para o *LHB*. Na ocorrência de um processamento

normal do RNAm, o oligo LH23R, em combinação com o oligo 1F, amplificam um fragmento de 446 pb. O oligo 2F se anela quase completamente no final do éxon 2, mas tem o último nucleotídeo na sua extremidade 3' complementar ao primeiro nucleotídeo no éxon 3, o que o torna específico para a forma normalmente processada do RNAm. Por fim, o oligo 4F se anela completamente no íntron 2, e portanto só amplifica formas de mRNA que não sofreram processamento após a transcrição. (**Figura 6**)

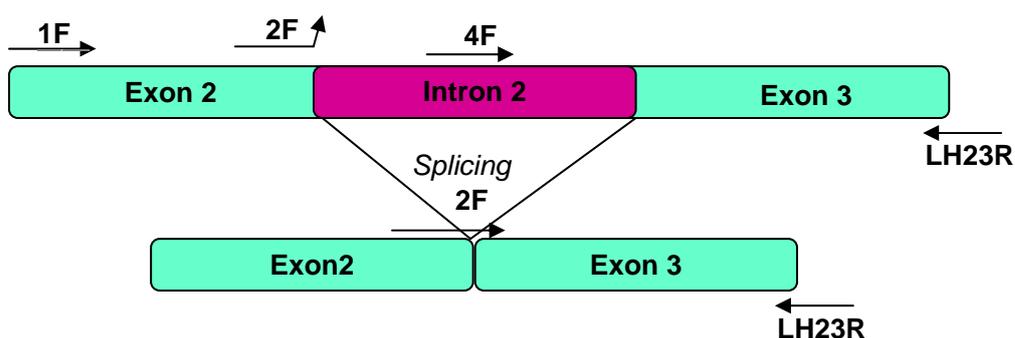


Figura 6. Representação esquemática da estratégia de amplificação utilizada na *semi-nested* RT-PCR, mostrando as regiões de hibridização dos oligonucleotídeos (1F, 2F, 4F e LH23R) no cDNA.

Os produtos finais da *semi-nested* RT-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Posteriormente, suas seqüências e especificidade foram verificadas por meio de seqüenciamento automático.

4. RESULTADOS

4.1 ESTUDO A

4.1.1 RESULTADOS DO PROTOCOLO DE ESTIMULAÇÃO HORMONAL NA PACIENTE COM DEFICIÊNCIA SELETIVA DE FSH (SEXO FEMININO)

Inicialmente, apresenta-se o resultado da ultrassonografia pélvica realizada por via abdominal (a paciente era virgem), no primeiro dia do protocolo, após suspensão do uso de hormônios sexuais 30 dias antes do exame. Observou-se: a) útero de volume normal (56 cm³; normal 30 a 90 cm³), b) endométrio linear, medindo 3,5 mm de espessura, c) ovários de tamanho reduzido, hipotróficos, de aspecto fusiforme, medindo à direita 2,3 X 0,6 cm e à esquerda 2,2 X 0,5 cm. Não foram visualizados folículos antrais (**Figura 7**).



Figura 7. Ultrassonografia pélvica abdominal da paciente homocigota para a mutação Tyr76X do *FSHB*.

Ritmo noturno de LH - Características da pulsatilidade espontânea do LH (sexo feminino)

Os valores das concentrações de LH obtidas nas amostras coletadas ao longo da noite variaram entre 39,7 mUI/ml e 61,3 mUI/ml, e estão apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de LH obtidos no período da noite, a cada 15 min, nos dois indivíduos com deficiência seletiva de FSH (pulsatilidade)

Hora	LH (mUI/l)		Hora	LH (mUI/l)		Hora	LH (mUI/l)	
	F	M		F	M		F	M
			00:00	45,5	5			
21:00	-	5	00:15	48,7	9	03:15	53,7	11
21:15	42	12	00:30	50,4	5	03:30	61,3	13
21:30	46,4	12	00:45	50,8	6	03:45	55,8	10
21:45	44,3	7	01:00	47	6	04:00	49,9	10
22:00	41	8	01:15	46,4	7	04:15	47,8	9
22:15	39,9	10	01:30	48,6	9	04:30	50,3	7
22:30	44,4	9	01:45	56	8	04:45	52,5	12
22:45	39,7	14	02:00	48,5	8	05:00	55,5	14
23:00	40,6	11	02:15	58,5	12	05:15	51,6	1
23:15	48,6	12	02:30	56,2	10	05:30	-	10
23:30	45,6	6	02:45	49,3	10	05:45	-	10
23:45	49,4	5	03:00	60,5	11	06:00	-	12

LH: hormônio luteinizante; F: sexo feminino; M: sexo masculino

A concentração média de LH obtida nessas amostras foi elevada ($49,2 \pm 5,7$ mIU/ml; normal: 1 a 18 mUI/ml na fase folicular do ciclo). Foram detectados 8 pulsos ao longo das 8 horas de avaliação. A média da amplitude dos pulsos foi $53,4 \pm 6,5$ mIU/mL (**Figura 8**).

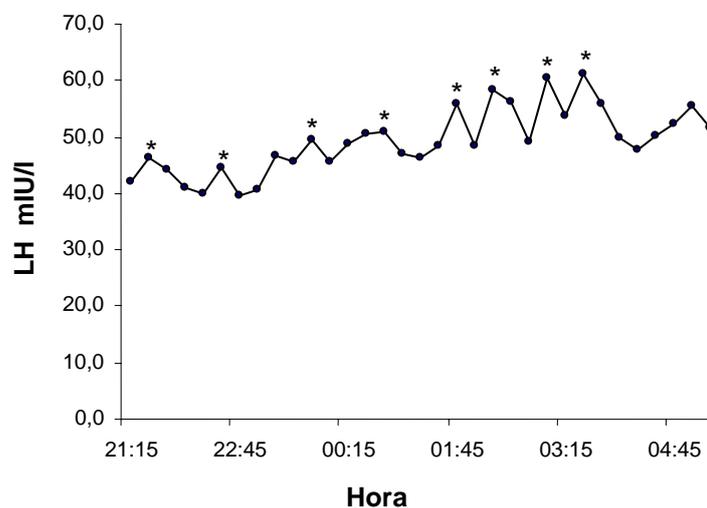


Figura 8. Pulsatilidade noturna espontânea do LH na paciente com deficiência seletiva de FSH. Os asteriscos indicam os pulsos.

Resposta esteroidegênica aos testes de estimulação gonadotrófica

Os valores absolutos das concentrações hormonais obtidas nessa etapa do estudo, na paciente feminina, estão apresentados na **Tabela 5**.

Resumidamente, as concentrações basais de FSH foram repetidamente indetectáveis pelo imunoensaio utilizado, exceto nas amostras colhidas após administração de FSH exógeno, enquanto as concentrações de LH foram elevadas. Verificou-se que todas as medidas de concentração plasmática de esteróides gonadais, obtidas sob supressão com dexametasona, estavam abaixo do nível de detecção pelo método e não se modificaram após os estímulos com hCG apenas, FSH apenas ou FSH seguido de hCG. Os valores de 17 hidroxiprogesterona foram muito baixos em todas as amostras, e não foi observada variação superior ao coeficiente de variação do ensaio utilizado, isto é, acima de 10%. De forma semelhante, não houve variação nas concentrações de SDHEA, as quais se encontravam muito baixas em todas as amostras.

Tabela 5. Valores hormonais basais e após administração de hCG (teste 1), FSH e FSH seguido de hCG (FSH+hCG) (teste 2) na paciente com deficiência seletiva de FSH (sexo feminino)

	FSH (mUI/ml)	LH (mUI/ml)	Estradiol (pg/ml)	Progesterona (ng/ml)	Testosterona (ng/dl)	AD (ng/ml)	170HP (ng/ml)	SDHEA (µg/ml)
Teste 1 ^a								
Pré Hcg	0,1	51,9	<20	0,36	<20	<0,3	8	15
Pós Hcg	0,1	52,6	<20	0,35	<20	<0,3	5	15
Teste 2 ^b								
Pré FSH	0,1	51,5	<20	<0,2	<20	<0,3	8	15
Pós FSH	4,74	43,8	<20	<0,2	<20	<0,3	6	15
Pós FSH+Hcg	4,59	45,5	<20	<0,2	<20	<0,3	4	15
Valores basais normais	4,0 – 13,0	1,0 – 18,0	9,0 - 221	0,33 – 1,2	<100	0,3– 3,3	19 - 182	34 - 430

^a Teste de estímulo 1: Basal e 24 horas após hCG.

^b Teste de estímulo 2: Basal, 24 h após FSH e 24h após hCG (48h após FSH).

hCG: gonadotrofina coriônica humana, FSH: hormônio foliculoestimulante; LH: hormônio luteinizante; AD: Androstenediona; 170HP: 17hidroxiprogesterona; SDHEA: Sulfato de deidroepiandrosterona.

Observações: Valores basais normais para fase folicular, definidos pelo fabricante. Todas as amostras foram obtidas após supressão adrenal com dexametasona.

4.1.2 RESULTADOS DO PROTOCOLO DE AVALIAÇÃO HORMONAL NO PACIENTE COM DEFICIÊNCIA SELETIVA DE FSH (SEXO MASCULINO)

Ritmo noturno de LH - Características da pulsatilidade espontânea do LH (sexo masculino)

Os valores das concentrações de LH obtidos nas amostras coletadas ao longo da noite variaram entre 1,0 e 14,0 mIU/ml e estão apresentados na **Tabela 4**. A concentração média de LH obtida nessas amostras foi normal, porém no limite superior da normalidade ($9,1 \pm 2,9$ mIU/ml; normal: 2,0 a 12,0). Foram detectados 9 pulsos ao longo das 9 horas de avaliação. A média da amplitude dos pulsos foi $11,7 \pm 1,9$ mIU/ml (**Figura 9**).

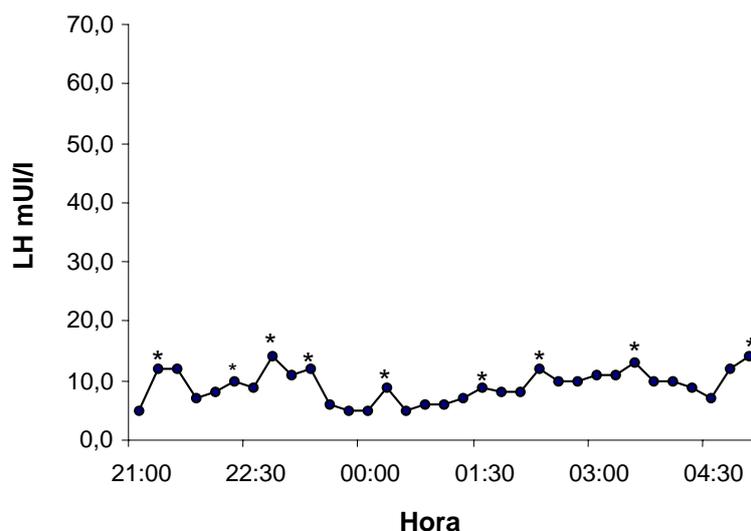


Figura 9. Pulsatilidade noturna espontânea do LH no paciente com deficiência seletiva de FSH. Os asteriscos indicam os pulsos.

Resposta esteroidogênica aos testes de estimulação gonadotrófica

Os valores basais de FSH foram repetidamente indetectáveis pelo método de quimioluminescência (à exceção das amostras colhidas após administração de FSH exógeno) e os de LH estavam discretamente elevados (LH = 17,9 e 12,7 mIU/ml; normal 2,0 a 12,0). Esses e todos os valores absolutos das concentrações de esteróides sexuais obtidos ao longo do protocolo de testes estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores hormonais basais e após administração de hCG (teste 1), FSH e FSH seguido de hCG(FSH+hCG) (teste 2) no paciente com deficiência seletiva de FSH (sexo masculino)

	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Estradiol (pg/ml)	Testosterona (ng/dl)	AD (ng/ml)	170HP (ng/ml)	SDHEA (µg/ml)	Inibina B (pg/ml)
Teste 1 ^a								
Pré Hcg	0,1	17,9	<20	357	0,4	568	107	
Pós hCG	0,1	7,42	43,2	554	0,9	310	108	
Teste 2 ^b								
Pré FSH	0,1	12,7	54,3	334	0,5	245	124	10
Pós FSH	6,84	16,4	60	589	0,7	280	110	58
Pós FSH+hCG	4,42	7,47	115	561	1,2	830	118	57
Valores basais normais	4,0 - 8,0	2,0 – 12,0	ND – 70	270 – 1734	0,4 - 3,5	60 – 342	80 - 560	80 - 300

^a Teste de estímulo 1: Basal e 24 horas após hCG.

^b Teste de estímulo 2: Basal, 24 h após FSH e 24h após hCG (48h após FSH).

hCG: gonadotrofina coriônica humana; FSH: hormônio foliculoestimulante; LH: hormônio luteinizante; AD: androstenediona; 170HP: 17hidroxiprogesterona; SDHEA: Sulfato de deidroepiandrosterona; **ND**: não detectável. Obs.: Valores normais definidos pelo fabricante. Todas as dosagens foram obtidas sob supressão adrenal.

As principais variações percentuais nas concentrações de esteróides em resposta aos diferentes estímulos gonadotróficos estão a seguir destacadas e representadas na forma de gráficos (**Figuras 10 a 14**):

- a. Houve um grande incremento da concentração de inibina B após estimulação com FSH (480%), porém mantendo-se em um valor absoluto abaixo do normal. Essa variação não se modificou após a aplicação de hCG .

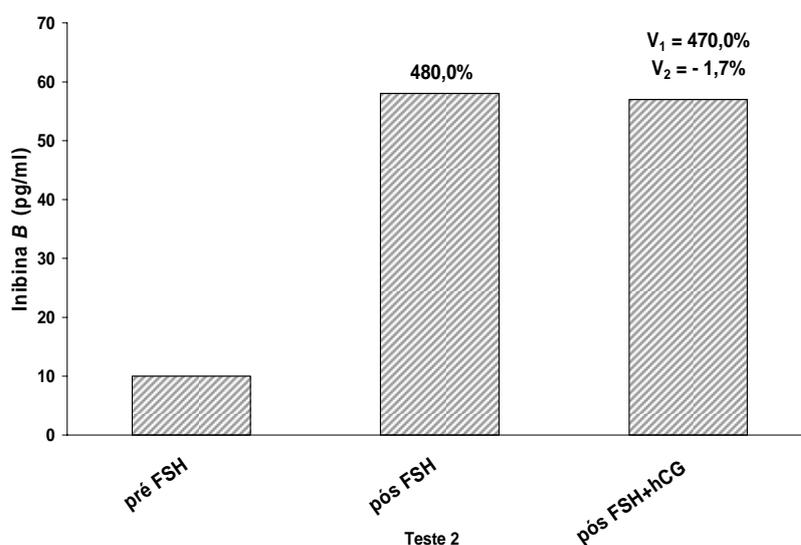


Figura 10. Concentrações plasmáticas de inibina B no teste 2 do paciente masculino com deficiência isolada de FSH. Basal (pré FSH), 24 horas após estímulo com FSH (pós FSH) e 24 horas após estímulo com hCG (48 horas após estímulo com FSH: pós FSH+hCG). Valores normais de inibina B no sexo masculino: 80-300 pg/ml. V₁: variação em relação ao valor pré-FSH. V₂: variação em relação ao valor pós-FSH.

- b. Houve um incremento de 55,2% nos concentrações de testosterona após administração de hCG (teste 1), de 76,3% após FSH (teste 2) e 68% pós estimulação com hCG precedido de FSH (FSH+hCG: teste 2). Paralelamente, observou-se um aumento de 125% na concentração de androstenediona pós hCG (teste 1) e de 140% após FSH+hCG, sendo que após FSH apenas esse aumento foi de 40% (teste 2).

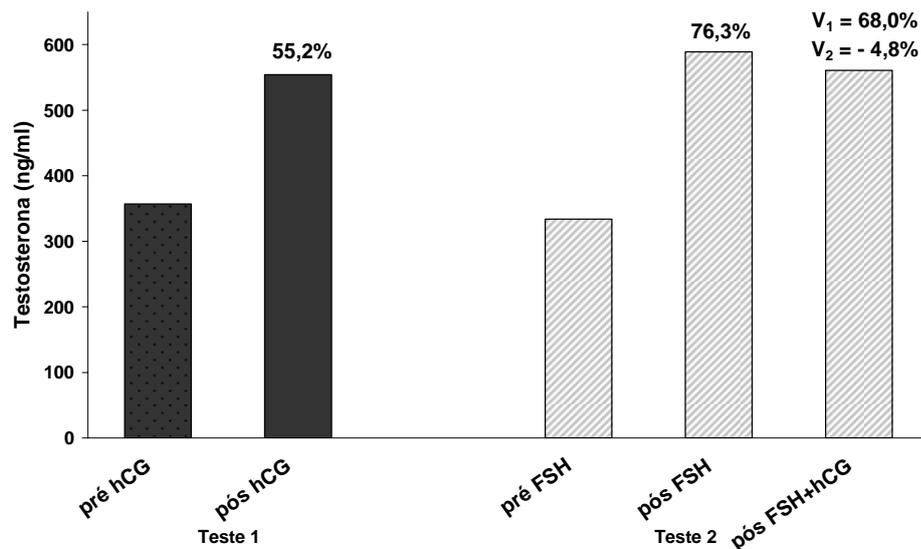


Figura 11. Concentrações plasmáticas de testosterona do paciente masculino com deficiência isolada de FSH. Basal (pré FSH), 24 horas após estímulo com FSH (pós FSH) e 24 horas após estímulo com hCG (48 horas após estímulo com FSH: pós FSH+hCG). V₁: variação em relação ao valor pré-FSH. V₂: variação em relação ao valor pós-FSH.

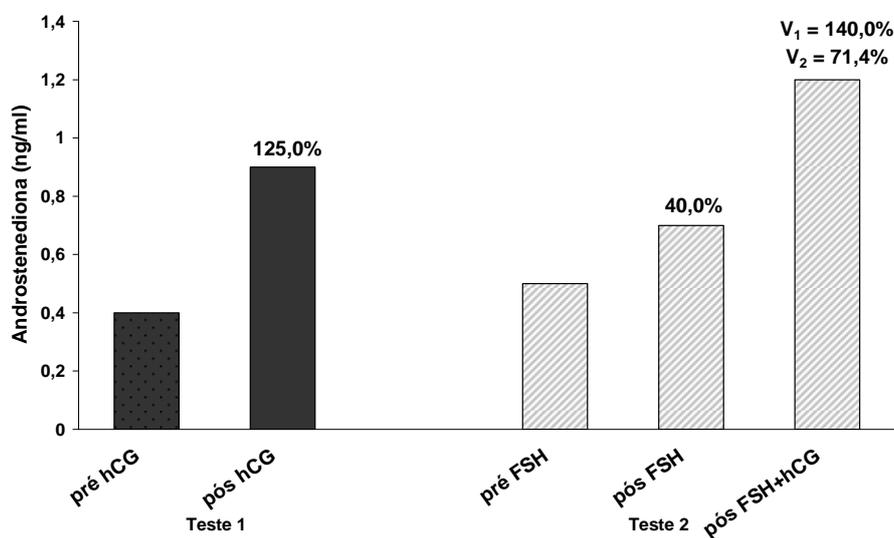


Figura 12. Concentrações plasmáticas de androstenediona do paciente masculino com deficiência isolada de FSH. Basal (pré FSH), 24 horas após estímulo com FSH (pós FSH) e 24 horas após estímulo com hCG (48 horas após estímulo com FSH: pós FSH+hCG). V₁: variação em relação ao valor pré-FSH. V₂: variação em relação ao valor pós-FSH.

- c. Na **Figura 13**, pode-se observar que também ocorreu aumento exuberante da concentração de 17-hidroxiprogesterona após estimulação combinada por hCG seguido de FSH (238,8%), que não foi observado após estímulos com hCG apenas ou com FSH apenas (- 45,4% e 14,3 %).

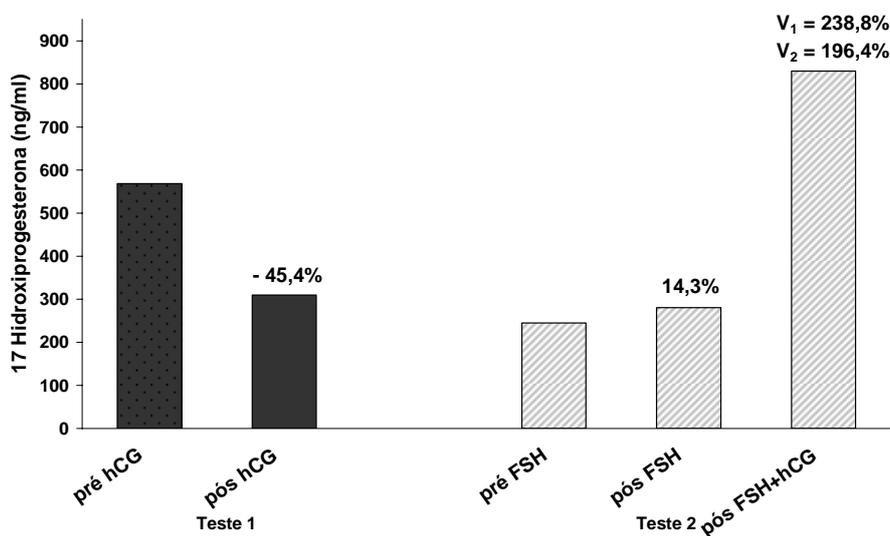


Figura 13. Concentrações plasmáticas de 17-hidroxiprogesterona do paciente masculino com deficiência isolada de FSH. Basal (pré FSH), 24 horas após estímulo com FSH (pós FSH) e 24 horas após estímulo com hCG (48 horas após estímulo com FSH: pós FSH+hCG). V₁: variação em relação ao valor pré-FSH. V₂: variação em relação ao valor pós-FSH.

- d. Em relação ao estradiol, o maior incremento observado também foi após a estimulação combinada (FSH+hCG: 111,8%), sendo que aparentemente não houve ou foi mínima a variação após FSH.

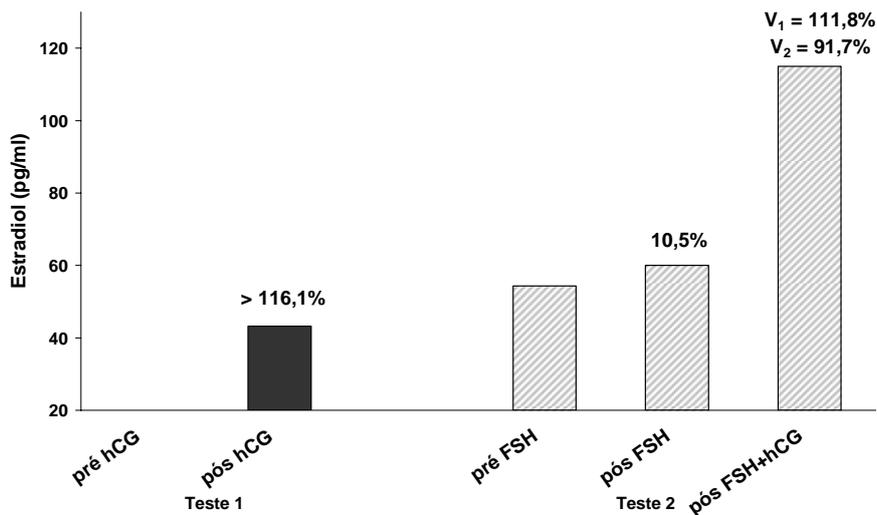


Figura 14. Concentrações plasmáticas de estradiol do paciente do sexo masculino com deficiência isolada de FSH. Basal (pré FSH), 24 horas após estímulo com FSH (pós FSH) e 24 horas após estímulo com hCG (48 horas após estímulo com FSH: pós FSH+hCG). V₁: variação em relação ao valor pré-FSH. V₂: variação em relação ao valor pós-FSH.

- e. Os valores de SDHEA variaram discretamente, abaixo do coeficiente de variação para o ensaio (até 10%) e, portanto, não configuram variação real. (Tabela 5)

4.2 ESTUDO B

4.2.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Aspectos clínicos e perfil hormonal de três irmãos portadores de deficiência seletiva de LH

Nessa seção, estão descritas as características clínicas dos três pacientes com deficiência seletiva de LH. Os resultados das dosagens hormonais desses indivíduos foram agrupados e estão apresentados nas **Tabelas 7 e 8**, ao final da descrição dos casos clínicos.

CASO 1

O caso-índice foi um paciente de 38 anos, do sexo masculino, que foi encaminhado à Unidade de Endocrinologia do HUB devido a suspeita diagnóstica de hipogonadismo. Média 181 cm de altura, com envergadura de 193 cm e pesava 87 Kg. Apresentava hábito eunucóide, voz juvenil, ginecomastia bilateral, ausência de pelos faciais e raros pelos axilares. O exame genital revelou micropênis (4,5 cm; normal: 13,3 ± 3.8), testículos tópicos com volume reduzido (6 ml; normal adulto: 15 a 25 ml) e estágio P4 de desenvolvimento de pelos pubianos, segundo a classificação de Tanner.

Os exames hormonais estão apresentados na **Tabela 7**. Sumariamente, observou-se concentração sérica de LH indetectável, FSH elevado, testosterona baixa, estradiol baixo, subunidade alfa elevada e inibina normal. A ausência de LH imunologicamente detectável foi confirmada em repetidas amostras, segundo dois diferentes imunoensaios. Após estímulo com GnRH houve aumento do FSH de 20,4 para 28,7 UI/L e o LH permaneceu indetectável (**Tabela 8**).

À admissão no HUB, o paciente apresentava ainda um discreto bócio difuso, indolor, e exames de função tiroideana compatíveis com hipertiroidismo subclínico, com anticorpos anti-tireoglobulina, anti-peroxidase e anti-receptor do TSH negativos, além de captação de iodo ¹³¹ baixa. A velocidade de hemossedimentação era normal. A função tiroideana normalizou-se espontaneamente após três meses. O espermograma revelou azoospermia e o cariótipo foi 46XY. A ressonância magnética nuclear da hipófise e região supra-selar não mostrou alterações.

A ultrassonografia testicular inicial mostrou testículos de tamanho reduzido (direito: 5 cm³; esquerdo 4,6 cm³; normal adulto: 20 a 25) hipoeecogênicos e heterogêneos, apresentando microlitíase difusa.

Após a confirmação do diagnóstico de hipogonadismo foi iniciado tratamento com testosterona 250 mg por via intramuscular (Durateston, Akzo Organon) a cada três semanas. Ao longo dos primeiros 12 meses de tratamento com testosterona, observou-se progressiva virilização, crescimento do pênis para 9 cm e aumento do volume testicular. A ultrassonografia testicular realizada 18 meses após início do tratamento confirmou o aumento do volume testicular para 7,1 cm³ à direita e 6,6 cm³ à esquerda.

