MARILENA NAKAGUMA

Estudo da etiologia do hipopituitarismo congênito por sequenciamento paralelo em larga escala de um painel gênico

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold

Co orientador: Prof. Dr. Alexander Augusto de Lima Jorge

(Versõa corrigida. resolução CoPGr 5890 de 20 de dezembro de 2010)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Nakaguma, Marilena
Estudo da etiologia do hipopituitarismo congênito por sequenciamento paralelo em larga escala de um painel gênico / Marilena Nakaguma. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientador: Ivo Jorge Prado Arnhold.
Coorientador: Alexander Aaugusto de Lima Jorge.

Descritores: 1.Hipopituitarismo 2.Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala 3.Mutação 4.Nanismo hipofisário 5.Anormalidades congênitas 6.Sistema hipotálamo-hipofisário

USP/FM/DBD-240/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento e no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42 da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): Projeto temático 13/03236-5 e Bolsa de Doutorado CAPES

“Só um sentido de invenção e uma necessidade intensa de criar levam o homem a revoltar-se, a descobrir e a descobrir-se com lucidez”

Pablo Picasso

Agradecimentos

A meu orientador Prof. Ivo Jorge Prado Arnhold, por ter confiado em mim e ter me recebido para realização deste estudo. Seus ensinamentos e orientações foram essenciais não só ao desenvolvimento desta pesquisa, como também para meu crescimento pessoal nesse período. Seu conhecimento e profissionalismo servem de exemplo que levarei para a vida.

Ao Prof. Alexander Augusto de Lima Jorge, meu co orientador, agradeço pelos muitos ensinamentos, dedicação e paciência.

Agradecimento especial a Fernanda Correa, pesquisadora entusiasmada, incentivadora e amiga, que me ensinou sobre a pesquisa e seus valores, sobretudo.

Agradeço aos colegas e à equipe técnica do LIM 42 e LIM 25 pelo companheirismo, dedicação e profissionalismo. Em especial, a Elisangela Quedas, Lucas Santos, Betty Urtremary e Graça, pela atenção e carinho ao longo desta trajetória. Obrigada também a Mariana Funari, pelo sequenciamento – etapa delicada e fundamental do projeto e por todo apoio e ajuda, e a Antonio Lerário pela análise de bioinformática.

A Profa. Berenice B. de Mendonça e a Profa. Ana Claudia Latrônico que são modelos de pesquisadora e liderança.

A Luciani Carvalho, Anna Flávia, Isabela Biscotto, João Madeira e Nathalia Ferreira, do grupo do hipopituitarismo, e a Alexsandra Malaquias, Edoarda Vasco, Gabriela Vasques, Renata Scalco, Thais Lima, Thais Kataoka, do grupo de crescimento, pelo convívio, companhia e constante apoio. Tenho certeza que nossas amizades não ficarão restritas ao ambulatório. Em especial, às minhas amigas queridas Cybelle Rejane Marques Silveira, Cristiane Gruetzmacher, Mirela Costa de Miranda,

Priscila Salles e Tatiana Pelaes que desde o início estiveram ao meu lado, nos melhores momentos e nos mais difíceis.

A todos os professores e membros da equipe do curso de Pós-Graduação em Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), pelo profundo conhecimento e profissionalismo transmitido durante esse período. Agradeço também a nossos pacientes, que constituem a fonte de nossos estudos e que sempre trazem ensinamentos e inspirações para nossas vidas. Não é possível mencionar individualmente aqui todos que me ajudaram, de maneira direta ou indireta, mas nestes parágrafos registro minha gratidão aos que estiveram envolvidos no desenvolvimento de meu trabalho.

Agradecimento aos colaboradores Ricardo Perez, Mirta Miras e à querida amiga e entusiasta de pesquisa Martha Katherine P Huayllas.

Quero agradecer também a minha família, em especial, a meu pai Roberto, a minha mãe Eliza e a meu irmão Marcos que nunca deixaram de iluminar um caminho que tenha me parecido escuro. Obrigada pelo amor e apoio incondicionais durante o desenvolvimento de meu doutorado e também por toda a vida.

E, por fim, a meu querido marido Jackson que jamais deixou de me apoiar e incentivar.

Normalização

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Jornal Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de Apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha; Maria Júlia de A. L. Freddi; Maria F. Crestana; Marinalva de Souza Aragão; Suely Campos Cardoso; Valéria Vilhena. 3a. ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação, 2011.

Abreviatura dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas e Símbolos
Lista de Genes e Proteínas
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Lista de anexos
Resumo
Abstract
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Ontogênese hipofisária 4
1.1.1 Defeitos na embriogênese da região hipotálamo-hipofisária 6
1.1.2 Defeitos na diferenciação das células hipofisárias 8
1.2 Regulação da síntese e secreção de GH 9
1.2.1 Defeitos na síntese e secreção de GH 9
1.3 O uso da técnica de SPLE na identificação de genes associados à DGH congênita 11
2 OBJETIVOS 13
3 MATERIAL E MÉTODOS 15
3.1 Considerações éticas 16
3.2 Casuística 16
3.3 Sequenciamento 21
3.3.1 Extração do DNA genômico 21
3.3.2 Desenho de sondas de captura do painel 21
3.3.3 Genotipagem por sequenciamento de nova geração 22
3.4 Análise de bioinformática 25
3.5 Seleção das variantes candidatas 26
4 RESULTADOS 29
4.1 Resultados moleculares 30
4.2 Fenótipo dos pacientes com variantes patogênicas 33
4.2.1 Paciente com a variante *GLI2* c.1681G>T 33

4.2.2 Paciente com a variante *OTX2* c.295C>T 34
4.2.3 Paciente com variantes *PROP1* [c.301_302del];[c.109+1G>A] 36
4.2.4 Pacientes com variantes *GHRHR* [c.57+1G>A];[c.57+1G>A] e *GHRHR* [c.820_821insC];[c.820_821insC] 38
4.3 VUS de interesse 40
4.3.1 Pacientes com a variante *GHSR* c.545T>C 40
4.3.2 Paciente com a variante *TGIF1* c.82T> C 43
5 DISCUSSÃO 45
5.1 Variantes patogênicas 46
5.2 VUS de interesse 48
6 CONCLUSÕES 51
7 ANEXOS 53
8 REFERÊNCIA 65

Listas

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABraOM	*Brazilian genomic variants*
AC	*allele counting* (número de alelos encontrados*)*
ACMG/AMP	Colégio Americano de Genética Médica e Associação de Patologia Molecular
ACTH	*adrenocorticotropic hormone* (hormônio adenocorticotrófico)
ADH	hormônio antidiurético
BWA	*Burrows-Wheeler Aligner* (programa de bioinformática)
CADD	*Annotation Dependent Depletion*
CNVs	*Copy Number Variations* (variação do número de cópias)
CONTRA	*Copy Number Analysis for Targeted Resequencing* (análise do número de cópias para sequenciamento direcionado)
CtBP	*C-terminal-binding protein 1*
DGH	deficiência do hormônio de crescimento
DHEAS	sulfato de deidroepiandrosterona
DHHM	deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla
DIGH	deficiência isolada de hormônio de crescimento
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSO	displasia septo-óptica
ESP-6500	*Exome Sequencing Project, do National Heart, Lung, and Blood Institute*
ExAC	*Exome Aggregetion Consortium* (banco de dados populacional)
FATHMM	*Functional Analysis through Hidden Markov Models* (ferramenta de predição *in silico*)
FSH	*follicle-stimulating hormone* (hormônio folículo-estimulante)
GERP	*genomic evolutionary rate profiling*
GH	*growth hormone* (hormônio do crescimento)
HC	hipopituitarismo congênito
HGMD	*The Human Gene Mutation Database*
HPE	Holoprosencefalia

IAMSPE	Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual
IGF-1	*insulin like growth factor 1*
IGFBP-3	*insulin-like growth factor binding protein 3*
IGV	*Integrative Genomics Viewer* (visualizador integrativo de genômica)
IO	idade óssea
ITT	teste de tolerância à insulina
LH	*luteinizing hormone* (hormônio luteinizante)
MAF	*minor allele frequence* (frequência do alelo menos frequente)
NH	neuro-hipófise
NHE	neuro-hipófise ectópica
NHT	neuro-hipófise tópica
OMIM	*Online Mendelian Inheritance in Man* (base de dados que cataloga doenças genéticas)
PCR	reação em cadeia da polimerase
PolyPhen	*Polymorphism Phenotyping* (ferramenta de predição *in silico*)
PRL	Prolactina
PROVEAN	*Protein Variation Effect Analyzer* (ferramenta de predição *in silico*)
PSIS	Pituitary stalk interruption syndrome (síndrome da interrupção de haste)
ACCD	Atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento
RM	ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RXR	receptor de ácido retinóico
SIFT	*Sorting Intolerant from Tolerant Human Protein* (ferramenta de predição *in silico*)
SNC	sistema nervoso central
SNPs	*single nucleotide polymorphisms* (polimorfismo de nucleotídeo único)
SPLE	sequenciamento paralelo em larga escala
SST	Somatostatina
TRH	*thyrotropin-releasing hormone* (hormônio liberador de tireotropina)
TSH	*thyroid stimulating hormone* (hormônio tireoestimulante)
VC	velocidade de crescimento
VCF	*Variant Call Format*
VEST3	*Variant Effect Scoring Tool*
VR	valor de referência
VUS	*Variant of Uncertain Significance* (Variante de Significado Incerto)
WES	*Whole Exome Sequencing* (sequenciamento exômico)

GENES E PROTEÍNAS

ARNT2	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2
DMXL2	Rabconnectin
FGF8	fibroblast growth factor 8
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
GH1	growth hormone 1
GHRH	growth hormone-releasing hormone
GHRHR	growth hormone-releasing hormone receptor
GHSR	growth hormone secretagogue receptor
GLI2	gli-kruppel family member 2
GPR161	g protein-coupled receptor 161
HES1	hairy/enhancer of split
HESX1	homeobox gene expressed in es cells
HHIP	hedgehog-interacting protein
IGSF1	immunoglobulin superfamily, member 1
KAL1	kal1 gene
LHX3	lim homeobox gene 3
LHX4	lim homeobox gene 4
NEUROD4	neurogenic differentiation 4
OTX2	orthodenticle, drosophila, homolog of, 2
PITX2	paired-like homeodomain transcription factor 2
POU1F1	pituitary-specific transcription factor 1
PROKR2	prokineticin receptor 2
PROP1	prop paired-like homeobox 1
RNPC3	RNA-binding region-containing protein 3
SHH	sonic hedgehog
SOX2	sry-box 2
SOX3	sry-box 3
PSIS	Pituitary Stalk Interruption Syndrome (Síndrome da Interrupção da Haste)
TGIF1	transforming growth factor-beta-induced factor
*TGF*β	transforming growth factor beta

FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipofisário 5

Figura 2 - Diagnóstico da deficiência do hormônio de crescimento 17

Figura 3 - Pacientes selecionados para estudo 19

Figura 4 - Sequenciamento paralelo em larga escala 24

Figura 5 - Visualização das variantes encontradas no gene *PROP1* no programa IGV 37

Figura 6 - Eletroferograma do sequenciamento por Sanger das variantes no gene *PROP1* 37

Figura 7 - Visualização das variantes encontradas no gene *GLI2* no programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*) 42

TABELAS

Tabela 1 - Genes relacionados a defeitos na embriogênese da região hipotálamo-hipofisária, fenótipo e modelo de herança dos pacientes com hipopituitarismo congênito 7

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes selecionados para estudo 19

Tabela 3 - Métricas do sequenciamento 30

Tabela 4 - Variantes patogênicas identificadas pelo painel de genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito 32

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes com variantes patogênicas 39

Tabela 6– Variantes de significado incerto de interesse identificadas pelo painel de genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito 44

ANEXOS

Anexo 1 - 16 variantes de significado incerto, identificadas pelo Painel de Genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito 54

Anexo 2 - Critérios utilizados pela ACMG/AMP – Colégio Americano de Genética Médica e pela Associação de Patologia Molecular – para classificação das variantes encontradas..... 56

Anexo 3 - "Genetic diagnosis of congenital hypopituitarism by a target gene panel: novel pathogenic variants in *GLI2*, *OTX2* and *GHRHR*".. 59

Resumo

Nakaguma M. *Estudo da etiologia do hipopituitarismo congênito pelo sequenciamento paralelo em larga escala de um painel gênico* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2019.

Convencionou-se chamar de hipopituitarismo congênito (HC) a deficiência de um ou mais hormônios hipofisários. O HC pode se apresentar na forma de insuficiência isolada do hormônio de crescimento (DIGH) ou combinada com a deficiência de outros hormônios hipofisários – deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM) e apresenta uma prevalência de um a cada 3.500 a 10.000 nascimentos. O diagnóstico precoce apresenta impacto no tratamento clínico inicial e, posteriormente, no aconselhamento genético. A maioria dos estudos realizados até o momento, que identificou uma etiologia genética para a deficiência hormonal, utilizou a técnica de Sanger. Mais recentemente, o sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) vem sendo utilizado como uma forma de investigação genética mais rápida e a um custo menor, permitindo estender esse processo de sequenciamento a milhares de reações de forma simultânea e automatizada. Os objetivos deste estudo foram: 1) desenvolver um painel customizado de sequenciamento paralelo em larga escala (SPLE) para investigação da etiologia genética da deficiência do hormônio de crescimento congênito e 2) correlacionar os achados moleculares encontrados com o fenótipo. Para este estudo, foram selecionados: 117 pacientes acompanhados no serviço de endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Serviço de Endocrinologia do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (HSPE-IAMSPE), Hospital de Transplantes Euryclides de Jesus Zerbini de São Paulo e Hospital de Niños Santísima Trinidad em Cordoba, Argentina. Métodos: os pacientes foram sequenciados por SPLE, utilizando um painel contendo 26 genes associados ao hipopituitarismo. Como resultados foram encontradas quatro novas variantes patogênicas nos genes *OTX2* c.295C>T, *GLI2* c.1681G>T, *GHRHR* c.820_821insC:p.Asp274Alafs*113 e *PROP1* c.109+1G>A e variantes previamente classificadas como patogênicas pelos critérios da ACMG / AMP nos genes *GHRHR* c.57+1G>A e *PROP1* c.301_302delAG em cinco pacientes. Os resultados indicaram que um painel projetado sob medida é um método útil para rastrear, simultaneamente, variantes de relevância biológica e clínica para a deficiência congênita de hormônio de crescimento (GH). Um diagnóstico genético foi possível em cinco de 117 (4%) pacientes desta coorte. Foram identificadas quatro novas variantes patogênicas nos genes *GHRHR*, *GLI2*, *OTX2* e *PROP1*, expandindo o espectro de variantes associadas ao hipopituitarismo congênito.

Descritores: Hipopituitarismo, Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala, Mutação, Nanismo Hipofisário, Anormalidades Congênitas, Sistema Hipotálamo-Hipofisário

Abstract

Nakaguma M. *Massive-parallel sequencing by gene panel in the diagnosis of congenital hypopituitarism* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

Congenital hypopituitarism can be present as isolated growth hormone deficiency (IGHD) or combined with the impaired production of other pituitary hormones (CPHD) and has an incidence of 1: 3,500 to 10,000 births. Genetic diagnosis has an impact on management and genetic counseling. Most studies to identify the genetic etiology of the hormonal deficiency used Sanger sequencing. Massive-parallel sequencing has been used as a method of faster genetic investigation with reduced costs, allowing extending this sequencing process to thousands of reactions in a simultaneous and automated manner. The objectives of our study are: 1) developing a customized panel for massively-parallel sequencing (MPS) to investigate the genetic etiology of congenital hypopituitarism, and 2) correlate the molecular findings with the phenotype. In this study, 117 subjects were studied from the endocrinology units of Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (HSPE-IAMSPE), Hospital de Transplantes Euryclides de Jesus Zerbini de São Paulo and Hospital de Niños Santísima Trinidad de Cordoba, Argentina. Methods: patients were screened by a target panel containing 26 genes associated to hypopituitarism. As result, four novel pathogenic variants were found in *OTX2* c.295C>T, *GLI2* c.1681G>T, *GHRHR* c.820_821insC and *PROP1* c.109+1G>A and the previously reported variants in *PROP1* c.301_302delAG and *GHRHR* c.57+1G>A in five patients. In conclusion, our results indicate that a custom designed panel is an efficient method to screen simultaneously variants of biological and clinical relevance for congenital GH deficiency. A genetic diagnosis was possible in 5 out of 117 (4%) patients of our cohort expanding the spectrum of variants associated with congenital hypopituitarism.

Descriptors: Hypopituitarism, High-Throughput Nucleotide Sequencing, Mutation, Dwarfism, Pituitary, Congenital Abnormalities, Hypothalamo-Hypophyseal System

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A deficiência da secreção do hormônio de crescimento (DGH) congênita pode apresentar-se de forma isolada (DIGH) ou combinada com deficiência de outros hormônios hipofisários – deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla (DHHM) e apresenta uma prevalência de um a cada 3.500 a 10.000 nascimentos. Convencionou-se chamar de hipopituitarismo congênito (HC) a deficiência de um ou mais hormônios hipofisários [1].