CASO 2

O irmão, um homem de 30 anos, vinha sendo tratado com injeções intramusculares de testosterona desde os 25 anos de idade em outro serviço, devido à ausência de desenvolvimento puberal. Foi encaminhado à Unidade de Endocrinologia do HUB para seguimento do quadro de hipogonadismo. Relatava que após o início do tratamento com testosterona, observou desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários, crescimento do pênis e aumento do volume testicular. À avaliação no HUB, apresentava desenvolvimento puberal completo (estágio G5P5 de Tanner), ausência de ginecomastia, pênis de 9 cm (normal) e testículos de 10 ml (normal adulto: 15 a 25 ml). Peso: 72 Kg, altura: 178 cm. O espermograma mostrava azoospermia e a ressonância magnética da hipófise era normal. As dosagens hormonais após 45 dias de suspensão da testosterona exógena foram semelhantes às do irmão (**Tabelas 7 e 8**).

O exame histopatológico do testículo revelou espessamento fibroso intersticial, hipoplasia de túbulos seminíferos, com espermatogênese bastante reduzida e restrita ao estágio de espermátides. Observou-se ainda a predominância de células de Sertoli e não foram visualizadas células de Leydig (**Figura 15**).

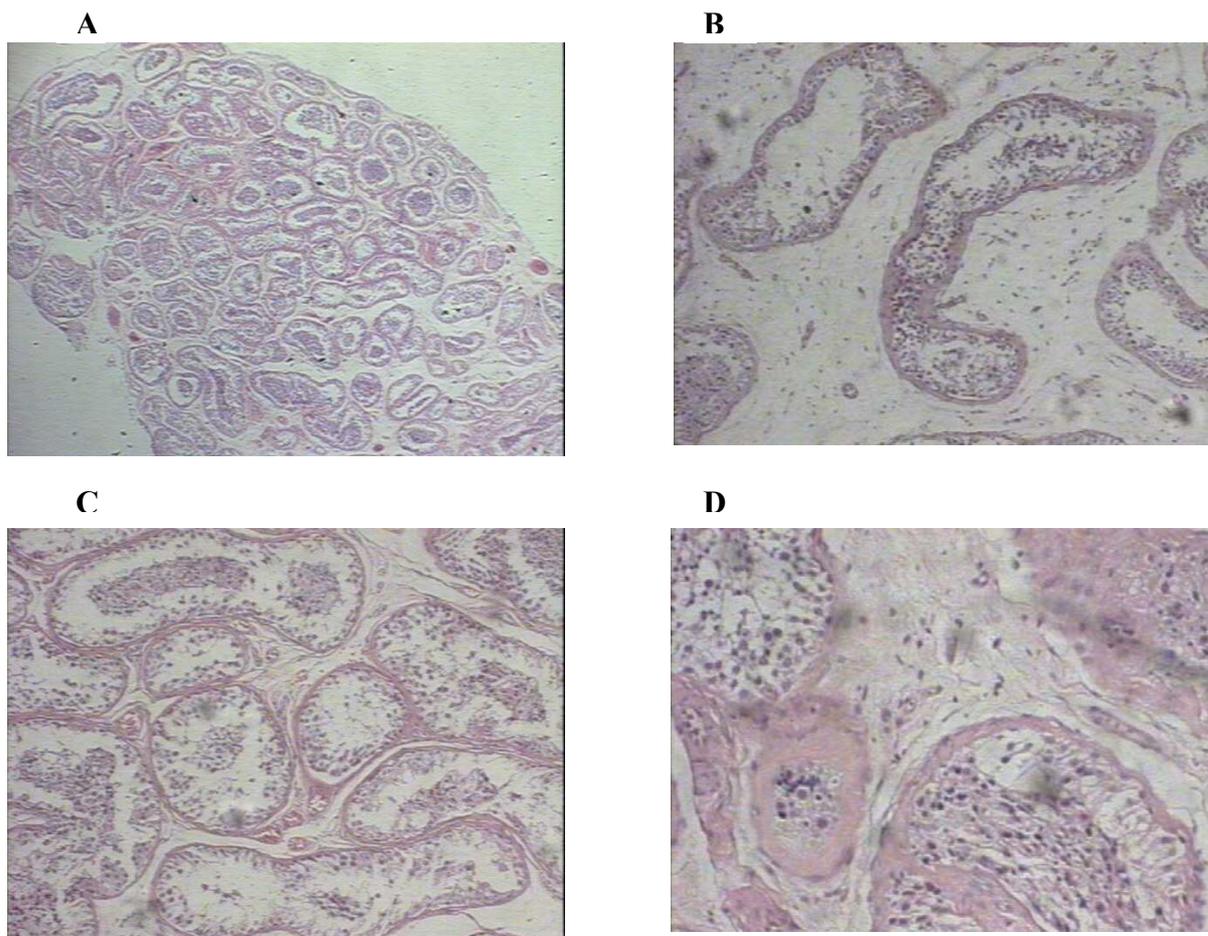


Figura 15. Aspecto histopatológico do testículo do paciente (caso 2) com deficiência seletiva de LH. Painel A: atrofia de túbulos seminíferos, espessamento intersticial. Painéis B e C: espessamento e fibrose intersticial; ausência de células de Leydig. Painel D: espermatogênese reduzida e desorganizada; presença de espermátides, ausência de espermatozóides.

A ultrassonografia testicular à admissão no HUB mostrava padrão semelhante ao do irmão (caso-índice) com testículos hipoecogênicos, heterogêneos, apresentando microlitíase difusa e volume de $10,7 \text{ cm}^3$ à direita e $8,2 \text{ cm}^3$ à esquerda (normal adulto 20 a 25 cm^3).

CASO 3

O terceiro caso identificado nessa família foi de uma mulher de 29 anos, irmã dos dois primeiros pacientes, que apresentava amenorréia secundária e infertilidade. Compareceu à Unidade de Endocrinologia do HUB após ter sido contatada pela equipe responsável por essa pesquisa. Relatava desenvolvimento puberal normal e menarca aos 13 anos, seguida de oligomenorréia, e posterior amenorréia nos últimos dois anos. Sua altura era 166 cm, e o peso 56 Kg. Apresentava desenvolvimento completo de caracteres sexuais secundários (classificação de Tanner: M5P5) (**Figura 16**).



Figura 16. Paciente de 29 anos com deficiência seletiva de LH. Observa-se desenvolvimento puberal normal, com mamas e pelos pubianos compatíveis com estágio M5P5, na classificação de Tanner.

Os exames hormonais iniciais também foram compatíveis com deficiência eletiva de LH e estão apresentados na **Tabela 7**. Resumidamente, observou-se concentração de LH indetectável, FSH normal, estradiol e progesterona baixos, porém dentro do intervalo de normalidade para mulheres na fase folicular do ciclo menstrual. As concentrações de inibina B e subunidade alfa livre foram elevadas. Após estímulo com GnRH não houve elevação do LH, porém verificou-se uma resposta normal do FSH (**Tabela 8**).

A ultrassonografia pélvica inicial, realizada por via transvaginal, está apresentada na **Figura 17**.

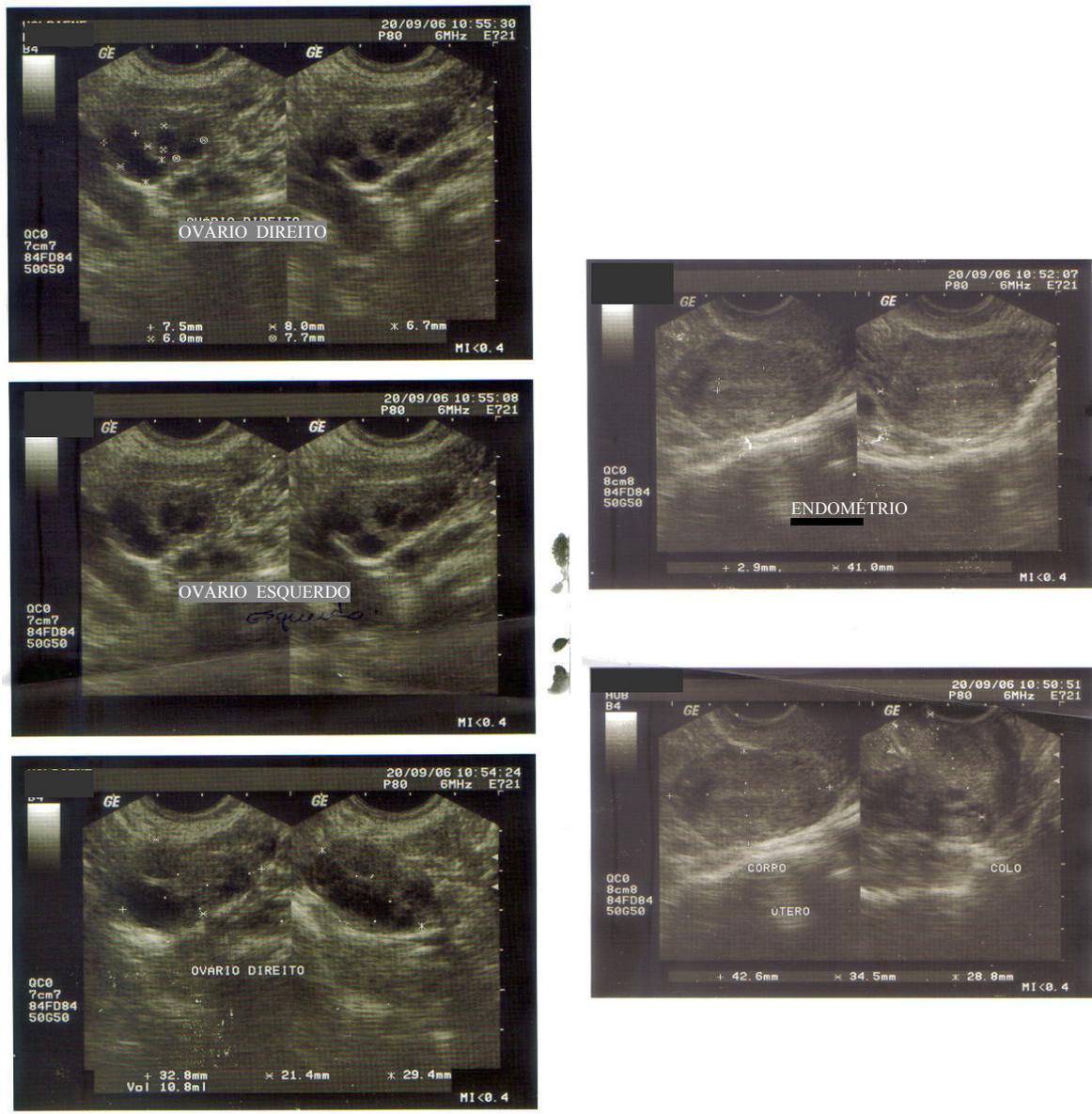
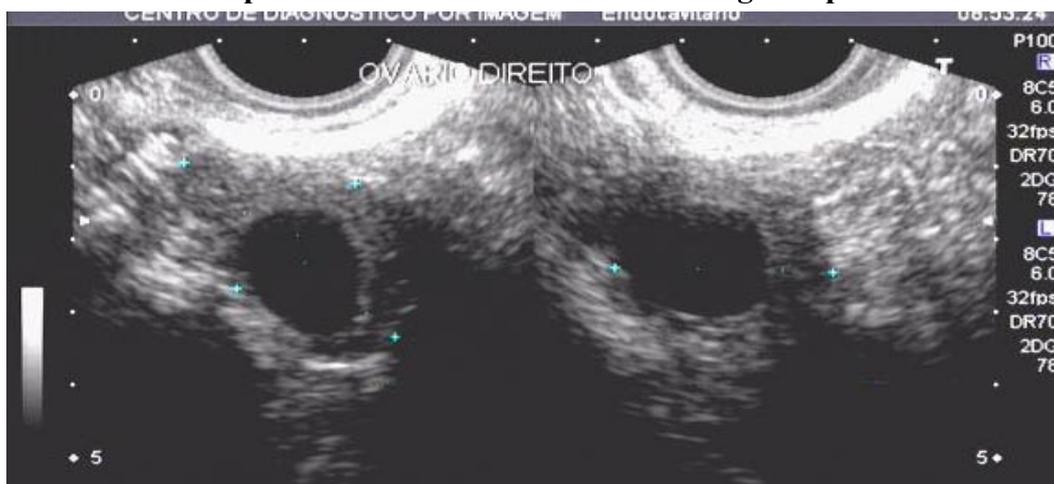


Figura 17. Aspecto ultrassonográfico inicial do útero e ovários da paciente com deficiência seletiva de LH (pré-tratamento). Útero de volume normal (50 cm^3 ; normal: 30 a 90), com endométrio atrófico (3 mm). Ovários de tamanho normal (direito: 10 cm^3 , esquerdo 7 cm^3 ; normal para idade: 3 a 12 cm^3), apresentando vários folículos antrais (de até 13 mm), distribuídos por todo o parênquima. O estroma ovariano tinha aspecto normal.

Outros exames realizados nessa paciente incluíram uma densitometria óssea de coluna lombar e fêmur proximal e uma ressonância magnética nuclear de sela túrcica e região supra-selar, que foram normais.

A paciente foi então submetida à reposição hormonal inicialmente com estrógeno apenas (Premarim, Wyeth, 0,625 mg ao dia) durante os primeiros três meses, seguido de tratamento combinado com estrógeno e progestágeno (Trisequens, Medley). Ao longo desse período, foram realizadas ultrassonografias pélvicas seriadas que mostraram proliferação endometrial e crescimento folicular progressivos (**Figura 18**).

Após 90 dias de tratamento com estrógeno apenas



Após 10 dias de tratamento combinado estrógeno-progestágeno



Figura 18. Aspecto ultrassonográfico do ovário direito da paciente com deficiência seletiva de LH após início do tratamento de reposição hormonal. Painel superior: Observou-se o desenvolvimento de um folículo dominante (18 mm) após 90 dias de reposição com estrógeno apenas, imediatamente antes do início do uso do progestágeno. Outros folículos menores, de cerca de 5 mm, também foram visualizados dispersos no parênquima ovariano. Painel inferior: Após 10 dias de reposição combinada estrógeno-progestágeno, houve a formação de um cisto folicular de 44 mm.

A seguir, estão tabulados os resultados das principais dosagens hormonais dos três pacientes com deficiência seletiva de LH, obtidas no estado basal (**Tabela 7**) e após estímulo com GnRH (**Tabela 8**).

Tabela 7. Dados hormonais de três pacientes homozigotos para a mutação IVS2+1G>C no gene da subunidade beta do LH

Sujeitos	Sexo	Idade (anos)	LH (UI/l)	FSH (UI/l)	E ₂ (pg/ml)	P (ng/ml)	T (ng/ml)	Δ4 (ng/ml)	SDHEA (μg/dl)	α-livre (ng/l)	InB (pg/ml)
II-5	M	38	< 0,6	20,4	<13		97			1736,9	107
II-10	M	30	< 0,6	12,8	<13		188	1,9		1192,7	163
II-13	F	29	< 0,6	4,8	44	0,44	26,8*	2,5	303	1010,1	194
Faixa Normal:											
M			1,0 – 8,4	0,6 – 10,5	Até 35		271 - 965	0,4 – 3,5		120 – 790	80 – 300
F ^a			2,2 – 6,8	2,4 – 9,3	22 - 215	0,33 – 1,2	<100*	0,3 – 3,3	34 - 430	80 - 604	15 - 90

LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio foliculo estimulante; E₂: estradiol; P: progesterona; T: testosterona total; Δ4: androstenediona; DHEAS: sulfato de deidroepiandrosterona; α-livre: subunidade alfa livre; M: masculino; F: feminino;

^a valores normais para fase folicular. Androstenediona e SDHEA foram dosados por quimioluminescência (IMMULITE 2000, EuroDPC); LH, FSH, estradiol, progesterona e testosterona foram dosados pelo método imunofluorométrico (AutoDELFIA) (*exceto a testosterona na paciente II-13, que foi dosada por quimioluminescência).

Tabela 8. Teste de estímulo com GnRH em três pacientes homozigotos para a mutação IVS2+IG>C no gene *LHB*

Tempo (min)	LH (IU/l)			FSH (IU/l)		
	II-5 (M)	II-10(M)	II-13 (F)	II-5 (M)	II-10 (M)	II-13(F)
0	< 0,6	< 0,6	< 0,6	20,4	12,8	4,8
15	< 0,6	< 0,6	< 0,6	25,7	16,6	6,8
30	< 0,6	< 0,6	< 0,6	27,6	17,4	8,1
60	< 0,6	< 0,6	< 0,6	28,7	17,3	8,2
90	< 0,6	< 0,6	< 0,6	25,7	18,6	-

Faixa de normalidade:

Basal:	1,0 – 8,4	2,2 – 6,8*	0,6 – 10,5	2,4 – 9,3*
Pico:	12,0 – 29,7	7,6 – 31,7*	2,9 – 7,8	4,6 – 11,7*

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio foliculoestimulante; * valores de normalidade para fase folicular.

LH e FSH foram medidos por ensaio de imunofluorométrico (autoDELFIA).

M: sexo masculino; F: sexo feminino; II-5, II-10 e II-13 referem-se à identificação dos indivíduos no heredograma.

Aspectos clínicos e perfil hormonal dos heterozigotos para a mutação IVS2+1G>C

Após a identificação da mutação IVS2+1G>C em homozigose nos três indivíduos portadores de deficiência seletiva de LH, os seus familiares consangüíneos foram procurados para rastreamento dessa mutação. Dessa forma, puderam ser avaliados outros 14 membros da família, dentre os quais foram identificados seis heterozigotos para a mutação IVS2+1G>C: três heterozigotos compostos para a mutação e o polimorfismo Ile15Thr e três heterozigotos para a mutação e o alelo selvagem (*wild-type*).

Todos os heterozigotos eram férteis. As concentrações de LH, FSH e esteróides sexuais eram normais para a idade, à exceção do indivíduo I-2. A mãe dos indivíduos afetados (I-2) apresentava concentração sérica de LH inapropriadamente baixa para uma mulher em menopausa, porém com valores de FSH, estradiol e inibina B compatíveis com a idade.

Os principais resultados da avaliação clínica inicial, perfil hormonal e genótipo dos indivíduos heterozigotos encontram-se sumarizados na **Tabela 9**. Os resultados dos testes de estímulo com GnRH realizados em três dos heterozigotos (II-14, II-7 e I-2) estão apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 9. Características clínicas e hormonais de familiares dos pacientes com deficiência seletiva de LH, heterozigotos para a mutação IVS2+1G>C no gene *LHB*

Indivíduo	Sexo	Idade	LH (IU/L)	FSH (IU/L)	E2 (pg/mL)	T (ng/dL)	Sub α (ng/L)	Inibina B (pg/mL)	Fenótipo	Genótipo
I-1	M	76	5.0	4.9		567	456.8	185	Fértil (10 filhos)	v/mut
I-2	F	66	4.6	32.7	<13		575.5	<10	Fértil/ menopausa (G14P10)	wt/mut
II-2	F	49	17.6	31,5	56		1486.3	48	Fértil G4P4 climatério (G4P4)	v/mut
II-7	F	36							Fértil (G2P2)	wt/mut
II-14	M	25	4.1	8.0		542	447.4	62	Fértil (1 filho)	v/mut
III-3*	M	28	1.44	2.26	32.9	577			Fértil (1 filho)	wt/mut
Valores normais:										
M			1.0–8.4	0.6–10.5		271-965	120-790	80-300		
F:										
Fase folicular			2.2–6.8	2.4–9.3	22-215		80-604	15-90		
Pós-menopausa					Até 25		340-4000			

G: número de gestações; P: partos; A: abortos; F: filhos; wt: alelo selvagem; mut: alelo mutante IVS2+1G>C; v: variante alélica Ile15Thr. LH, FSH, Estradiol (E2), Testosterona total (T) e Subunidade alfa livre (Sub α) foram dosados por um ensaio imunofluorométrico (autoDELFI, Wallac Oy, Turku, Finland) e Inibina B, por um ensaio imunoenzimático (*Active Inhibin B ELISA*, Diagnostics Systems Laboratories, Inc, Webster, Texas, USA) nos indivíduos I-1, I-2, II-14, II-2 e II-7. *No indivíduo III-3, LH e FSH foram dosados por um ensaio imunométrico quimioluminescente (*Immulite 2000*, Euro/DPC, UK) e estradiol e testosterona, por um ensaio imunoenzimático quimioluminescente (*Immulite 2000*, Euro/DPC, UK).

Tabela 10. Teste de estímulo com GnRH em 3 pacientes heterozigotos para a mutação IVS2+IG>C no gene *LHB*

Tempo (min)	LH (UI/l)			FSH (UI/l)		
	II-14 (M)	II-7(F)	I-2(F)	II-14(M)	II-7(7)	I-2(7)
0	4,2	< 0,6	6,4	6,0	0,48	33,9
15	13,4	15,7	18,0	9,1	11,3	41,6
30	15,2	20,5	19,6	10,6	17,0	42,4
60	13,5	23,6	20,0	10,6	24,7	47,8
90	10,7	19,8	18,6	9,1	24,6	49,9
Faixa de normalidade						
Basal:	1,0 – 8,4	2,2 – 6,8*		0,6 – 10,5	2,4 – 9,3*	
Pico:	12,0 – 29,7	7,6 – 31,7*		2,9 – 7,8	4,6 – 11,7*	

GnRH: fator de liberação das gonadotrofinas; LH: hormônio luteinizante; FSH: hormônio foliculo estimulante; * valores de normalidade para fase folicular; LH e FSH foram medidos por ensaio imunofluorométrico (autoDELFI)

4.2.2 AVALIAÇÃO MOLECULAR

Análise do genótipo do *LHB* nos três pacientes com deficiência seletiva de LH

O fragmento de 806 pares de bases (pb) do gene *LHB* contendo a seqüência codificante da subunidade beta do LH foi amplificado com sucesso. O seqüenciamento automático revelou a substituição de uma guanina (G) por uma citosina (C) na posição +1 do íntron 2 do gene *LHB*, em homozigose, nos três irmãos afetados (**Figura 19**).

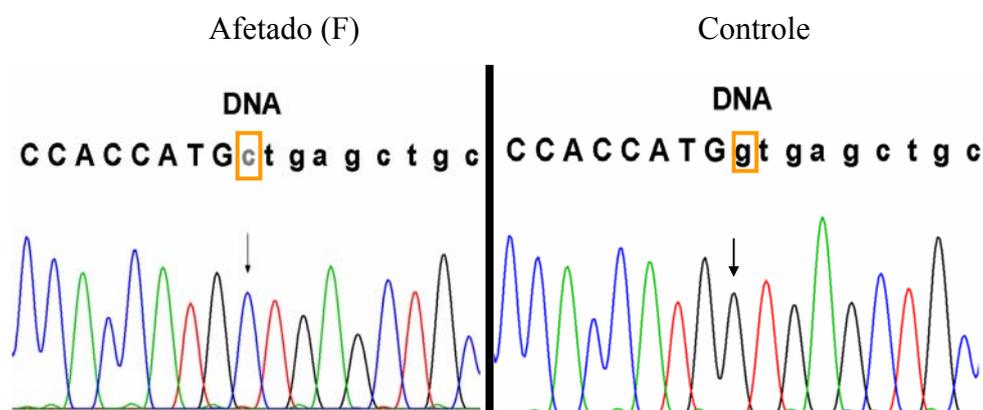


Figura 19. À esquerda: seqüenciamento da junção éxon 2 – íntron 2 do gene *LHB* da mulher com deficiência seletiva de LH, mostrando a substituição G>C no primeiro nucleotídeo do íntron 2, no sítio doador de *splicing* (5'). À direita: seqüência normal (controle). As setas mostram a mutação (IVS2+1G>C). Letras maiúsculas representam nucleotídeos exônicos e letras minúsculas, nucleotídeos intrônicos.

A posição da mutação identificada no gene *LHB* está representada abaixo:

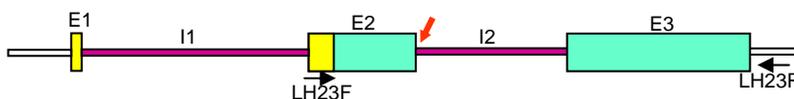


Figura 20. Representação esquemática do gene *LHB*, mostrando a posição da mutação IVS2+1G>C (seta vermelha) e os sítios de hibridização dos oligonucleotídeos utilizados na PCR (LH23F e LH23R). As regiões que codificam o peptídeo sinal aparecem em amarelo e as que codificam a proteína madura, em verde. E: éxon; I: íntron.

Rastreamento da mutação IVS2+1G>C nos familiares

O fragmento do gene *LHB* de 14 familiares consangüíneos dos indivíduos afetados foi amplificado com sucesso, para rastreamento da mutação. A digestão dos produtos de PCR com *NcoI* (**Figura 21**) resultou na identificação de seis heterozigotos para mutação de um total de 17 indivíduos estudados: os pais, duas irmãs, um irmão e sobrinho (representados no heredograma da **Figura 22** por I-1, I-2, II-1, II-7, II-14 e III-3, respectivamente).