O quadro clínico e a forma de apresentação da DGH podem variar de formas clínicas menos evidentes nos casos parciais e/ou de início mais tardio na infância até apresentações graves de DGH. Ao nascimento, o peso e o comprimento costumam estar normais, e o diagnóstico deve ser suspeitado na presença de sintomas como hipoglicemia e icterícia prolongada. Micropênis, criptorquidia e hipoplasia da bolsa escrotal podem ocorrer sobretudo quando associados à deficiência de gonadotrofinas [2].

Com frequência, a baixa estatura e o atraso da velocidade de crescimento são os únicos sintomas presentes no paciente com DGH, normalmente, associados a atraso na idade óssea. Quando não tratada, a estatura pode ficar abaixo de -3 ou -4 desvios-padrão em relação à média para idade e sexo [2].

Outros estigmas como obesidade truncal, aumento de espessura de pregas cutâneas, desenvolvimento muscular diminuído, aparência facial infantil com fronte proeminente e nariz em sela, atraso no fechamento das fontanelas, atraso na dentição, cabelos finos e esparsos, voz aguda e infantil também podem estar presentes [3].

Defeitos de linha média e/ou malformações complexas como agenesia de corpo caloso, displasia septo-óptico, holoprosencefalia ou síndrome da interrupção da haste (PSIS: hipoplasia da adeno-hipófise, afilamento ou transecção da haste hipofisária) e neuro-hipófise ectópica (NHE) estão com frequência associados à deficiência hormonal [4].

Em relação à etiologia do HC, várias evidências apontam para uma possível causa genética: a) sua ocorrência em casos familiares ou em famílias consanguíneas, b) a identificação até o momento de diversos genes como causa da deficiência hormonal e c) sua frequente associação com fenótipos que compartilhem desenvolvimento comum onde causas genéticas já foram estabelecidas, como HPE, DSO, etc [4].

A etiologia genética do HC pode ser classificada, de acordo com o mecanismo molecular que resultou na deficiência de GH, em três grandes grupos:

1. Genes envolvidos na embriogênese hipotálamo-hipofisária
2. Genes envolvidos na diferenciação das células hipofisárias
3. Genes envolvidos diretamente na síntese e secreção de GH.

Nas últimas décadas, diversos estudos avaliaram a frequência e a importância de defeitos envolvidos nestas vias em famílias isoladas e populações de pacientes com DIGH ou DHHM. Estes estudos foram baseados na estratégia da escolha de um gene candidato, que considera a apresentação clínica para identificação de um possível gene relacionado à deficiência hormonal e sequenciamento de Sanger em toda a casuística.

Em nosso serviço no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, a primeira avaliação com o objetivo de identificar a etiologia genética de HC ocorreu na década de 1990 com o sequenciamento dos genes *GH1* e *PROP1* [5-8]. Até o momento,

15 genes foram estudados, utilizando a estratégia de gene candidato, por diversos pesquisadores do serviço (*PROP1, SOX3, LHX3, LHX4, GLI2, GH1, GHRH, GHRHR, GHRS, HESX1, HES1, OTX2, FGFR1, PROKR2, NEUROD4*) [5-36]. Foram encontradas variantes patogênicas nos genes *GH1*, *PROP1*, *GHRHR*, *GLI2* e *HESX1* e variantes com possível envolvimento nos genes *FGFR1* e *PROKR2*, o que corresponde a cerca de 12% dos pacientes com etiologia genética identificada. Este dado está em acordo com a literatura na qual a etiologia da deficiência hormonal, na grande maioria dos pacientes (84%), permanece desconhecida [4, 28].

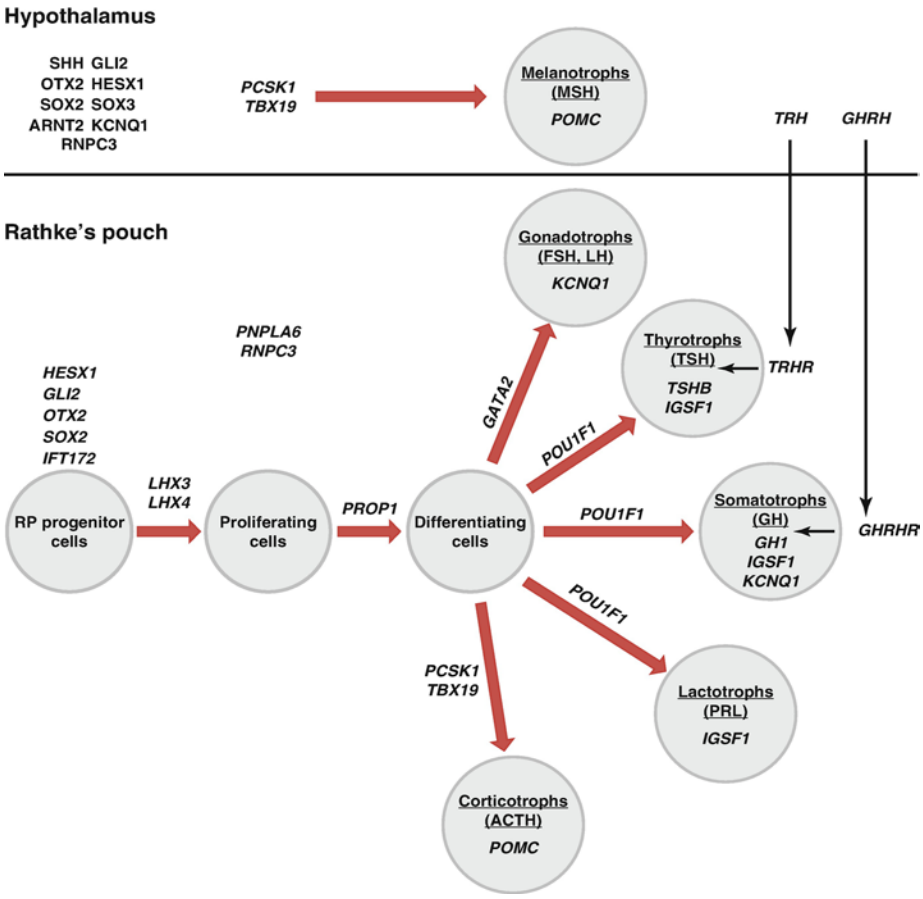
Mais de 30 genes foram identificados, como possível causa genética de DHHM associado a amplo espectro fenotípico [4].

A utilização de sequenciamento paralelo em larga (SPLE) utiliza o mesmo princípio do sequenciamento de Sanger – a identificação em sequência das bases de pequenos fragmentos de DNA – porém permite estender esse processo a milhares de reações em sequenciamento simultâneo de forma automatizada, em menor tempo [37].

1.1 ONTOGÊNESE HIPOFISÁRIA

A glândula hipófise é composta pela adeno-hipófise e pela neuro-hipófise que são estruturas funcionais e morfologicamente distintas, cujos desenvolvimentos estão diretamente relacionados com a presença de sinais gerados pelo diencéfalo em desenvolvimento, assim como a ativação de uma cascata de fatores de transcrição e sinalização que regula a diferenciação celular, proliferação e, posteriormente, a produção de hormônios hipofisários (Figura 1) [1, 38].

A adeno-hipófise é proveniente do ectoderma oral e é responsável pela secreção de seis hormônios GH, LH, FSH, PRL, ACTH e TSH, provenientes de cinco diferentes grupos celulares. A neuro-hipófise é proveniente do neuroectoderma, uma região situada na linha média ventral do diencéfalo – com a formação de outras placas sensoriais (placas olfatórias, óticas e ópticas) – e contém projeções axonais terminais dos neurônios magnocelulares, dos núcleos paraventriculares e supraópticos do hipotálamo, sendo responsável pela produção de oxitocina e hormônio antidiurético (ADH) [39].



Fonte: Gregory LC e Dattani MT [38]

Figura 1 - Desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipofisário

1.1.1 Defeitos na embriogênese da região hipotálamo-hipofisária

De forma geral, as frequências de defeitos nestes fatores de transcrição são raras e os quadros clínico e radiológico são bastante heterogêneos [1].

O OTX2 é um fator de transcrição precocemente expresso durante o desenvolvimento embrionário, crítico para o desenvolvimento do diencéfalo ventral, adeno-hipófise, além de órgãos sensoriais como as células olfativas, gânglio coclear, células fotorreceptoras e placa ótica. Mutações nesse gene possuem herança autossômica dominante, frequente penetrância incompleta e ampla variabilidade fenotípica (Tabela 1), com ausência de correlação genótipo-fenótipo demonstrada em diversos casos [40, 41]. Os pacientes afetados podem apresentar malformação ocular, micrognatia ou agnatia, holoprosencefalia, com a presença ou não de DGH isolada ou combinada.

O HESX1 é um dos marcadores mais precoces do desenvolvimento hipofisário [41, 42]. Inicialmente, variantes no gene *HESX1* foram descritas em associação à DSO, mas podem apresentar-se com um amplo espectro de fenótipos e herança autossômica dominante ou recessiva, como descrito nos dados da Tabela 1. As variabilidades clínica e radiológica podem ocorrer mesmo dentre portadores da mesma mutação, como demonstrado por Carvalho *et al*, que descreveram pacientes de mesmo genótipo que apresentavam DHHM sem associação com DSO, com a presença de neuro-hipófise tópica (NHT) ou ectópica [11, 31].

Nos fatores de transcrição da via Sonic Hedgehog (SHH) – como o *GLI2* e *SHH*, variantes são mais estudadas até o momento, como causa de holoprosencefalia [4]. Durante o início da embriogênese de vertebrados, o SHH é expresso na notocorda e tubo neural e atua no desenvolvimento do SNC e elementos

distais dos membros em desenvolvimento [43]. França *et al* identificaram a presença de mutações no *GLI2* associadas a DIGH e DHHM e associação variável a defeitos de linha média e polidactilia, com modo de herança autossômica dominante e penetrância incompleta [16, 23].

Como outros exemplos de genes envolvidos na embriogênese da região hipotálamo-hipofisária, podem-se citar os genes *LHX3, LHX4, SOX3 e PITX2.* Suas principais características e modelos de herança das variantes associadas ao hipopituitarismo estão descritos nos dados da Tabela 1.

Tabela 1 - Genes relacionados a defeitos na embriogênese da região hipotálamo-hipofisária, fenótipo e modelo de herança dos pacientes com hipopituitarismo congênito [4]

Gene	Características Sindrômicas	Modelo de Herança
GLI2	DSO, HPE, polidactilia, sindactilia	Autossômica dominante e penetrância incompleta
HESX1	DSO, anoftalmia, microftalmia, defeitos do corpo caloso, outras malformações cerebrais	Autossômica dominante ou recessiva
LHX3	Dificuldade de rotação e rigidez cervical, deficiência auditiva	Recessiva
LHX4	Doença respiratórias, malformações genitais e craniofaciais	Dominante e penetrância incompleta
OTX2	Malformações oculares e craniofaciais	Dominante e penetrância incompleta
PITX2	Malformações oculares e craniofaciais	Dominante
SOX2	Malformações em SNC, anoftalmia, déficit intelectual, deficiência auditiva, atresia esofágica, malformações genitais	Autossômica dominante e penetrância incompleta
SOX3	Malformações craniofaciais, retrognatia, déficit intelectual, deficiência auditiva	Recessiva ligada a X e penetrância incompleta

1.1.2 Defeitos na diferenciação das células hipofisárias

O PROP-1 é um fator de transcrição da família homeodomíneo paired-like, que é expresso especificamente nas células embrionárias da hipófise, envolvido diretamente na formação e diferenciação dos somatotrofos, lactotrofos, tireotrofos e gonadotrofos. Pode funcionar como ativador ou repressor, conforme a fase em que é expresso, e liga-se como um dímero aos promotores dos genes *HESX-1* e *POU1F1 (PIT-1)* – fatores de transcrição fundamentais para o desenvolvimento hipofisário [44]. Mutações identificadas no gene *PROP1* são a causa genética mais frequente de hipopituitarismo com modelo de herança autossômico recessivo e penetrância completa em pacientes com DHHM e NHT [30, 33, 39, 45]. As duas variantes mais prevalentes são as deleções c.301_302delAG e c.150delA, que podem ser explicadas pela ocorrência do fenômeno do efeito fundador [30].

O *POU1F1* pertence à família POU dos genes homeobox específicos da hipófise, necessária para a expressão de GH, TSH e PRL. Variantes no POU1F1 foram descritas em pacientes apresentando herança autossômica dominante ou recessiva, NHT com hipoplasia de adeno-hipófise e deficiência de GH, TSH e PRL. Apenas um estudo, que descreveu nove indivíduos afetados em três gerações, correlacionou mutação no gene *POU1F1* – isoforma alfa – com apresentação clínica de deficiência de GH isolada [46].

1.2 REGULAÇÃO DA SÍNTESE E SECREÇÃO DE GH

O GH é um hormônio polipeptídico codificado pelo gene *GH1*, produzido nos somatotrofos – células localizadas na adeno-hipófise [47].

A isoforma principal contém 191 aminoácidos e peso molecular de 22 kDA. Por meio de um mecanismo de *splicing* alternativo são produzidas diversas isoformas, como 27, 20, 17 e 5 kDa e oligômeros como o "big" e o "big big" GH (>45 kDa) [3, 48].

A regulação de sua produção ocorre por meio de dois principais peptídeos hipotalâmicos: o hormônio liberador de GH (GHRH) que estimula a produção de GH e a somatostatina (SST) que inibe sua secreção [3]. O GHRH age por meio de um receptor acoplado à proteína Gs que ativa a adenilciclase e eleva os níveis de AMPc intracelular, que estimula a síntese de GH [47].

Já o GHSR é o receptor do secretagogo de GH, membro da família de receptores acoplados à proteína G com sete domínios transmembrana, expresso na hipófise e hipotálamo. A isoforma GHSR1a é forma ativa que atua como receptor ligante da grelina – hormônio secretado pelas mucosa gástrica e sistema nervoso central, que tem potente efeito orexigênico e, ao ligar-se ao GHSR, estimula a secreção de GH [49].

1.2.1 Defeitos na síntese e secreção de GH

Em 1981, Phillips *et al.* examinaram o DNA genômico de crianças suíças com nanismo e descobriram usando a técnica de Southern Blot que o gene *GH1* estava ausente. Esta foi uma das primeiras formas de doença monogênica associada a distúrbio de crescimento em que a etiologia genética foi identificada [50].

Posteriormente, outras formas de herança relacionadas a mutações no *GH1* foram descritas e atualmente são conhecidas quatro formas familiares de DIGH: tipo IA e IB (autossômica recessiva), tipo II (autossômica dominante) e tipo III (recessiva ligada ao X) [50].

Existe uma particularidade de mutações no gene *GH1* que pode levar à deficiência hormonal hipofisária combinada que ocorre na forma familiar de DGH tipo II. Nestes casos, há produção aumentada da isoforma de 17,5 kDa que permanece retida no retículo endoplasmático, comprometendo a via de secreção de GH e dos demais hormônios hipofisários. Exceto nessa condição, mutações em genes que participam diretamente da síntese e secreção de GH levam à deficiência de GH isolada com imagem da região hipotálamo-hipofisária normal [51].

Mutações no gene *GHRHR* devem ser suspeitadas sobretudo nos casos familiares ou consanguíneos com herança recessiva [3]. Em 1999, Salvatori R *et al*. descreveram a maior família já descrita contendo 105 indivíduos afetados em sete gerações, apresentando a mutação *GHRHR* c.57+1G>A em homozigose – na cidade de Itabaianinha em Sergipe (BR) [52].

Embora o gene *GHRH* seja um candidato óbvio para investigação como causa de DIGH, estudo multicêntrico realizado por França *et al*, em uma casuística contendo 151 pacientes com DIGH, não identificou variantes patogênicas causadoras da deficiência hormonal [20]. Portanto mutações no *GHRH* não são uma causa frequente de DIGH [20, 48].

No gene *GHSR*, mutações foram identificadas nas formas de herança recessiva e dominante com penetrância incompleta, associadas a fenótipos variados como baixa

estatura idiopática, DIGH e atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento (ACCD) [19].

Estima-se que 3% - 30% dos casos com deficiência isolada de GH tenham etiologia genética com mutações principalmente nos genes *GH1* e *GHRHR*. Outros genes, embora pouco frequentes, também cursam com DIGH e NHT e podem ser investigados [53].

1.3 O USO DA TÉCNICA DE SPLE NA IDENTIFICAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À DGH CONGÊNITA

O sequenciamento exômico completo (WES), que consiste na codificação de todas as regiões exônicas, e a utilização de painel que captura apenas regiões de interesse (exônicas ou intrônicas) são as técnicas de SPLE mais comumente utilizadas atualmente.

A taxa de diagnósticos é muito variável e é maior nos casos de doenças com alta probabilidade de condições genéticas subjacentes, doenças monogênicas ou com herança mendeliana bem conhecida [54]. O painel, apesar de realizar sequenciamento restrito a regiões-alvo, possibilita a melhoria da cobertura, com o aumento do número de sondas desenhadas para cobertura destas regiões de interesse e também do sequenciamento de regiões intrônicas.

A primeira descoberta de um gene não previamente relacionado à DHHM por meio do WES, ocorreu em 2013 com Webb *et al.* que descreveram uma variante do tipo *frameshift* em homozigose no gene *ARNT2* identificada em uma família consanguínea com seis indivíduos afetados que apresentavam características

sindrômicas, além de associação com DHHM [55]. Desde esta primeira descoberta, cinco outros genes foram implicados na etiologia de DHHM empregando tal técnica [4].