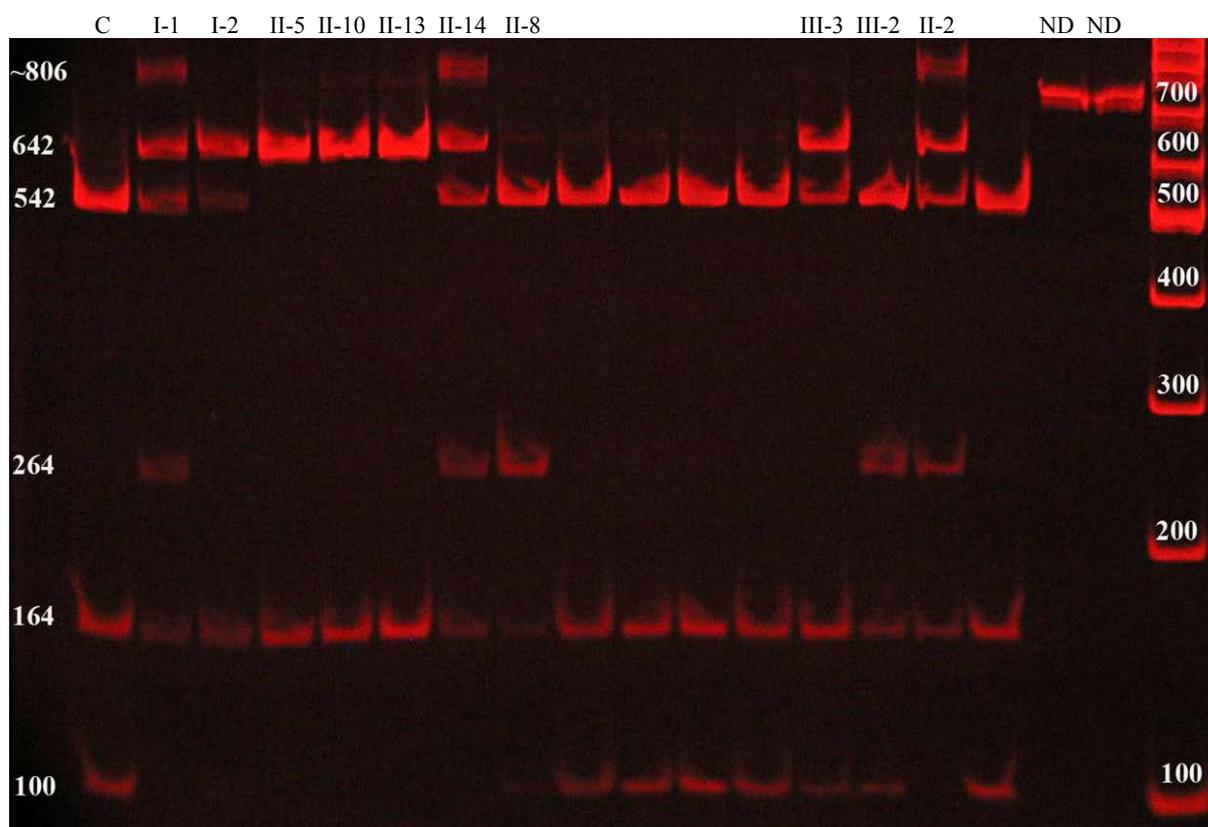
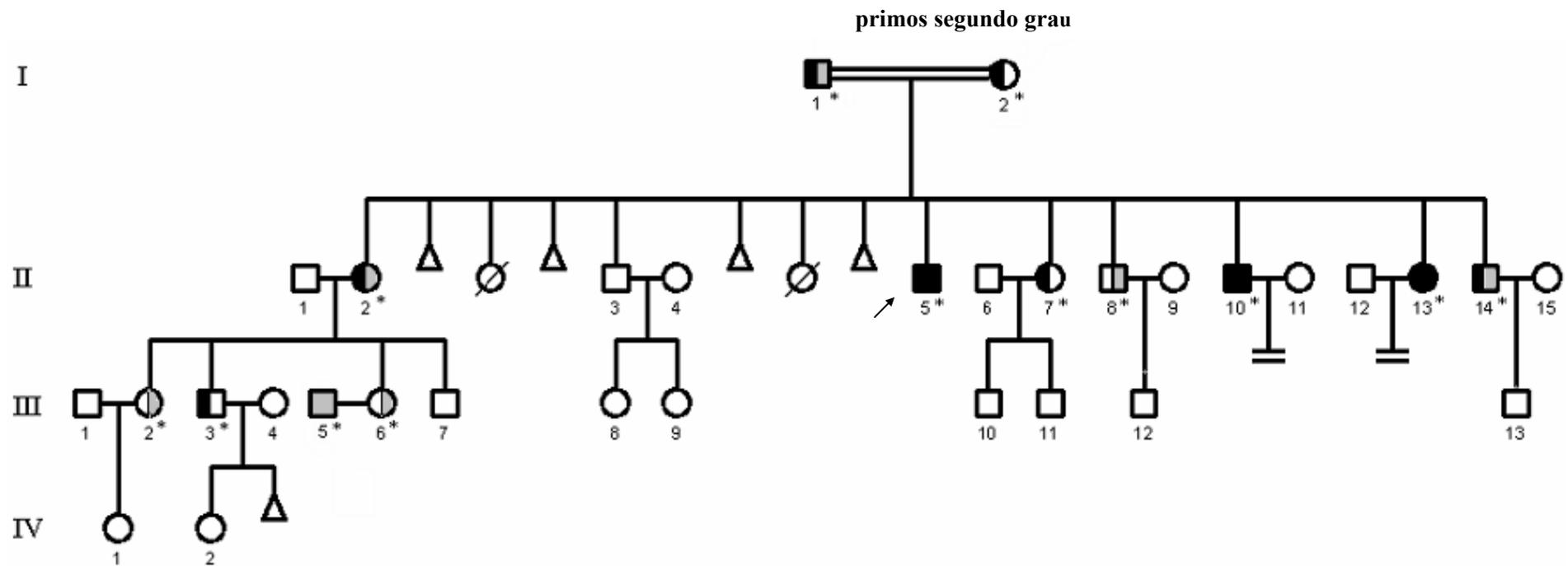


Figura 21. Fotografia de um gel de acrilamida, visualizado sob luz ultravioleta, mostrando os produtos da digestão com a enzima *NcoI*. Os números à esquerda expressam o tamanho dos fragmentos (em pares de bases). A linha acima das colunas de eletroforese se refere à identificação dos indivíduos no heredograma. C: indivíduo-controle; ND: fragmento não digerido; M: marcador de peso molecular.

A digestão com *NcoI* permitiu também a identificação da presença da variante alélica Ile15Thr em heterozigose em 6 dos 17 membros da família estudados: I-1, II-2, II-14, II-8, III-2 e III-6. Os indivíduos I-1, II-2 e II-14 são heterozigotos compostos, isto é, possuem um alelo contendo o polimorfismo (variante alélica) e o outro contendo a mutação IVS2+1G>C (**Figura 21**). O indivíduo III-5, embora não apresentasse o vínculo consanguíneo em estudo, também foi incluído nessa análise devido à história relatada de infertilidade. Curiosamente, observou-se que esse indivíduo era homozigoto para a variante alélica Ile15Thr.

Apenas um irmão dos pacientes afetados (II-3) e os descendentes não foram estudados. O heredograma da família é apresentado na **Figura 22**.



Legenda:

- Indivíduo do sexo masculino
- Indivíduo do sexo feminino
- ⊗ Indivíduo falecido
- △ Aborto ou natimorto

- Alelo selvagem
- ◻ Variante alélica Ile15Thr
- Alelo mutante IVS2+1G>C

Figura 22. Heredograma. Os indivíduos homocigotos para a mutação IVS2+1G>C estão representados por uma figura preenchida de preto. Os asteriscos sinalizam os indivíduos estudados. A seta aponta o caso-índice.

Rastreamento da mutação IVS2+1G>C no grupo controle

No grupo controle, a análise do fragmento do *LHB* por digestão com *NcoI* não demonstrou a presença da mutação IVS2+1G>C em nenhum dos 100 indivíduos estudados. Já a variante alélica Ile15Thr, em heterozigose, foi observada em 19 indivíduos desse grupo.

Análise do efeito da mutação IVS2+1G>C sobre o processamento do RNA (*splicing*)

O RNAm do gene *LHB* extraído de leucócitos de 2 pacientes afetados (II-5 e II-13), 2 familiares heterozigotos e do sujeito-controle foram submetidos à transcrição reversa e amplificados com sucesso. Os resultados da amplificação reversa estão apresentados na **Figura 23** e são descritos a seguir:

Um fragmento do tamanho esperado (445 pb) foi amplificado com o par de oligos 1F/LH23R na *semi nested* RT-PCR, no controle e nos heterozigotos assintomáticos. Entretanto, nos indivíduos homozigotos para a mutação, observou-se sistematicamente um produto aproximadamente 250 pb maior (**Figura 23 - Painel superior**).

Com a utilização do oligonucleotídeo 2F, específico para a forma normalmente processada do RNAm *LHB*, não ocorreu amplificação no material extraído dos pacientes homozigotos para a mutação, mas houve amplificação do produto esperado no controle e nos heterozigotos (328 pb) (**Figura 23 - Painel central**). Por outro lado, a RT-PCR com o oligo 4F, específico para a forma não processada do RNAm *LHB*, isto é, a forma que inclui o íntron 2, resultou na amplificação de um produto de 473 pb apenas nos homozigotos, mas não nos heterozigotos ou no controle (**Figura 23 - Painel inferior**).

Como esperado para uma amostra não contaminada por DNA genômico, não se observou produto de amplificação nas amostras que não foram submetidas à transcrição reversa (representadas na **Figura 23** por “-”).

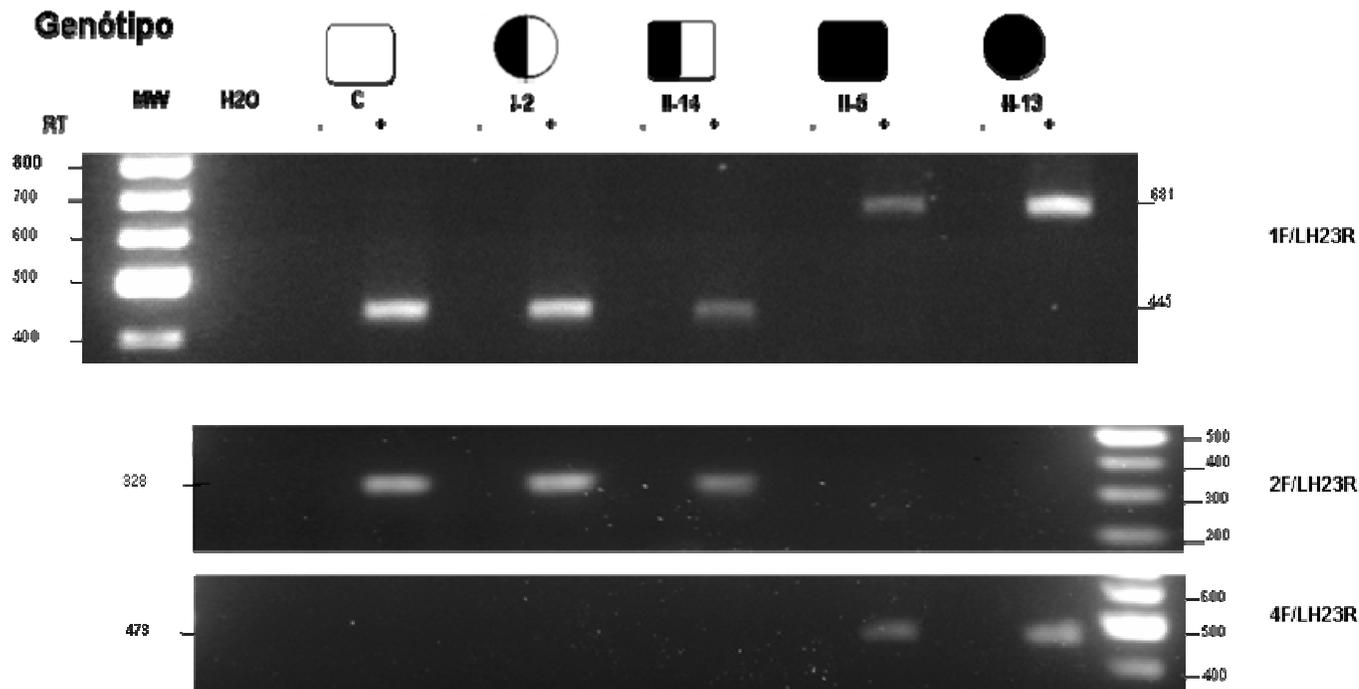


Figura 23. Produtos da *semi nested* RT-PCR do RNAm *LHB*, visualizados em gel de agarose. Painel superior: Utilizando-se o par de oligonucleotídeos 1F/LH23R, o fragmento amplificado nos homocigotos para a mutação IVS2+1G>C é aproximadamente 250 pb maior do que o esperado, que foi normalmente observado no controle (445 pb). Nos heterocigotos, observou-se amplificação apenas do fragmento de tamanho normal (igual ao controle). Painel do meio: Com o par de oligos_2F/LH23R, houve amplificação de um fragmento de 328 pb no controle e nos heterocigotos, mas não nos homocigotos. Painel inferior: Com o par de oligos 4F/LH23R, observou-se amplificação de um fragmento de 473 pb presente apenas no RNA extraído dos pacientes homocigotos, mas não no controle ou nos heterocigotos. Na linha acima da figura estão representados os indivíduos dos quais as amostras foram obtidas e seus respectivos genótipos, conforme apresentados no heredograma da **Figura 22** (I-2, II-14, II-5 e II-13). RT “+” e “-” indicam as amostras que foram (+) submetidas à transcrição reversa antes da PCR e as que não foram (-). MW: marcador de peso molecular. C: controle.

Os produtos da *semi nested* RT-PCR (oligos 1F/LH23R) da paciente afetada (II-13) e controle foram sequenciados para confirmação do defeito no processamento pós-transcricional do RNAm resultante da mutação IVS2+1G>C. Verificou-se que a diferença de tamanho do fragmento obtido na RT-PCR da amostra da paciente em relação ao controle devia-se à presença de todos os 236 nucleotídeos do íntron 2 no RNAm da paciente. Em outras palavras, o seqüenciamento revelou a inclusão completa do íntron 2 no RNAm da paciente, resultante da presença da mutação pontual (G>C) no sítio doador de *splicing* (5') e conseqüente comprometimento do processamento pós-transcricional (**Figura 24**).

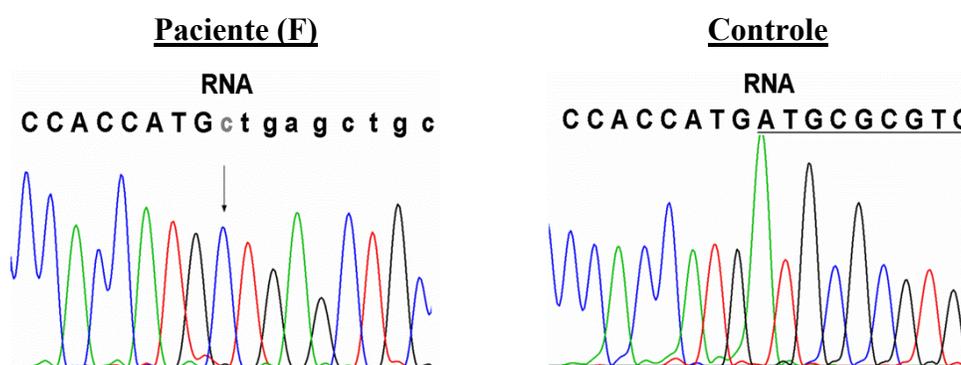


Figura 24. Seqüenciamento automático do produto da RT-PCR da paciente afetada (II-13) e do controle, mostrando a região da junção éxon 2- íntron 2. As letras maiúsculas indicam seqüências exônicas e as minúsculas, seqüências intrônicas. A seta indica a mutação. No controle, observa-se que o RNAm processado possui as seqüências exônicas esperadas, enquanto no RNAm da paciente, a presença de um nucleotídeo C na posição +1 do íntron 2 resultou na retenção desse íntron.

Análise comparativa das seqüências do LHB selvagem (wt) e mutante (mut)

Os produtos da RT-PCR obtidos com o par de oligos 1F/LH23R foram seqüenciados e as seqüências de nucleotídeos do *LHB* selvagem (éxon 2, íntron 2, éxon 3) e do mutante foram comparadas. Nessa análise, observou-se que a seqüência do fragmento do *LHB* amplificado dos pacientes afetados era idêntica à seqüência de referência do NCBI (National Center for Biotechnology Information) (ref|NC_000019.8|NC_000019:c54212159-54211049), exceto o nucleotídeo G na posição +1 do íntron 2, que foi substituído por um C (mutação IVS2+1G>C).

Em seguida, procedeu-se à análise da seqüência de aminoácidos da suposta proteína aberrante em comparação com a do LH-beta selvagem. Observou-se que a inclusão da seqüência de nucleotídeos do íntron 2 no RNAm mutante resultaria em mudança da fase de leitura do éxon 3. Além disso, a proteína aberrante apresentaria a inserção de 79 aminoácidos correspondentes ao íntron 2.

Os resultados do alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos estão esquematicamente apresentados na **Figura 25**.

5. DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO A

No ESTUDO A, a análise hormonal de pacientes com deficiência seletiva de FSH teve por objetivo fundamental a observação *in vivo* dos efeitos de diferentes estímulos gonadotróficos, isoladamente, sobre a produção de esteróides gonadais. Estudos desse tipo são difíceis de realizar em seres humanos, devido às características peculiares de secreção integrada de FSH e LH, sujeita à regulação pulsátil pelo GnRH (MAGGI R et al., 2006). Esses hormônios, embora exerçam suas ações principais em diferentes células-alvo, são secretados pela mesma célula hipofisária e estão sujeitos a mecanismos de regulação semelhantes, bastante complexos e integrados. Por esse motivo, a maioria dos trabalhos sobre a análise das atividades isoladas de FSH e de LH é realizada em modelos animais, geralmente utilizando ferramentas moleculares para nocaute de genes específicos ou experimentos *in vitro* (LOFRANO-PORTO e NEVES, 2006). Entretanto, sabe-se que vários aspectos da fisiologia reprodutiva humana diferem daqueles demonstrados em modelos animais, o que dificulta sua extrapolação para os seres humanos (THEMMEN e HUHTANIEMI, 2000; THEMMEN, 2005).

A seleção de apenas dois indivíduos é decorrente da raridade e singularidade de sua condição patológica, deficiência seletiva de apenas uma gonadotrofina, a qual possibilita a oportunidade para análise da resposta gonadal ao estímulo por uma ou outra gonadotrofina isoladamente. A questão imediata que se impõe diz respeito aos critérios de comparação para a interpretação das respostas hormonais observadas. Nesse caso, a ausência de outro modelo humano de deficiência congênita, isolada, de uma só gonadotrofina torna essa comparação praticamente impossível. Sendo assim, na impossibilidade de definição de um grupo controle, a análise limitou-se à descrição da resposta hormonal após os diferentes estímulos em comparação com o estado hormonal basal, para cada indivíduo, à semelhança do estudo realizado por Barnes e colaboradores (BARNES et al., 2000; BARNES et al., 2002).

Sobre a ausência de resposta esteroidogênica ovariana aos diferentes estímulos gonadotróficos

No caso da paciente deficiente de FSH, observou-se que a administração aguda de FSH não resultou em nenhum efeito sobre a função das células da granulosa, como verificado pela ausência de elevação do estradiol e outros esteróides ovarianos 24 horas após a aplicação de FSH recombinante (**Tabela 5**).

Na verdade, a concentração de estradiol basal era indetectável e assim permaneceu após o estímulo. Esse achado foi, de certa forma, inesperado, por vários motivos. Primeiro, a paciente tinha história de desenvolvimento mamário espontâneo, o que sugere algum grau de produção estrogênica, em algum momento de sua vida, ainda que pequeno. Segundo, no caso semelhante descrito por Barnes e colaboradores (2000; 2002), foram observados folículos antrais ao exame ultrassonográfico e houve resposta imediata do estradiol e inibina B à administração exógena de FSH. O estradiol basal, que também era indetectável, aumentou para 80 pg/ml após estímulo com FSH. Esses achados sugeriram a existência de células da granulosa funcionais, que foram capazes de se desenvolver até o estágio de folículo antral, apesar da ausência de FSH endógeno. Terceiro, trabalhos anteriores relataram a ocorrência de gestação após aproximadamente 14 dias de tratamento com gonadotrofinas menopáusicas em duas mulheres com quadro clínico compatível com deficiência seletiva de FSH (RABINOWITZ et al., 1979; MATTHEWS et al., 1993). Em uma dessas pacientes foi feito o estudo molecular e foi constatado que a presença da mutação Val61X no gene *FSHB* em homozigose era responsável pela deficiência de FSH (MATTHEWS et al., 1993). Esses achados reforçam as evidências de que alguns folículos saudáveis podem se desenvolver até pelo menos o estágio que antecede o recrutamento, independentemente da presença de FSH.

Ainda em comparação com o estudo de Barnes e colaboradores, na paciente do presente estudo, não foi observada nenhuma resposta aos estímulos com hCG, com ou sem administração prévia de FSH (**Tabela 5**). Ao contrário, esses autores observaram um aumento de oito vezes em relação ao basal na concentração sérica de testosterona após administração de hCG precedida por uma injeção de 300 UI de FSH recombinante, utilizando o mesmo protocolo de estimulação gonadotrófica, em uma paciente de 21 anos portadora de condição clínica semelhante, isto é, com deficiência seletiva de FSH (BARNES et al., 2000; BARNES et al., 2002). A aparente

discrepância entre as respostas dos dois estudos pode ter sido influenciada pela diferença de idade entre as pacientes estudadas. No caso aqui apresentado, a paciente foi submetida aos testes de avaliação da esteroidogênese aos 41 anos de idade. Estudos prévios demonstraram que a capacidade ovariana de secreção androgênica em resposta à estimulação com hCG pode declinar até mesmo antes dos 30 anos de idade (PILTONEN et al., 2003). De maneira semelhante, a não elevação do estradiol em resposta ao estímulo com FSH também poderia estar relacionada à reserva ovariana diminuída, associada ou não à idade da paciente (SCOTT e HOFMANN, 1995). Nesse caso, a mutação no *FSHB* e a resultante ausência de secreção de FSH (LAYMAN et al., 2002) comprometem a interpretação do valor sérico do FSH, já que não ocorre a esperada elevação do FSH relacionada à diminuição da reserva ovariana. Alternativamente, a medida das concentrações séricas de inibina B poderiam contribuir para o melhor esclarecimento da capacidade funcional das células da granulosa e da reserva ovariana (BROEKMANS et al., 2006). Contudo, infelizmente não foi possível realizar essa dosagem.

No presente estudo, não houve resposta das concentrações de esteróides ovarianos a nenhum dos estímulos gonadotróficos. Além disso, não foram visualizados folículos antrais no exame ultrassonográfico (**Figura 7**). Mesmo considerando a acurácia inferior do exame realizado por via abdominal em relação àquele por via transvaginal, não foi possível identificar nessa paciente nenhum outro indício de desenvolvimento folicular em estágios mais avançados (antral). Por limitações éticas, o exame histológico do ovário não pôde ser realizado.

É necessário ainda destacar que a ausência de resposta ovariana aos estímulos gonadotróficos também pode estar relacionada a limitações intrínsecas ao protocolo utilizado. Por exemplo, o fato de que a paciente estava em uso de reposição de esteróides sexuais por vários anos pode, teoricamente, ter contribuído para a relativa hipofunção ovariana observada. Nesse caso, um novo protocolo de estimulação gonadotrófica seriada e prolongada possivelmente auxiliaria no esclarecimento dessa questão.

Até o presente momento, poucos estudos avaliaram o papel dos testes de estimulação gonadotrófica, particularmente com FSH exógeno, para a predição da reserva ovariana. Além disso, não há padronização de respostas a esses testes, o que dificulta a interpretação dos resultados no presente estudo (BROEKMANS et al., 2006; KWEE et al., 2006). Entretanto, a ausência de resposta do estradiol ao estímulo com FSH exógeno é considerada evidência de falência ovariana, em mulheres em idade reprodutiva (BROEKMANS et al., 2006).

Por fim, considerando o conjunto de resultados aqui apresentados, concluímos que nessa paciente com deficiência seletiva de FSH não foram observados efeitos da estimulação gonadotrófica sobre a produção de esteróides ovarianos. Não foi possível determinar se esses achados refletem uma insuficiência no desenvolvimento dos folículos e das células da granulosa devido à ausência de FSH, ou uma aceleração dos processos de apoptose e atresia folicular (RICHARDS et al, 1994). Os dados aqui apresentados e as questões levantadas reforçam ainda a necessidade do desenvolvimento de outros modelos para estudo das ações isoladas das gonadotrofinas em humanos. Além disso, novos estudos em mulheres com deficiência seletiva de FSH poderiam contribuir adicionalmente para o esclarecimento do papel do FSH sobre os aspectos da fisiologia do desenvolvimento folicular aqui apresentados, particularmente a regulação da esteroidogênese ovariana.

Sobre a resposta esteroidogênica testicular

O papel do FSH sobre a regulação da esteroidogênese no testículo é ainda menos compreendido do que aquele descrito na esteroidogênese ovariana.

Estudos anteriores mostraram variações entre os fenótipos dos raros homens portadores de mutação no *FSHB* e o fenótipo de camundongos nocauteados para o *FSHB* (THEMMEN, 2005). Um dos homens deficientes de FSH descritos até o momento, e caracterizados a nível molecular (mutação Cys82Arg), apresentava fenótipo semelhante ao do paciente do presente estudo, isto é, com desenvolvimento puberal e virilização normal (LINDSTEDT et al., 1998). O outro, portador da mutação Val61X, apresentou fenótipo aparentemente mais severo, com comprometimento concomitante da produção de testosterona e ausência de desenvolvimento puberal (PHILLIP et al., 1998).

No paciente do sexo masculino aqui estudado, as concentrações basais de LH (17,9 e 12,7 UI/l) bem como a média dos valores obtidos nas coletas noturnas ($9,1 \pm 2,9$ UI/ml) foram normais, porém próximos ao limite superior da normalidade (2 a 12 UI/ml). Analisando os valores absolutos, observa-se que aparentemente existe algum grau de hipersecreção de LH, porém muito menor do que o que foi observado na paciente do sexo feminino. Provavelmente, nesse caso, essa diferença deve-se à retroalimentação negativa exercida pela secreção normal de testosterona sobre a produção de LH pela hipófise (MELMED e KLEINBERG, 2003).

Os resultados apresentados sugerem que a estimulação das células de Sertoli pelo FSH exógeno foi eficaz, o que pode ser inferido pelo aumento, superior a quadro vezes o valor inicial, da concentração de inibina B após a administração de FSH (**Figura 10**). Além disso, o incremento da testosterona após administração de FSH (76,3%) foi superior àquele obtido após estímulo com hCG isolado (55,2%) ou precedido de FSH (FSH+hCG: 68%) (**Figura 11**). O aumento de testosterona e seu precursor, androstenediona, após o estímulo com FSH exógeno, sugere que a secreção de andrógenos pelas células de Leydig pode ser modulada pelo FSH.

Sabe-se que os receptores para FSH estão presentes exclusivamente nas células de Sertoli e que a produção de andrógenos é regulada pela ação do LH nas células de Leydig (KRETSER, 2007). Entretanto, a existência de mecanismos de comunicação entre os dois principais compartimentos do testículo ainda não foi definitivamente comprovada.

Estudos experimentais *in vitro* e em animais sugeriram que células de Sertoli estimuladas pelo FSH poderiam amplificar a produção de testosterona pelas células de Leydig (LEVALLE et al., 1998; KRISHNAMURHTY et al., 2001). Além disso, uma proteína secretada pelas células de Sertoli e capaz de estimular a esteroidogênese pelas células de Leydig já foi identificada *in vitro*, porém sua ação ainda não foi confirmada *in vivo* (BOUJRAD et al., 1995). Corroborando essa hipótese, outro estudo demonstrou que a administração de FSH a animais hipofisectomizados aumentou tanto a esteroidogênese quanto a expressão de LHR nas células de Leydig (KRISHNAMURHTY et al., 2001). Por outro lado, um elegante estudo realizado em uma série de seis pacientes com hipogonadismo hipogonadotrófico adquirido não demonstrou evidências de efeito estimulatório do FSH sobre a secreção de andrógenos pelas células de Leydig (YOUNG et al., 2000), ao contrário do que foi observado no presente estudo.

Uma possível explicação para essa aparente discrepância pode ser o fato de que o paciente do presente estudo, ao contrário dos demais pacientes hipogonádicos, tinha secreção preservada e suficiente de LH e testosterona (CHANSON et al., 1997; KRISHNAMURHTY et al., 2001). Assim, a secreção normal de LH pode ter contribuído para a manutenção do estado relativamente saudável das células de Leydig, de forma que essas puderam reter a capacidade de secretar andrógenos, sendo, portanto, capazes de responder prontamente com elevação da taxa de secreção androgênica após o estímulo agudo com hCG, FSH ou ambos.

As observações no presente trabalho indicam ainda que as células de Leydig são capazes de manter sua capacidade funcional mesmo na ausência completa de atividade do FSH, embora

possivelmente com capacidade reduzida de secreção androgênica basal, mas que pode ser amplificada com a estimulação exógena pelo FSH. Essas observações estão de acordo com estudos prévios realizados em camundongos com atividade deficiente de FSH, seja por nocaute do gene *FSHB* ou do *FSHR*. Tais estudos mostraram que na ausência do ligante (FSH), mas na presença de concentrações adequadas de LH, os receptores para FSH apresentam atividade constitutiva, suficiente para permitir o desenvolvimento normal das células de Leydig (BAKER et al., 2003).