O presente estudo visa utilizar a técnica de SPLE para determinar o envolvimento de um painel de genes na etiologia do hipopituitarismo congênito.

2 Objetivos

2 OBJETIVOS

1. Utilizar um painel customizado de sequenciamento paralelo em larga escala na investigação genética do hipopituitarismo congênito.

2. Correlacionar os achados moleculares com o fenótipo.

3 Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O estudo foi conduzido conforme os princípios éticos, seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki e nos termos descritos pela Portaria nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

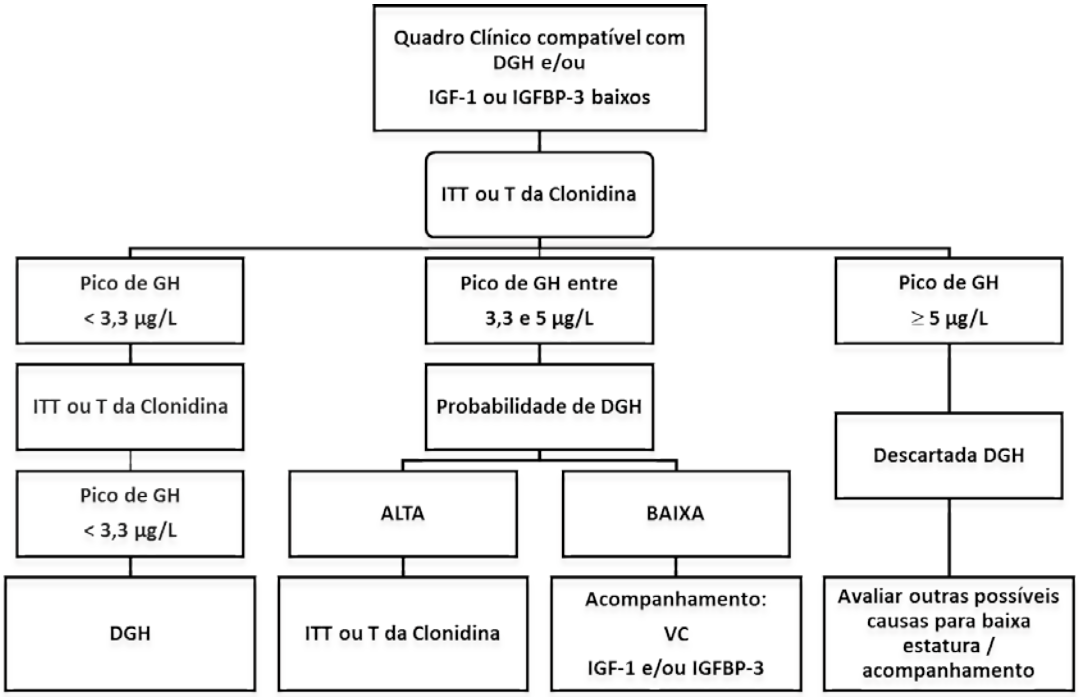
O projeto (FAPESP 13/03236-5) foi submetido à avaliação pela comissão de ética em pesquisa. O consentimento por escrito foi obtido de todos os pacientes e/ou pais/tutores, de acordo com as exigências do Comitê de Ética de cada serviço (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa no Brasil CAAE e Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Niño y del Adulto na Argentina).

3.2 CASUÍSTICA

Foram selecionados 117 pacientes, com diagnóstico de DIGH ou DHHM, acompanhados pela Disciplina de Endocrinologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na Universidade de Cordoba na Argentina, no Hospital de Transplantes Euryclides de Jesus Zerbini e no Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (IAMSPE). As características clínicas dos pacientes estão resumidas nos dados da Tabela 2.

3.2.1 Diagnóstico da Deficiência de GH

A presença de deficiência do hormônio de crescimento foi definida pela avaliação combinada do quadro clínico; dosagens de IGF-1 e IGFBP-3, resposta a testes de estímulo de liberação de GH e avaliação por ressonância magnética das estruturas da região hipotálamo-hipofisária. O diagnóstico de DGH pode ser resumido pela Figura 2.



ALTA: presença de neuro-hipófise ectópica e/ou transecção de haste hipofisária, antecedente de tumor, cirurgia ou RT na região hipotálamo hipofisária, causa genética comprovada de deficiência de GH, presença de outras deficiências hipofisários e/ou DI.

Figura 2 - Diagnóstico da deficiência do hormônio de crescimento; DGH: deficiência do hormônio do crescimento,ITT: teste de tolerância a insulina, GH: hormônio de crescimento, IGF-1: insulin-like growth fator, IGFBP3: insulin-like growth fator binding protein, VC: velocidade de crescimento – adaptado de Berenice BM et al [56]

Quadro clínico compatível com DGH pode ser caracterizado ao nascimento pela presença de hipoglicemia (agravada quando à DGH se associa a deficiência de ACTH), icterícia prolongada com hiperbilirrubinemia direta devido à colestase e hepatite de células gigantes. Pode ainda apresentar micropênis, criptorquidia e hipoplasia da bolsa

escrotal, principalmente quando da associação de deficiência de gonadotrofinas; Quando não tratado, leva principalmente a baixa estatura (Z escore da altura < -2,0) e associado à presença de estigmas como obesidade truncal, aumento da espessura de pregas cutâneas, desenvolvimento muscular diminuído, aparência facial infantil com fronte proeminente e nariz em sela, atraso no fechamento das fontanelas, atraso na dentição, cabelos finos e esparsos, voz aguda e infantil, e idade óssea atrasada em relação à idade cronológica.

Em relação às dosagens hormonais, o diagnóstico se baseia na presença de IGF-I e IGFBP-3 abaixo de -2 escore-Z para a idade e sexo. Quando é realizado teste de estímulo para a liberação de GH, é considerada **f**alta de resposta ao teste de liberação quando o pico de GH < 7 µg/L (IRMA) ou < 5 µg/L (IFMA).

Também foi realizada a avaliação da presença de deficiência dos demais hormônios através de dosagens hormonais basais de LH, FSH, estradiol (sexo feminino) testosterona total (sexo masculino), sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS), TSH, T4 livre, T4 total e prolactina. Alguns pacientes foram submetidos a teste de estímulo para avaliação de deficiência de cortisol utilizanto o teste de insulina ou teste com ACTH sintético (250 mcg/IV). A resposta de cortisol, após hipoglicemia ou ACTH sintético, foi considerada normal quando ocorreu incremento > 8 µg/dL e um pico de cortisol > 18 µg/dL e como deficiência parcial de ACTH quando ocorreu um incremento no valor de cortisol sem atingir o pico de 18 µg/dL. Deficiência de TSH foi determinada por baixas concentrações de T4 livre e/ou T4 total com concentração de TSH baixa ou normal. Hipogonadismo hipogonadotrótico foi definido pela ausência de desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, após 13 anos nas meninas e 14 anos nos meninos, e concentrações de LH e FSH indetectáveis ou

normais. Deficiência de prolactina foi determinada pelo valor de máximo de prolactina < 20 µg/L (RIA), após estímulo com TRH. Deficiência de ADH foi definida pela densidade urinária <1010 e volume urinário > 50 ml/kg em 24h e/ou naqueles pacientes com prova de privação hídrica compatível com diabetes insipidus neurogênico.

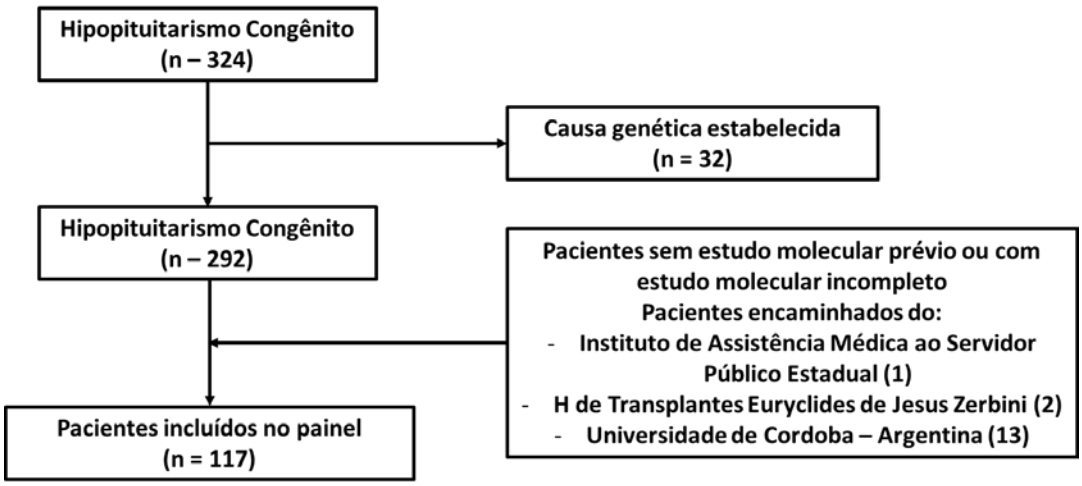


Figura 3 - Pacientes selecionados para estudo

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes selecionados para estudo

Características	
N	117
Sexo (F:M)	53:64
Idade inicial	9,5
Mediana (intervalo)	(6 dias a 43,8)
Consanguinidade	8
Baixa estatura referida na família	29
Z da altura ao diagnóstico	-3,8
Mediana (intervalo)	(-0,3 a -7,8)
Deficiência hormonal	
DIGH	27
DHHM	90
TSH	70
ACTH	59
LH/ FSH	56
ADH	7
Pico de GH	0,9
Mediana (intervalo)	(indetectável a 5,1)
Localização da neuro-hipófise	
Tópica	17
Ectópica	79
Não visualizada	19
Adeno-hipófise	
Ausente	3
Hipoplásica	96
Normal	14
Não descrita	2
Outros achados de RM	
DSO	6
Meningocele esfenoidal	2
Microadenoma	3
Malformação de Chiari	2
Outros	5

DIGH: deficiência isolada do hormônio de crescimento; **DHHM:** deficiência hipotálamo-hipofisária múltipla; **TSH:** hormônio tireoestimulante; **ACTH:** hormônio adenocorticotrófico; **LH:** hormônio luteinizante; **FSH:** hormônio folículo-estimulante; **ADH:** hormônio antidiurético; **DSO:** displasia septo-óptica;

* As imagens de ressonância magnética estavam indisponíveis em dois pacientes

3.3 SEQUENCIAMENTO

3.3.1 Extração do DNA genômico

As amostras de DNA dos pacientes selecionados e familiares foram obtidas a partir de leucócitos de sangue periférico ou de células extraídas por esfregaço da mucosa oral. O DNA foi extraído de acordo com o procedimento padronizado no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular da Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A concentração do DNA extraído foi obtida por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 260 nm (1 unidade DO 260 = 50 μg/mL). A relação ideal entre as leituras entre 260 e 280 nm para caracterização da pureza do material foi superior a 1,75. As amostras foram mantidas congeladas a -20ºC até seu uso.

3.3.2 Desenho de sondas de captura do painel

O painel customizado para o sequenciamento de nova geração de genes relacionados ao DIGH ou DHHM foi elaborado a partir da ferramenta Agilent SureDesign 2.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Esta ferramenta desenha sondas específicas para seleção e captura das regiões genômicas de interesse, com base na metodologia SureSelectXT (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O desenho do estudo foi realizado em janeiro de 2015 e optou-se pela inclusão de 26 genes conhecidos e candidatos até então relacionados ao hipopituitarismo *GH1, GHRH, GHRHR, GHSR, PROP1, POU1F1, GLI2, HESX1, LHX3, LHX4, OTX2,*

PITX2, ARNT2, DMXL2, FGF8, FGFR1, GPR161, HHIP, IGSF1, KAL1, PROKR2, RNPC3, SHH, SOX2, SOX3 e *TGIF1*.

Para o preparo das bibliotecas, foi utilizado um kit de sondas customizado para regiões exônicas. Para o gene *GH1*, optou-se pela inclusão da região promotora.

3.3.3 Genotipagem por sequenciamento de nova geração

As bibliotecas do painel foram elaboradas de acordo com o protocolo SureSelectXT Target Enrichment System for Illumina Paired-End Sequencing Library (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

O sequenciamento do painel foi realizado utilizando a plataforma Illumina (*Illumina, Inc, San Diego*, CA, EUA), produzindo sequências *paired-end* (quando as duas extremidades da molécula do DNA são lidas) de 36 a 100 pares de bases, permitindo leituras de fragmentos de até 200 pares de base.

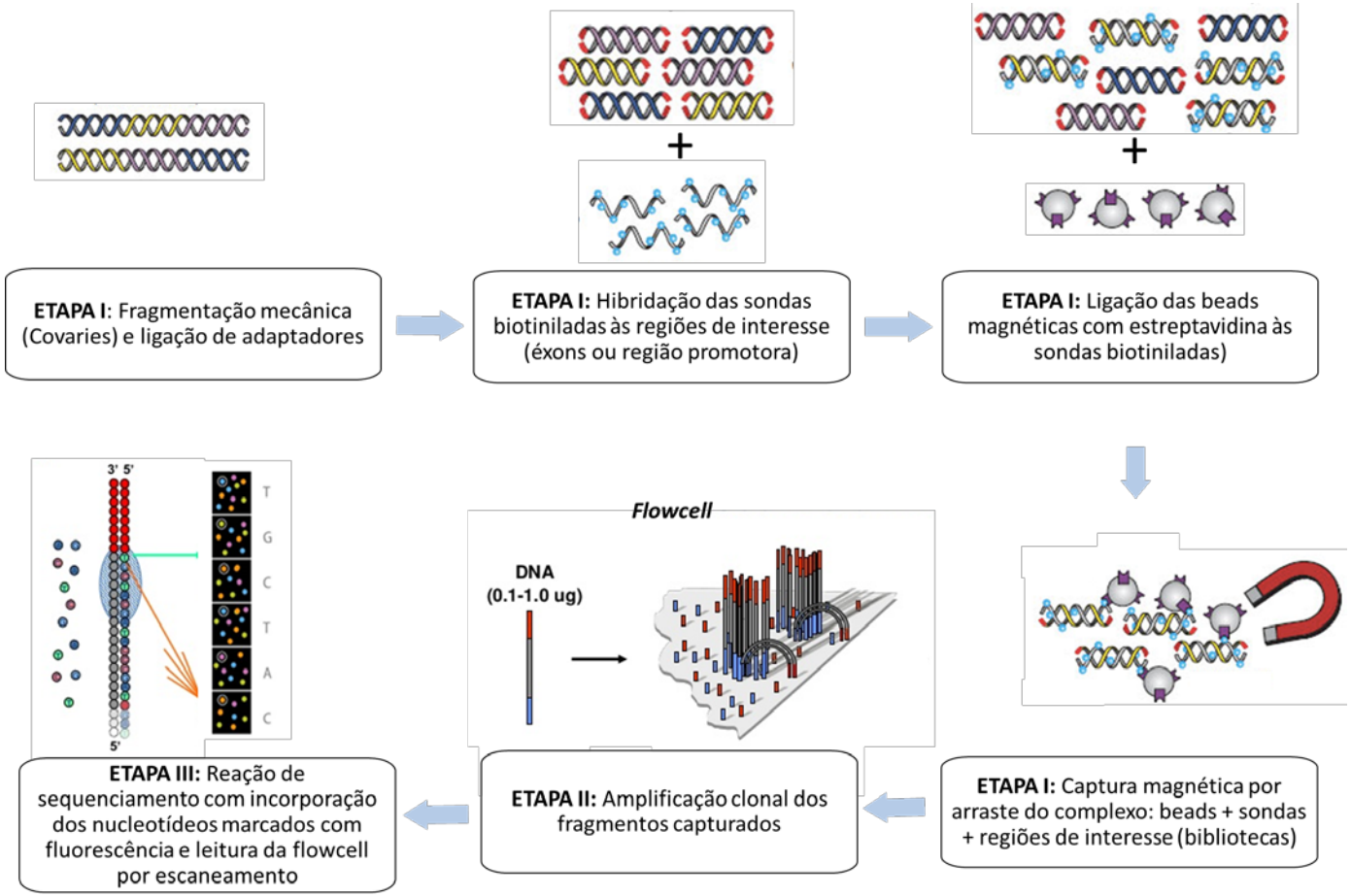
O enriquecimento e o sequenciamento envolveram três etapas fundamentais descritas a seguir e resumidas nos dados da Figura 4.

ETAPA I. Confecção de bibliotecas de fragmentos de DNA: o DNA genômico foi fragmentado de forma mecânica por ultrassonicação centrada, utilizando a plataforma E220 Focused Ultrasonicator (*Covaries, Wonurm*, MA, EUA). Foram adicionados adaptadores e índex que permitiram a identificação de cada uma das amostras. As regiões de interesse foram então capturadas e enriquecidas, utilizando sondas complementares de RNA.

ETAPA II. Amplificação clonal: nesta etapa, as bibliotecas são depositadas em uma lâmina especial, denominada *flowcell*, em cuja superfície encontram-se fixados oligonucleotídeos complementares às moléculas adaptadoras presentes nas

bibliotecas. Cada molécula é amplificada várias vezes (clusterização) por meio de uma reação conhecida como PCR em ponte. Ao final desta etapa, são gerados clones da biblioteca original ligados covalentemente à superfície da *flowcell*.