Finalmente, vale destacar o aumento da secreção de estradiol que foi mais pronunciado após o estímulo com hCG isolado e combinado com FSH (**Figura 14**). De fato, estudos prévios demonstraram atividade da aromatase testicular e secreção de estrógenos principalmente nas células de Leydig, porém as células de Sertoli também foram capazes de sintetizar estrógenos *in vitro*. Em roedores, foi demonstrado que as células de Leydig sintetizam estrógenos nos animais adultos, enquanto nos animais imaturos, são as células de Sertoli que secretam mais estrógeno (CARREAU et al., 2003). Deve-se considerar ainda um possível efeito da aromatização periférica dos andrógenos testiculares como interpretação alternativa para a origem da resposta pronunciada do estradiol ao hCG.

Em resumo, os resultados apresentados sugerem que, no sexo masculino, o FSH pode exercer efeito amplificador ou facilitador na produção androgênica nas células de Leydig já estimuladas pelo LH, provavelmente mediado por sua ação primária nas células de Sertoli, num mecanismo de regulação parácrina. Outros estudos são necessários para caracterizar os mecanismos exatos de sinalização pelos quais as células de Sertoli medeiam o aumento da secreção de andrógenos pelas células de Leydig.

Os dados do ESTUDO A resultaram em um artigo que se encontra em fase final de revisão para publicação no *Fertility and Sterility* (**Anexo IV**).

5.2 ESTUDO B

No ESTUDO B, foi descrita uma nova mutação no gene *LHB* que causou deficiência seletiva de LH em três irmãos, dois homens e uma mulher, de pais consangüíneos. A mutação está localizada numa região altamente conservada do íntron 2 do gene *LHB*, no sítio 5' ou sítio doador de *splicing* (IVS2+1G>C). A caracterização clínica do hipogonadismo hipogonadotrófico por deficiência seletiva de LH foi apresentada em ambos os sexos, sendo que essa foi a primeira descrição do fenótipo feminino da deficiência seletiva de LH, até então inexistente na literatura. Os três irmãos afetados foram homocigotos para a nova mutação e seis heterocigotos foram descritos. A análise da mutação revelou que a substituição do nucleotídeo G por um C na posição +1 do íntron 2 resultou na inclusão dos 256 pares de bases do íntron 2 no RNAm dos afetados, o que representa a inclusão de 79 aminoácidos na suposta proteína aberrante e alteração na fase de leitura do éxon 3.

Quanto à apresentação clínica, os dois irmãos afetados tinham ausência de desenvolvimento puberal e virilização, além de azoospermia. O hipogonadismo nesses pacientes caracterizou-se pela ausência de LH imunologicamente e biologicamente ativo, com testosterona baixa e FSH elevado, porém com inibina B normal. A subunidade alfa livre estava elevada em ambos. O aspecto histopatológico do testículo de um deles foi compatível com a deficiência seletiva de LH, mostrando ausência de células de Leydig maduras e parada de evolução da espermatogênese (**Figura 15**). Esse fenótipo é semelhante ao dos homens com mutações inativadoras do *LHB* anteriormente descritos (WEISS et al., 1992; VALDES-SOCIN et al., 2004; DALY e BECKERS, 2006). Esse fenótipo é também muito semelhante àquele observado em camundongos do sexo masculino com nocaute do gene *LHB* (MA et al., 2004).

Uma observação interessante foi o aumento de volume testicular verificado nos pacientes com deficiência de LH após reposição prolongada de testosterona. Considerando a grande acurácia da avaliação do volume testicular por ultrassonografia (SAKAMOTO et al., 2007b; SAKAMOTO et al., 2007a), foi observado aumento do volume testicular total (VTT) de 42,7% no caso 1 (VTT aumentou de 9,6 para 13,7 cm³). O paciente do caso 2 foi avaliado após cinco anos de tratamento com testosterona exógena, mas referia também aumento testicular. Nesse caso, constatou-se um VTT de 18,9 cm³ após o tratamento, o que também está de acordo com essa observação. Sabe-se que o principal determinante do tamanho testicular em adultos é o

número de células de Sertoli maduras e que células imaturas podem persistir em algumas condições patológicas, como o hipogonadismo hipogonadotrófico (MENDIS-HANDAGAMA e ARIYARATNE, 2001). Além disso, foi demonstrado que tanto o FSH quanto a testosterona aumentam a taxa de proliferação e maturação dessas células (SHARPE et al., 2003). Dessa forma, é possível que o aumento da concentração de testosterona decorrente do tratamento, agindo sinergicamente com a elevada concentração de FSH nesses casos, tenha contribuído para a proliferação de células de Sertoli e conseqüente crescimento testicular, como um mecanismo de recuperação tardio.

Os valores de inibina B observados nesses pacientes foram normais (**Tabela 7**). Em homens, tem-se que a principal fonte de inibina B circulante é a população de células de Sertoli e que, em geral, a concentração circulante reflete o número e a capacidade funcional dessas células (DE KRETSEK et al., 2004), embora ainda haja ampla discussão a respeito de seu papel fisiológico e aplicabilidade clínica. O FSH é o principal estimulador da secreção de inibina B, a qual por sua vez parece ser o mais importante fator de retroalimentação negativa sobre a secreção hipofisária de FSH (HAYES et al., 2001; DE KRETSEK et al., 2004). De fato, um estudo anterior realizado em homens mostrou que a ablação aguda da secreção de esteróides sexuais não resulta em aumento significativo da concentração de FSH, reforçando que um fator não-esteroidal (provavelmente inibina B) seria o maior responsável pela regulação por retroalimentação negativa do FSH no sexo masculino (HAYES et al., 2001). Nos homens desse estudo, as concentrações de inibina B se encontravam inapropriadamente normais para os altos valores de FSH observados, reforçando a idéia de que esses pacientes apresentavam algum grau de comprometimento na função e/ou no número de células de Sertoli maduras, e conseqüentemente da espermatogênese.

Provavelmente, é a deficiência severa de testosterona que resulta no comprometimento da espermatogênese e função das células de Sertoli, reforçando o conceito da regulação parácrina entre os dois principais compartimentos testiculares: esteroidogênico (células de Leydig) e espermatogênico (células de Sertoli e túbulos seminíferos). A ausência de células de Leydig e a hipoespermatogênese que foram evidenciadas no testículo desses pacientes estão de acordo com seu perfil hormonal. Destaca-se aqui o fato de que a dosagem de inibina B foi realizada após longo período de reposição de testosterona, quando já havia ocorrido crescimento testicular e possivelmente maior estimulação ou proliferação das células de Sertoli.

Já na paciente do sexo feminino, a deficiência congênita seletiva de LH não impediu o desenvolvimento normal dos caracteres sexuais femininos e a puberdade, de maneira semelhante às mulheres com mutações inativadoras do receptor do LH (LATRONICO et al., 1996; TOLEDO et al., 1996; THEMME, 2005) . Porém, ao contrário dessas mulheres que apresentavam útero atrófico e amenorréia primária, a paciente aqui apresentada tinha o útero bem desenvolvido e apresentou menarca e ciclos menstruais ao longo de 14 anos, embora fossem ciclos oligomenorreicos. As determinações séricas de estradiol obtidas na ocasião da avaliação para essa pesquisa, quando a paciente estava em amenorréia há cerca de dois anos, encontravam-se sistematicamente na faixa inferior da normalidade para a fase folicular (**Tabela 7**). O endométrio era atrófico. Dessa forma, embora não seja possível determinar com certeza a quantidade de estrógenos produzidos após a menarca nessa paciente, há evidências de que essa quantidade foi suficiente para permitir o desenvolvimento mamário completo, bem como o desenvolvimento das camadas uterinas. Mulheres com mutações no receptor do LH aparentemente têm um quadro de hipoestrogenismo um pouco mais severo, em comparação com o caso aqui apresentado. (LATRONICO et al., 1996; TOLEDO et al., 1996 ; THEMME e HUHTANIEMI, 2000; THEMME, 2005; HUHTANIEMI, 2006). Essas observações também estão de acordo com o conceito de que o fenótipo das mutações no receptor parece ser um pouco mais severo do que aquele das mutações no ligante.

Na verdade, há evidências de que na ausência completa de atividade do LH a quantidade de substrato androgênico para aromatização na granulosa provavelmente é limitada (RICHARDS et al., 2002) e pode ter contribuído para as concentrações relativamente baixas de estradiol e, conseqüentemente, atrofia endometrial. Reforçando essa hipótese, estudos em camundongos nocauteados para o LH demonstraram que a expressão da maioria das enzimas esteroidogênicas estava significativamente reduzida, embora a diferenciação da teca não estivesse comprometida (MA et al., 2004; HUHTANIEMI, 2006).

A apresentação clínica nessa paciente, caracterizada fundamentalmente por amenorréia secundária e anovulação crônica, associada aos valores sistematicamente baixos de progesterona, corrobora o papel essencial do LH sobre a capacidade ovulatória. O LH tem papel facilitador nos estágios mais avançados da maturação folicular e é essencial para a ovulação (RICHARDS et al., 2002). O aspecto policístico dos ovários dessa paciente é consistente com algum desenvolvimento folicular, induzido pelo FSH. Esse achado também é compatível com os valores

elevados de inibina B, que potencialmente representam o número de folículos antrais, em estágio inicial, saudáveis e disponíveis para o recrutamento (RICHARDS et al., 2002; LAVEN e FAUSER, 2004). Pelo mesmo motivo, os valores normais de FSH, ao contrário dos valores elevados observados nos pacientes masculinos, também podem ser explicados pela regulação por retroalimentação negativa exercida pela alta concentração de inibina B circulante sobre a secreção hipofisária de FSH. De fato, estudos prévios demonstraram que a inibição da secreção de FSH efetuada pela inibina B é o efeito dominante nesse sistema de retroalimentação entre a granulosa e a hipófise.

Interessantemente, houve aparente desenvolvimento folicular e formação de um folículo dominante (de 18 mm) após o tratamento com estrógenos (**Figura 18**), porém sem evidência de ocorrência de ovulação ou formação de corpo lúteo. Essa observação sugere que, nessa mulher, em uma situação de suficiência de FSH, os estrógenos apenas, ou fatores relacionados a eles, foram determinantes para o desenvolvimento folicular até o estágio pré-ovulatório inicial, e a atividade do LH não foi necessária até esse estágio. Dessa forma, concluímos que a mutação IVS2+1G>C causa impedimento da ovulação e da formação de corpo lúteo, o que se manifesta clinicamente por amenorréia. Como esperado, essa mutação do *LHB* não afetou o desenvolvimento puberal, permitindo assim o desenvolvimento normal dos caracteres sexuais secundários, da glândula mamária e do útero.

Quanto à análise dos indivíduos heterozigotos (**Tabelas 9 e 10**), observou-se que todos eram férteis e não apresentavam condições clínicas relacionadas à presença do alelo mutante. Aparentemente a secreção de LH era normal nesses indivíduos. A única exceção foi a mãe dos pacientes afetados (I-2), que apresentou valores de LH basais e após estimulação com GnRH abaixo daqueles esperados para sua idade e estado de menopausa. Nessa paciente, foram afastadas outras condições patológicas que pudessem influenciar esse resultado, como hiperprolactinemia e lesões anatômicas na hipófise. O seqüenciamento do gene *LHB* dessa paciente não revelou a presença de polimorfismos, que pudessem interferir na detecção do LH pelo imunoensaio. Dessa forma, nesse estudo, não foi possível esclarecer as razões para essa aparente discrepância. Entretanto, a alta fecundidade observada nessa paciente evidencia que a bioatividade do LH estava preservada. Estudos futuros de quantificação do RNAm nos heterozigotos poderão contribuir para o esclarecimento desse fenômeno.

Todas as mutações nos genes das gonadotrofinas descritas até o momento estão

localizadas nos éxons desses genes (WEISS et al., 1992; MATTHEWS et al., 1993; LAYMAN et al., 1997; PHILLIP et al., 1998; LINDSTED et al., 1998; LAYMAN et al., 2002; VALDESSOCIN et al., 2004; DALY e BECKERS, 2006). A mutação descrita nesse trabalho está localizada no íntron e resultou em deficiência de LH por um mecanismo molecular distinto. Foi descrito que as seqüências que flanqueiam as junções éxon-íntron são críticas para o reconhecimento dos sítios de *splicing*, pois contém sinais reguladores importantes para o processamento pós-transcricional do RNAm (XING et al., 2006). Mutações nessas regiões freqüentemente têm sido associadas a doenças (LOPEZ-BIGAS et al., 2005). Por esse motivo, com a hipótese de que a substituição G>C pudesse interferir no *splicing* do íntron 2, realizamos a análise da transcrição do gene *LHB in vivo*, utilizando o RNA isolado de leucócitos dos pacientes afetados. Através da análise dos produtos da RT-PCR, foi possível demonstrar que a mutação INS2+1G>C resultou na inclusão de todo o íntron 2, e conseqüentemente, na mudança da fase de leitura do éxon 3. Além disso, induziu anormalidade grosseira no RNAm do *LHB*, dando origem à seqüência de aminoácidos bastante alterada da suposta proteína aberrante.

Curiosamente, a análise molecular dos heterozigotos revelou a presença apenas do RNAm normal (*wild-type*), mas não do mutante (**Figura 23**). A razão para esse achado não pôde ser determinada no presente estudo, mas várias possibilidades podem ser sugeridas. A hipótese mais direta e provável nesse caso é que a ausência de detecção do RNAm mutante nos heterozigotos seja decorrente de diferenças nas concentrações iniciais das duas espécies de RNAm, de modo que aquela presente em maior concentração será preferencialmente amplificada na RT-PCR. Entretanto, estudos futuros de quantificação das duas espécies de RNAm dos homozigotos, heterozigotos e controles poderão contribuir para esclarecer essa questão.

A ausência da mutação nos cem indivíduos do grupo controle (200 cromossomos) reforça que não se trata de um polimorfismo.

Na análise comparativa das seqüências do RNAm mutante e suposta proteína aberrante e da subunidade beta do hCG, verificou-se que a região do “cinto de segurança” (*seat-belt region*) estaria ausente na proteína aberrante (**Figura 25**). A região da proteína correspondente a essa estrutura constitui-se em um segmento conservado entre as subunidades beta dos hormônios glicoproteicos, codificado pelo éxon 3 (LAPTHORN et al., 1994). No hCG maduro, essa estrutura envolve a subunidade alfa e é essencial para a manutenção do dímero e, portanto, para a ligação com o receptor (MATZUK et al., 1989; LAPTHORN et al., 1994). Além disso, a proteína

mutante também perderia resíduos de cisteína importantes para a formação do “nó de cisteínas”, uma outra estrutura essencial para a dimerização. Esses aspectos estão ilustrados na **Figura 26**, na qual estão simulados os efeitos da mutação IVS2+1G>C sobre a estrutura tridimensional do hCG, análoga à do LH (LAPTHORN et al., 1994). Essas observações sugerem que a proteína aberrante seria incapaz de se dimerizar corretamente com a subunidade alfa e provavelmente não seria secretada, dando origem então à condição patológica de deficiência seletiva de LH.

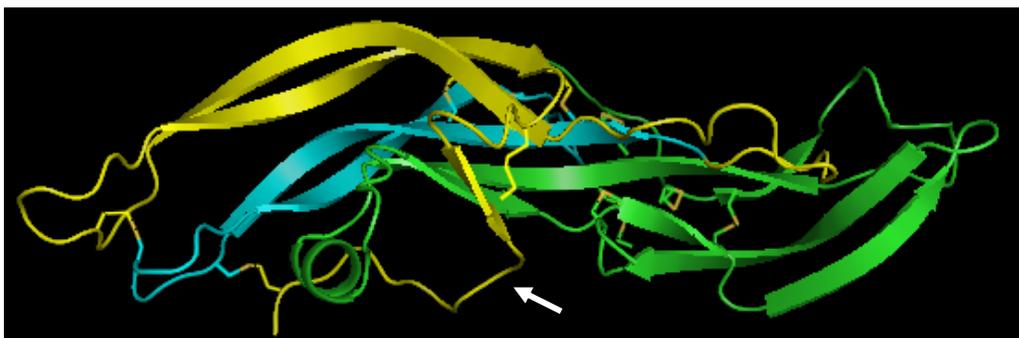


Figura 26 – Simulação teórica da estrutura tridimensional da proteína madura (dímero subunidade alfa - proteína aberrante), resultante da mutação IVS2+1G>C. A subunidade alfa está representada em verde. Em azul, tem-se a região da subunidade beta do LH que estaria preservada. Em amarelo, está apresentada a região comprometida pela presença da mutação. A seta branca aponta a região do “cinto de segurança”. Estrutura depositada no *Protein Data Bank* (PDB), referência: 1HRP. Imagem criada e visualizada com o programa PYMOL (DeLano Scientific LLC, Palo Alto, USA). (Gentilmente cedida por Gustavo Barcelos Barra, laboratório de Farmacologia Molecular – FS/UnB.)

Em resumo, os estudos aqui apresentados vêm somar-se à vasta gama de artigos científicos que tratam de temas relacionados à fisiologia e fisiopatologia reprodutiva. As lacunas ainda presentes no conhecimento a respeito da regulação da função gonadal estão sendo progressivamente preenchidas, pela somatória dos avanços das técnicas de estudo molecular bem como sua disponibilidade crescente. Nesse contexto, estudos de análise de interações hormonais realizados em seres humanos têm ganhado expressão crescente.

Os dados do ESTUDO B resultaram em artigo que foi aceito recentemente para publicação no *The New England Journal of Medicine* e que está apresentado no **Anexo V**.

Por fim, os principais aspectos do hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo identificados nos estudos aqui apresentados estão sintetizados a seguir:

1. Sobre os efeitos da estimulação gonadotrófica seletiva na esteroidogênese gonadal em uma mulher e um homem portadores de deficiência seletiva de FSH (ESTUDO A):

No sexo feminino:

- Os efeitos do FSH e do hCG (semelhante ao LH) sobre a produção de esteróides gonadais não foi possível avaliar, já que não houve produção de esteróides ovarianos, seja de estrógenos ou de andrógenos, em resposta a nenhum desses estímulos gonadotróficos.
- Com base nos dados obtidos nesse estudo, não foi possível esclarecer a causa da ausência de resposta esteroidogênica ovariana na paciente com deficiência seletiva de FSH. É possível que a ausência de resposta esteroidogênica seja decorrente da redução precoce da reserva ovariana relacionada à deficiência congênita de FSH, porém outros estudos são necessários para confirmar essa observação.
- Os valores de LH observados foram bastante elevados e mantiveram padrão de secreção pulsátil. Esses valores provavelmente são decorrentes da perda da retroalimentação negativa na hipófise e no hipotálamo pela ausência de secreção dos esteróides sexuais gonadais.
- A ausência de produção de andrógenos ovarianos na presença de concentrações elevadas de LH demonstra que esse hormônio apenas não é suficiente para garantir a produção fisiológica de andrógenos pelo ovário, sendo o FSH necessário para o desenvolvimento dos folículos e aquisição da capacidade funcional das células da teca. Esse resultado está de acordo com o conhecimento prévio.
- Outros estudos em mulheres com deficiência seletiva de FSH são necessários para esclarecer o papel isolado do FSH sobre a esteroidogênese ovariana.

No sexo masculino:

- As secreções de LH e testosterona no paciente com deficiência seletiva de FSH estão aparentemente preservadas. As concentrações de LH tendem a discreta elevação, isto é, se encontram no limite superior da normalidade, enquanto as de testosterona estão normais, porém no limite inferior da normalidade, reforçando o funcionamento do sistema de retroalimentação negativa dos esteróides gonadais sobre a secreção hipofisária de LH.
- O aumento de 76,3% da secreção testicular de testosterona e seu precursor androstenediona, em resposta ao estímulo com FSH, em comparação com o aumento de 55,2% após estímulo com hCG, sugere que a secreção de andrógenos pelas células de Leydig pode ser modulada e amplificada pelo FSH. Assim, o FSH parece exercer efeito regulador, amplificador ou facilitador da produção androgênica pelas células Leydig normais, isto é, estimuladas pelo LH.
- O aumento concomitante da inibina B em resposta ao FSH (480 %), somado ao conhecimento prévio de que os receptores para FSH estão presentes apenas nas células de Sertoli, reforçam que o efeito regulador do FSH sobre a secreção de andrógenos pelas células de Leydig provavelmente é mediado pelas células de Sertoli, por via de regulação parácrina.
- A evidência de secreção normal de testosterona pelas células de Leydig na ausência de FSH e o seu imediato aumento após os estímulos gonadotróficos indicam que as células de Leydig mantêm seu desenvolvimento e função independentemente do FSH, embora possivelmente com capacidade reduzida de secreção androgênica basal, mas que pode ser amplificada pela estimulação exógena com FSH.
- O aumento da secreção de estradiol, que foi mais pronunciado após estímulo com hCG (semelhante ao LH), reforça o conceito de que a atividade da aromatase no testículo é predominantemente dependente das células de Leydig, entretanto essa observação não é definitiva.

- Outros estudos são necessários para caracterizar os mecanismos de sinalização pelos quais as células de Sertoli medeiam o aumento, induzido pelo FSH, da secreção de andrógenos pelas células de Leydig.

2. Sobre os aspectos clínicos e fisiopatológicos do hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo por deficiência de LH (ESTUDO B):

No sexo masculino:

- O quadro clínico dos homens com deficiência seletiva de LH na família estudada foi semelhante ao dos pacientes anteriormente descritos. Caracteriza-se por hipogonadismo severo, com virilização normal ao nascimento, porém com ausência de desenvolvimento puberal associado a concentrações séricas muito baixas de testosterona e azoospermia.
- O LH parece ser essencial para o desenvolvimento das células de Leydig e a produção androgênica normal. Homens com deficiência seletiva congênita de LH não apresentaram células de Leydig maduras no testículo.
- O perfil de secreção do FSH e da inibina B nos homens com deficiência de LH sugere comprometimento severo da espermatogênese e do desenvolvimento e função das células de Sertoli, possivelmente resultantes da deficiência severa (ausência) de produção de testosterona. Esses achados corroboram o conceito de regulação parácrina dos compartimentos testiculares.
- O aumento de volume testicular observado após reposição prolongada com testosterona exógena pode estar relacionado ao grau de proliferação das células de Sertoli nos indivíduos com deficiência seletiva de LH e concentrações elevadas de FSH.

No sexo feminino:

- Apresentamos a descrição do fenótipo feminino resultante de uma mutação no gene *LHB*, que se caracterizou por desenvolvimento puberal normal, amenorréia secundária e anovulação crônica.

- A deficiência seletiva de LH no sexo feminino não compromete o desenvolvimento dos caracteres sexuais e a puberdade, sugerindo produção de estrógenos suficiente para esses efeitos, embora reduzida.
- Os achados clínicos confirmam que o LH foi essencial para a ovulação e formação do corpo lúteo. Além disso, sugerem que o LH possivelmente exerça papel facilitador do desenvolvimento folicular para os estágios mais avançados, provavelmente relacionado à produção de grandes quantidades de estradiol, necessárias para a maturação folicular completa.
- A verificação de crescimento folicular após reposição com estrógeno reforça o conceito de que o FSH e estrógenos em concentrações suficientes são os principais determinantes do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório e o LH teria papel facilitador na amplificação da produção estrogênica.

3. Sobre o estudo do gene *LHB* nos indivíduos com deficiência seletiva de LH e em seus familiares (ESTUDO B):

- Foi identificada uma nova mutação no gene *LHB*, IVS2+1G>C, em homozigose, nos indivíduos afetados, e em heterozigose nos pais, duas irmãs, um irmão e um sobrinho desses indivíduos.
- Foi demonstrado, por meio de análise do RNAm dos indivíduos afetados e heterozigotos, que a mutação IVS2+1G>C resultou em anormalidade grosseira no RNAm do *LHB*, pela inclusão de todo o íntron 2, e conseqüentemente, mudança da fase de leitura do éxon 3.
- O alinhamento das seqüências da suposta proteína aberrante, do LH-beta normal e do hCG-beta revelou que, devido à mutação, a proteína aberrante perderia a região do “cinto de segurança” e possivelmente do “nó de cisteínas”, regiões essenciais para a dimerização alfa-beta no LH maduro e conseqüentemente para sua secreção.

- A ausência da mutação IVS2+1G>C nos 200 cromossomos dos indivíduos do grupo controle indica que não se trata de um polimorfismo.
- Não foi possível determinar com os dados apresentados a causa da ausência de amplificação do RNAm mutante nos heterozigotos estudados. Outros estudos são necessários para verificação desse fenômeno.
- Os dados permitem concluir que a mutação IVS2+1G>C resultou no quadro clínico de deficiência seletiva de LH nos indivíduos homozigotos, enquanto os heterozigotos são férteis, confirmando um padrão de herança autossômico recessivo.

6. CONCLUSÕES

- No sexo feminino, a deficiência isolada de FSH resultou em comprometimento da gametogênese e da esteroidogênese, enquanto no sexo masculino, a esteroidogênese estava preservada.
- Na mulher deficiente de FSH, não houve resposta ovariana aos estímulos gonadotróficos, não sendo possível, portanto, avaliar os efeitos isolados do FSH e do hCG sobre a produção de esteróides gonadais no sexo feminino.
- No sexo masculino, o FSH parece exercer efeito regulatório sobre a produção de andrógenos pelas células de Leydig normais, provavelmente agindo de forma parácrina, mediada pelas células de Sertoli.
- O fenótipo masculino da deficiência seletiva de LH caracterizou-se por ausência de desenvolvimento puberal, concentrações séricas muito baixas de testosterona e azoospermia.
- No sexo masculino, foi demonstrado que o LH é essencial para o desenvolvimento e maturação das células de Leydig e produção androgênica normal.
- A deficiência seletiva de LH resultou ainda em comprometimento da espermatogênese e do desenvolvimento das células Sertoli, assim corroborando o conceito de interação funcional entre os compartimentos testiculares.
- A descrição do fenótipo feminino da deficiência seletiva de LH é inédita e caracterizou-se por desenvolvimento puberal normal, amenorréia secundária e anovulação crônica.
- No sexo feminino, foi demonstrado que o LH é essencial para a ovulação e a formação do corpo lúteo e aparentemente exerce papel também no desenvolvimento folicular avançado e produção suficiente de estrógenos.

- A mutação IVS2+1G>C induziu anormalidade no processamento do mRNA *LHB* e resultou em hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo familiar.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITTOMAKI, K.; LUCENA, J.L.D.; PAKARINEN, P.; SISTONEN, P.; TAPANAINEN, J.; GROMOLL, J.; KASKIKARI, R.; SANKILA, E.; LEHVÄSLEIHO, H.; ENGEL, A.R.; NIESCHLAG, E.; HUHTANIEMI, I.; DE LA CHAPELLE, A. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, 82: 959-968, 1995.

AITTOMAKI, K.; HERVA, R.; STENMAN, U.; JUNTUNEN, K.; YLOSTALO, P.; HOVATTA, O.; DE LA CHAPELLE, A. Clinical features of primary ovarian failure caused by a point mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene. **J Clin Endocrinol Metab**, 81: 3722-3726, 1996.

ANDERSSON, A.; JORGENSEN, N.; FRYDELUND-LARSEN, L.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; SKAKKEBAEK, N. Impaired leydig cell function in infertile men: a study of 357 idiopathic infertile men and 318 proven fertile controls. **J Clin Endocrinol Metab**, 89: 3161-3167, 2004.

BAKER, P.; PAKARINEN, P.; HUHTANIEMI, I.; ABEL, M.H.; CHARLTON, H.M.; KUMAR, T.R.; O'SHAUGHNESSY, P.J. Failure of normal Leydig cell development in follicle-stimulating hormone (FSH) receptor-deficient mice, but not FSH-deficient mice: role for constitutive FSH receptor activity. **Endocrinol**, 144: 138-145, 2003.

BARNES, R.B.; NAMNOUM, A.B.; ROSENFELD, R.L.; LAYMAN, L.C. The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries. **Hum Reprod**, 17(1): 88-91, 2002.

BARNES, R.B.; ROSENFELD, R.L.; NAMNOUM, A.B.; LAYMAN, L.C. Effect of follicle-stimulating hormone on ovarian androgen production in a woman with isolated follicle-stimulating hormone deficiency. **N Engl J Med**, 343(16): 1197-1198, 2000.

BEAU, I.; TOURAINE, P.; MEDURI, G.; GOUGEON, A.; DESROCHES, A.; MATUCHANSKY, C.; MILGROM, E.; KUTTENN, F. MISRAHI, M. A Novel Phenotype Related to Partial Loss of Function Mutations of the Follicle Stimulating Hormone Receptor. **J Clin Invest**, 102: 1352–1359, 1998.

BERGER, K.; SOUZA, H.; BRITO, V.N.; D'ALVA, C.A.; MENDONÇA, B.B.; LATRONICO, A.C. Clinical and hormonal features of selective follicle-stimulating hormone (FSH) deficiency due to FSH beta-subunit gene mutations in both sexes. **Fertil Steril**, 83(2): 466-470, 2005.

BHAGAVATH, B.; PODOLSLY, R.; OZATA, M.; BOLU, E.; BICK, D.; KULHARYA, A.; SHERINS, R.; LAYMAN, L. Clinical and molecular characterization of a large sample of patients with hypogonadotropic hypogonadism. **Fertil Steril**, 85: 706-713, 2006.

BOUJRAD, N.; OGWUEGBU, S.O.; GARNIER, M.; LEE, C.H.; MARTIN, B.M.; PAPADOPOULOS, V. Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis. **Science**, 268(5217): 1609, 1995.

BRITO, V.N.; BATISTA, M.C.; BORGES, M.F.; LATRONICO, A.C.; KOHEK, M.B.F.; THIRONE, A.C.P. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. **J Clin Endocrinol Metab**, 84(10): 3539-3544, 1999.

BROEKMANS, F.J.; KWEE, J.; HENDRIKS, D.J.; MOL, B.W.; LAMBALK, C.B. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. **Hum Reprod Update**, 12(6): 685-718, 2006.

BULUN, S. e ADASHI, E. The physiology and pathology of the female reproductive axis. In: Larsen, PR, Kronenber, HM, Melmed, S, and Polonsky, KS (Ed). **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 587-648, 2003.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALANCHE, C.; DENIS-GALERAUD, I.; BILINSKA, B.; BOURGUIBA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reprod Biol Endocrinol**, 1: 35, 2003.

CHANSON, P.; PANTEL, J.; YOUNG, J.; COUZINET, B.; BIDART, J.M.; SCHAISON, G. Free luteinizing-hormone beta-subunit in normal subjects and patients with pituitary adenomas. **J Clin Endocrinol Metab**, 82: 1397-1402, 1997.

CHENNA, R.; SUGAWARA, H.; KOIKE, T.; LOPEZ, R.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G.; THOMPSON, J. D. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Res**, 31(13): 3497-3500, 2003.

COUNIS, R.; LAVERRIÈRE, J.; GARREL, G.; BLEUX, C.; COHEN-TANNOUDJI, J.; LERRANT, Y.; KOTTLER, M.; MAGRE, S. Gonadotropin-releasing hormone and the control of gonadotrope function. **Reprod Nutr Dev**, 45: 243-254, 2005.

DALY, A.F.; SALVI, R.; MENAJE, J.; THIRY, A.; PRALONG, F.; GAILLARD, R.; BECKERS, A. Identification of a family harboring a novel LH beta-subunit mutation associated with hypogonadism. (Abstract) **Endocrine Society Meeting**, 2006.

DE KRETZER, D.M.; BUZZARD, J.J.; OKUMA, Y.; O'CONNOR, A.E.; HAYASHI, T.; LIN, S.; MORRISON, J.R.; LOVELAND, K.L.; HEDGER, M.P. The role of activin, follistatin and inhibin in testicular physiology. **Mol Cell Endocrinol**, 225 : 57-64, 2004.

DIERICH, A.; SAIRAM, M.R.; MONACO, L.; FIMIA, G.A.; GANSMULLER, A.; LEMEUR, M.; SASSONE-CORSI, P. Impaired follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. **Proc Natl Acad Sci USA**, 95: 13612-13617, 1998.

ERICKSON, G. Morphology and physiology of the ovary. In: Arnold, A, Grossman, A, Carr, B, Tcshoep, M, Chrousos, G, Gharib, H, De Groot, L, Goldfine, I, Hershman, JM, McLachlan, R, New, M, Rebar, R, and Vinik, A (Ed). **Endotext.com**. MDText.com,Inc, 2003.

ERICKSON, G. F. e SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril**, 76(5): 943-949, 2001.

FISHER, D. Endocrinology of fetal development. In: Larsen, PR, Kronenber, HM, Melmed, S, and Polonsky, KS (Ed). **Williams textbook of endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 811-841, 2003.

GRIFFIN, J. e WILSON, J. Disorders of the testes and the male reproductive tract. In: Wilson, JD, Foster, DW, Kronenberg, HM, and Larsen, PR (Ed). **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 709-769, 2003.

GROMOLL, J.; SIMONI, M.; NIESCHLAG, E. An activating mutation of the follicle-stimulating hormone receptor autonomously sustains spermatogenesis in a hypophysectomized man. **J Clin Endocrinol Metab**, 81: 1367-1370, 1996.

GRUMBACH, M. e STYNE, D. Puberty: ontogeny, neuroendocrinology, physiology, and disorders. In: Larsen, PR, Kronenber, HM, Melmed, S, and Polonsky, KS (Ed). **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 1115-1286, 2003.

HAYES, F.J.; PITTELOUD, N.; DECRUZ, S.; CROWLEY JR, W.F.; BOEPPLE, P.A. Importance of inhibin B in the regulation of FSH secretion in the human male. **J Clin Endocrinol Metab**, 86(11): 5541-5546, 2001.

HOTAKAINEN, P. K.; SERLACHIUS, E. M.; LINTULA, S. I.; ALFTHAN, H. V.; SCHRODER, J. P.; STENMAN, U. H. Expression of luteinising hormone and chorionic

gonadotropin beta-subunit messenger-RNA and protein in human peripheral blood leukocytes. **Mol Cell Endocrinol**, 162(1-2): 79-85, 2000.

HUHTANIEMI, I. The Parkes lecture. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology. **J Reprod Fertil**, 119: 173-186, 2000.

HUHTANIEMI, I. Mutations along the pituitary–gonadal axis affecting sexual maturation: Novel information from transgenic and knockout mice. **Mol Cell Endocrinol**, 254-255: 84-90, 2006.

JAMNONGJIT, M. e HAMMES, S. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. **Cell Cycle**, 5(11): 1178-1183, 2006.

KREMER, H.; KRAAIJ, R.; TOLEDO, S.P.A.; FRIDMAN, J.B.; VAN REEN, C.Y.; MILGROM, E.; ROPERS, H.H.; MARIMAN, E.; THEMME, A.P.N.; BRUNER, H.G. Male pseudohermaphroditism due to a homozygous missense mutation of the luteinizing hormone receptor gene. **Nat Genet**, 9: 160-164, 1995.

KRETZER, D. Endocrinology of the male reproductive system. In: Arnold, A, Grossman, A, Carr, B, Tcshoep, M, Chrousos, G, Gharib, H, De Groot, L, Goldfine, I, Hershman, JM, McLachlan, R, New, M, Rebar, R, and Vinik, A (Ed). **Endotext.com**. MDText.com, Inc, 2007,

KRISHNAMURHTY, H.; KATS, R.; DANILOVICH, N.; JAVESHGHANI, D.; SAIRAM, M. R. Intercellular communication between Sertoli cells and Leydig cells in the absence of follicle-stimulating hormone-receptor signaling. **Biol Reprod**, 65: 1201-1207, 2001.

KUMAR, T.R.; WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M.M. Follicle-stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. **Nat Genet**, 15: 201-204, 1997.

KWEE, J.; SCHATS, R.; MCDONNELL, J.; SCHOEMAKER, J.; LAMBALK, C.B. The clomiphene citrate challenge test versus the exogenous follicle-stimulating hormone ovarian reserve test as a single test for identification of low responders and hyperresponders to in vitro fertilization. **Fertil Steril**, 85(6): 1714-1722, 2006.

LAPTHORN, A.; HARRIS, D.; LITTLEJOHN, A.; LUSTBADER, J.; CANFIELD, R.; MACHIN, K.; MORGAN, F.; ISAACS, N. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. **Nature**, 369: 455-461, 1994.

LATRONICO, A.C.; ANASTI, J.; ARNHOLD, I.J.; MENDONÇA, B.B.; DOMENICE, S.; ALBANO, M.C.; ZACHMAN, K.; WAJCHENBERG, B.L.; TSIGOS, C. A novel mutation of the luteinizing hormone receptor gene causing male gonadotropin-independent precocious puberty. **J Clin Endocrinol Metab**, 80: 2490-2494, 1995.

LATRONICO, A. C.; ANASTI, J.; ARNHOLD, J. P.; RAPAPORT, R.; MENDONCA, B.M.; BLOISE, W.; CASTRO, M.; TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene. **N Engl J Med**, 334(8): 507-512, 1996.

LATRONICO, A.C.; ABELL, A.N.; ARNHOLD, I.J.; LIU, X.; LINS, T.S.; BRITO, V.N.; BILLERBECK, A.E.; SEGALOFF, D.L.; MENDONÇA, B.B. A unique constitutively activating mutation in third transmembrane helix of luteinizing hormone receptor causes sporadic male gonadotropin-independent precocious puberty. **J Clin Endocrinol Metab**, 83: 2435-2440, 1998a.

LATRONICO, A.C.; CHAI, Y.; ARNHOLD, I.J.; LIU, X.; MENDONÇA, B.B.; SEGALOFF, D.L. A homozygous microdeletion in helix 7 of the luteinizing hormone receptor associated with familial testicular and ovarian resistance is due to both decreased cell surface expression and impaired effector activation by the cell surface receptor. **Mol Endocrinol**, 12: 442-450, 1998b.

LATRONICO, A.C.; SHINOZAKI, H.; GUERRA, G.J.; PEREIRA, M.; LEMOS MARINI, S.; BAPTISTA, M.; ARNHOLD, I.; FANELLI, F.; MENDONÇA, B.; SEGALOFF, D.

Gonadotropin-independent precocious puberty due to luteinizing hormone receptor mutations in Brazilian boys: a novel constitutively activating mutation in the first transmembrane helix. **J Clin Endocrinol Metab**, 85: 4799-4805, 2000.

LAUE, L.L.; WU, S.M.; KUDO, M.; HSUEH, A.J.W.; CUTLER Jr, G.B.; GRIFFIN, J.E.; WILSON, J.D.; BRAIN, C.; BERRY, A.C.; GRANT, D.B.; CHAN, W.Y. A nonsense mutation of the human luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. **Hum Mol Genet**, 4:1429–1433, 1995.

LAUE, L.L.; WU, S.M.; KUDO, M.; BOURDONY, C.J.; CUTLER Jr, G.B.; HSUEH, A.J.W.; CHAN, W.Y. Compound heterozygous mutations of the luteinizing hormone receptor gene in Leydig cell hypoplasia. **Mol Endocrinol**, 10: 987–997, 1996.

LAVEN, J. e FAUSER, B.C.J.M. Inhibins and adult ovarian function. **Mol Cell Endocrinol**, 225: 37-44, 2004.

LAYMAN, L.; LEE, E.; PEAK, D.; NAMNOUM, A.; VU, K.; VAN LINGEN, B.; GRAY, M.; MCDONOUGH, P.; REINDOLLAR, R.; JAMESON, J. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. **N Engl J Med**, 337(9): 607-611, 1997.

LAYMAN, L.; LOFRANO-PORTO, A.; XIE, J.; DAMOTTA, L.; DAMOTTA, L.; WEISE, W.; SLUSS, P. *FSHB* gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. **J Clin Endocrinol Metab**, 82: 3702-3707, 2002.

LEVALLE, O.; ZYLBERSZTEIN, C.; ASZPIS, S.; AQUILANO, D.; TERRADAS, C.; COLOMBANI, M.; ARANDA, C.; SEAGLIA, H. Recombinant human follicle-stimulating hormone administration increases testosterone production in men, possibly by a Sertoli cell-secreted nonsteroid factor. **J Clin Endocrinol Metab**, 83(11): 3973-3976, 1998.

LINDSTED, G.; NYSTROM, E.; MATTHEWS, C.; ERNEST, I.; JANSON, P.; CHATTERGEE, K. Follitropin deficiency in an infertile man due to *FSHB* gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations. **Clin Chem Lab Med**, 36: 663-665, 1998.

LOFRANO-PORTO, A. e NEVES, F. As bases moleculares da medicina: da bancada do laboratório à beira do leito. **Brasília Médica**, 43: 4-6, 2006.

LOPEZ-BIGAS, N.; AUDI, B.; OUZOUNIS, C.; PARRA, G.; GUIGO, R. Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? **FEBS Letters**, 579(9): 1900-1903, 2005.

MA, X.; DONG, Y.; MATZUK, M.M.; KUMAR, T.R. Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. **PNAS**, 101(49): 17294-17299, 2004.

MAGGI, R.; DONDI, D.; PIVA, F. Biologia de neurônios hipotalâmicos produtores do hormônio liberador das gonadotrofinas: novas informações com o uso das células imortalizadas secretoras desse hormônio. **Brasília Médica**, 43: 40-47, 2006.

MARSHALL, W.A. e TANNER, J.M. Variation in pattern of pubertal changes in girls. **Arch Dis Child**, 44: 291-303, 1969.

MARSHALL, W.A. e TANNER, J.M. Variation in pattern of pubertal changes in boys. **Arch Dis Child**, 45: 13-23, 1970.

MATTHEWS, C.; BORGATTO, S.; BECK-PECCOZ, P.; ADAMS, M.; TONE, Y.; GAMBINO, G.; CASAGRANDE, S.; TEDESCHINI, G.; BENEDETTI, A.; CHATTERJEE, V. Primary amenorrhea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. **Nat Genet**, 5: 83-86, 1993.

MATTHIESSON, K.L.; MCLACHLAN, R.I.; O'DONNELL, L.; FRYDENBERG, M.; ROBERTSON, D.M.; STATON, P.G.; MEACHEM, S.J. The relative roles of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in maintaining spermatogonial maturation and spermiation in normal men. **J Clin Endocrinol Metab**, 91: 3962-3969, 2006.

MATZUK, M.M.; SPANGLER, M.M.; CAMEL, M.; SUGANUMA, N.; BOIME, I. Mutagenesis and chimeric genes define determinants in the beta subunits of human chorionic gonadotropin and lutropin for secretion and assembly. **J Cell Biol**, 109(4): 1429-1438, 1989.

MCLACHLAN, R.; O'DONNELL, L.; MEACHEM, S.; STANTON, P.; DE KRETZER, D.; PRATIS, K.; ROBERTSON, D. Hormonal regulation of spermatogenesis in primates and man: insights for development of the male hormonal contraceptive. **J Androl**, 23(2): 149-162, 2002.

MELMED, S. e KLEINBERG, D. Anterior Pituitary. In: Larsen, PR, Kronenberg, HM, Melmed, S, and Polonsky, KS (Ed). **Williams Textbook of Endocrinology**. Philadelphia: Saunders, 2003, 177-279p.

MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C. e ARIYARATNE, S. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biol Reprod**, 65: 660-671, 2001.

MITCHELL, R.; HOLLIS, S.; CROWLEY, V.; MCLOUGHLIN, J.; PEERS, N.; ROBERTSON, W.R. Immunometric assays of luteinizing hormone (LH): differences in recognition of plasma LH by anti-intact and β -subunit-specific antibodies in various physiological and pathophysiological situations. **Clin Chem**, 41(8): 1139-1145, 1995.

MONTANELLI, L.; DELBAERE, A.; DI CARLO, C.; NAPPI, C.; SMITS, G.; VASSART, G.; COSTAGLIOLA, S. A mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 89(3): 1255-1258, 2004.

OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **J Clin Endocrinol Metab**, 82: 3748-3751, 1997.

PHILLIP, M.; ARBELLE, J.; SEGEV, Y.; PARVARI, R. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. **N Engl J Med**, 338: 1729-1732, 1998.

PILTONEN, T.; KOIVUNEN, R.; RUOKONEN, A.; TAPANAINEN, J.S. Ovarian age-related responsiveness to human chorionic gonadotropin. **J Clin Endocrinol Metab**, 88(7): 3327-3332, 2003.

RABINOWITZ, D.; BENVENISTE, R.; LINDNER, J.; LORBER, D.; DANIELL, J. Isolated follicle-stimulating hormone deficiency revisited. **N Engl J Med**, 300: 126-128, 1979.

RICHARDS, J.S. Hormonal control of gene expression in the ovary. **Endocr Rev**, 15(6): 725-751, 1994.

RICHARDS, J.S.; RUSSELL, D.L.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K.H.; FALENDER, A.E.; LO, Y.K.; SHARMA, S.C. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. **Recent Prog Horm Res**, 57(1): 195-220, 2002.

SAIRAM, M.R. e KRISHNAMURTHY, H. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons form knockout animal models. **Arch Med Res**, 32: 601-608, 2001.

SAKAMOTO, H.; SAITO, K.; OGAWA, Y.; YOSHIDA, H. Testicular volume measurements using Prader orchidometer versus ultrasonography in patients with infertility. **Urology**, 69(1): 158-162, 2007a.

SAKAMOTO, H.; SAITO, K.; OOHTA, M.; INOUE, K.; OGAWA, Y.; YOSHIDA, H. Testicular volume measurement: comparison of ultrasonography, orchidometry, and water displacement. **Urology**, 69(1): 152-157, 2007b.

SCOTT JR, R.T. e HOFMANN, G.E. Prognostic assessment of ovarian reserve. **Fertil Steril**, 63(1): 1-11, 1995.

SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **J Reprod Fertil**, 125: 769-784, 2003.

SHIRAISHI, K. e NAITO, K. Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the β subunit of the luteinizing hormone. **Endocr J**, 50(6): 733-737, 2003.

SMITS, G.; OLATUNBOSUN, O.; DELBAERE, A.; PIERSON, R.; VASSART, G.; COSTAGLIOLA, S. Ovarian hyperstimulation syndrome due to a mutation in the follicle-stimulating hormone receptor. **N Engl J Med**, 349(8): 760-766, 2003.

STYNE, D. Puberty. In: Greespan, FS and Gardner, DG (Ed). **Basic and Clinical Endocrinology**. San Francisco: Lange Medical Books/McGraw-Hill Companies, 556-561, 2001.

TALMADGE, K.; VAMVAKOPOULOS, N.; FIDDES, J. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. **Nature**, 307: 37-40, 1984.

TAPANAINEN, J.S.; AITTO MAKI, K.; MIN, J.; VASKIVUO, T.; HUHTANIEMI, I. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. **Nat Genet**, 15: 205-206, 1997.

THEMEN, A. e HUHTANIEMI, I. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. **Endoc Rev**, 21: 551-5, 2000.

THEMMEN, A. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms. **Reprod**, 130: 263-274, 2005.

TOLEDO, S.P.; BRUNNER, H.G.; KRAAIJ, R.; POST, M.; DAHIA, P.L.; HAYASHIDA, C.Y.; KREMER, H.T. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46,XX female. **J Clin Endocrinol Metabol**, 81(11): 3850-3854, 1996.

ULLOA-AGUIRRE, A. e TIMOSSO, C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. **Hum Reprod Update**, 4(3): 260-283, 1998.

VALDES-SOCIN, H.; SALVI, R.; DALY, A.F.; GAILLARD, R.C.; QUATRESOOZ, P.; TEBEU, P.M.; PRALONG, F.P.; BECKERS, A. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. **N Engl J Med**, 351: 2619-2625, 2004.

VAN CAUTER, E. e COPINSCHI, G. **Human pituitary hormones: circadian and episodic variations**. The Hague: Martinus Nijhoff, 1981,

VASSEUR, C.; RODIEN, P.; BEAU, I.; DESROCHES, A.; GERARD, C.; DE PONCHEVILLE, L.; CHAPLOT, S.; SAVAGNER, F.; CROUE, A.; MATHIEU, E.; LAHLOU, N.; DESCAMPS, P.; MISRAHI, M.A. Chorionic gonadotropin-sensitive mutation in the follicle-stimulating hormone receptor as a cause of familial gestational spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome. **N Engl J Med**, 349(8): 753-759, 2003.

WALSH, P.S.; METZGER, D.A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, 10(4): 506-513, 1991.

WEISS, J.; AXELROD, L.; WHITCOMB, R.; HARRIS, P.; CROWLEY, W.; JAMESON, J. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. **N Engl J Med**, 326(3): 179-183, 1992.

WELT, C. K.; MARTIN, K. A.; TAYLOR, A. E.; LAMBERT-MESSERLIAN, G. M.; CROWLEY, W. F., JR.; SMITH, J. A.; SCHOENFELD, D. A.; HALL, J. E. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. **J Clin Endocrinol Metab**, 82(8): 2645-2652, 1997.

XING, Y.; WANG, Q.; LEE, C. Evolutionary divergence of exon flanks: a dissection of mutability and selection. **Genetics**, 173(3): 1789-1791, 2006.

YOUNG, J.; COUZINET, B.; CHANSON, P.; BRAILLY, S.; LOUMAYE, E.; SCHAISON, G. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. **J Clin Endocrinol Metab**, 85(9): 3239-3244, 2000.

ZHANG, F.; PAKARAINEN, T.; POUTANEN, M.; TOPPARI, J.; HUHTANIEMI, I. The low gonadotropin-independent constitutive production of testicular testosterone is sufficient to maintain spermatogenesis. **PNAS**, 23(100): 13692-13697, 2003.

ZHANG, F.P.; POUTANEN, M.; WILBERTZ, J.; HUHTANIEMI, I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. **Mol Endocrinol**, 15(1): 172-183, 2001.

ANEXOS

ANEXO I



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Campus Universitário, Asa Norte – CEP 70910-9000 – Brasília, DF - Tel.: (061) 3307-2520 / 3273-4069

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de projeto: CEP-FM 062/2004

Título: Avaliação funcional da esteiroidogênese gonadal em portadores de hipogonadismo por deficiência isolada e FSH e combinada de FSH e LH

Pesquisador responsável: Adriana Lofrano Alves Porto

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de Responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo(s) de pesquisador(es)

Data de entrada: 02/12/2004

Proposição do(a) relator(a)

() **Aprovação**

() **Não aprovação**

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UnB: 14/01/2005

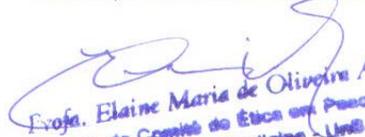
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UnB: 26/08/2006

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS Nº 196/96, que regulamenta a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 31/01/2007, conforme parecer do(a) relator(a), o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

- 1 – Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
- 2 – O(s) pesquisador(es) deve(m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 01 de fevereiro de 2007.


 Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves
 Coord. do Comitê de Ética em Pesquisa
 Faculdade de Medicina - UnB

Obs: O título original do projeto, bem como a descrição dos sujeitos do estudo, foi modificado junto ao CEP em julho/06 e passou a “Caracterização de mutações nos genes *FSHB* e *LHB* em portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico seletivo”.

ANEXO II
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO
(ESTUDO A)

Eu,....., abaixo assinado, declaro ter lido ou ouvido, e compreendido totalmente o presente termo de consentimento para a participação como voluntário(a) na pesquisa intitulada **“Avaliação funcional da esteroidogênese gonadal em pacientes portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico por deficiência isolada de FSH ou combinada de FSH e LH”**, o qual estabelece o seguinte:

Estou participando por minha livre e espontânea vontade, de uma pesquisa a respeito da doença de que sou portador, isto é, hipogonadismo hipogonadotrófico. Tenho conhecimento de que, devido a esta doença, não sou capaz de produzir os hormônios FSH e LH (ou FSH apenas), que são responsáveis pela estimulação dos ovários e testículos. Esta pesquisa servirá para demonstrar os efeitos da aplicação de FSH e LH sobre a produção dos hormônios do ovário ou testículo. Fui claramente informado a respeito das etapas dos exames que serão realizados ao longo da pesquisa, que estão descritas a seguir:

1. Após 30 dias sem usar nenhum remédio à base de hormônios, deverei tomar o remédio dexametasona 0,5 mg (01 comprimido de 6/6 horas, via oral), durante 4 dias e em seguida deverei comparecer à enfermaria do Hospital Universitário de Brasília para iniciar os exames, acompanhada pelos médicos responsáveis por esta pesquisa.
2. Já no HUB, serei submetida(o) inicialmente a uma ecografia (transvaginal ou pélvica ou testicular), e a um hemograma completo para certificação de que não tenha anemia ou infecção. Caso o resultado do meu hemograma esteja normal, ficarei internada(o) em enfermaria do Hospital durante 1 noite (cerca de 14 horas), quando será feita uma punção venosa para coleta de sangue e será colocada uma agulha que deverá ficar fixada na minha veia durante toda a noite, para que sejam feitas retiradas de pequenas quantidade de sangue (cerca de 3 ml) a cada 15 min, durante cerca de 12 horas. Ao término deste período, pela manhã, será aplicada uma injeção intra-muscular de Pregnyl ou Profasi HP 5000 UI e em seguida poderei retornar para casa, devendo continuar tomando a dexametasona de 6/6 horas. No dia seguinte, pela manhã, 24 horas após a injeção, será feita nova coleta de sangue (cerca de 10 ml).
3. Em seguida permanecerei mais 30 dias sem utilizar nenhuma medicação à base de hormônios. Após este período, deverei novamente utilizar o remédio dexametasona 0,5 mg (1 comprimido de 6/6horas, via oral) durante 4 dias e retornar ao hospital para novo exame como se segue: Pela manhã, será coletado sangue venoso (cerca de 10 ml) ; em seguida, será aplicada uma injeção subcutânea de Gonal ou Puregon 150 UI e retornarei para casa, continuando em uso da medicação dexametasona 0,5 mg 6/6 horas. No dia seguinte, 24 horas após, retornarei para nova coleta de sangue (cerca de 10 ml) seguida de 01 injeção intra-muscular de Pregnyl 5000UI e em seguida, retornarei para casa, ainda mantendo o uso da dexametasona. Por fim, no dia seguinte, 24 horas após, retornarei ao hospital para nova coleta de sangue(cerca de 10ml) e ecografia (transvaginal, pélvica ou testicular), quando termina este protocolo de exames.

Fui satisfatoriamente informado de que os procedimentos acima descritos NÃO resultam em riscos graves à minha saúde, apenas terei o desconforto das picadas de agulha para punções de veia e das aplicações de injeções.