ETAPA III. Sequenciamento: após a amplificação clonal, as moléculas antissenses são removidas enzimaticamente e o processo de sequenciamento é iniciado com o acoplamento de um oligonucleotídeo iniciador especial. Em seguida, nucleotídeos modificados com terminadores reversíveis marcados com fluoróforos são adicionados ao meio. A cada ciclo de incorporação, são geradas imagens de toda a superfície da *flowcell* por um *scanner* de fluorescência em cada um dos comprimentos de onda específicos para cada fluoróforo. Os clones presentes na superfície da *flowcell* são então identificados e mapeados. A sobreposição das imagens produzidas a cada ciclo de incorporação propicia a identificação da sequência de bases nucleotídicas de cada grupo de moléculas.



Fonte: adaptado de https://www.illumina.com/

Figura 4 - Sequenciamento paralelo em larga escala

3.4 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

O grande volume de dados gerados pelas novas plataformas de sequenciamento requer o emprego de ferramentas computacionais específicas para o tratamento/processamento de toda informação genômica obtida. O fluxo de análise é constituído por etapas que incluem: 1) Análise/controle de qualidade do dado bruto; 2) Alinhamento ao genoma referência humano; 3) Chamada das variantes (genotipagem) e 4) Anotação. O processamento dos dados foi realizado em colaboração com o pesquisador Dr. Antonio Marcondes Lerário da Universidade de Michigan.

1) Análise e controle de qualidade do dado bruto: checagem da estrutura e integridade dos arquivos e cálculo de estatísticas básicas, como número de sequências produzidas.

   Programas utilizados: md5sum (https://linux.die.net/man/1/md5sum), FASTQ Groomer e FASTQC [57].

2) Alinhamento ao genoma referência humano: alinhamento dos fragmentos sequenciados (*reads*) (contidos em arquivos chamados FastQ) a uma sequência referência do genoma humano (hg19 UCSC ou b37 GRC/NCBI). Como o alinhamento é feito sequência a sequência individualmente, torna-se necessário recalibrar o alinhamento realizado na fase anterior, visto que, em algumas situações, diferentes sequências oriundas da mesma região cromossômica apresentam resultados ligeiramente diferentes de mapeamento (por exemplo, quando existem pequenas inserções, deleções ou repetições no genoma-alvo). A

recalibragem pode ser considerada um realinhamento, mas agora de forma contextualizada.

Programa utilizado: BWA (*Burrows-Wheeler Aligner*) [58].

3) Chamada das variantes (genotipagem): a partir do melhor alinhamento possível, é realizada a genotipagem da amostra, que consiste em determinar, com bases estatísticas, todos os alelos existentes. Após isso, uma recalibragem da genotipagem é realizada com o objetivo de remover variantes falso-positivas.

   Programas utilizados: FreeBayes (*Bayesian genetic variant detector*) (variantes pontuais e pequenos indels); CONTRA [59] (copy number variations - CNVs).

4) Anotação: esta etapa consiste em anotar as variantes identificadas e simular, computacionalmente, o impacto funcional de cada uma delas.

   Programas utilizados: SnpEff (http://snpeff.sourceforge.net/) e ANNOVAR (http://www.openbioinformatics.org/annovar)

3.5 SELEÇÃO DAS VARIANTES CANDIDATAS

Foram selecionadas variantes alélicas localizadas em regiões exônicas e sítios de *splicing* com uma frequência populacional (Minor Allele Frequency – MAF) <1% em bases de dados públicos: (global) gnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org/) e (local) ABraOM [60] (http://abraom.ib.usp.br/). Em seguida, foram priorizadas variantes com potencial de patogenicidade, variantes de perda de função (LoF). As variantes foram classificadas conforme os critérios da ACMG / AMP utilizando o

programa de classificação de variantes Varsome (https://varsome.com/) que utiliza os programas de predição de patogenicidade e/ou análise de conservação: DANN [61], DEOGEN2 [62], EIGEN [63], FATHMM [64], GERP [65], LRT [66], MutationAssessor [67], Mutation Taster [68], MutPred2 [69], PROVEAN [70], REVEL [71], SIFT [72], MetaSVM MetaLR [73].

Para avaliação de patogenicidade em região de *splicing* foram utilizados os preditores dbscSNV [74], *Human Splicing Finder Version 2.4.1* [75] e *NetGene2* [76].

As variantes candidatas foram confirmadas utilizando-se o Integrative Genomics Viewer (IGV) para reduzir chamadas falso-positivas.

Todas as variantes consideradas potencialmente patogênicas foram confirmadas nos pacientes e em seus familiares, quando disponíveis, por sequenciamento de Sanger.

As seguintes ferramentas foram utilizadas para auxiliar no processo de priorização das variantes alélicas e as possíveis correlações genótipo-fenótipo:

- *OMIM* (https://www.omim.org/)
- *Pubmed* (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)
- *GeneCards* (http://www.genecards.org/)
- *Human Protein Atlas* (http://www.proteinatlas.org/)
- *HGMD* (http://www.hgmd.cf.ac.uk/)

As variantes potencialmente candidatas foram classificadas utilizando-se os critérios de avaliação publicados pela *The American College of Medical Genetics and Genomics* e *The Association for Molecular Pathology* (ACMG / AMP) como:

1. Patogênica 2. Provavelmente patogênica 3. Variante de significado incerto (VUS) 4. Provavelmente benigna e 5. Benigna (Anexo 2)

4 Resultados

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS MOLECULARES

A profundidade da cobertura média das regiões codificadoras em nosso painel foi 426 (mediana 295) e, pelo menos, 99,6% das bases sequenciadas foram cobertas mais de 20 vezes (Tabela 3).

Tabela 3 - Métricas do sequenciamento

Cobertura (x±DP)	426±417
% com cobertura > 10x	99,81
% com cobertura > 20x	99,62

Nos 117 pacientes com diagnóstico de hipopituitarismo congênito avaliados pelo painel de genes foram encontradas: seis variantes patogênicas (quatro novas) em cinco genes em cinco pacientes (Tabela 4 e Tabela 5), 16 variantes de significado incerto (Anexo 1) e duas variantes (uma nova) em dois genes em três pacientes que apresentam caraterísticas que sugerem ser possivelmente patogênicas (Tabela 6).

Foram identificados variantes patogênicas responsáveis pelo fenótipo de hipopituitarismo em cinco dos 117 pacientes (Tabela 4 e Tabela 5). Estas variantes estavam em genes diretamente envolvidos no desenvolvimento hipofisário (*GLI2*,

OTX2), na diferenciação celular hipofisária (*PROP1*) ou na secreção de GH (*GHRHR*). Todas as variantes estavam ausentes ou eram extremamente raras em bancos de dados locais e públicos (Tabela 4).

Duas variantes patogênicas em heterozigose do tipo nonsense foram identificadas nos genes *GLI2* c.1681G>T e *OTX2* c.295C>T, pacientes 1 e 2 (Tabela 4).

Duas variantes patogênicas em heterozigose composta foram identificadas no gene *PROP1* (c.301_302del; c.109+1G>A) no paciente 3. A variante c.109+1G>A foi identificada pela primeira vez neste painel e recentemente publicada com uma coorte de pacientes brasileiros portadores de mutações no gene *PROP1* [33].

No gene *GHRHR* foram identificadas variantes em homozigose em duas pacientes: na paciente 4, foi identificada uma variante em região consenso de splicing c.57+1G>A e na paciente 5, uma inserção levando a um *frameshift* c.820_821insC.

Tabela 4 – Variantes patogênicas identificadas pelo painel de genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito

Paciente	Gene	Variante	Sequência Referência	Tipo	GnomAD	ABraOM	Herança	Evidência de patogenicidade para classificação da ACMG/AMP	Classificação ACMG/AMP
1	***GLI2***	c.1681G>T:p.Glu561*	NM_005270.4	Nonsense	0	0	Heterozigose	PVS1, PM2, PP3	Patogênica
2	***OTX2***	c.295C>T:p.Gln99*	NM_172337.2	Nonsense	0	0	Heterozigose	PVS1, PM2, PP3	Patogênica
3	***PROP1***	c.301_302del:p.Leu102Cysfs*8	NM_006261.4	Frameshift	0,0001805	0	Heterozigose Composta	PVS1, PM1, PP5	Patogênica
		c.109+1G>A	rs193922688	Sítio de splicing	0	0	Heterozigose composta	PVS1, PM2, PP3	Patogênica
4	***GHRHR***	c.57+1G>A	NM_000823.3 rs2302022	Sítio de splicing	0,00001957	0	Homozigose	PVS1, PM2, PP3	Patogênica
5	***GHRHR***	c.820_821insC:p.Asp274Alafs*113	NM_000823.3	Inserção frameshift	0	0	Homozigose	PSV1, PM2, PP3	Patogênica

ACMG / AMP: Colégio Americano de Genética Médica e Genômica e Associação de Patologia Molecular; **PVS1**: Variante "nula" (nonsense, frameshift, região canônica de splicing ± 1 ou 2, codon de iniciação, deleção simples ou em múltiplos exons) em um gene onde a perda de função é um mecanismo conhecido da doença, **PM1**: Localizado em uma região mutacional hot spot e / ou domínio funcional crítico e bem estabelecido (por exemplo, sítio ativo de uma enzima) sem variação benigna, **PM2**: ausente em controles (ou em frequência extremamente baixa se recessivo) no ExAC, 1000G, ou gnomAD, **PP3**: múltiplas linhas de evidências computacionais suportam um efeito deletério no produto gênico, **PP5**: Fonte confiável recentemente descreve a variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente.

4.2 FENÓTIPO DOS PACIENTES COM VARIANTES PATOGÊNICAS

Todos os pacientes apresentavam deficiência grave de GH (mediana de altura na primeira consulta de –5,0, variando de –7,8 a –4,4) (Tabela 5). Em relação às características de base, como peso e comprimento ao nascer, idade na primeira visita e pico de GH, os pacientes com variantes patogênicas não foram diferentes daqueles com resultados moleculares negativos.

4.2.1 Paciente com a variante *GLI2* c.1681G>T

Paciente 1, sexo masculino, sem história de consanguinidade na família, apresentou relato de complicações durante o parto, hemorragia com necessidade de transfusão em razão da presença de placenta prévia e provável pré-eclampsia. Apresentou desenvolvimento neuropsicomotor normal. Aos 6 anos, procurou atendimento por baixa estatura com altura de 92 cm (Z da altura -4,4) e idade óssea (IO) de 1,5 anos. Foi realizado teste de estímulo com clonidina, apresentando pico de GH de 2,9 ng/ml e teste do glucagon com pico de GH de 6,0 ng/ml (dosado por radioimunoensaio com anticorpos policlonais). O paciente fez uso de rGH (somatropina recombinante humana) dos 6 aos 20,5 anos e evoluiu com puberdade espontânea aos 13 anos, alcançando altura adulta de 167,5 cm (Z da altura -1,0). A ressonância magnética (RM) de sela demonstrou presença de NHE com transecção de haste. O paciente foi submetido a reteste com teste de tolerância a insulina (ITT) para deficiência de GH na fase adulta – sem o uso de rGH por 1 ano – com pico de GH 4,3 ng/ml e IGF-1 208 ng/dl (VR para a idade cronológica: 116 a 341 ng/dl). A resposta ao cortisol foi normal com pico de 20,6 µg/dl e a prolactina basal de 42 ng/ml.

Neste paciente, foi identificada uma variante no gene *GLI2* c.1681G>T (p.Glu561*) que ocasiona um códon de parada prematuro com perda de 1.026 dos 1.587 aminoácidos. A segregação confirmou a presença da mesma variante em sua mãe com baixa estatura (DP da altura de -4,0) e NHE. Seu tio e primo maternos apresentavam relato de polidactilia, mas o estudo genético não pôde ser realizado.

4.2.2 Paciente com a variante *OTX2* c.295C>T

O paciente 2, sexo masculino, sem história de consanguinidade, nascido de parto normal, a termo, 3.450 g, 47 cm de comprimento, sem complicações ao nascimento. Apresentou atraso no desenvolvimento psicomotor, engatinhou aos 2 anos e andou aos 3. Este paciente iniciou acompanhamento recentemente em nosso serviço e em sua primeira consulta aos 7 anos, apresentava altura de 87 cm (Z da altura -6,1). IGF-1 não detectável e atraso de idade óssea (IO de 2 anos). Foram realizados testes de estímulo com clonidina com pico de GH < 0,1 ng/mL e RM de sela, demonstrando hipoplasia de adeno-hipófise, NHE, e displasia septo-óptica com sinais de microftalmia à direita com redução das dimensões do nervo óptico direito. Este paciente iniciou acompanhamento recente em nosso serviço e ainda está em tratamento com rGH.

Foi identificada uma variante *nonsense*, em heterozigose no gene *OTX2* c.295C>T (p.Gln99*) que leva a um códon de parada prematuro com perda de 190 aminoácidos. Esta variante foi confirmada no paciente, em sua mãe de fenótipo normal, uma meia irmã com diagnóstico de microftalmia, um meio irmão com malformação em ouvido interno e externo e estrabismo e uma tia materna com

diagnóstico de Tetralogia de Fallot e atresia tricúspide, sem anomalias craniofaciais e todos com altura normal.

4.2.3 Paciente com variantes *PROP1* [c.301_302del];[c.109+1G>A]

O paciente 3, sexo masculino, sem história de consanguinidade, nasceu de parto normal, sem outros dados do nascimento, e apresentou desenvolvimento neuropsicomotor normal. Ele iniciou acompanhamento em nosso serviço já em idade adulta. Relata uso de rGH dos 18 aos 22 anos de forma irregular, chegando a uma altura final de 144 cm (Z da altura -4,6). O paciente apresentou deficiência de LH/FSH, iniciando reposição com ésteres de testosterona a partir dos 22 anos. Sua RM de hipófise demonstrava sela parcialmente vazia, adeno-hipófise hipoplásica, NHT e haste íntegra.

Foram identificadas duas variantes em heterozigose composta no gene *PROP1* – uma variante já previamente descrita na literatura como c.301_302del (p.Leu102Cysfs*8) e uma que troca uma guanina (G) por uma adenosina (A) em região consenso (+1) de *splicing*, (c.109+1G>A) localizada entre o primeiro íntron e segundo éxon, também predita como patogênica pelos programas Human Splicing Finder Version 2.4.1 NetGene2 e visualizada no IGV (Figura 5).

Pela indisponibilidade do DNA dos pais, a segregação foi realizada apenas em seu irmão não afetado, sendo encontrada apenas deleção c.301_302del, confirmando que as variantes estavam presentes em diferentes alelos (Figura 6).

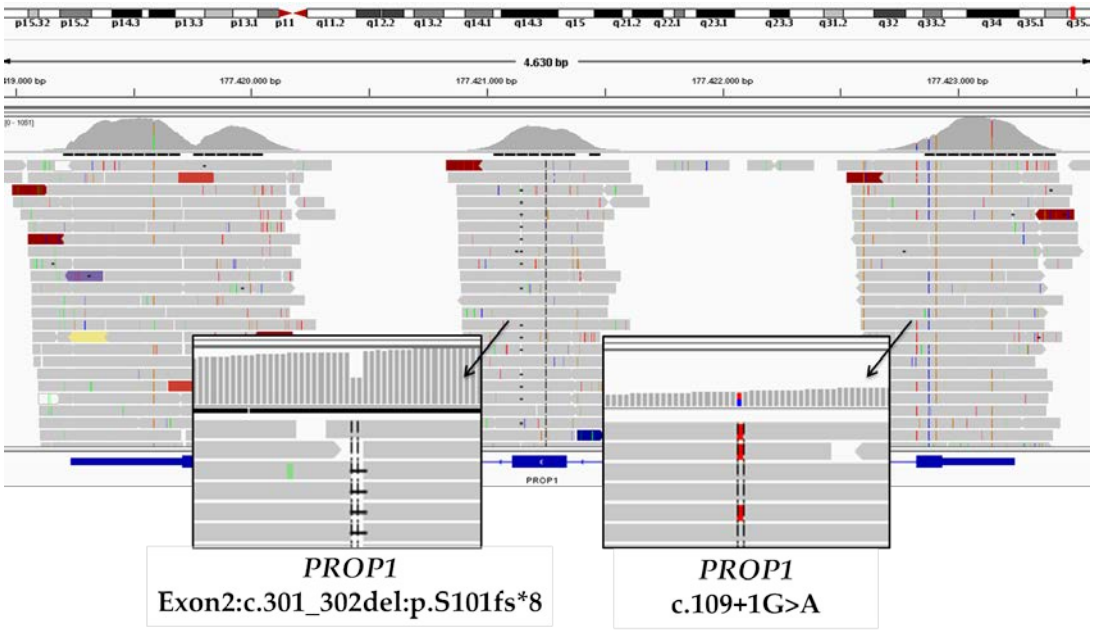


Figura 5 - Visualização das variantes encontradas no gene *PROP1* no programa IGV (Integrative Genomics Viewer). Cada barra cinza corresponde a uma "read" (uma vez em que aquela região foi sequenciada). A deleção c.301_302del:p.S101fs*8 é visualizada pela descontinuidade do "read" e a variante em sítio de splicing c.109+1G>A no gene *PROP1* identificada no painel pela presença de duas cores, o que significa que aquela região foi lida como adenina (A) (cor vermelha) no lugar de guanina (G) (cor azul)

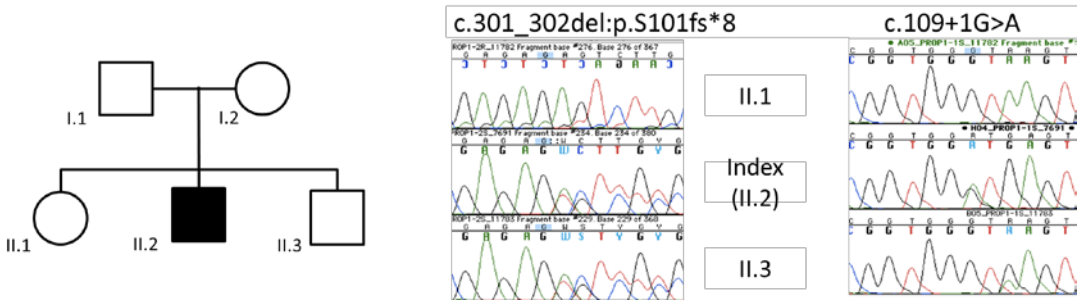


Figura 6 - Eletroferograma do sequenciamento por Sanger das variantes no gene *PROP1* que confirmou que o irmão não afetado (II.3) apresenta apenas uma variante.