Aceito fazer uso dos comprimidos de dexametasona, conforme a orientação dos médicos; Fui informado que estes comprimidos servem para controlar a produção de hormônios de uma glândula existente em meu corpo chamada adrenal, durante os exames. Fui alertado de que este remédio pode, às vezes, causar pequeno aumento de pressão ou dor de estômago, e que deverei informar imediatamente os médicos abaixo assinados caso eu observe qualquer efeito colateral. Também fui esclarecido de que estes efeitos não ocorrem sempre e que mais provavelmente não apresentarei efeitos colaterais.

As aplicações das injeções servem para estimular ou aumentar a produção de hormônios pelos meus ovários (ou testículos). Os médicos me explicaram que essas injeções são as mesmas utilizadas no tratamento de mulheres que desejam engravidar e nestes casos raramente elas podem provocar alguns efeitos colaterais como dor de cabeça, enjôos, cisto no ovário e resfriado. Os médicos me informaram ainda que essas injeções não costumam causar qualquer efeito colateral quando são aplicadas em apenas uma única dose para realização de exames, como será feito nesta pesquisa, porém devo comunicar aos médicos qualquer sintoma que eu apresente.

Fui ainda informado de que a minha participação nesta pesquisa é importante para os avanços dos conhecimentos da Medicina, que ocorrem através de estudos como este. Neste caso, este estudo poderá contribuir para melhorar o entendimento das doenças que causam infertilidade.

Entendi que deverei ficar 60 dias sem usar nenhuma medicação à base de hormônios, que não sejam aquelas prescritas pelos médicos abaixo assinados, durante todo o período em que durar este protocolo de exames, e que isto não trará nenhum prejuízo para minha saúde.

Poderei ter acesso a todas as informações e esclarecimentos que desejar, a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa e tenho assegurado o direito de abandonar a participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem qualquer consequência ou prejuízo para mim ou no meu atendimento, bastando para isto comunicar o meu desejo aos pesquisadores responsáveis.

Nenhum tipo de pagamento será feito pela minha participação como voluntário(a) nessa pesquisa, mas tenho a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de minha responsabilidade, inclusive o custo do transporte de minha residência para o HUB, nos dias de exames (calculado com base nas tarifas de ônibus vigentes).

Quando estiver concluída a pesquisa, poderei, sob minha expressa solicitação, ser informado(a) detalhadamente sobre os resultados e ter uma cópia da mesma.

Os pesquisadores garantem que qualquer informação pessoal bem como a minha participação serão mantidas sob sigilo, e a descrição e publicação dos resultados não resultará em identificação da pessoa examinada.

Sendo assim, concordo em participar da pesquisa acima descrita.

Brasília ,.....dede

Nome.....

Assinatura.....

Voluntário(a)

Nome.....

Assinatura.....

Pesquisador Responsável

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

Contato: ambulatório de Endocrinologia – HUB (segundas e quintas-feiras à tarde)

Fones: 9984-2469/ 442-8317

Orientador: Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo Motta

Contatos: ambulatório de endocrinologia – HUB (segunda-feira à tarde) e

Ambulatório de ginecologia endócrina – HUB (terça-feira à tarde) – FONE: 9214-5142

ANEXO III
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO
(ESTUDO B)

Eu,, abaixo assinado, declaro ter lido ou ouvido, e compreendido totalmente o presente termo de consentimento para a participação como voluntário(a) na pesquisa intitulada **“Caracterização de mutações nos genes FSH β e LH β em portadores de hipogonadismo hipogonadotrófico”**, o qual estabelece o seguinte:

Estou participando por minha livre e espontânea vontade, de uma pesquisa a respeito da doença de que sou portador (ou algum de meus parentes), isto é, hipogonadismo hipogonadotrófico. Tenho conhecimento de que, devido a esta doença, não sou capaz(ou meu parente) de produzir alguns tipos de hormônios (FSH e/ou LH), que são responsáveis pela estimulação dos ovários e testículos. Esta pesquisa servirá para verificar se existem causas genéticas para doenças que afetam a puberdade e a capacidade de ter filhos (fertilidade). É possível que estas doenças sejam causadas por problemas genéticos que podem ser herdados em pessoas da mesma família, e os médicos responsáveis por esta pesquisa estão tentando descobrir se há problemas nos genes destas pessoas, que possam causar infertilidade ou outros problemas de reprodução. Fui claramente informado sobre esta pesquisa e o exame que será realizado:

4. Serei solicitado a fornecer uma amostra de sangue de cerca de 20 ml; será feita punção na minha veia para coleta de sangue. Fui satisfatoriamente informado de que este procedimento NÃO resulta em riscos graves à minha saúde, apenas terei o desconforto da picada de agulha para punções de veia.

A partir da coleta do sangue, serão cultivadas as células brancas do meu sangue para obter DNA (o meu código ou identidade genética), para que nele sejam estudados alguns genes que possam estar alterados e causar doenças.

O resultado desta pesquisa poderá mostrar a causa do meu problema de infertilidade ou deficiência de hormônios. Isso poderá ajudar a mim diretamente ou apenas ser útil para o diagnóstico de outros membros da família ou outras pessoas que tenham o mesmo problema.

Fui informado de que a minha participação nesta pesquisa é importante para os avanços dos conhecimentos da Medicina, que ocorrem através de estudos como este. Neste caso, este estudo poderá contribuir para melhorar o entendimento das doenças que causam infertilidade.

Poderei ter acesso a todas as informações e esclarecimentos que desejar, a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa e tenho assegurado o direito de abandonar a participação nesta pesquisa a qualquer momento, sem qualquer consequência ou prejuízo para mim ou no meu atendimento, bastando para isto comunicar o meu desejo aos pesquisadores responsáveis.

Nenhum tipo de pagamento será feito pela minha participação como voluntário(a) nessa pesquisa, mas tenho a garantia de que todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa não serão de minha responsabilidade, inclusive o custo do transporte de minha residência para o HUB, nos dias de exames (calculado com base nas tarifas de ônibus vigentes).

Quando estiver concluída a pesquisa, poderei, sob minha expressa solicitação, ser informado(a) detalhadamente sobre os resultados e ter uma cópia da mesma.

Os pesquisadores garantem que qualquer informação pessoal bem como a minha participação serão mantidas sob sigilo, e a descrição e publicação dos resultados não resultará em identificação da pessoa examinada.

Sendo assim, concordo em participar da pesquisa acima descrita.

Brasília,dede

Nome.....

Assinatura.....

Voluntário(a)

Nome.....

Assinatura.....

Pesquisador Responsável

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:

Dra. Adriana Lofrano Alves Porto

Endocrinologista – Hospital Universitário de Brasília

Contato: ambulatório de Endocrinologia – HUB (segundas e quintas-feiras à tarde)

Fones: 9984-2469/ 3442-8317

Orientador: Dr. Luiz Augusto Casulari Roxo Motta

Contatos: ambulatório de endocrinologia – HUB (segunda-feira à tarde)

Fones: 9214-5142

ANEXO IV

(Artigo referente aos resultados do ESTUDO A. Manuscrito em fase de revisão final para publicação no *Fertility and Sterility*)

Effects of follicle-stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotropin (hCG) on gonadal steroidogenesis in two siblings with an FSH beta-subunit mutation

Adriana Lofrano-Porto, M.D.^a

Luiz Augusto Casulari, Ph.D.^a

Paula P Nascimento, MS-4^a

Leonardo Giacomini, MS-5^a

Luciana A Naves, Ph.D.^a

Lucilia Domingues Casulari da Motta, Ph.D.^b

Lawrence C Layman, M.D.^c

University Hospital of Brasília, University of Brasília, Brasília, DF, Brazil and Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA.

Financial support and conflict of interest disclosure: The authors have nothing to disclose.

Presented at the 27th Brazilian Congress of Endocrinology and Metabolism, Recife, PE, Brazil, September 06 to 09, 2006.

Department affiliations:

^aSection of Endocrinology, Department of Medicine, Faculty of Medicine, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia (UnB), Brasilia, DF, BRAZIL.

^bSection of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University Hospital of Brasilia, University of Brasilia (UnB), Brasília, DF, BRAZIL;

^cSection of Reproductive Endocrinology, Infertility, & Genetics, Department of Obstetrics & Gynecology; Reproductive Medicine Program, Developmental Neurobiology Program, The Institute of Molecular Medicine and Genetics, The Neuroscience Program, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA.

Reprint requests: Adriana Lofrano-Porto, M.D., SHIN QI 12 conjunto 02 casa 16,

Lago Norte - Brasilia – DF, Brazil – CEP 71525-220

Phone/Fax: 55 – 61 – 3442-8367; e-mail: adlofrano@unb.br

ABSTRACT

Objective: To quantify gonadal steroid responses to different gonadotropin regimens.

Design: Transversal clinical study.

Setting: Academic medical center.

Patients: A 41 year-old female and her 37 year-old brother with isolated FSH deficiency (IFSHD) due to a homozygous Tyr76X FSH beta-subunit gene (*FSHB*) mutation.

Interventions: Initially, serial LH samples were drawn overnight. Following two-day dexamethasone suppression, steroids were measured at baseline and after hCG, rFSH, or hCG+rFSH administration.

Main Outcome Measures: Pulse number, peak amplitude, and mean overnight LH levels, as well as basal and stimulated FSH, LH, testosterone, estradiol, DHEAS, 17-hydroxyprogesterone, and androstenedione.

Results: The mean \pm SD overnight LH was 49.2 \pm 5.7mIU/mL and 9.1 \pm 2.9mIU/mL; there were 8pulses/8h and 9pulses/9h, with mean amplitudes of 53.4 \pm 6.5mIU/mL and 11.7 \pm 1.9mIU/mL, for the female and male, respectively. There was no steroid response to rFSH, hCG, or hCG+rFSH in this female. In the male, testosterone increased after hCG, rFSH, and hCG+rFSH, whereas estradiol, androstenedione, and 17-hydroxyprogesterone increased only after hCG+rFSH.

Conclusions: This report constitutes the first detailed endocrine study of a male with IFSHD due to an *FSHB* mutation and suggests that IFSHD in both sexes severely affects gametogenesis, but males may have a less severe phenotype due to sex-specific effects of LH.

Key words: FSH deficiency, *FSHB* mutation, ovary, testes, gonadal steroidogenesis

INTRODUCTION

The pituitary gonadotropins LH and FSH are the main regulators of gonadal steroid secretion, pubertal maturation and fertility. Naturally occurring human inactivating mutations of the genes encoding gonadotropin subunits and their receptors have been shown to be rare, although they have contributed significantly for elucidating some aspects of reproductive physiology and physiopathology. However, despite major advances over the last years, many reproductive disturbances still remain idiopathic (1;2).

Three inactivating *FSHB* mutations have been characterized in women, which resulted in a similar phenotype of delayed puberty, absent or incomplete breast development, primary amenorrhea and infertility, with low levels of estradiol and progesterone, high LH and undetectable FSH (3-6). A detailed study of ovarian function from one of these FSH-deficient women showed no clinical or laboratory effects of LH excess(7;8). These findings provide supportive evidence that FSH is not necessary for the development of small, normal antral follicles readily responsive to FSH, although it later becomes important for full development and function of theca cells (8).

Only three men with inactivating *FSHB* mutations have been described (5;9;10). All of them were azoospermic but two had normal puberty associated with normal to low-normal testosterone and high LH levels (5;9), while the third presented with low testosterone concentration and absent puberty (10). This phenotype is apparently discordant to the variable degree of oligospermia and decreased fertility (but not infertility) that was observed in five men homozygous for inactivating FSH receptor mutation (11). The reasons for these discrepancies between *FSHB* and FSH receptor gene mutations effects on the impairment of spermatogenesis and perhaps on testicular testosterone production remain to be elucidated.

The aim of this study was to assess ovarian and testicular stimulated steroid production capacity in response to exogenous gonadotropins. For this purpose, we performed the analysis of the gonadal steroid response to hCG and FSH stimulus in two siblings, a male and a female, with the inactivating Tyr76X *FSHB* gene mutation (5). To our knowledge, this report also constitutes the first detailed endocrine study of a male with selective FSH deficiency due to an *FSHB* mutation. This pathological condition provides the opportunity to assess *in vivo* the physiological roles of gonadotropins on gonadal compartments paracrine regulation, in both sexes.

PATIENTS AND METHODS

Two siblings, a male and a female, previously demonstrated to be homozygous for the Tyr76X *FSHB* gene mutation were included in the study. The detailed clinical characteristics of the patients were described in a previous publication (5). Briefly, the female presented with primary amenorrhea, partial breast development (Tanner stages II-III) and a low estradiol. Her brother had normal sexual maturation and an adult testosterone level, but was infertile. At the time of the endocrine evaluation for this study, the proband was a healthy 41-year-old Brazilian woman who was receiving cyclic estrogen – progesterone treatment, which was discontinued one month before and during the evaluation protocol. Her brother was a 37 year-old male, with small testes, azoospermia, and mild bilateral gynecomastia. He had normal libido, normal erections and ejaculation. Basal and stimulated serum FSH levels were undetectable, while LH was elevated in both patients (5).

Endocrine Evaluation Protocol

The protocol was adapted from Barnes *et al* (7;8) and is summarized in [Figure 1](#). Initially, patients were submitted to overnight serum LH sampling every 15 min from 9:00pm to 5:00am at

the Endocrinology Unit of the University Hospital of Brasília, Federal District, Brazil. The female also underwent a pelvic ultrasound examination. Afterwards, the patients were given dexamethasone 0.5 mg four times daily for 48 hours before and continuing throughout the protocol, in order to suppress adrenal function. In the third morning after dexamethasone was started, a human chorionic gonadotropin (hCG) test was performed as follows: a blood sample was drawn for basal estradiol (E2), progesterone (P), testosterone (T), androstenedione (AD), 17-hydroxyprogesterone (17OHP) and dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) measurements. Then hCG 5000 UI (Choragon, Ferring Pharmaceuticals) was administered IM and, 24 h after the hCG stimulus, blood was drawn for repeat hormone measurements.

The second part of the endocrine evaluation protocol was performed one month after the first hCG test following a similar adrenal suppression period. A baseline sample was drawn followed by administration of 300 IU SC of recombinant FSH (rFSH) (Puregon; Organon). In the next morning, 24 h later, a blood sample was drawn for hormones measurements after FSH stimulus, and then hCG 5000 IU was administered i.m. The last sample was drawn 24 h after hCG (48h after rFSH) for repeat hormone measurements (Figure 1). The doses of exogenous hCG and rFSH were identical to those used in the Barnes's study (7;8).

Hormonal Assays and Analysis

Serum LH and FSH concentrations were determined by commercial, solid-phase, two-site chemiluminescent immunometric assays (IMMULITE 2000; EURO/DPC, United Kingdom). Estradiol, progesterone, testosterone, androstenedione and SDHEA were measured by commercial, solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (IMMULITE 2000; EURO/DPC, United Kingdom). 17OHP and Inhibin B were measured by enzyme immunoassays (Diagnostics Systems Laboratories, Inc, Webster, Texas, USA). The intra and

interassay coefficients of variation were less than 8% and 10% respectively for all hormones, except LH. For the serial LH assays, the intra-assay coefficients of variation were 13% for values of 0.15mIU/mL and <5% for values >0.3mIU/mL. LH pulse analysis was performed using the ULTRA Program (12).

The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Brasília, Federal District, Brazil and appropriate written informed consent was obtained from the patients.

RESULTS

Female

Pelvic ultrasound using an abdominal probe prior to FSH stimulation demonstrated small fusiform hypotrophic ovaries, with no identifiable antral follicles. There was no visible change after acute stimulation with FSH (Image not shown). Baseline immunoactive FSH was undetectable and LH was high (51.9 mIU/mL). The mean immunoactive LH in the overnight samples was 49.2 ± 5.7 mIU/mL (mean \pm SD) and there were 8 pulses detected in 8 hours with a mean pulse amplitude = 53.4 ± 6.5 mIU/mL (Figure 2). As shown in Table 1, all serum steroids levels after two days of dexamethasone suppression were less than the lower limits of detection and did not rise after hCG or FSH stimulation. Unfortunately, it was not possible to have inhibin B assays run on the samples from the female patient, for unforeseen reasons.

Male

Baseline FSH was undetectable and LH was elevated (17.9 mIU/mL). Upon serial LH sampling, the mean overnight LH level was 9.1 ± 2.9 mIU/mL and there were 9 pulses in 9 hours with a mean pulse amplitude = 11.7 ± 1.9 mIU/mL (Figure 2). As shown in Table 2, in contrast to

the female, the male patient had lower baseline LH levels and a normal testosterone value at baseline. Testosterone increased after hCG (55%), FSH (76%), and hCG+FSH (68%) stimulation. Moreover, it appeared that the T precursor, androstenedione, also increased after hCG (125%), FSH (40%), and hCG+FSH (140%) stimulation. Interestingly, hCG apparently diminished the level of 17OHP (- 83%) and FSH stimulation resulted in only a modest rise (14%), whereas a huge stimulatory response of 17OHP level after FSH+hCG was observed (238 %). Estradiol levels changed little following hCG (from undetectable to 43pg/mL) or FSH; however, the level more than doubled following FSH+hCG. DHEAS levels did not change after each stimulus. Inhibin B level was very low at baseline and increased after FSH stimulation, although not to a normal level (from 10 to 58 pg/mL, respectively; normal range: 80-300 pg/mL), whereas showing no further increase after hCG stimulation (57 pg/mL) (Table 2).

DISCUSSION

Normal pubertal development and reproductive function depend on complex interactions between the actions of FSH and LH on their specific receptors on target cells (13). In the ovary, FSH receptors (FSHR) are present only on granulosa cells of growing follicles, where FSH exerts its known fundamental role on the regulation of the progression of the later stages of folliculogenesis (14). In women, FSH is responsible mainly for granulosa cell proliferation and consequently follicular growth and maturation beyond the initial phases of follicle development, which may occur independently of gonadotropins (14). However, it is intriguing that FSHR messenger RNA (mRNA) has been found to be expressed as early as the primary follicle stage(15), making it possible that FSH may have a role on preantral stages of folliculogenesis, although this is not completely understood. Moreover, decreased FSH responsiveness of isolated follicles has been associated with atresia (14). Upon acting on maturing follicles, FSH

progressively induces the expression of genes involved in the secretion of granulosa cells products, like peptides (activin, follistatin and, mainly, inhibin B) and steroid hormones, thus having an essential but not exclusive role on the phenomenon of dominance. With the progression of dominant follicular maturation, FSH regulates the expression of LH receptors on luteinized granulosa cells, thus making them responsive to LH in an up-regulated manner(14).

In the testis, FSH actions are even more unclear. FSH stimulates Sertoli cell proliferation and maturation during puberty. In addition, FSH also plays a fundamental role on the initiation of qualitatively and quantitatively normal spermatogenesis, acting synergistically with testosterone. FSH receptors are present exclusively on Sertoli cells, where FSH induces secretion of many proteins including inhibin B, androgen-binding protein, insulin-like growth factor I (IGF-I), transferrin, ceruloplasmin, plasminogen activator, and aromatase inhibitor, among others, which could mediate germ cell maturation indirectly (16). Some previous *in vitro* and *in vivo* animal studies have suggested that FSH may also exert an indirect stimulatory effect on Leydig cells, resulting in increased steroidogenesis and LH receptor expression (16;17). As such, FSH would act as a paracrine regulator of spermatogenesis and Leydig cell steroidogenesis, by mechanisms not yet completely understood. However, this concept is still a matter of debate since other studies performed in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism have not confirmed these findings (18).

The purpose of the present study was to determine the steroidogenic response of the gonads from two siblings, one male and one female, with isolated FSH deficiency due to homozygous mutations in the *FSHB* gene. Studying both the male and female from the same family affords the opportunity to determine gonadal function in patients with the same ethnic and genetic background, thereby reducing these effects upon the phenotype.

Although she has isolated FSH deficiency, the administration of FSH had little effect upon granulosa cell function in the female with IFSHD, as indicated by a lack of increase in estradiol and other ovarian steroids. In fact, her estradiol was undetectable at baseline and after 300IU rFSH. This finding was somewhat unexpected for several reasons. First, the patient had a history of spontaneous breast development, compatible with some, albeit low, estrogen production (5). Second, a previously described FSH-deficient woman had antral follicles observed on transvaginal ultrasonography, and she showed prompt estradiol (from undetectable to 80pg/mL) and inhibin B responses to exogenous FSH administration, suggesting normal granulosa cell development to the antral follicle stage despite the absence of FSH(7;8). Third, two other women clinically diagnosed with isolated FSH deficiency have achieved successful pregnancy after approximately 14 days of menotrophins, implying that some healthy follicles have reached the point of recruitability in spite of the absence of FSH (3;7;8). Unfortunately, inhibin B assays were unavailable for the endocrine evaluation protocol of this FSH-deficient female.

Our female patient had little ovarian response to either hCG, rFSH, or both when administered in the current protocol. The female with IFSHD studied by Barnes *et al* (7;8) had no testosterone response to hCG alone, but demonstrated a three-fold increase in testosterone following both rFSH and hCG at doses comparable to those in the present study. However, our patient is currently 41 years of age in contrast to the patient reported by Barnes *et al*, who was 21-years-of age. It also has been described that ovarian androgen secretion capacity may decline in response to hCG stimulation even before the age of 30 years (19). It is also possible that the absent ovarian steroidogenic response to exogenous rFSH could be due to diminished ovarian reserve, related to the patient's advanced age. However, since FSH is low because of a mutation in the beta subunit gene, it cannot rise as it would in other women with diminished ovarian

reserve. It is currently unknown if the response could be related to poorly developed granulosa cells in the absence of FSH or perhaps to accelerated follicular apoptosis or atresia (14). Endocrine studies in additional women with congenital IFSHD, although uncommon, are needed to clarify these particular aspects of follicular development physiology.

The phenotype of isolated FSH deficiency in males has been more variable and generally less severe than that of females. Normal to low testosterone levels would be expected based on the observations of the male *FSHB* knockout mice phenotype, although these animals displayed some degree of spermatogenesis and preserved, although reduced, fertility (20). Of the two other FSH-deficient men previously characterized at the molecular level (9;10), the one with the Cys82Arg mutation had a phenotype which was similar to our male with regard to pubertal development (9). The male with the Val61X mutation had the most severe endocrine deficiency, as evidenced by the lack of puberty and a prepubertal serum testosterone level (10). In the present study, we extend the findings of men with IFSHD since the steroidogenic response of the testis from the FSH deficient patient was evaluated by selectively stimulating Leydig and Sertoli cells with hCG and FSH respectively, thus providing an *in vivo* human model to assess the physiological importance of the paracrine regulation of Leydig cells by Sertoli cells. It is noteworthy that the male's LH hypersecretion in the present case was not as high as the female's, probably because of negative feedback accounted by normal testosterone secretion.

Our finding of testosterone and its precursor androstenedione increase after rFSH stimulus in this FSH-deficient male is unique and corroborates some experimental data from *in vitro* and *in vivo* studies in animals, which suggest that FSH-stimulated Sertoli cells can enhance LH induced Leydig cell testosterone production (16;17). It is well established that FSH receptors are present exclusively on Sertoli cells and such a stimulatory effect of FSH on Leydig cell testosterone secretion would be indirectly mediated by paracrine factor(s) secreted by those cells.

Indeed, a protein secreted by Sertoli cells *in vitro* has been reported to stimulate steroidogenesis in the Leydig cell, although this action has not yet been confirmed *in vivo* (21). Similarly, FSH administration in hypophysectomized animals has been shown to increase both Leydig cell steroidogenesis and LH receptors (17). On the other hand, a study of a series of six patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism has not shown evidence of such a stimulatory effect of rFSH on Leydig cell androgen secretion (18). A possible reason for this apparent discrepancy could be because the male in the present case, contrary to those previously reported (17;18), had preserved LH secretion. Normal LH secretion could account for the relative healthy status of his Leydig cells, which retained the capacity to respond promptly to acute gonadotropins stimulation by increasing androgen secretion to either hCG alone, FSH alone, or to both FSH and hCG. Our observations also suggest that Leydig cells can remain functional in the complete absence of FSH activity, although with a reduced basal testosterone secretion capacity, which can be enhanced by rFSH stimulation. These observations are in agreement to previous studies with FSHr knock out mice (17).

Finally, in this male with IFSHD, we observed a modest increase in estradiol secretion after hCG alone or after rFSH alone, but estradiol more than doubled after both hCG+rFSH. These findings may suggest that testicular aromatase activity in this FSH-deficient man is regulated primarily by LH (reproduced by hCG stimulation), but is augmented by rFSH administration. Indeed, previous studies have demonstrated testicular aromatase activity and estrogen secretion in humans mainly in Leydig cells; however, the Sertoli cells are able to synthesize estradiol *in vitro* (22). Similarly, in rodents, it has been demonstrated that Leydig cells synthesize estrogen in adults, whereas Sertoli cells are the major source in immature animals (22). Although peripheral aromatization of testicular androgens could be an alternative

interpretation for the present results, additional studies will be necessary to clarify the origin and regulation of aromatase and estradiol production in the human testis.

In conclusion, our findings in these siblings with IFSHD suggest that, in men, FSH may have a positive regulatory effect on healthy LH-stimulated Leydig cells probably mediated by its primary tropic action on the Sertoli cell, in a paracrine mechanism. Further studies are necessary to characterize the exact signaling mechanisms by which Sertoli cells mediate the increase in Leydig cell androgen secretion in humans. The lack of ovarian response to exogenous gonadotropins in this 41-year-old female with IFSHD suggests that with advancing age, the gonadal response may diminish with age without elevations in serum FSH. This report constitutes the first detailed endocrine study of a male with isolated FSH deficiency due to an *FSHB* mutation and suggests that isolated FSH deficiency in both sexes severely affects gametogenesis, but males may have a less severe phenotype due to sex-specific effects of LH.

Acknowledgements: We are greatly indebted to Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasilia, Federal District, Brazil, for gently providing hormonal assays; to Rachel Leproult, University of Chicago, Illinois, USA, who kindly performed the LH pulse analysis; to the residents in endocrinology at the University Hospital of Brasilia, for their contribution on blood samples collection; and to Dr. Ana Claudia Latronico, from Sao Paulo University Medical School, Sao Paulo, Brazil, for gently providing the Inhibin B assay performed on samples from the male patient.

REFERENCES

1. Huhtaniemi IT, Themmen APN. Mutations in human gonadotropin and gonadotropin-receptor genes. *Endocrine* 2005; 26(3):207-217.
2. Huhtaniemi I. Mutations along the pituitary - gonadal axis affecting sexual maturation: novel information from transgenic and knockout mice. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 254:84-90.
3. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, *et al.* Primary amenorrhea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet* 1993; 5(1):83-86.
4. Layman LC, Lee EJ, Peak DB, Namnoum AB, Vu KV, van Lingen BL, *et al.* Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 1997; 337(9):607-611.
5. Layman LC, Porto ALA, Xie J, da Motta LA, da Motta LCD, Weiser W, *et al.* *FSHB* gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8):3702-3707.
6. Berger K, Souza H, Brito VN, d'Alva CB, Mendonca BB, Latronico AC. Clinical and hormonal features of selective follicle-stimulating hormone (FSH) deficiency due to FSH beta-subunit gene mutations in both sexes. *Fertil Steril* 2005; 83(2):466-470.
7. Barnes RB, Rosenfield RL, Namnoum A, Layman LC. Effect of follicle-stimulating hormone on ovarian androgen production in a woman with isolated follicle-stimulating hormone deficiency. *N Engl J Med* 2000; 343(16):1197-1198.