4.2.4 Pacientes com variantes *GHRHR* [c.57+1G>A];[c.57+1G>A] e *GHRHR* [c.820_821insC];[c.820_821insC]

A paciente 4, sexo feminino, nascida a termo por parto cesárea, pais consanguíneos, adequada para a idade gestacional, com 2.506 g e 47cm. Na primeira avaliação aos 9,6 anos, ela apresentava altura de 101,5cm (Z da altura -5,2) e IO de 5,5 anos. Foi submetida ao teste de clonidina confirmando deficiência de GH (pico de GH 0,3 ng /mL) e RM de hipófise normal. A paciente foi submetida a reteste aos 14 anos de idade, demonstrando um nível basal de IGF-1 de 122 ng/ml (<-2SD) e ITT com pico de GH de 0,2 ng/ml confirmando sua deficiência de GH. A paciente recebeu tratamento com rGH dos 15,1 aos 16,7 anos, apresentando altura final de 144,2 cm (Z da altura -2,9).

O painel identificou a variante em homozigose no gene *GHRHR* c.57+1G>A (rs2302022) previamente publicada por Salvatori *et al.*, que leva à perda do sítio canônico de *splicing* e formação de uma proteína truncada [52].

A paciente 5 iniciou acompanhamento já adulta com diagnóstico de DIGH sem tratamento prévio e não apresenta dados do nascimento disponíveis. RM demonstrando hipoplasia de adeno-hipófise e neuro-hipófise não visualizada. Foi identificada a variante em homozigose c.820_821insC (p.Asp274Alafs*113) – inserção que leva a um *frameshift* seguido de um códon de parada, confirmada em homozigose no caso índex e em seu irmão com fenótipo de baixa estatura.

Tabela 5- Características clínicas dos pacientes com variantes patogênicas

Pacientes	Gene	Sexo	Parto	História familiar	Idade	DP da altura	Deficiência hormonal	Imagem	Outros fenótipos
1	***GLI2***	M	Cesárea, hemorragia durante o parto	Baixa estatura	6,0	– 4.4	DIGH	Neuro-hipófise ectópica	Ausente
2	***OTX2***	M	Normal	Não	7,0	– 6.1	DIGH	Neuro-hipófise ectópica Displasia septo-óptica	Microftalmia, nistagmo, atraso do DNPM
3	***PROP1***	M	Normal	Não	ND	– 7.8	DGH, TSH, ACTHp	Aplasia de adeno-hipófise, neuro-hipófise tópica	Ausente
4	***GHRHR***	F	Cesárea	Não	9,6	– 5.2	DIGH	Normal	Surdez
5	***GHRHR***	F	Normal	Irmão com DIGH	ND	– 5.8	DIGH	Hipoplasia de adeno-hipófise, Neuro-hipófise NV	Ausente

ND: não disponível, **NV:** não visualizado; **DIGH:** deficiência isolada do hormônio de crescimento; **DGH:** deficiência do hormônio de crescimento; **DNPM:** desenvolvimento neuropsicomotor

4.3 VUS DE INTERESSE

Dentre as variantes classificadas como VUS, foram selecionadas duas de significado incerto nos genes *TGIF1* c.82T> C e *GHSR* c.545T>C. Esta última foi identificada em dois pacientes. Estas variantes foram selecionadas como de interesse por apresentarem associação anterior à deficiência de GH e estudos funcionais prévios realizados no mesmo códon, demonstrando perda de função na proteína. No entanto, não foi possível classificá-las como patogênicas pelos critérios do ACMG / AMP.

4.3.1 Pacientes com a variante *GHSR* c.545T>C

O paciente 6, sexo masculino, sem história de consanguinidade, nasceu de parto vaginal normal, a termo, 3.510 g, 50 cm de comprimento, sem complicações ao nascimento e apresentou desenvolvimento neuropsicomotor normal. O paciente iniciou acompanhamento aos 13,2 anos com altura de 129,5 cm (Z da altura -3,4), IO de 8 anos. Aos 15,3 anos, exames laboratoriais demonstravam IGF-1 de 54 ng/mL (< -2 DP). Foram realizados dois testes de estímulo com clonidina com pico de GH de 2,2 ng/mL e teste de tolerância a insulina (ITT) com pico de GH de 0,72 ng/mL, sem outra deficiência hormonal associada. A RM de hipófise apresentava hipoplasia de adeno-hipófise, haste hipofisária íntegra e a presença de hipersinal em T1 na transição da haste hipofisária e adeno-hipófise, podendo corresponder a cisto hiperproteico ou a NHE. O paciente apresentou puberdade espontânea aos 15,2 anos, ainda com altura de 137,0 cm (Z da altura -3,9), recebeu tratamento com rGH dos 15,2 aos 18,9 anos, apresentando VC de crescimento de 12,3 cm/a no primeiro ano de tratamento, com altura adulta de 167,5 cm (Z da altura -1,0). Foi realizado reteste com ITT –

apresentando resposta de GH de 6,7 ng/mL, indicando ausência de deficiência na fase adulta.

Neste paciente, foi identificada uma variante missense, presente em heterozigose no gene *GHSR* c. 545 T>C (p.Val182Ala) – classificada como variante de significado incerto – confirmada em sua irmã e pai com fenótipos normais e em seu filho, atualmente em investigação para atraso constitucional do crescimento e desenvolvimento, em outro serviço. Os dados de frequência e previsão *in silico* estão detalhados na Tabela 6.

Esta mesma variante no gene *GHSR* foi identificada na paciente 7, nascida de pais não consanguíneos, prematura (24 semanas) em razão de amioniorrexe prematura, nascida de parto pélvico vaginal, 935g. Esta paciente apresentou complicações ao nascimento e permaneceu internada por 3 meses na UTI neonatal. Procurou atendimento aos 7,6 anos, com altura de 95 cm (Z da altura -4,8) e IO de 3,5 anos. A paciente apresentava IGF-1 não detectável e foi realizado teste de estímulo com clonidina com pico de GH de 4,2 ng/ml. Recebeu rGH dos 7,6 aos 18,6 anos, atingindo estatura final de 146 cm (Z da altura -2,7). Aos 9,9 anos, evoluiu com puberdade espontânea e, aos 10,5 anos, foi iniciado bloqueio de puberdade com análogo de GnRH que foi suspenso aos 12,6 anos. Aos 7,6 anos, foi identificada deficiência de TSH, iniciando reposição com levotiroxina.

Nesta paciente, em estudo prévio realizado em nosso serviço, foi identificada uma variante *missense* em heterozigose no gene *GLI2* c.2798G>A (p.Arg933His) [23]. Como pacientes com variantes no *GLI2* apresentam um padrão de herança dominante com penetrância incompleta, sugerindo a presença de um segundo fator para explicar o fenótipo, a paciente foi encaminhada para estudo genético no painel. É interessante

ressaltar que a variante no *GLI2* não foi identificada na primeira análise do painel em razão de baixa cobertura nesta região e foi necessária uma busca ativa no IGV (*Integrative Genome Browser*) para localizá-la (Figura 7). Na avaliação familiar, as mesmas variantes no *GLI2* e *GHSR* estavam presentes em sua mãe com baixa estatura (Z da altura -2,4) e ausentes em sua irmã não afetada. A paciente apresenta história de uma tia com polidactilia, porém a análise de seu DNA não foi realizada.

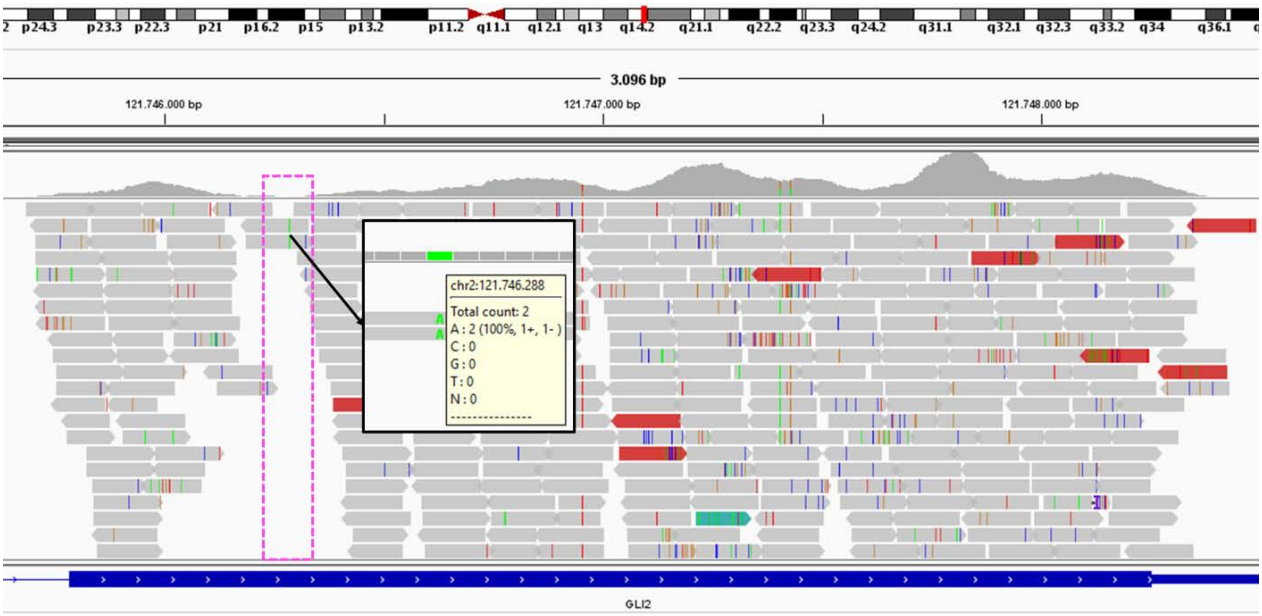


Figura 7 - Visualização das variantes encontradas no gene *GLI2* no programa IGV (*Integrative Genomics Viewer*). Cada barra cinza corresponde a uma *"read"* (uma vez em que aquela região foi sequenciada) e observa-se que a região destacada em rosa foi lida apenas duas vezes. A variante missense gene *GLI2* é representada pela presença de duas cores, o que significa que aquela região foi lida como adenina (A) (cor verde) no lugar de guanina (G)

4.3.2 Paciente com a variante *TGIF1* c.82T> C

O paciente 8, sexo masculino, nasceu de pais não consanguíneos a termo com 3.850 g e 48 cm. Seu desenvolvimento neuropsicomotor foi normal. Iniciou acompanhamento aos 4,9 anos de idade, com uma altura de 86,7 cm (Z da altura -5,5) com IO = 2,5 anos. Realizou um teste de clonidina e ITT, apresentando pico de GH de 0,4 ng/mL. Aos 8,6 anos, foi retestado com novo ITT, com uma resposta de GH de 0,1 ng/mL e cortisol de 7,2 µg / dL (basal de 8,0 µg/dL). Recebeu reposição de rGH de 5 a 19 anos, com uma velocidade de crescimento no primeiro ano de tratamento de 12 cm/ano – atingindo uma altura final de 168,5 cm (Z da altura -0,62). Foi iniciada reposição com acetato de hidrocortisona aos 9,1 anos, quando apresentou um cortisol basal de 6,0 µg / dL e reposição com levotiroxina aos 12,6 anos. RM de hipófise demonstrou ausência de parênquima hipofisário, haste interrompida e NHE.

A nova variante *TGIF1* c.82T> C, uma troca de serina por prolina no códon 28 em heterozigose, foi encontrada no caso índice, em sua mãe e em um irmão não afetados. Os dados de frequência e previsão *in silico* estão detalhados na Tabela 6.

Tabela 6– Variantes de significado incerto de interesse identificadas pelo painel de genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito

Paciente	Gene	Variante	Sequência Referência	Tipo	GnomAD	ABraOM	Herança	Mutation Taster	CADD	SIFT	Polyphen2	PROVEAN	Critérios ACMG / AMP
6	***GHSR***	c.545T>C: p.Val182Ala	NM_198407.2	Missense	0	0.000821	Heterozigose	D	27,4	D	D	D	VUS
7	***GHSR***	c.545T>C: p.Val182Ala	NM_198407.2	Missense	0	0.000821	Heterozigose	D	27,4	D	D	D	VUS
	GLI2*	c.2798G>A: p.Arg971His	NM_005270	Missense	0	0	Heterozigose	D	15,4	T	B	N	VUS
8	***TGIF1***	c.82T>C: p.Ser28Pro	NM_173207.2	Missense	0	0	Heterozigose	D	12,69	T	D	N	VUS

B – benigno; **T** – tolerada; **D** – deletério; **N** – neutro
***** Esta variante nesta paciente foi identificada em estudo prévio realizado em nosso serviço [16]

5 Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram sequenciados 26 genes por meio de sequenciamento paralelo em larga escala – painel de genes – de forma simultânea em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito. Foram identificadas seis variantes patogênicas responsáveis pelo fenótipo de hipopituitarismo congênito em cinco pacientes (taxa positividade de 4%) em quatro genes *GLI2*, *OTX*, *PROP1* e *GHRHR*.

5.1 VARIANTES PATOGÊNICAS

A nova variante do tipo *nonsense* no gene *GLI2* (p.Glu561*) prediz uma proteína truncada com perda dos domínios de dedo de zinco e transativação no caso de escapar de degradação do RNA mensageiro. As variantes no *GLI2* têm penetrância incompleta e podem levar a defeitos da linha média complexos, holoprosencefalia (HPE), fenda palatina, polidactilia e DHHM com fenótipos variáveis [29]. O paciente apresenta um fenótipo leve, com apenas DIGH, NHE e ausência de outras malformações craniofaciais.

A variante *nonsense* identificada no gene *OTX2* (p.Gln107*) no estado heterozigoto, identificada pela primeira vez neste painel, caso traduzida, resultaria em uma proteína truncada com a perda de 190 aminoácidos. As variantes do *OTX2* foram associadas a malformações oculares graves, como anoftalmia, microftalmia e graus variáveis de DHHM [4]. A maioria dos pacientes com mutações no *OTX2* também

apresenta anomalias cerebrais, convulsões e/ou atraso no desenvolvimento neuropsicomotor, o último também presente em nosso paciente.

Em relação às variantes no gene *PROP1* [c.301_302delAG];[c.109+1G>A]: a deleção c.301_302delAG é a variante com maior prevalência no mundo em razão do de efeito fundador [30]; a variante c.109+1G>A foi encontrada pela primeira vez por este painel e, recentemente, publicada como uma nova variante por nossa Unidade em uma coorte de pacientes brasileiros com neuro-hipófise tópica (NHT) e DHHM [33]. Embora a presença de variantes no gene *PROP1* seja maior nos casos familiares e consanguíneos, o paciente aqui descrito é um caso esporádico e o único membro afetado de sua família. Este paciente apresentava deficiência combinada de GH, LH/FSH e desenvolveu tardiamente a deficiência de ACTH aos 23,5 anos que, assim como descrito anteriormente, se desenvolve mais tardiamente [36, 77].

Foram encontradas duas variantes em homozigose do tipo *nonsense* no gene *GHRHR* em dois pacientes, ambos com fenótipo de DIGH. A primeira variante – uma inserção levando a um *frameshift* – foi descrita pela primeira vez no presente estudo e a segunda, uma variante afetando uma região canônica de sítio de *splicing GHRHR* c.57+1G>A, inicialmente foi relatada em uma grande comunidade com DIGH na cidade de Itabaianinha no Nordeste do Brasil. Sua maior prevalência no país ocorre pela presença de um fenômeno de gene fundador [24]. A maioria dos pacientes com DIGH com modo de herança autossômico recessivo tem variantes no *GHRHR*, sendo, portanto, um dos primeiros genes candidatos a serem rastreados em casos consanguíneos.

5.2 VUS DE INTERESSE

Foram selecionadas duas variantes de significado incerto nos genes *GHSR* e *TGIF1*.

Mutações no gene *GHSR* foram implicadas na etiologia da baixa estatura, sendo associadas tanto com ACCD como com DIGH [19, 78]. Em nossa casuística, foi identificada a variante do tipo *missense* em heterozigose *GHSR* c.545T>C (p.Val182Ala), prevista como deletéria em cinco programas de predição *in silico*. Esta variante está ausente no banco de dados GnomAD e presente no banco de dados brasileiro com uma frequência de 1/1.218 alelos, e foi previamente publicada no estudo de Pugliese *et al.* associada à ACCD demonstrando redução de 50% da atividade basal em comparação à variante selvagem, o que se correlacionou com diminuição da expressão na superfície celular [19]. Diferentemente do estudo publicado, na família aqui descrita, a variante não segregou perfeitamente com o fenótipo (irmã e pai carreadores sem deficiências hormonais). No entanto, em estudos anteriores foi descrita penetrância incompleta neste gene, bem como a variabilidade fenotípica [78]. Por esses motivos, acredita-se que essa variante possa estar envolvida com o fenótipo de nosso paciente.

O TGIF1 atua como um repressor transcricional essencial no desenvolvimento do eixo neural durante o desenvolvimento do prosencéfalo ventral, regulando a via de sinalização Shh, sendo crucial para a bifurcação do prosencéfalo humano e formação de estruturas da linha média. Variantes com perda de função foram identificadas pela primeira vez, como causa de holoprosencefalia em humanos por Gripp *et al*. em 1998 [79]. O único relato de uma variante desse gene c.799C>T, (p.Gln267*), como

causa de DHHM, foi descrito por Tatsi *et al.* [80], em paciente com deficiência de GH, TSH e LH / FSH, incisivo único central e PSIS (Pituitary Stalk Interruption Syndrome). A variante em heterozigose, identificada no gene *TGIF1* c.82T>C (p.Ser28Pro) em nossa casuística, afeta o mesmo códon de uma mutação *missense* relatada anteriormente *TGIF1* c.83C>T (p.Ser28Cys), encontrada em um paciente com defeitos na linha média sem hipopituitarismo. Estudos funcionais realizados por Gripp *et al* [79]. demonstraram que a proteína p.Ser28Cys diminui a repressão transcricional dependente de RXR (receptor de ácido retinóico) e TGFβ (*transforming growth factor beta*) e perde a capacidade de repressão via CtBP (*C-terminal-binding protein 1*). Dessa forma, embora classificada como VUS, a localização da variante e a presença de fenótipo semelhante ao anteriormente descrito sugerem a possibilidade de que a referida variante possa estar envolvida na etiologia do hipopituirarismo de nosso paciente.

Até o momento, apenas um estudo utilizou um painel de gene alvo para o diagnóstico de uma coorte de pacientes com HC. Foram estudados 51 pacientes de 44 famílias não relacionadas. A mesma mutação heterozigótica no gene *GH1* (p.209Arg>His) foi identificada em duas famílias com o fenótipo de DIGH [81]. Outros estudos utilizaram painel de genes ou exoma para estudar pacientes com baixa estatura por diferentes etiologias, incluindo poucos pacientes com DGH. Dauber *et al.*[82], estudaram 1.077 genes em 192 pacientes (31 com DHHM) e encontraram quatro variantes patogênicas nos genes *PTPN11* e *IGF1R* (nenhum paciente com DHHM). Hauer *et al.*[83] sequenciaram 200 pacientes com baixa estatura que foram submetidos a extensa avaliação clínica e endocrinológica para excluir defeitos na via do hormônio de crescimento e identificaram uma variante no gene *GHSR*.

Como limitações do estudo atual, destaca-se que a maioria dos pacientes já havia sido avaliada para algum defeito genético em genes classicamente associados ao HC, porém pelo método de Sanger, o que provavelmente tenha implicado em uma menor taxa de resultados positivos.

O diagnóstico de deficiência de GH é complexo e, geralmente, envolve estudos auxológicos, hormonais e de imagem. A modesta taxa positiva de triagem genética de HC obtida com painéis genéticos indica que essa ferramenta genética ainda não pode substituir completamente o diagnóstico clínico.

Nos casos em que o paciente apresente um quadro clínico que, classicamente, aponte para uma causa frequente como, por exemplo, DHHM com neuro-hipófise tópica, que é fortemente associada a defeitos genéticos no *PROP1*, a abordagem de gene candidato pode ser efetiva.

No entanto, a dificuldade de correlação precisa genótipo-fenótipo na maioria dos pacientes com HC indica que o painel de genes oferece vantagens no diagnóstico genético, uma vez que se pode estudar inúmeros genes simultaneamente com precisão.

6 Conclusões

6 CONCLUSÕES

1. Um painel de genes associados ao hipopituitarismo congênito para sequenciamento paralelo em larga escala foi confeccionado com sucesso.

2. Em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito foram encontradas seis variantes patogênicas em cinco pacientes (4%), incluindo novas variantes nos genes *GLI2*, *OTX2*, *PROP1* e *GHRHR*.

3. A correlação genótipo-fenótipo nos pacientes com variantes patogênicas e suspeitas para patogenicidade permitiu expandir o número de variantes e o quadro clínico relacionado a estes genes

4. O sequenciamento paralelo em larga escala de um painel de genes para hipopituitarismo congênito é um método útil para rastrear simultaneamente variantes de relevância biológica e clínica para a deficiência congênita de GH.

7 Anexos

Anexo 1 – 16 variantes de significado incerto, identificadas pelo Painel de Genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito

Gene	Variante	Sequência Referência	GnomAD	ABraOM	MutationTaster	GERP	SIFT	PROVEAN
ARNT2	c.1066A>G p.Ser356Gly	NM_014862	0	0	D	5,02	T	N
FGF8	c.G127T p.Gly43Cys	NM_033163.3	0	0	D	2,84	T	N
FGFR1	c.G566A p.Arg189His	NM_023110.2	0,00006092	0	D	5,56	T	N
GH1	c.134G>A p.Arg45His *	NM_000515.3	0,0001	0	D	1,77	T	N
GHRH	c.89G>A p.Arg30Gln	NM_021081.4	0.000012	0	N	-2,62	T	N
GHRHR	c.20C>T p.Ala7Val	ENST00000409316.1	0.00002122	0	N	-8,68	D	D
GHRHR	c.29T>G p.Val10Gly	NM_000823	0,0002	0	N	-0,242	D	N
GLI2	c.1106V>C p.Val369Ala	NM_005270	0,0004	0	N	4,81	T	N
GLI2	c.4729G>A p.Glu1577Lys	NM_005270	0,00006465	0	D	4,98	D	D
KAL1	c.A31C p.Thr11Pro	NM_000216.2	0	0	N	0,505	T	N

continua

Anexo 1 - 16 variantes de significado incerto, identificadas pelo Painel de Genes em uma coorte de 117 pacientes com hipopituitarismo congênito (conclusão)

Gene	Variante	Sequência Referência	GnomAD	ABraOM	MutationTaster	GERP	SIFT	PROVEAN
KAL1	c.716C>G: p.Thr239Arg	NM_000216.2	0	0	D	4,15	D	D
KAL1	c.911A>G p.Asn304Ser	NM_000216.2	0.000192	0	N	4,11	T	N
PITX2	c.460A>G p.Met154Val	NM_153427.2	0,0003	0	D	4,92	T	N
POU1F1	c.A370G p.Met124Val	NM_000306.2	0,0026	0	D	4,46	T	N
PROP1	c.G675T p.Trp225Cys	NM_006261.4	0	0	D	2,35	D	D
TGIF1	c.320A>T p.Gln107Leu	NM_173208.1	0.000322	0	A	4,25	T	D

***** Encontrada em dois pacientes

Anexo 2 - Critérios utilizados pela ACMG/AMP – Colégio Americano de Genética Médica e pela Associação de Patologia Molecular – para classificação das variantes encontradas

Grupo de Evidência	Abreviação	Significado	Grau de Evidência
Frequência Populacional	PS4	A prevalência da variante nos indivíduos afetados é significativamente maior quando comparada com a prevalência em controles	Forte para patogenicidade
	PM2	Variante ausente nos bancos de dados populacionais (*1000Genomes*, ExAC) (ou presente em frequência extremamente baixa, para os casos recessivos)	Moderado para patogenicidade
	BS1	A frequência do alelo é maior que a esperada para a doença	Forte para benignidade
	BS2	Variante para doença recessiva (em homozigose), dominante (em heterozigose) ou ligada ao X (hemizigose), com penetrância completa e de início precoce, observada em indivíduo adulto saudável	Forte para benignidade
	BA1	Frequência alélica maior que 5% nos bancos de dados populacionais (*1000Genomes*, ExAC)	Benigno por si só

continua

Anexo 2 - Critérios ulitizados pela ACMG/AMP – Colégio Americano de Genética Médica e pela Associação de Patologia Molecular – para classificação das variantes encontradas (continuação)

Grupo de Evidência	Abreviação	Significado	Grau de Evidência
Predição *In silico*	PVS1	Variante *nonsense*, *frameshift*, em sítios de *splice* canônicos ±1 ou 2, códon de iniciação ou deleção de 1 ou vários exons (*null variant*) em um gene no qual variantes com perda de função (*LoF*) são mecanismos conhecidos de doença	Muito forte para patogenicidade
	PS1	Troca de aminoácido já estabelecida como patogênica, independente da troca do nucleotídeo	Forte para patogenicidade
	PM4	Modificação no tamanho da proteína causada por deleções ou inserções *in-frame* em região não repetitiva ou por variantes que perdem o códon de parada (tipo *stop-loss*)	Moderado para patogenicidade
	PM5	Nova variante *missense* em um aminoácido em que uma variante *missense* diferente já foi estabelecida como patogênica	Moderado para patogenicidade
	PP3	Várias ferramentas computacionais suportam a evidência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no sítio de *splicing* etc)	"Supporting" para patogenicidade
	BP1	Variante *missense* em um gene no qual variantes com perda de função (*LoF*) são mecanismos conhecidos de doença	Fraco para benignidade
	BP3	Deleções ou inserções *in-frame* em região repetitiva sem função conhecida	Fraco para benignidade
	BP4	Várias ferramentas computacionais sugerindo ausência de efeito deletério no gene ou proteína (conservação evolutiva, impacto no sítio de *splicing* etc)	Fraco para benignidade
	BP7	Variante sinônima cujas ferramentas de predição de dano a sítio de *splicing* não predizem impacto na sequência consenso de *splice* nem a criação de um novo sítio, e o nucleotídeo não é conservado	Fraco para benignidade

continua

Anexo 2 - Critérios ulitizados pela ACMG/AMP – Colégio Americano de Genética Médica e pela Associação de Patologia Molecular – para classificação das variantes encontradas (conclusão)

Grupo de Evidência	Abreviação	Significado	Grau de Evidência
Estudos Funcionais	PS3	Presença de estudos funcionais (*in vitro* ou *in vivo*) bem estabelecidos que suportem o efeito prejudicial no gene ou sua proteína	Forte para patogenicidade
	PM1	Variante localizada em uma região *hotspot* para mutações e/ou região importante já estabelecida com um domínio funcional da proteína, sem variantes descritas como benignas	Moderado para patogenicidade
	PP2	Variante *missense* em um gene com uma baixa taxa de mutações *missense* benignas e no qual esse tipo de variante é considerado um mecanismo comum de doença	Apoia patogenicidade
	BS3	Presença de estudos funcionais (*in vitro* ou *in vivo*) bem estabelecidos mostrando ausência de efeito prejudicial para a proteína ou sítio de *splicing*	Forte para benignidade
Segregação	PP1	Segregação da variante (em um gene conhecido como causador de doença) com a doença em uma família com vários membros afetados	Moderado para patogenicidade
	BS4	Ausência de segregação nos indivíduos afetados da família	Forte para benignidade
Dados do Alelo	PM3	Variante detectada em *trans* com uma variante patogênica para as doenças recessivas	Moderado para patogenicidade
	BP2	Variante detectada em *trans* com uma variante patogênica dominante com penetrância completa ou observada em *cis* com uma variante patogênica em qualquer tipo de herança	Fraco para benignidade
Outros Dados	PP4	O fenótipo do paciente ou a história da família são bastante específicos de uma doença monogênica	Apoia patogenicidade
	BP5	Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença	Fraco para benignidade
Dado Artefato	--	Artefato de sequenciação conforme determinado por profundidade, qualidade ou outros dados previamente revisados	--

ANEXO 3 – PUBLICAÇÃO

Endocrine CONNECTIONS | M Nakaguma *et al.* | Novel pathogenic variants in congenital hypopituitarism | 8:5 | 590–595

RESEARCH

Genetic diagnosis of congenital hypopituitarism by a target gene panel: novel pathogenic variants in *GLI2*, *OTX2* and *GHRHR*

Marilena Nakaguma[1], Fernanda A Correa[1], Lucas S Santana[2], Anna F F Benedetti[1], Ricardo V Perez[3], Martha K P Huayllas[4], Mirta B Miras[5], Mariana F A Funari[1], Antonio M Lerario[6], Berenice B Mendonca[1], Luciani R S Carvalho[1], Alexander A L Jorge[2] and Ivo J P Arnhold[1]

[1]Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
[2]Unidade de Endocrinologia Genética, Laboratório de Endocrinologia Celular e Molecular LIM25, Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil
[3]Serviço de Endocrinologia, Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo, Instituto de Assistência Médica ao Servidor Público Estadual (HSPE-IAMSPE), São Paulo, Brasil
[4]Hospital de Transplantes Euryclides de Jesus Zerbini, São Paulo, Brasil
[5]Hospital de Niños Santísima Trinidad, Cordoba, Argentina
[6]Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan, USA

Correspondence should be addressed to I J P Arnhold: iarnhold@usp.br

Abstract

Aim: Congenital hypopituitarism has an incidence of 1:3500–10,000 births and is defined by the impaired production of pituitary hormones. Early diagnosis has an impact on management and genetic counselling. The clinical and genetic heterogeneity of hypopituitarism poses difficulties to select the order of genes to analyse. The objective of our study is to screen hypopituitarism genes (candidate and previously related genes) simultaneously using a target gene panel in patients with congenital hypopituitarism.
Methods: Screening of 117 subjects with congenital hypopituitarism for pathogenic variants in 26 genes associated with congenital hypopituitarism by massively parallel sequencing using a customized target gene panel.
Results: We found three novel pathogenic variants in *OTX2* c.295C>T:p.Gln99*, *GLI2* c.1681G>T:p.Glu561* and *GHRHR* c.820_821insC:p.Asp274Alafs*113, and the previously reported variants in *GHRHR* c.57+1G>A and *PROP1* [c.301_302delAG];[c.109+1G>A].
Conclusions: Our results indicate that a custom-designed panel is an efficient method to screen simultaneously variants of biological and clinical relevance for congenital GH deficiency. A genetic diagnosis was possible in 5 out of 117 (4%) patients of our cohort. We identified three novel pathogenic variants in *GHRHR*, *OTX2* and *GLI2* expanding the spectrum of variants associated with congenital hypopituitarism.

Key Words

- congenital hypopituitarism
- growth hormone deficiency
- mutations
- massively parallel sequencing
- high-throughput nucleotide sequencing
- target gene panel

Endocrine Connections (2019) **8**, 590–595

Introduction

Congenital hypopituitarism (CH) is a rare disorder (incidence of 1:3500–10,000 births) defined by the deficiency of one or more pituitary hormones (1, 2). Clinical presentation varies, ranging from isolated growth hormone deficiency (IGHD) to combined pituitary hormone deficiencies (CPHD). CH also varies with respect to hypothalamic–pituitary anatomy from normal magnetic resonance imaging to the presence of midline defects such as pituitary stalk interruption syndrome (PSIS) and/or severe complex

https://ec.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/EC-19-0085
© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

craniofacial malformations, such as septo-optic dysplasia (SOD).

The genetic defects leading to CH were classified in: defects in GH secretion (*GH1*, *GHRHR*); defects in pituitary cell differentiation (*PROP1*, *POU1F1*) and defects in pituitary development (such as *HESX1*, *GLI2*, *OTX2*) (2). The most common genes implicated are those encoding *GH1* and *GHRHR* in IGHD and *PROP1* in CPHD, especially in certain geographical regions. Until now, most studies used the candidate-gene approach as the main strategy to identify the genetic cause of CH (3). As this strategy considers the patient's clinical presentation to guide the molecular investigation, genes were heterogeneously screened in most studies – the same genes were not analysed in the entire cohort. Moreover, as the clinical phenotype is highly variable, we cannot assure that all possible causative genes were excluded (4). The use of massive parallel sequencing, mostly targeted sequencing panel or whole exome sequence (WES), allows the screening of several genes simultaneously with high accuracy in a less time-consuming way.

In the present study, we developed a comprehensive gene panel for systematic assessment of CH including previously known and newly discovered genes related to CH in a large cohort with the objective of expanding the clinical and etiological spectrum of this disease.