8. Barnes RB, Namnoum AB, Rosenfield RL, Layman LC. The role of LH and FSH in ovarian androgen secretion and ovarian follicular development: clinical studies in a patient with isolated FSH deficiency and multicystic ovaries. *Hum Reprod* 2002; 17(1):88-91.
9. Lindstedt G, Nystrom E, Matthews C, Ernest I, Janson PO, Chatterjee K. Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSHB gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(8):663-665.
10. Phillip M, Arbelle JE, Segev Y, Parvari R. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *N Engl J Med* 1998; 338(24):1729-1732.
11. Tapanainen JS, Aittomaki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet* 1997; 15(2):205-206.
12. Van Cauter E, Copinschi G. *Human Pituitary Hormones: Circadian and Episodic Variations*. The Hague: Martinus Nijhoff, 1981.
13. Carr BR. Disorders of the Ovary and Female Reproductive Tract. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. *Williams Textbook of Endocrinology*. 9th ed. Philadelphia: Saunders; 751-817, 1998.
14. Richards JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr Rev* 1994; 15(6):725-751.

15. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(11):3748-3751.
16. Levalle O, Zylbersztein C, Aszpis S, Aquilano D, Terradas C, Colombani M, Aranda C, *et al.* Recombinant human follicle-stimulating hormone administration increases testosterone production in men, possibly by a Sertoli cell-secreted nonsteroid factor. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83(11):3973-3976.
17. Krishnamurthy H, Kats R, Danilovich N, Javeshghani D, Sairam MR. Intercellular communication between Sertoli cells and Leydig cells in the absence of follicle-stimulating hormone-receptor signaling. *Biol Reprod* 2001; 65:1201-1207.
18. Young J, Couzinet B, Chanson P, Brailly S, Loumayer E, Schaison G. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(9):3239-3244.
19. Piltonen T, Koivunen R, Ruokonen A, Tapanainen JS. Ovarian Age-Related Responsiveness to Human Chorionic Gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(7):3327-3332.
20. Kumar TR, Wang Y, Lu NF, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet* 1997; 15(2):201-204.

21. Boujrad N, Ogwuegbu SO, Garnier M, Lee CH, Martin BM, Papadopoulos V.
Identification of a stimulator of steroid hormone synthesis isolated from testis.
Science 1995; 268(5217):1609.

22. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinska B, Bourguiba S.
Aromatase expression and role of estrogens in male gonad : a review. *Reprod Biol
Endocrinol* 2003; 1(1):35.

TABLE/ FIGURE LEGENDS

Table 1. Hormonal data obtained from hCG and FSH stimulation tests in a 41 year-old FSH-deficient woman due to the *FSHB* gene mutation Tyr76X.

Table 2. Hormonal data obtained from hCG and FSH stimulation tests in a 37 year-old FSH-deficient man due to the *FSHB* gene mutation Tyr76X.

Figure 1. Schematic representation of the endocrine evaluation protocol. First, serial samples of LH were drawn overnight. Thereafter, following dexamethasone suppression for two days, serum steroids were measured at baseline and repeated after hCG administration, and, one month later, after hCG+rFSH administration. Gonadotropins administration is represented as long arrows above the horizontal line and blood samples collections for steroid data, as short arrows below. Adapted from Barnes *et al* (7).

Figure 2. Overnight LH profile from the female (top) and male (bottom) FSH-deficient patients. LH was measured at 15 min intervals over 8 h for the female and 9 hours for the male. LH pulses are shown by asterisks.

Table 1. Hormonal data obtained from hCG and FSH stimulation tests in a 41 year-old FSH-deficient woman due to the *FSHB* gene mutation Tyr76X.

	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Estradiol (pg/ml)	Progesterone (ng/ml)	Testosterone (ng/dl)	AD (ng/ml)	170HP (ng/ml)	SDHEA (µg/ml)
Stimulation								
Test 1 ^a								
Prior hCG	0.1	51.9	<20	0.36	<20	<0.3	8	15
After hCG	0.1	52.6	<20	0.35	<20	<0.3	5	15
Stimulation								
Test 2 ^b								
Prior FSH	0.1	51.5	<20	<0.2	<20	<0.3	8	15
After FSH	4.74	43.8	<20	<0.2	<20	<0.3	6	15
After								
hCG+FSH	4.59	45.5	<20	<0.2	<20	<0.3	4	15
Normal								
baseline								
values	4.0-13.0	1.0-18.0	9.0-221	0.33-1.2	<100	0.3-3.3	19-182	34-430

^a Stimulation Test 1: Baseline and 24 hours after hCG

^b Stimulation Test 2: Baseline, 24 h after FSH, and 24h after hCG (48h after FSH).

hCG: human chorionic gonadotropin, FSH: Follicle-stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone; AD: Androstenedione; 170HP: 17hydroxi-progesterone; SDHEA: Dehydroepiandrosterone sulphate; Normal baseline values for follicular phase, as defined by assays manufacturers.

Table 2. Hormonal data obtained from hCG and FSH stimulation tests in a 37 year-old FSH-deficient man due to the *FSHB* gene mutation Tyr76X.

	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	Estradiol (pg/ml)	Testosterone (ng/dl)	AD (ng/ml)	170HP (ng/ml)	SDHEA (µg/ml)	Inhibin B (pg/ml)
Stimulation								
Test 1 ^a								
Prior hCG	0.1	17.9	<20	357	0.4	568	107	
After hCG	0.1	7.42	43.2	554	0.9	310	108	
Stimulation								
Test 2 ^b								
Prior FSH	0.1	12.7	54.3	334	0.5	245	124	10
After FSH	6.84	16.4	60	589	0.7	280	110	58
After								
hCG+FSH	4.42	7.47	115	561	1.2	830	118	57
Normal								
baseline								
values	4.0-8.0	2.0-12.0	ND-70	270-1734	0.4-3.5	60-342	80-560	80-300

^a Stimulation Test 1: Baseline and 24 hours after hCG.

^b Stimulation Test 2: Baseline, 24 h after FSH, and 24h after hCG (48h after FSH).

hCG: human chorionic gonadotropin, FSH: Follicle-stimulating hormone; LH: Luteinizing hormone; AD: Androstenedione; 170HP: 17hydroxi-progesterone; SDHEA: Dehydroepiandrosterone sulphate; Normal values as defined by assays manufacturers.

Figure 1

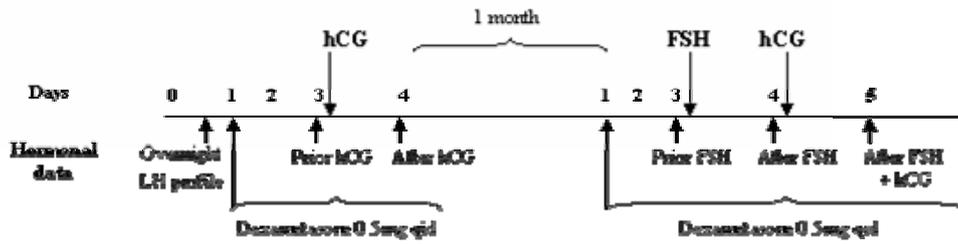
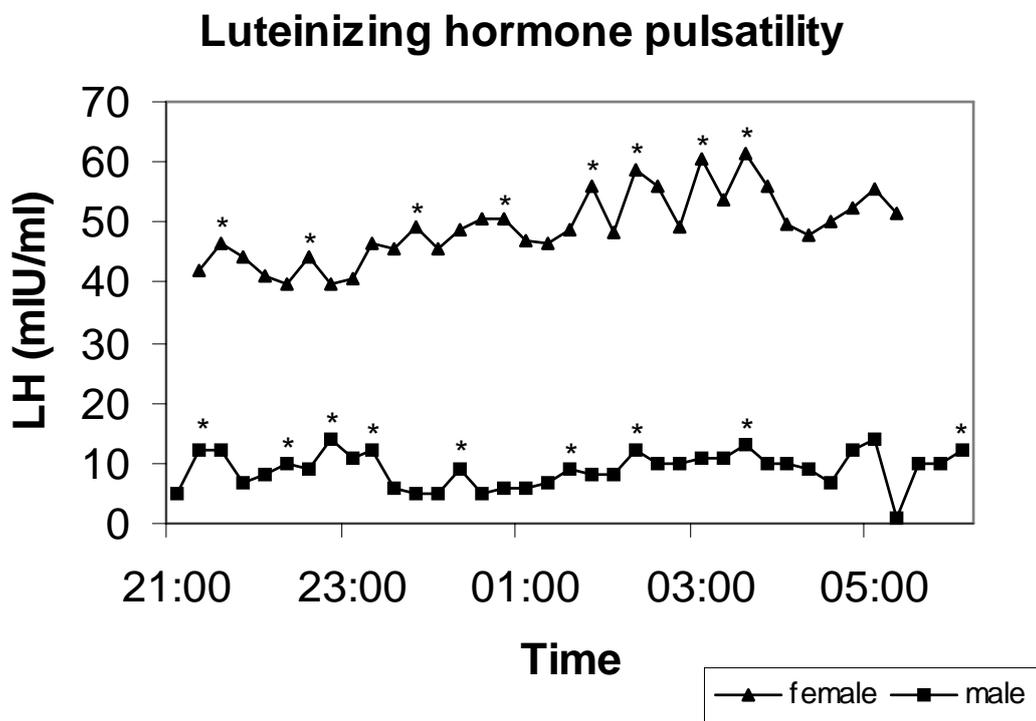


Figure 2



ANEXO V

(Artigo referente aos resultados do ESTUDO B, aceito para publicação no *The New England Journal of Medicine*)

Luteinizing Hormone Beta Mutation induces hypogonadism in men and women

Adriana Lofrano-Porto, M.D.^{1*}, Gustavo Barcelos Barra, Pharm.D.^{2,4*}, Leonardo Abdala Giacomini^{1**}, Paula Pires Nascimento^{1**}, Ana Claudia Latronico, M.D.³, Luiz Augusto Casulari, M.D.¹, Francisco de Assis da Rocha Neves, M.D.⁴.

¹Section of Endocrinology, University Hospital of Brasilia, Faculty of Medicine, University of Brasilia - UnB, Brasilia, DF, Brazil. ²Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasilia, DF, Brazil. ³Developmental Endocrinology Unit, Hormone and Molecular Genetic Laboratory LIM/42, Sao Paulo University Medical School, Sao Paulo, SP, Brazil. ⁴Molecular Pharmacology Laboratory, Faculty of Health Sciences, University of Brasilia – UnB, Brasilia, DF, Brazil.

*ALP and GBB contributed equally to this article.

** LAG and PPN are undergraduate medical students.

Short title: LH beta-subunit gene mutation in both sexes

Key words: LH deficiency, *LHB*, hypogonadotropic hypogonadism

Word count: Text: 2383; Summary: 97; Table: 1; Figures: 2; References: 25; Supplemental data: Table: 1; Figure 1.

Corresponding author: Adriana Lofrano-Porto, M.D.

University Hospital of Brasília
Section of Endocrinology
SHIN – QI 12 – conjunto 02 – casa 16
Lago Norte – Brasília – DF
Brazil – CEP 71525-220
Phone/Fax: 55 – 61 – 3442-8367
Email: adlofrano@unb.br

SUMMARY

Selective luteinizing hormone (LH) deficiency due to mutations in the LH beta-subunit (*LHB*) gene is a rare cause of hypogonadism. We describe the clinical features of a consanguineous family in which three siblings, two men and one woman, had hypogonadism related to isolated LH deficiency. These patients carry a novel homozygous 5'-splice site mutation of the LH beta-subunit (*LHB*) gene. An IVS2+1G>C mutation disrupted mRNA splicing, generating a gross abnormality on LH beta-subunit mRNA processing, which abrogated LH secretion. We also characterized the female phenotype of an *LHB* mutation by normal pubertal development, secondary amenorrhea and infertility.

INTRODUCTION

Luteinizing hormone (LH) plays an essential role in normal pubertal development and reproductive function in humans. It consists of two glycosylated, non-covalently linked subunits: a hormone-specific beta subunit and an alpha subunit common to all members of the glycoprotein hormone family, hereafter called alpha subunit. Selective LH deficiency is predicted to severely compromise reproductive capacity in both sexes (1,2).

To date, inactivating mutations of the human LH beta-subunit (*LHB*) gene have been described in three men with hypogonadism (3-5), who had normal genitalia at birth, but had absent pubertal development and infertility due to selective LH deficiency. However, the female phenotype of such inactivating mutations in the *LHB* gene remains unknown. In the present study, we describe the clinical and hormonal characteristics of three siblings, two men and a woman, all of whom have hypogonadism due to a novel mutation of the *LHB* gene. Women have not previously, to our knowledge, been reported as affected by an *LHB* mutation.

SUBJECTS

The proband (II-5; Figure 1A), a 38-year-old Brazilian man, born to consanguineous parents, was referred to the Endocrinology Unit of the University Hospital of Brasilia for hypogonadism. He presented with eunuroid habitus, juvenile voice and bilateral gynecomastia, with scant axillary and absent facial hair (see footnote of Table 1). He was 181 cm tall, weighed 87 Kg and had an arm span of 193 cm. He had a micropenis (4.5 cm, normal \pm SD: 13.3 ± 3.8 cm) and underdeveloped though descended testes. The results of the initial laboratory tests are summarized in Table 1.

LH was undetectable and follicle-stimulating hormone (FSH) levels were high, both at baseline and after gonadotropin-releasing hormone (GnRH) stimulation. Serum testosterone level was low, free alpha-subunit was high and inhibin B level was normal. Estradiol level was normal. He was azoospermic. A testicular ultrasound showed heterogeneous, hypoechogenic testes, with diffuse microlithiasis and confirmed the clinically reduced testicular volume (right 5.0 cm³; left 4.6 cm³). Magnetic resonance imaging (MRI) of the brain and pituitary gland was normal. Karyotype was 46XY. A diagnosis of hypogonadism due to selective LH deficiency was made. Treatment with intramuscular testosterone (Durateston, Akzo Organon – 250 mg every three weeks) was initiated. Over 12 months, testosterone induced virilization, penile growth to 9 cm, as well as an increase in testicular volume to 7.1 cm³ (right) and 6.6 cm³ (left), a total testicular volume increase of 42.7%.

The proband's 30-year-old brother (II-10) was treated for hypogonadism with intramuscular testosterone from the age of 25 years. He reported significant penile and also testicular growth after treatment, but he remained azoospermic. On admission, he had normal male genitalia with no gynecomastia; Tanner stage was G5P5, penile length 9 cm. Ultrasound revealed testicular volumes of 10.7 cm³ (right) and 8.2 cm³ (left). Hormonal profile was similar to his brother's (Table 1). A testicular biopsy specimen showed interstitial fibrous thickening, hypoplastic seminiferous tubules with predominance of Sertoli cells, spermatogenic arrest, and absent Leydig cells.

The proband's 28-year-old sister (II-13) presented with secondary amenorrhea and infertility. She had spontaneous normal pubertal development and menarche at the age of 13, followed by oligomenorrhea. Her weight was 56 kg and height 166 cm. She had normal breast and pubic hair development (Tanner stage M5P5, Figure 1B). Pelvic ultrasound revealed a normal uterus (volume: 50 cm³; normal 30 to 90), with atrophic

endometrium (3 mm). Ovaries were normal in size (right 10 cm³; left 7 cm³) and showed multiple antral follicles (up to 13 mm), not restricted to the periphery. (Figure 1C, upper panel). Serial pelvic ultrasound examinations, within two-week intervals, showed unchanged endometrial thickness and ovarian appearance. Repeated serum estradiol and progesterone concentrations were in the low normal range for the follicular phase. Inhibin B and free alpha-subunit levels were elevated. She also had undetectable LH levels measured by two different assays (IMMULITE 2000 and autoDELFI; see Methods), whereas FSH levels were normal (Table 1). Serum testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone sulfate, prolactin, human chorionic gonadotropin (hCG) levels and thyroid function tests were all normal. During GnRH stimulation test, FSH rose from 4.8 IU/L to 6.8, 8.1 and 8.2 IU/L after 15, 30 and 60 minutes, respectively (normal at baseline, 2.4 to 9.3, and at peak 4.6 to 11.7), while LH remained undetectable. Pituitary and brain MRI were normal. Therefore, she was prescribed estrogen-only replacement therapy (Premarin, Wyeth, 0.625 mg per day) for the three months, followed by combined estrogen-progestagen pills (Trisequens, Medley). During this period, ultrasound follow-up imaging showed progressive endometrial thickening and follicle enlargement (Figure 1C, middle and lower panels).

In addition, ten asymptomatic family members and one hundred unrelated ethnically-matched Brazilian subjects (200 chromosomes) were studied. Appropriate written informed consent was obtained from all participants. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brazil.

METHODS

Hormonal Assays

Immunofluorimetric assays (IMFA) (autoDELFI A, Wallac Oy, Turku, Finland) was used to measure LH, FSH, estradiol (E2), testosterone (T), progesterone (P) and free alpha-subunit levels. Serum LH, estradiol and progesterone levels were confirmed by chemiluminescent immunometric assay (IMMULITE 2000, EURO/DPC, UK). Inhibin B was detected by an enzyme immunoassay (*Active Inhibin B ELISA*, Diagnostics Systems Laboratories, Inc, Webster, Texas, USA). The intraassay and interassay variations were less than 8% and 10%, respectively, for all hormones. The GnRH stimulation test was performed in the three affected siblings. Serum LH and FSH levels were measured at 0, 15, 30, 60, and 90 min after intravenous administration of 100 µg of GnRH. Each result was compared with normal values previously established (6).

DNA Sequencing and Analysis

Genomic DNA from patients and controls were prepared from whole blood by the Chelex-100 method (7). The region spanning exon 2, intron 2 and exon 3 of the *LHB* gene was amplified by PCR with primers designated as LH23F and LH23R and conditions previously described (8). PCR products were sequenced in sense and antisense orientation with the use of an automated sequencer ABI-377 (Perkin-Elmer Corp., Foster City, CA). The primer LH23R has specific 3' end mismatches in order to discriminate between *LHB* and highly homologous hCG beta-subunit (*hCGB*) gene or pseudogenes. To investigate whether the identified mutation represented a polymorphism, the same *LHB* gene fragment from 100 ethnically-matched subjects from Brazil was amplified and digested with *NcoI* restriction enzyme (Fermentas Inc., Hanover, MD). This PCR-RFLP procedure was also used to analyze other family members.

Leukocytes LHB mRNA Amplification and Analysis

Since *LHB* mRNA, but not *hCGB*, was previously shown to be detectable by RT-PCR in unstimulated human blood leucocytes (9), total RNA was extracted from a buffy coat of 5ml of blood, using Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). To exclude contamination of genomic DNA, each sample was subjected to RNase free-DNase-I (Fermentas Inc., Hanover, MD). cDNA synthesis was performed with LH23R primer and M-MLV Reverse transcriptase (Promega Madison, WI). cDNA (5 μ l) was subsequently pre-amplified (35 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min at 72°C) with primers (3F5'-GCACCAAGGATGGAGATGCTCCAG-3' and LH23R) using GoTaq DNA Polymerase (Promega Madison, WI). Half-nested PCR was then performed with the pre-amplification product (1 μ l) using an internal primer 1F5'-GGCGGGGCATGGGCATCCAG-3' and LH23R in identical conditions. Sequences and specificity were verified by direct sequencing.

RESULTS

Automated DNA sequencing of exon 2, intron 2 and exon 3 of the *LHB* gene revealed a homozygous G to C substitution at the +1 position of intron 2 (IVS2+1G>C), a 5'donor splice site, in the male proband, his affected brother and his sister (Figure 2A).

Their asymptomatic parents (subjects I-1 and I-2), two other sisters (II-2 e II-7), one additional brother (II-14) and 1 nephew (III-3) were heterozygous for this mutation. All heterozygotes were fertile and had normal basal gonadotropin and sex steroid levels for age, except the mother, a 66-year-old woman, who, unexpectedly, had low serum LH levels for her menopausal state (Table S1, Supplemental data).

The IVS2+1G>C mutation was not identified in any of 200 alleles from normal unrelated subjects tested.

We detected RT-PCR products of the expected size both in the control and in the normal heterozygotes (Figure 2B). It is noteworthy to observe that, in the affected homozygotes, a PCR product approximately 250 bp larger was consistently obtained. (Figure 2B). Direct sequencing of these amplicons revealed that the observed difference in size was due to the presence of the entire intron 2 containing 236 nucleotides in the homozygotes. However, the larger PCR product was not detected in the heterozygotes (Figure 2C).

The mRNA analysis of the affected siblings clearly supported that the IVS2+1G>C mutation disrupted intron 2 splicing of *LHB* mRNA, resulting in the insertion of 236 nucleotides in the mutant transcript (Figure S1, Online Appendix).

DISCUSSION

We herein report a novel homozygous mutation of the *LHB* gene associated with selective LH deficiency in three siblings, two men and one woman, members of a consanguineous Brazilian family. To our knowledge, this is the first report of a woman affected by a *LHB* mutation. The IVS2+1G>C mutation was located in a non-coding intronic sequence affecting a conserved 5' splice donor site.

The LH-deficient woman underwent normal pubertal feminization and thelarche, similar to several women harboring a homozygous inactivating mutation in the LH receptor gene (1, 2, 10). However, in contrast to those women, the present case had a uterus of normal size, allowing irregular sporadic menses to occur during the first 14 years after menarche. Although the amount of estradiol produced throughout her life could not be quantified with certainty, it was sufficient to attain normal breast development as well as trophic uterine layers. In the absence of LH activity, the amount of androgenic substrates for aromatization to estradiol in granulosa cells would probably be limited (11), and may have accounted for the low-normal serum estrogen levels and endometrial atrophy subsequently observed. Consistently, studies with mice lacking the LH-beta subunit (LH-beta^{-/-}) showed a significantly reduced expression of the majority of steroidogenic enzymes, although differentiation of the ovarian thecal layer was not impaired (12).

The clinical presentation of amenorrhea and systematically low progesterone levels in this woman corroborates the essential roles of LH on ovulatory capacity. The finding of multicystic ovaries is consistent with FSH-induced follicular growth, as reflected by the elevated inhibin B levels, which potentially represent the number of healthy, early antral follicles (11,13). Taken together, these findings suggest that granulosa cells fail to maintain sufficient estradiol production, probably related to

decreased LH-dependent secretion of androgenic precursors by theca cells, whereas inhibin B production is spared. The high inhibin B levels, in turn, exert a negative feedback on FSH secretion, resulting in normal FSH levels in this woman (13).

Following estrogen supplementation, ultrasound demonstrated improvement in ovarian imaging, suggesting the development of a dominant follicle (18 mm), although ovulation remained impaired and no corpus luteum was observed. This finding may reflect that, in this woman, in the presence of a normal FSH level, estrogen and/or estrogen-related factors were the primary determinants of the follicular growth, up to the early preovulatory stage, whereas LH activity was not necessary until this stage. Thus, we concluded that the *LHB* IVS2+1G>C mutation resulted in impairment of ovulation and corpus luteum function. As expected, this *LHB* mutation did not affect pubertal feminization, thereby allowing normal adult breast and uterine development.

The two men in the present report presented with hypogonadism and selective LH deficiency, associated with the absence of mature Leydig cells and spermatogenic arrest, corroborating previous descriptions (3-5). This phenotype is similar to that of the male *LHB* knockout mice (12). Surprisingly, both affected men had an increase of their testicular volume after testosterone replacement. It is known that the key determinant of adult testicular size is the number of mature Sertoli cells, though immature cells may persist in pathological conditions, such as isolated hypogonadotropic hypogonadism (14). Therefore, since both FSH and testosterone increase the rate of proliferation and maturation of these cells (14), it is possible that exogenous testosterone administration contributed to Sertoli cell proliferation and testicular growth in these men, by acting synergistically with elevated FSH levels, in a late compensatory mechanism.

Moreover, it is noteworthy that inhibin B levels were inappropriately normal for the elevated FSH secretion in these men. In normal adults, inhibin B levels are

positively correlated with Sertoli cell function and spermatogenic status (15). Although unusual, our findings are in keeping with previous studies, showing that in boys, during the first pubertal years, basal inhibin B increases under FSH stimulation in parallel with Sertoli cell proliferation (16). Moreover, in hypogonadotropic hypogonadism, baseline inhibin B levels have been shown to correlate with testicular volume (16). The two previously described LH deficient males also showed elevated FSH levels (3,4) and, at least in one, inhibin B was normal (4).

Previously published gonadotropin mutations are located in the coding region of the genes (3-5; 17-21). However, mutations in exon flanks have been frequently associated with disease (22). Upon analysis of the *LHB* mRNA isolated from peripheral blood leucocytes, we demonstrated that the IVS2+1G>C mutation resulted in the inclusion of the entire intron 2 and, consequently, disruption of the exon 3 reading frame. Furthermore, it induced a gross abnormality in the *LHB* mRNA (Figure S1). On the other hand, the mechanism involved in the failure to detect abnormal transcripts in the heterozygotes, but not in the homozygotes, is presently unknown.

Common variants identified in the *LHB* gene are sometimes associated with pathological conditions such as polycystic ovary syndrome and infertility (23). The absence of this mutation in 200 unrelated chromosomes reinforces that this is not a polymorphism.

As predicted from our mutant nucleotide sequence, the hypothetical aberrant protein would have an insertion of 79 residues encoded by intron 2, which would severely affect its tertiary structure. In addition, the exon 3 frameshift results in the lack of essential domains enrolled on heterodimer stability and receptor binding, such as the conserved “seat belt” region (amino acids 90-110) and disulfide bonds from the cysteine knot (Figure S1) (3,24,25). These observations strongly suggest that the mutant LH

beta-subunit would be unable to assemble correctly with the alpha-subunit and would not be secreted.

We concluded that the novel IVS2+1G>C mutation induced a gross abnormality on *LHB* mRNA processing, causing familial selective hypogonadotropic hypogonadism. The male phenotype was similar to previously descriptions, and the first female phenotype of an *LHB* gene mutation was characterized by normal pubertal development, secondary amenorrhea and chronic anovulation.

Disclosure: The authors have nothing to disclose.

Acknowledgments: This work was supported by Brazilian Research Council (CNPq/PADCT SBIO 620003/02-2; CNPq 40.00.43/02-5; Finatec and Funksaúde, Brazil). We are greatly indebted to Dr. Lawrence C Layman, Section of Reproductive Endocrinology, Infertility, & Genetics, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA for his helpful comments on this paper; to Dr. Ceres Resende, Section of Obstetrics and Gynecology, University Hospital of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil, for performing transvaginal ultrasounds; to Dr. Marcelo Serra, Centro de Diagnóstico por Imagem, Brasilia, DF, Brazil, for performing testicular ultrasounds; to Dr. Luciana Naves, Section of Endocrinology, University Hospital of Brasilia, Faculty of Medicine, University of Brasilia - UnB, Brazil, for helpful discussions about the patients and hormonal assays, and to Sabin Institute and Laboratory of Clinical Analysis, Brasilia, DF, Brazil, for gently providing technical assistance.