Patients and methods

Patients with CH followed at the Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento (São Paulo, Brazil) and Hospital de Niños Santísima Trinidad (Cordoba, Argentina) with previous positive genetic diagnosis by Sanger sequencing with the candidate-gene approach were not included in this study. We selected 117 subjects with CH of unknown cause (104 from Brazil and 13 from Argentina) (Fig. 1). The patients were predominantly male (55%, $n=64$), only eight were born from consanguineous parents and another 25 had relatives with short stature. Most of them had CPHD (77%, $n=90$) and ectopic posterior pituitary (EPP) lobe (68%, $n=79$) (Fig. 1). The median age of the first visit was 11 years (ranging from 6 days to 51.9 years), height SDS of –3.8 (ranging from –1.8 to –7.4) and GH peak of 1.7 µg/dL (ranging from undetectable to 4.7 µg/dL). This study was approved by the respective Local Ethics Committees ('Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa' in Brazil and 'Comité Institucional de Ética de la Investigación en Salud del Niño y del Adulto' in Argentina) and the patients or guardians gave their written informed consent.

Serum levels of TSH, GH, LH, FSH, PRL, cortisol, dehydroepiandrosterone sulphate, total thyroxine, free thyroxine, insulin-like growth factor 1 (IGF-1), oestradiol or testosterone levels were measured at baseline. Stimulatory tests were performed for the diagnosis of GH and other pituitary hormone deficiencies as previously described (5). In neonates, GH (cut-off limit <5 ng/mL) deficiency was evaluated considering the baseline GH measurement during hypoglycaemia and IGF-1 and IGFBP-3 levels less than –2 SDS for age and sex. As patients were studied at different centres using different hormonal assays, normal ranges of each centre were considered.

Target gene panel

Genomic DNA was extracted from peripheral blood leucocytes of all patients. A customized gene panel was

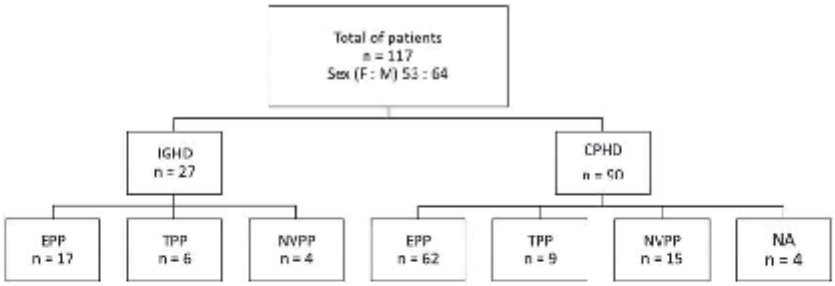


Figure 1
Clinical features of sequenced patients. CPHD, combined pituitary hormone deficiency; EPP, ectopic posterior pituitary lobe; IGHD, isolated growth hormone deficiency; NA, not available; NVPP, non-visualized posterior pituitary; TPP, topic posterior pituitary lobe.

https://ec.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/EC-19-0085
© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

designed using Agilent Sure Design (Agilent Technologies, Inc.) with probes for 26 genes previously related to hypopituitarism *GH1, GHRH, GHRHR, GHSR, PROP1, POU1F1, GLI2, HESX1, LHX3, LHX4, OTX2, PITX2, ARNT2, DMXL2, FGF8, FGFR1, GPR161, HHIP, IGSF1, KAL1, PROKR2, RNPC3, SHH, SOX2, SOX3* and *TGIF1* (2).

Genomic DNA was mechanically fragmented using Covaris. Libraries were constructed using SureSelect Target Enrichment System Technology in accordance with the manufacture's protocols (Agilent Technologies). The sequences were generated in the Illumina NextSeq 500 platform running on paired-end mode. Reads were aligned to the GRCh37/hg19 assembly of the human genome with the Burrows-Wheeler aligner (BWA-MEM) (GNU General Public License version 3.0 (GPLv3), MIT License, Cambridge, MA, USA). Variant calling was performed with Freebayes (https://wiki.gacrc.uga.edu/wiki/Freebayes) and the resulting variant call formats (VCFs) were annotated with ANNOVAR (http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/).

The targeted panel sequencing data were screened for rare variants (MAF <1%) in public global and Brazilian databases: gnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org/) and ABraOM (http://abraom.ib.usp.br/), located in exonic regions and consensus splice site sequences. Next, our variant filtration prioritized genes based on their potential to be pathogenic: loss-of-function (LoF) variants and variants predicted to be pathogenic by multiple in silico programmes (SIFT, PolyPhen2, Mutation Taster, PROVEAN and CAAD). The sequencing reads carrying candidate variants were inspected visually using the Integrative Genomics Viewer (IGV) to reduce false-positive calls. Sanger sequencing confirmed all pathogenic and probably pathogenic variants. (Primer sequence and amplification protocols are available upon request.) The variants at the final list were assessed for the clinical interpretation of pathogenicity using InterVar (http://wintervar.wglab.org/) according to the American College of Medical Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology (ACMG/AMP) variant pathogenicity guidelines (6).

Results

Molecular results

The median coverage depth of the coding regions in our panel data was 462×, with at least 99.6% of the sequenced bases covering more than 20-fold.

We identified causative pathogenic variants in 5 of 117 CH patients (diagnostic yield of 4%) (Table 1). These variants were in genes directly involved in GH secretion (*GHRHR*), in pituitary cell differentiation (*PROP1*) and in pituitary development (*GLI2, OTX2*). All variants were absent or extremely rare in local and public databases (Table 1).

Biallelic LoF variants were identified in *GHRHR* and *PROP1* genes. One pathogenic mutation located in a consensus splice site (c.57+1G>A) and another causing a frameshift mutation (c.820_821insC:p.Asp274Alafs*113) in *GHRHR* were found in homozygous state, each in one patient with IGHD. Two pathogenic variants in *PROP1* were identified in compound heterozygous state in one patient with CPHD by this panel and has been recently published with a cohort of *PROP1* Brazilian patients (7).

Two novel heterozygous nonsense pathogenic variants were identified in *GLI2* (c.1681G>T:p.Glu561*) and *OTX2* (c.295C>T:p.Gln99*), each one in one subject.

Phenotype of subjects with variants of interest

Characteristics of affected subjects are detailed in Table 2. Weight, length at birth, GH peak, age and height SDS at first visit did not differ significantly from those with negative molecular results. All patients were severely affected at presentation (median height SDS of −5.8, ranging from −7.8 to −4.4) (Table 2).

Among the patients with homozygous variants in *GHRHR*, one patient was born to consanguineous parents and the other patient's parents came from the same small village and probably presented some degree of consanguinity. The second case had a short brother and the presence of the same variant was identified in homozygous state by Sanger sequencing.

The patients carrying variants in *GHRHR* had IGHD and topic posterior pituitary (TPP). The patient with *PROP1* mutation had CPHD (GH, TSH and partial ACTH deficiencies) and TPP.

Patients with pathogenic variant in genes precociously expressed during hypothalamic-pituitary development, *GLI2* and *OTX2*, presented IGHD and EPP.

The mother of the patient with *GLI2* variant, also carrying the same mutation, has short stature (−4.0 HSDS), EPP, hypoplasia of anterior pituitary and thin stalk, despite having IGF-1 levels in the normal range for her advanced age. The index patient's mother referred that her brother and nephew (not available for clinical or genetic studies) had polydactyly.

https://ec.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/EC-19-0085
© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

Endocrine CONNECTIONS | M Nakaguma *et al.* | Novel pathogenic variants in congenital hypopituitarism | 8:5 | 593

Table 1 Pathogenic variants identified by targeted panel sequencing in a cohort of 117 patients with congenital hypopituitarism.

Patient	Gene	Allelic variant	GnomAD	ABraOM	Inheritance	Evidence of pathogenicity according to ACMG/AMP	Final ACMG/AMP classification	RefSeq ID
1	*GHRHR*	c.57+1G>A	0.00001957	0	Homozygous	PVS1, PM2, PP3	Pathogenic	NM_000823.3 rs2302022
2	*GHRHR*	c.820_821insC: p.Asp274Alafs*113	0	0	Homozygous	PVS1, PM2, PP3	Pathogenic	NM_000823.3
3	*PROP1*	c.301_302del: p.Leu102Cysfs*8	0,0001805	0	Compound Heterozygous	PVS1, PM1, PP5	Pathogenic	NM_006261.4 rs193922688
		c.109+1G>A	0	0	Compound Heterozygous	PVS1, PM2, PP3	Pathogenic	NM_006261.4
4	*GLI2*	c.1681G>T:p.Glu561*	0	0	Heterozygous	PVS1, PM2, PP3	Pathogenic	NM_005270.4
5	*OTX2*	c.295C>T:p.Gln99*	0	0	Heterozygous	PSV1, PM2, PP3	Pathogenic	NM_172337.2

PVS1, null variant (nonsense, frameshift, canonical ±1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LoF is a known mechanism of disease; PM1, located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g. active site of an enzyme) without benign variation; PM2, absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium; PP3, multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene product; PP5, reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation.

The patient carrying the mutation in *OTX2* had microphthalmia, nystagmus and neuropsychomotor developmental delay.

Discussion

In this study, we screened simultaneously 26 genes in a cohort of 117 patients with CH using a target gene panel approach and identified five causative pathogenic variants (positive yield of 4%) in genes *GHRHR*, *PROP1*, *GLI2* and *OTX2*. A limitation of this study is that this cohort included, in addition to patients who were not sequenced before, patients in whom some candidate genes had been negative by Sanger sequencing. Therefore, a higher yield might be expected in a prospective cohort.

We found two null homozygous mutations in *GHRHR* in two patients and, as expected, both patients had IGHD with orthotopic posterior pituitary lobe. One variant was a frameshift insertion described for the first time in the present study and the other was a splicing mutation (c.57+1G>A) initially reported in a large kindred with isolated GH deficiency from Itabaianinha in Northeastern Brazil (8). The same variant in homozygous and compound heterozygous state was also previously described in other Brazilian familial and sporadic cases and a founder effect was demonstrated (9). Most patients with autosomal recessive IGHD have variants in *GHRHR*

Table 2 Clinical characteristics of patients with pathogenic variants.

Patients	Gene	Sex	Delivery	Family history	Height SDS at first visit	Hormonal deficiency	MRI	Associated complex phenotype
1[a]	*GHRHR*	F	Caesarean section	No	−5.2	IGHD	Normal	Deafness
2[b]	*GHRHR*	F	Normal	Affected brother	−5.8	IGHD	Anterior pituitary hypoplasia, NVPP	Absent
3	*PROP1*	M	Normal	No	−7.8	GH, TSH, ACTHp	Anterior pituitary hypoplasia, TPP	Absent
4	*GLI2*	M	Caesarean section, hemorrhage during labour	Reported short stature	−4.4	IGHD	EPP	Absent
5	*OTX2*	M	Normal	No	−6.1	IGHD	EPP, septo-optic dysplasia	Microphthalmia, nystagmus, neuropsychomotor developmental delay

[a]Born to consanguineous healthy parents; [b]parents came from the same small village.
EPP, ectopic posterior pituitary; IGHD, isolated growth hormone deficiency; MRI, magnetic resonance imaging; NVPP, non visualized posterior pituitary; TPP, topic posterior pituitary.

https://ec.bioscientifica.com
https://doi.org/10.1530/EC-19-0085
© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

which is therefore one of the first candidate genes to be screened in consanguineous cases (10).

We found two pathogenic variants in compound heterozygous state in *PROP1* [c.301_302delAG];[c.109+1G>A] in one subject. Whereas c.301_302delAG is the most common *PROP1* variant worldwide due to a founder effect, the c.109+1G>A variant was first found by this panel and recently published as a novel variant by our Unit together within a cohort of Brazilian patients (7, 11). Although there is an increased prevalence of familial cases and consanguinity among patients with CPHD due to *PROP1* variants, the patient described here is a sporadic case and the only affected member of his family (7).

One patient in our cohort had a pathogenic stop codon variant in *GLI2* (p.Glu561*) that predicts a truncated protein with loss of the zinc finger and transactivation domains. Variants in *GLI2* have incomplete penetrance and can lead to complex midline defects, holoprosencephaly (HPE), cleft palate, polydactyly and CPHD with variable phenotypes (12, 13). Our patient presents a mild phenotype with only IGHD, and no craniofacial defects.

A novel nonsense variant was identified in *OTX2* (p.Gln107*) gene in heterozygous state, predicting a truncated protein with the loss of 642 amino acids. Variants in *OTX2* were associated to severe ocular malformations such as anophthalmia, microphthalmia and variable degrees of hypopituitarism. Most patients with *OTX2* mutations also exhibit brain anomalies and/or seizures that are not present in our case (14).

Until now, only one study used a target gene panel for the diagnosis of a cohort of patients with CH: 51 patients from 44 independent pedigrees were evaluated for mutations using a target sequence panel, in which genes were captured using smMIPS (single-molecule molecular inversion probe capture assay). In two families with IGHD phenotype, the same heterozygous mutation in *GH1* gene (p.Arg209His) was identified (15).

Other studies used target panel or whole exome sequencing to study patients with short stature due to different etiologies including few patients with GHD. Dauber *et al.* sequenced 1077 genes in 192 patients (31 with CPHD) and found four pathogenic variants in *PTPN11* and *IGF1R* genes (16). Hauer *et al.* sequenced 200 patients with short stature who underwent extensive prior endocrinological and diagnostic workup to exclude defects of the growth hormone pathway and identified one variant in the *GHSR* gene (17). At last, another study performed exome-sequencing on ten patients with CPHD and their unaffected parents and suggested *SLC20A1* and *SLC15A4* as new candidate genes (18).

Using a target gene panel in large cohorts allows the screening of many genes simultaneously with higher accuracy avoiding the misinterpretation caused by the lack of phenotype-genotype correlation. Therefore, we believe that this approach has advantages for the genetic diagnosis when compared to the candidate-gene approach.

The diagnosis of GH deficiency is complex and usually involves auxological, hormonal and imaging studies (19). If recent advances in genetic studies will curtail this diagnostic odyssey remains to be elucidated. The modest positive rate of genetic screening of CH (4%: this study) obtained with gene panels indicates that this genetic tool still cannot replace the clinical diagnosis of CH.

We conclude that a custom-designed target gene panel is an efficient method to screen simultaneously variants of biological and clinical relevance for congenital GH deficiency. A genetic diagnosis was possible in 5 out of 117 (4%) patients of our cohort. We identified novel variants in *GHRHR*, *PROP1*, *OTX2* and *GLI2*. Further studies are necessary to understand the participation of other genetic, epigenetic phenomena and/or environmental factors in the aetiology of most patients with CH.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

The National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) – Brazil, supported this work: grant number 305743/2011-2 to BBM and 301871/2016-7 to AALJ. São Paulo Research Foundation (FAPESP) also supported this work: grant number 2013/03236-5 to AALJ; 2015/26563-7 to LRC; grant 2013/02162-8and grant SELA 2014/50137-5.

References

1 Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson IC & Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocrine Reviews* 2009 **30** 790–829. (https://doi.org/10.1210/er.2009-0008)

2 Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LY, Daly AZ, Ajmal A, Pérez Millán MI, Ozel AB, *et al.* Genetics of combined pituitary hormone deficiency: roadmap into the genome era. *Endocrine Reviews* 2016 **37** 636–675. (https://doi.org/10.1210/er.2016-1101)

3 Crisafulli G, Aversa T, Zirilli G, De Luca F, Gallizzi R & Wasniewska M. Congenital hypopituitarism: how to select the patients for genetic analyses. *Italian Journal of Pediatrics* 2018 **44** 47. (https://doi.org/10.1186/s13052-018-0484-y)

4 De Rienzo F, Mellone S, Bellone S, Babu D, Fusco I, Prodam F, Petri A, Muniswamy R, De Luca F, Salerno M, *et al.* Frequency of genetic

© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

defects in combined pituitary hormone deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. *Clinical Endocrinology* 2015 **83** 849–860. (https://doi.org/10.1111/cen.12849)

5 Otto AP, França MM, Correa FA, Costalonga EF, Leite CC, Mendonca BB, Arnhold IJ, Carvalho LR & Jorge AA. Frequent development of combined pituitary hormone deficiency in patients initially diagnosed as isolated growth hormone deficiency: a long term follow-up of patients from a single center. *Pituitary* 2015 **18** 561–567. (https://doi.org/10.1007/s11102-014-0610-9)

6 Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine* 2015 **17** 405–424. (https://doi.org/10.1038/gim.2015.30)

7 Madeira JLO, Nishi MY, Nakaguma M, Benedetti AF, Biscotto IP, Fernandes T, Poqueno T, Figueiredo T, Franca MM, Correa FA, *et al.* Molecular analysis of Brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations. *Clinical Endocrinology* 2017 **87** 725–732. (https://doi.org/10.1111/cen.13430)

8 Salvatori R, Hayashida CY, Aguiar-Oliveira MH, Phillips JA, Souza AH, Gondo RG, Toledo SP, Conceicão MM, Prince M, Maheshwari HG, *et al.* Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999 **84** 917–923. (https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5599)

9 Marui S, Trarbach EB, Boguszewski MC, França MM, Jorge AA, Inoue H, Nishi MY, de Lacerda Filho L, Aguiar-Oliveira MH, Mendonca BB, *et al.* GH-releasing hormone receptor gene: a novel splice-disrupting mutation and study of founder effects. *Hormone Research in Paediatrics* 2012 **78** 165–172. (https://doi.org/10.1159/000342760)