REFERENCES

- (1) Themmen APN, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 2000; 21(5):551-583.
- (2) Latronico AC, Anasti J, Arnhold JP, Rapaport R, Mendonça BM, Bloise W. Testicular and ovarian resistance to luteinizing hormone caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone-receptor gene. *N Engl J Med* 1996; 334(8): 507-512.
- (3) Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta-subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 1992; 326(3): 179-183.
- (4) Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, et al. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 2004; 351:2619-2625.
- (5) Daly AF, Salvi R, Menage J, et al. Identification of a family harboring a novel LH beta-subunit mutation associated with hypogonadism. (Abstract) *Endocrine Society Meeting* 2006; OR52-5: 154.

- (6) Brito VN, Batista MC, Borges MF, et al. Diagnostic value of fluorometric assays in the evaluation of precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(10):3539-3544.
- (7) Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 1991; 10(4):506-513.
- (8) Shiraishi K, Naito K. Fertile eunuch syndrome with the mutations (Trp8Arg and Ile15Thr) in the beta subunit of luteinizing hormone. *Endocr J* 2003; 50(6):733-737.
- (9) Hotakainen PK, Serlachius EM, Lintula SI, Alfthan HV, Schröder JP, Stenman UE. Expression of luteinizing hormone and chorionic gonadotropin beta-subunit messenger-RNA and protein in human peripheral blood leukocytes. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 162(1-2):79-85.
- (10) Toledo SP, Brunner HG, Kraaij R, et al. An inactivating mutation of the luteinizing hormone receptor causes amenorrhea in a 46XX female. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3850-3854.
- (11) Richards JS, Russell DL, Ochsner S, et al. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002; 57(1):195-220.

- (12) Ma X, Dong Y, Matzuk MM, Kumar TR. Targeted disruption of luteinizing hormone β -subunit leads to hypogonadism, defects in gonadal steroidogenesis, and infertility. *PNAS* 2004; 101(49):17294-17299.
- (13) Laven JSE, Fauser BCJM. Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2004; 225: 37-44.
- (14) Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *J Reprod Fertil* 2003; 125(6):769-784.
- (15) Meachem SJ, Nieschlag E, Simoni M. Inhibin B in male reproduction: pathophysiology and clinical relevance. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 561 – 571.
- (16) Nachtigall LB, Boepple PA, Seminara SB, et al. Inhibin B secretion in males with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) deficiency before and during long-term GnRH replacement: relationship to spontaneous puberty, testicular volume and prior treatment – a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81: 3520 – 3525.

- (17) Layman LC, Porto ALA, Xie J, et al. *FSHB* gene mutations in a female with partial breast development and a male sibling with normal puberty and azoospermia. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(8):3702-3707.
- (18) Lindstedt G, Nystrom E, Matthews C, Ernest I, Janson PO, Chatterjee K. Follitropin (FSH) deficiency in an infertile male due to FSH beta gene mutation. A syndrome of normal puberty and virilization but underdeveloped testicles with azoospermia, low FSH but high lutropin and normal serum testosterone concentrations. *Clin Chem Lab Med* 1998; 36(8):663-665.
- (19) Matthews CH, Borgato S, Beckpeccoz P, et al. Primary amenorrhea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet* 1993; 5(1):83-86.
- (20) Layman LC, Lee EJ, Peak DB, et al. Delayed puberty and hypogonadism caused by mutations in the follicle-stimulating hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med* 1997; 337(9):607-611.
- (21) Phillip M, Arbelle JE, Segev Y, Parvari R. Male hypogonadism due to a mutation in the gene for the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *N Engl J Med* 1998; 338(24):1729-1732.
- (22) Xing Y, Wang Q, Lee C. Evolutionary divergence of exon flanks: a dissection of mutability and selection. *Genetics* 2006; 173(3):1787-1791.

- (23) Lamminen T, Huhtaniemi I. A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function. *Eur J Pharmacol* 2001;414(1):1-7.
- (24) Laphorn AJ, Harris DC, Littlejohn A, et al. Crystal structure of human chorionic gonadotropin. *Nature* 1994; 369(6480):455-461.
- (25) Matzuk MM, Spangler MM, Camel M, Suganuma N, Boime I. Mutagenesis and chimeric genes define determinants in the beta subunits of human chorionic gonadotropin and lutropin for secretion and assembly. *J Cell Biol* 1989; 109(4):1429-1438.

Table**Table 1. Hormonal data of three homozygous patients with the IVS2+1G>C mutation in the LH beta-subunit gene.**

Subjects	Sex	Age (yr)	LH(IU/L)		FSH (IU/L)		E ₂ (pg/mL)	P (ng/mL)	T (ng/dL)	Δ4 (ng/mL)	DHEAS (μg/dL)	Free α (ng/L)	InB (pg/mL)
			Baseline	Peak ^a	Baseline	Peak ^a							
II-5* ^c	M	38	<0.6	<0.6	20.4	28.7	<13		97			1736.9	107
II-10* ^c	M	30	<0.6	<0.6	12.8	18.6	<13		188			1192.7	163
II-13*	F	29	<0.6	<0.6	4.8	8.2	44	0.44		2.5	303	1010.1	194
Normal range:													
M			1.0-8.4	12-29.7	0.6-10.5	2.9-7.8	ND-35		271-965			120-790	80-300
F ^b			2.2-6.8	7.6-31.7	2.4-9.3	4.6-11.7	22-215	0.33-1.2		0.3-3.3	34-430	80-604	15-90

LH, FSH, Estradiol (E₂), Testosterone (T), Progesterone (P) and Free alpha-subunit (Free α) levels were measured by IMFA; Inhibin B (InB), by enzyme immunoassay; Androstenedione (Δ4) and Dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS) by chemiluminescent immunometric assay. ND: non detectable.

* Tanner stage at initial examination: Subject II-5 G1P4 (pre-treatment); subject II-10 G5P5 (after prolonged exogenous testosterone treatment); subject II-13 M5P5 (pre-treatment).

a. LH and FSH levels at peak after GnRH stimulation.

b. Normal values for follicular phase are shown.

c. Hormonal levels in the two affected men after 60 days off exogenous testosterone treatment are shown. In subject II-5, the pre-treatment hormonal profile was similar, except that testosterone level was undetectable (chemiluminescent immunometric assay IMMULITE 2000).

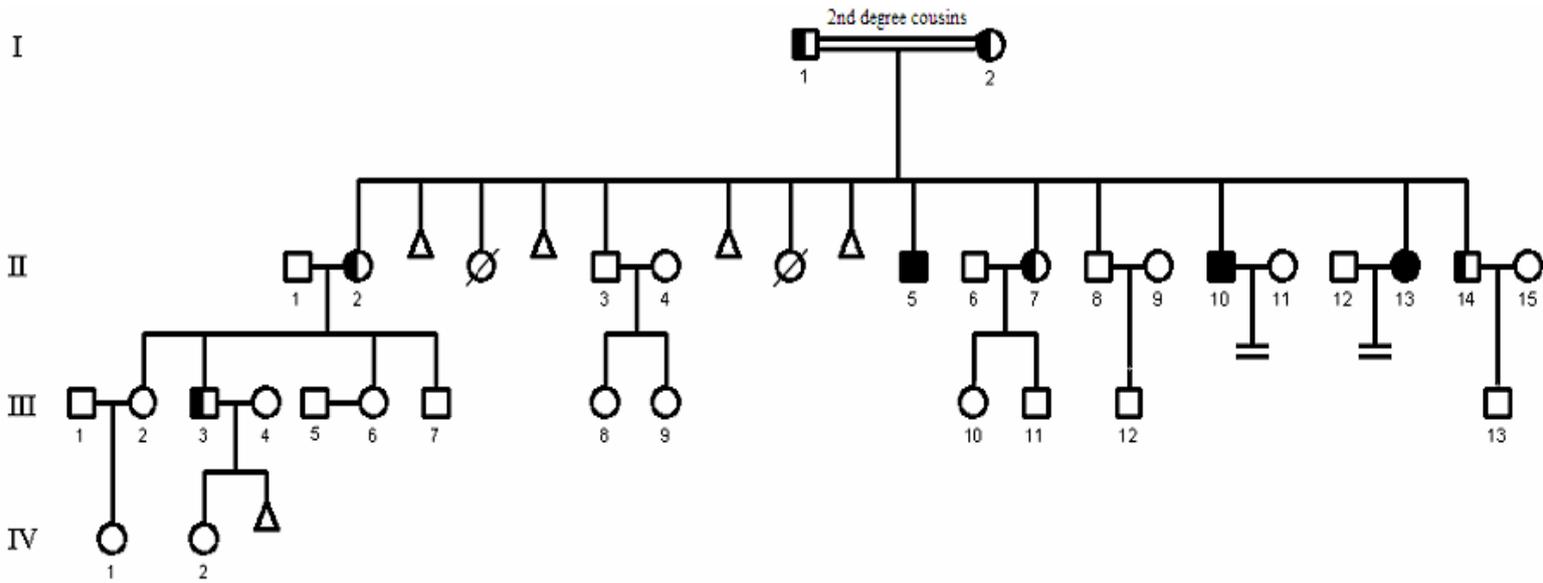
Figure legends

Figure 1. A) Pedigree of the family. The proband is shown by an arrow. Among the genetically tested family members (indicated by asterisks), open symbols represent individuals not carrying the mutation; half-filled symbols, heterozygous carriers; filled symbols, affected siblings homozygotes for the IVS2+1G>C *LHB* mutation. Squares denote men, circles women, triangles spontaneous abortions, and symbols with a slash deceased family members. Heterozygous parents are second degree cousins. Pedigree symbols are in accordance to the Recommendations for Standardized Human Pedigree Nomenclature, 1995. **B)** Female affected patient. **C)** Serial Ovarian Ultrasounds. Only right ovary is shown. Upper panel: pre-treatment image, showing normal sized ovary (10 cm³), with multiple antral follicles (up to 13 mm), dispersed over an apparently normal stroma. No dominant follicle was seen; Middle panel: aspect after three months of estrogen-only treatment, just before progestagen was started: a dominant follicle (18 mm) was seen with other sparse small follicles of approximately 5 mm. Lower panel: after 10 days of combined estrogen-progestagen treatment, a functional follicular cyst of 44 mm was observed.

Figure 2. **A)** Automated sequencing of genomic DNA (upper panel) and transcript of LH beta-subunit gene (lower panel) of a mutant homozygote (II-13) and a wild type homozygote used as a control (C) showing that IVS+1G>C mutation disrupts the splicing. Capital letters indicate exonic sequences, lowercase letters indicate intronic sequences and arrow indicates the mutation. **B)** Schematic representation of the strategy for LH beta-subunit gene and mRNA amplification, showing the primer hybridization sites (primers 3F, LH23F, 1F and LH23R), the mutation IVS2+1G>C site and the normal and mutant intron 2 spliced mRNA forms. The mutation added intron 2 236 nucleotides in the mutant mRNA and changed the exon 3 frame (Black box), compared to the correctly spliced form (White Boxes). Gray boxes indicate the signal peptide coding sequence. **C)** Half nested RT-PCR with primer pair 1F/LH23R, showing PCR products of the expected size in the control and heterozygotes (C, I-2 and II-14) and a PCR product approximately 250 bp larger in the affected patients (II-5 and II-13). Intron 2 5' splice site sequences of these products are displayed in A. RT (-) and (+) indicates without and with reverse transcription reaction, respectively.

Figure 1

A



B



C

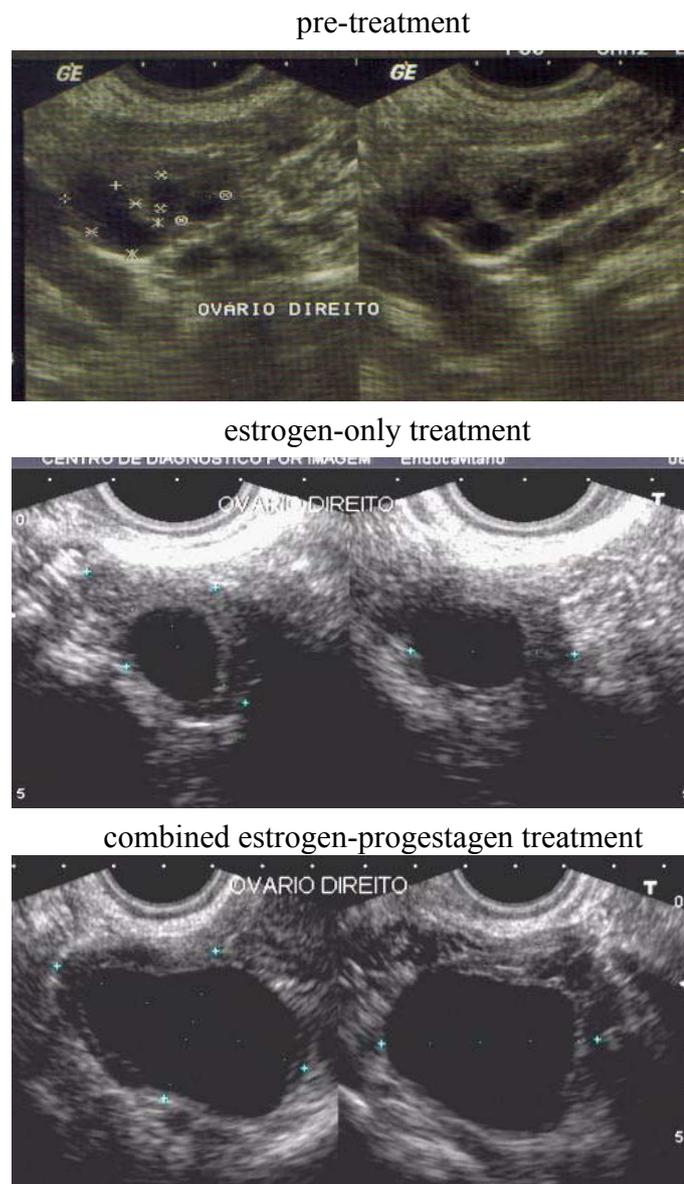


Figure 2

A

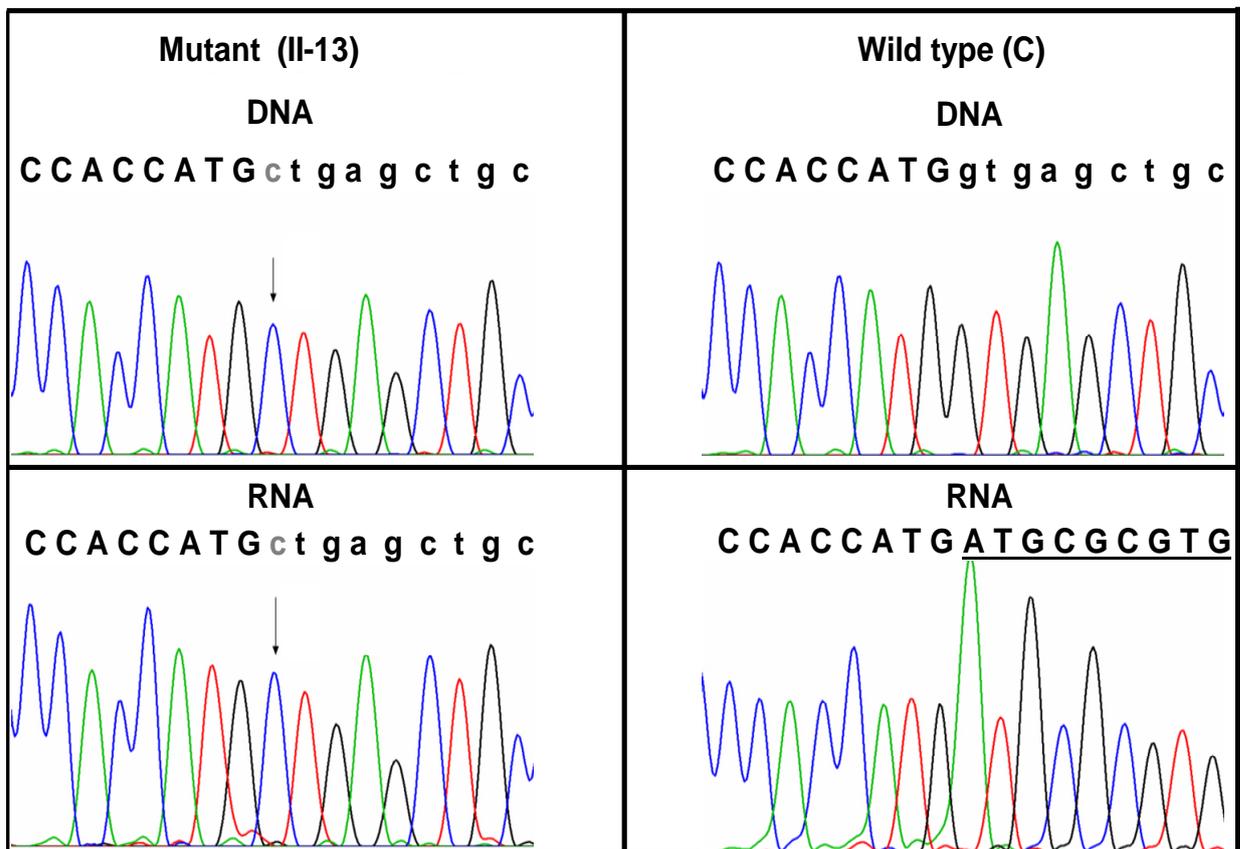


Figure 2

B

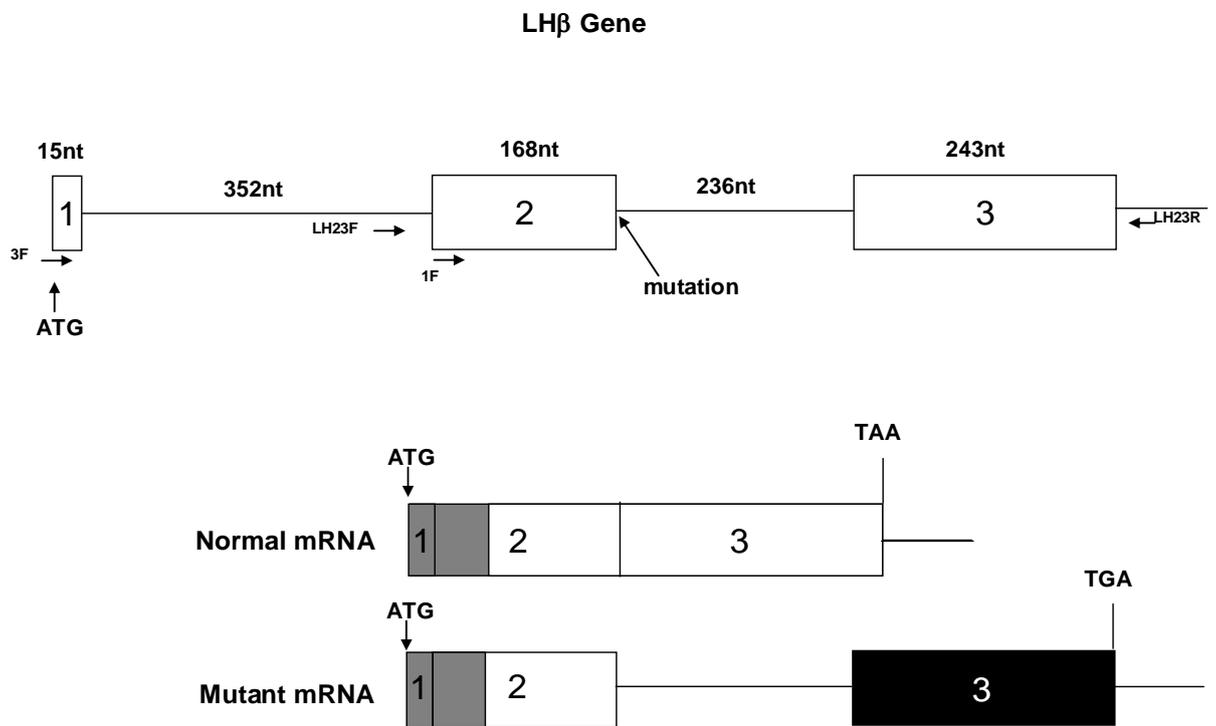
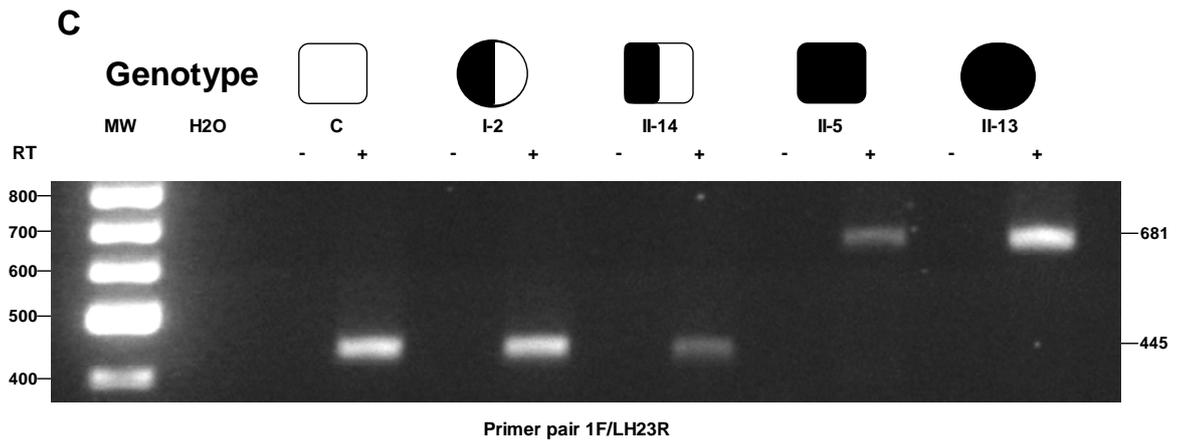


Figure 2



ONLINE APPENDIX

Table S1. Hormonal data of six consanguineous family members heterozygotes for the IVS2+1G>C mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene

Subjects	Sex	Age (yr)	LH (IU/L)		FSH (IU/L)		E ₂ (pg/mL)	T (ng/dL)	Free α (ng/L)	In B (pg/mL)	Phenotype
			Baseline	Peak ^a	Baseline	Peak ^a					
I-1	M	76	5.0		4.9		27.4*	567	456.8	185	Fertile
I-2	F	66	6.4	20.0	33.9	49.9	< 13	43.8*	575.5	< 10	Fertile/ menopause
II-2	F	49	17.6		31.5		56	31.3*	1486.3	48	Fertile/ climateric
II-7 ^b	F	36	<0.6	23.6	4.8	24.7					Fertile
II-14	M	25	4.2	15.2	6.0	10.6	43.3*	542	447.4	62	Fertile
III-3	M	28	1.44*		2.26*		32.9*	577*			Fertile
Normal range:											
M			1.0-8.4	12-29.7	0.6-10.5	2.9-7.8	<35	271-965	120-790	80-300	
F:											
follicular			2.2-6.8	7.6-31.7	2.4-9.3	4.6-11.7	22-215		80-604	15-90	
Menopause			15-64		31-134				340-400		

Luteinizing hormone (LH), Follicle-stimulating hormone (FSH), Estradiol (E₂), Testosterone (T) and Free alpha-subunit (Free α) were measured by an immunofluorimetric assay (autoDELFIA); Inhibin B (In B) was measured by an enzyme immunoassay (Active Inhibin B ELISA, Diagnostics).

*Values marked with an asterisk were determined by a chemiluminescent immunoassay (IMMULITE).

a. LH and FSH levels at peak after GnRH stimulation.

b. Subject II-7 was pregnant at the time of the first evaluation. Basal and GnRH-stimulated LH and FSH levels were obtained after five month of childbirth, when she was still nursing.

Figure S1. Nucleotides and predicted amino acid sequence of wild type (wt) and mutant *LHB* exon 2, intron 2 and exon 3. Exonic sequences are underlined and intron 2 sequence is in italic. The *LHB* gene NCBI reference sequence ref|NC_000019.8|NC_000019:c54212159-54211049 was identical to the mutant gene amplified fragment, except for the mutated nucleotide (shown in red). Intron 2 retention resulted in the insertion of 79 amino acids and in exon 3 frameshift. The predicted aberrant protein would lack important regions encoded by exon 3, such as the seat belt region, formed by amino acids 90-110 (light gray), and also some cysteine residues at positions 57, 88 and 90 (yellow), essential for the cysteine knot formation. Numbers above each series refer to amino acid positions in the *LHB* wt mature protein. (GenBank accession number for *LHB* IVS2+1G>C is EF621778).

1

G L L L L L L L L L S M G G A W A S R WT
GGGCTGCTGC TGTGCTGCT GCTGAGCATG GGCGGGGCAT GGGCATCCAG
G L L L L L L L L L S M G G A W A S R Mutant

10

E P L R P W C H P I N A I L A V E WT
GGAGCCGCTT CGGCCATGGT GCCACCCCAT CAATGCCATC CTGGCTGTCC
E P L R P W C H P I N A I L A V E Mutant

20 30

K E G C P V C I T V N T T I C A WT
AGAAGGAGGG CTGCCAGTG TGCATCACCG TCAACACCAC CATCTGTGCC
K E G C P V C I T V N T T I C A Mutant

40

G Y C P T M WT
GGTACTGCC CCACCATGCT GAGCTGCCTG GGGCCAGGGG CAGATGCTGC
G Y C P T M L S C L G P G A D A A Mutant

..... WT
CACCTCAGGG CCAGACCCAC AGAGGCAGCG GGGGAGGAAG GGTGGTCTGC
T S G P D P Q R Q R G R K G G L P Mutant

..... WT
CTCTCTGGCC TCGGTTGGG GAATGGGGTG TGGGAAGGCA GGAACAGAGG
L W P A V G E W G V G R Q E Q R Mutant

..... WT
GCTTCCTGGG CTCTGAGTC CAGGACCTGT GGGGTCAGCT TGGGAGCTCA
A S W A P E S R T C G V S L G A Q Mutant

..... WT
GCTGAGGCGC TGGCCTCAGG CACATGCTCA TTCCCCACT CACACGGCCT
L R R W P Q A H A H S P T H T A S Mutant

50

....M R V L Q A V L P P L P Q V V C WT
CCAGATGCGC GTGCTGCAGG CGGTCCTGCC GCCCCTGCCT CAGGTGGTGT
R C A C C R R S C R P C L R W C Mutant

60 70

T Y R D V R F E S I R L P G C P WT
GCACCTACCG TGATGTGCGC TTCGAGTCCA TCCGGTCCC TGGCTGCCCC
A P T V M C A S S P S G S L A A R Mutant

80 90

R G V D P V V S F P V A L S C R C WT
CGTGGTGTGG ACCCCGTGGT CTCCTTCCCT GTGGCTCTCA GCTGTGCTG
V V W T P W S P S L W L S A V A V Mutant

100

G P C R R S T S D C G G P K D H P WT
TGGACCCTGC CGCCGAGCA CCTCTGACTG TGGGGTCCC AAAGACCACC
D P A A A A P L T V G V P K T T Mutant

110 120

L T C D H P Q L S G L L F L * WT
CCTTGACCTG TGACCACCCC CAACTCTCAG GCCTCCTCTT CCTCTAAAGA
P * Mutant

CCCTCCCCG AGCCTTCAA GTCCATCCCC ACTCC