10 Alatzoglou KS, Turton JP, Kelberman D, Clayton PE, Mehta A, Buchanan C, Aylwin S, Crowne EC, Christesen HT, Hertel NT, *et al.* Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2009 **94** 3191–3199. (https://doi.org/10.1210/jc.2008-2783)

11 Dusatkova P, Pfäffle R, Brown MR, Akulevich N, Arnhold IJ, Kalina MA, Kot K, Krzisnik C, Lemos MC, Malikova J, *et al.* Genesis of two most prevalent PROP1 gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations. *European Journal of Human Genetics* 2016 **24** 415–420. (https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.126)

12 Arnhold IJ, França MM, Carvalho LR, Mendonca BB & Jorge AA. Role of GLI2 in hypopituitarism phenotype. *Journal of Molecular Endocrinology* 2015 **54** R141–R150. (https://doi.org/10.1530/JME-15-0009)

13 Babu D, Fanelli A, Mellone S, Muniswamy R, Wasniewska M, Prodam F, Petri A, Bellone S, Salerno MC & Giordano M. Novel GLI2 mutations identified in patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD): evidence for a pathogenic effect by functional characterization. *Clinical Endocrinology* 2019 **90** 449–456. (https://doi.org/10.1111/cen.13914)

14 Rizzoti K. Genetic regulation of murine pituitary development. *Journal of Molecular Endocrinology* 2015 **54** R55–R73. (https://doi.org/10.1530/JME-14-0237)

15 Pérez Millán MI, Vishnopolska SA, Daly AZ, Bustamante JP, Seilicovich A, Bergadá I, Braslavsky D, Keselman AC, Lemons RM, Mortensen AH, *et al.* Next generation sequencing panel based on single molecule molecular inversion probes for detecting genetic variants in children with hypopituitarism. *Molecular Genetics and Genomic Medicine* 2018. (https://doi.org/10.1002/mgg3.395)

16 Wang SR, Carmichael H, Andrew SF, Miller TC, Moon JE, Derr MA, Hwa V, Hirschhorn JN & Dauber A. Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2013 **98** E1428–E1437. (https://doi.org/10.1210/jc.2013-1534)

17 Hauer NN, Popp B, Schoeller E, Schuhmann S, Heath KE, Hisado-Oliva A, Klinger P, Kraus C, Trautmann U, Zenker M, *et al.* Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature. *Genetics in Medicine* 2018 **20** 630–638. (https://doi.org/10.1038/gim.2017.159)

18 Simm P, Griesbeck A, Choukair D, Weiß B, Paramasivam N, Klammt J, Schiesner M, Wiemann S, Martinez C, Hoffmann GF, *et al.* Identification of SLC20A1 and SLC15A4 among other genes as potential risk factors for combined pituitary hormone deficiency. *Genetics in Medicine* 2018 **20** 728–736. (https://doi.org/10.1038/gim.2017.165)

19 Grimberg A & Allen DB. Growth hormone treatment for growth hormone deficiency and idiopathic short stature: new guidelines shaped by the presence and absence of evidence. *Current Opinion in Pediatrics* 2017 **29** 466–471. (https://doi.org/10.1097/MOP.0000000000000505)

Received in final form 21 March 2019
Accepted 4 April 2019
Accepted Preprint published online 4 April 2019

© 2019 The authors
Published by Bioscientifica Ltd

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License.

8 Referências

8 REFERÊNCIAS

1. Kelberman, D., et al., *Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse.* Endocr Rev, 2009. **30**(7): p. 790-829.

2. SBP, et al., *Baixa Estatura por Deficiência do Hormônio de Crescimento: Diagnóstico*. 2004: Projeto Diretrizes, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.

3. Alatzoglou, K.S. and M.T. Dattani, *Genetic causes and treatment of isolated growth hormone deficiency-an update.* Nat Rev Endocrinol, 2010. **6**(10): p. 562-76.

4. Fang, Q., et al., *Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era.* Endocr Rev, 2016. **37**(6): p. 636-675.

5. Mendonca, B.B., et al., *Longitudinal hormonal and pituitary imaging changes in two females with combined pituitary hormone deficiency due to deletion of A301,G302 in the PROP1 gene.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(3): p. 942-5.

6. Arnhold, I.J., et al., *Clinical and molecular characterization of Brazilian patients with growth hormone gene deletions.* Braz J Med Biol Res, 1998. **31**(4): p. 491-7.

7. Arnhold, I.J., et al., *Clinical and molecular characterization of a Brazilian patient with Pit-1 deficiency.* J Pediatr Endocrinol Metab, 1998. **11**(5): p. 623-30.

8. Cogan, J.D., et al., *The PROP1 2-base pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(9): p. 3346-9.

9. Osorio, M.G., et al., *Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1.* J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(8): p. 2779-85.

10. Osorio, M.G., et al., *Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R, GH-1, or PROP-1 genes.* J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(11): p. 5076-84.

11. Carvalho, L.R., et al., *A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction.* J Clin Invest, 2003. **112**(8): p. 1192-201.

12. Abrão, M.G., et al., *Combined pituitary hormone deficiency (CPHD) due to a complete PROP1 deletion.* Clin Endocrinol (Oxf), 2006. **65**(3): p. 294-300.

13. Melo, M.E., et al., *Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe.* Clin Endocrinol (Oxf), 2007. **66**(1): p. 95-102.

14. Rocha, M.G., et al., *High prevalence of pituitary magnetic resonance abnormalities and gene mutations in a cohort of Brazilian children with growth hormone deficiency and response to treatment.* J Pediatr Endocrinol Metab, 2008. **21**(7): p. 673-80.

15. Costalonga, E.F., et al., *The -202 A allele of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP3) promoter polymorphism is associated with higher IGFBP-3 serum levels and better growth response to growth hormone*

treatment in patients with severe growth hormone deficiency. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(2): p. 588-95.

16. França, M.M., et al., *Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. E384-91.

17. Alatzoglou, K.S., et al., *Increased transactivation associated with SOX3 polyalanine tract deletion in a patient with hypopituitarism.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(4): p. E685-90.

18. Costalonga, E.F., et al., *Growth hormone pharmacogenetics: the interactive effect of a microsatellite in the IGF1 promoter region with the GHR-exon 3 and -202 A/C IGFBP3 variants on treatment outcomes of children with severe GH deficiency.* Pharmacogenomics J, 2012. **12**(5): p. 439-45.

19. Pugliese-Pires, P.N., et al., *Novel inactivating mutations in the GH secretagogue receptor gene in patients with constitutional delay of growth and puberty.* Eur J Endocrinol, 2011. **165**(2): p. 233-41.

20. França, M.M., et al., *Absence of GH-releasing hormone (GHRH) mutations in selected patients with isolated GH deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(9): p. E1457-60.

21. Braz, A.F., et al., *The interactive effect of GHR-exon 3 and -202 A/C IGFBP3 polymorphisms on rhGH responsiveness and treatment outcomes in patients with Turner syndrome.* J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(4): p. E671-7.

22. França, M.M. and I.J. Arnhold, *Clarification of intellectual abilities in patients with GLI2 mutations cited by Kevelam et al., 2012 Am J Med Genet Part A.* Am J Med Genet A, 2012. **158A**(6): p. 1519.

23. França, M.M., et al., *Relatively high frequency of non-synonymous GLI2 variants in patients with congenital hypopituitarism without holoprosencephaly.* Clin Endocrinol (Oxf), 2013. **78**(4): p. 551-7.

24. Marui, S., et al., *GH-releasing hormone receptor gene: a novel splice-disrupting mutation and study of founder effects.* Horm Res Paediatr, 2012. **78**(3): p. 165-72.

25. Braz, A.F., et al., *Genetic predictors of long-term response to growth hormone (GH) therapy in children with GH deficiency and Turner syndrome: the influence of a SOCS2 polymorphism.* J Clin Endocrinol Metab, 2014. **99**(9): p. E1808-13.

26. Lido, A.C., et al., *Autosomal recessive form of isolated growth hormone deficiency is more frequent than the autosomal dominant form in a Brazilian cohort.* Growth Horm IGF Res, 2014. **24**(5): p. 180-6.

27. Otto, A.P., et al., *Frequent development of combined pituitary hormone deficiency in patients initially diagnosed as isolated growth hormone deficiency: a long term follow-up of patients from a single center.* Pituitary, 2015. **18**(4): p. 561-7.

28. Correa, F.A., et al., *FGFR1 and PROKR2 rare variants found in patients with combined pituitary hormone deficiencies.* Endocr Connect, 2015. **4**(2): p. 100-7.

29. Arnhold, I.J., et al., *Role of GLI2 in hypopituitarism phenotype.* J Mol Endocrinol, 2015. **54**(3): p. R141-50.

30. Dusatkova, P., et al., *Genesis of two most prevalent PROP1 gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations.* Eur J Hum Genet, 2016. **24**(3): p. 415-20.

31. Fang, Q., et al., *HESX1 mutations in patients with congenital hypopituitarism: variable phenotypes with the same genotype.* Clin Endocrinol (Oxf), 2016. **85**(3): p. 408-14.

32. Madeira, J.L., et al., *A homozygous point mutation in the GH1 promoter (c.-223C>T) leads to reduced GH1 expression in siblings with isolated GH deficiency (IGHD).* Eur J Endocrinol, 2016. **175**(2): p. K7-k15.

33. Madeira, J.L.O., et al., *Molecular Analysis of Brazilian Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency and Orthotopic Posterior Pituitary Lobe Reveals Eight Different PROP1 Alterations with Three Novel Mutations.* Clin Endocrinol (Oxf), 2017.

34. Correa, F.A., et al., *Pathogenic copy number variants in patients with congenital hypopituitarism associated with complex phenotypes.* Clin Endocrinol (Oxf), 2018. **88**(3): p. 425-431.

35. Correa, F.A., et al., *Growth hormone deficiency with advanced bone age: phenotypic interaction between GHRH receptor and CYP21A2 mutations diagnosed by sanger and whole exome sequencing.* Arch Endocrinol Metab, 2017. **61**(6): p. 633-636.

36. Correa, F.A., et al., *Combined pituitary hormone deficiency caused by PROP1 mutations: update 20 years post-discovery.* Arch Endocrinol Metab, 2019. **63**(2): p. 167-174.

37. Metzker, M.L., *Sequencing technologies - the next generation.* Nat Rev Genet, 2010. **11**(1): p. 31-46.

38. Gregory, L.C. and M.T. Dattani, *Pituitary Disorders of Childhood: Diagnosis and Clinical Management*, ed. L. Poretsky. 2019: Human Press.

39. Rizzoti, K., *Genetic regulation of murine pituitary development.* J Mol Endocrinol, 2015. **54**(2): p. R55-73.

40. Dateki, S., et al., *Heterozygous orthodenticle homeobox 2 mutations are associated with variable pituitary phenotype.* J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(2): p. 756-64.

41. Ragge, N.K., et al., *Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations.* Am J Hum Genet, 2005. **76**(6): p. 1008-22.

42. Dattani, M.T., et al., *Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse.* Nat Genet, 1998. **19**(2): p. 125-33.

43. Villavicencio, E.H., D.O. Walterhouse, and P.M. Iannaccone, *The sonic hedgehog-patched-gli pathway in human development and disease.* Am J Hum Genet, 2000. **67**(5): p. 1047-54.

44. Sornson, M.W., et al., *Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism.* Nature, 1996. **384**(6607): p. 327-33.

45. Phillips, J.A. and J.D. Cogan, *Genetic basis of endocrine disease. 6. Molecular basis of familial human growth hormone deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 1994. **78**(1): p. 11-6.

46. Sobrier, M.L., et al., *Functional characterization of a human POU1F1 mutation associated with isolated growth hormone deficiency: a novel etiology for IGHD.* Hum Mol Genet, 2016. **25**(3): p. 472-83.

47. Sizonenko and P.C, *Diagnosis and management of growth hormone deficiency in childhood and adolescence.* 2001, Growth Horm IGF Res.

48. Alatzoglou, K.S., et al., *Expanding the spectrum of mutations in GH1 and GHRHR: genetic screening in a large cohort of patients with congenital isolated growth hormone deficiency.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(9): p. 3191-9.

49. Sun, Y., et al., *Ghrelin stimulation of growth hormone release and appetite is mediated through the growth hormone secretagogue receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(13): p. 4679-84.

50. Phillips, J.A., et al., *Molecular basis for familial isolated growth hormone deficiency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6372-5.

51. Mullis, P.E., J. Deladoëy, and P.S. Dannies, *Molecular and cellular basis of isolated dominant-negative growth hormone deficiency, IGHD type II: insights on the secretory pathway of peptide hormones.* Horm Res, 2002. **58**(2): p. 53-66.

52. Salvatori, R., et al., *Familial dwarfism due to a novel mutation of the growth hormone-releasing hormone receptor gene.* J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(3): p. 917-23.

53. Lindsay, R., et al., *Utah Growth Study: growth standards and the prevalence of growth hormone deficiency.* J Pediatr, 1994. **125**(1): p. 29-35.

54. Wood, A.R., et al., *Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height.* Nat Genet, 2014. **46**(11): p. 1173-86.

55. Webb, E.A., et al., *ARNT2 mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies.* Brain, 2013. **136**(Pt 10): p. 3096-105.

56. BM, B., *Investigação da Baixa Estatura: do Fenótipo ao Genótipo* 2012, 1a. ed. Atheneu: v. I. 175p.

57. Blankenberg, D., et al., *Manipulation of FASTQ data with Galaxy.* Bioinformatics, 2010. **26**(14): p. 1783-5.

58. Li, H. and R. Durbin, *Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform.* Bioinformatics, 2009. **25**(14): p. 1754-60.

59. Li, J., et al., *CONTRA: copy number analysis for targeted resequencing.* Bioinformatics, 2012. **28**(10): p. 1307-13.

60. Naslavsky, M.S., et al., *Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database.* Hum Mutat, 2017. **38**(7): p. 751-763.

61. Quang, D., Y. Chen, and X. Xie, *DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants.* Bioinformatics, 2015. **31**(5): p. 761-3.

62. Raimondi, D., et al., *DEOGEN2: prediction and interactive visualization of single amino acid variant deleteriousness in human proteins.* Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W201-W206.

63. Ionita-Laza, I., et al., *A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants.* Nat Genet, 2016. **48**(2): p. 214-20.

64. Shihab, H.A., et al., *Predicting the functional, molecular, and phenotypic consequences of amino acid substitutions using hidden Markov models.* Hum Mutat, 2013. **34**(1): p. 57-65.

65. Davydov, E.V., et al., *Identifying a high fraction of the human genome to be under selective constraint using GERP++.* PLoS Comput Biol, 2010. **6**(12): p. e1001025.

66. Chun, S. and J.C. Fay, *Identification of deleterious mutations within three human genomes.* Genome Res, 2009. **19**(9): p. 1553-61.

67. Reva, B., Y. Antipin, and C. Sander, *Predicting the functional impact of protein mutations: application to cancer genomics.* Nucleic Acids Res, 2011. **39**(17): p. e118.

68. Schwarz, J.M., et al., *MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.* Nat Methods, 2010. **7**(8): p. 575-6.

69. Pejaver, V., S.D. Mooney, and P. Radivojac, *Missense variant pathogenicity predictors generalize well across a range of function-specific prediction challenges.* Hum Mutat, 2017. **38**(9): p. 1092-1108.

70. Choi, Y., et al., *Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels.* PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46688.

71. Ioannidis, N.M., et al., *REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants.* Am J Hum Genet, 2016. **99**(4): p. 877-885.

72. Ng, P.C. and S. Henikoff, *Predicting deleterious amino acid substitutions.* Genome Res, 2001. **11**(5): p. 863-74.

73. Dong, C., et al., *Comparison and integration of deleteriousness prediction methods for nonsynonymous SNVs in whole exome sequencing studies.* Hum Mol Genet, 2015. **24**(8): p. 2125-37.

74. Jian, X. and X. Liu, *In Silico Prediction of Deleteriousness for Nonsynonymous and Splice-Altering Single Nucleotide Variants in the Human Genome.* Methods Mol Biol, 2017. **1498**: p. 191-197.

75. Desmet, F.O., et al., *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals.* Nucleic Acids Res, 2009. **37**(9): p. e67.

76. Brunak, S., J. Engelbrecht, and S. Knudsen, *Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence.* J Mol Biol, 1991. **220**(1): p. 49-65.

77. Böttner, A., et al., *PROP1 mutations cause progressive deterioration of anterior pituitary function including adrenal insufficiency: a longitudinal analysis.* J Clin Endocrinol Metab, 2004. **89**(10): p. 5256-65.

78. Pantel, J., et al., *Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor.* J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(11): p. 4334-41.

79. Gripp, K.W., et al., *Mutations in TGIF cause holoprosencephaly and link NODAL signalling to human neural axis determination.* Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 205-8.

80. Tatsi, C., et al., *Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(4): p. E779-84.

81. Pérez Millán, M.I., et al., *Next generation sequencing panel based on single molecule molecular inversion probes for detecting genetic variants in children with hypopituitarism.* Mol Genet Genomic Med, 2018.

82. Wang, S.R., et al., *Large-scale pooled next-generation sequencing of 1077 genes to identify genetic causes of short stature.* J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(8): p. E1428-37.

83. Hauer, N.N., et al., *Clinical relevance of systematic phenotyping and exome sequencing in patients with short stature.* Genet Med, 2018. **20**(6): p. 630-638.