

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA

RENATA KERTSZ

Revisitando o gene *HESX1* na busca de variantes sinônimas

São Paulo

2023

RENATA KERTSZ

Revisitando o gene *HESX1* na busca de variantes sinônimas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Endocrinologia.

Orientadora: Profa. Dra. Luciani Renata Silveira de Carvalho

Coorientador: Nilson Antonio de Assunção

São Paulo

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

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

©reprodução autorizada pelo autor

Kertsz, Renata  
Revisitando o gene HESX1 na busca de variantes  
sinônimas / Renata Kertsz. -- São Paulo, 2023.  
Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo.  
Programa de Endocrinologia.  
Orientadora: Luciani Renata Silveira de Carvalho.  
Coorientador: Nilson Antonio de Assunção.

Descritores: 1.Hipopituitarismo 2.Displasia  
septo-óptica 3.Deficiência hormonal 4.Glândula  
pituitária

USP/FM/DBD-496/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo, tua presença ao longo desta jornada foi um farol constante em dias desafiadores e a força que impulsionou cada avanço na conclusão deste trabalho. Este feito é, sem dúvida, um reflexo da nossa parceria e do amor que compartilhamos.

Ao meu querido filho Bernardo, desde os primeiros momentos compartilhados no ventre até os dias atuais, tua existência iluminou os caminhos da nossa jornada de maneiras indescritíveis. Cada batida do teu coração, mesmo antes da tua chegada ao mundo, foi um prelúdio emocionante do propósito e significado profundos que este trabalho assume para nossa família. Tua participação ativa, como um elo fundamental nesta trajetória, é um testemunho tocante de como a família, em sua essência, se entrelaça de maneiras extraordinárias. Agradeço por seres a luz que colore cada página desta história e por tornares cada conquista ainda mais especial.

À minha dedicada mãe, meu porto seguro e alicerce na vida, expresso minha eterna gratidão. Sua sabedoria, amor incondicional e apoio constante moldaram não apenas este trabalho, mas também a pessoa que sou. Seu papel como fonte de força e inspiração é inestimável.

A Lorenzo, meu enteado cuja entrada na minha vida ocorreu quando ele tinha apenas 1 ano e 3 meses, dedico um agradecimento especial. Desde então, não apenas enriqueceu meus dias, mas trouxe uma perspectiva única à nossa jornada. Sua presença é um lembrete constante de como a família pode se formar em diferentes momentos da vida, trazendo amor e laços que se aprofundam com o tempo.

Aos meus amigos, Maria, Rogério, Adriana e Aline, verdadeiros irmãos de coração, agradeço por serem meu refúgio nos momentos difíceis, minha força e a luz que guia meu caminho. Cada risada compartilhada e cada lágrima derramada juntos tornaram esta jornada mais rica e significativa. Agradeço por serem parte integrante da história que culmina neste momento.

A todos vocês, minha família e amigos, a conclusão deste trabalho não é apenas minha realização, mas a culminação de um esforço coletivo e do amor que compartilhamos. Cada página escrita é um testemunho do poder

transformador do apoio familiar e do vínculo que nos une. Obrigada por serem os protagonistas dessa história extraordinária.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Luciani, expresso minha mais profunda gratidão por sua orientação exemplar, dedicado ensino e inabalável suporte ao longo desta jornada acadêmica. Suas palavras e encorajamentos nos momentos mais desafiadores foram cruciais para o meu crescimento e para o êxito deste projeto. Acreditar em mim e na viabilidade deste trabalho, mesmo nos períodos mais difíceis, foi um gesto de confiança que jamais esquecerei.

Às Profas. Dras. Berenice e Ana Claudia, meu profundo apreço pela generosidade de vossa atenção no processo de definição e estruturação do projeto. A colaboração de vocês não apenas enriqueceu a qualidade do trabalho, mas também contribuiu significativamente para o meu desenvolvimento acadêmico. Sou verdadeiramente grata pela oportunidade de aprender e crescer sob a vossa orientação.

Estendo meu reconhecimento aos valorosos funcionários e amigos do Laboratório de Hormônios – LIM42, assim como aos colegas da pós-graduação. A amizade e colaboração constante de todos vocês foram pilares fundamentais ao longo deste percurso, tornando a jornada acadêmica mais rica e significativa.

À venerável Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, expresso minha profunda gratidão pela oportunidade concedida de realizar o curso de mestrado. Este ambiente acadêmico enriquecedor e desafiador moldou minha perspectiva e contribuiu para minha formação de maneira inestimável. Sou grata por fazer parte desta instituição que promove o conhecimento e a excelência acadêmica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), manifesto meu sincero agradecimento pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro que tornaram possível a realização desta pesquisa. Essa contribuição é um testemunho do comprometimento do CNPq com o avanço da ciência e da educação, e por isso, meu reconhecimento é profundo e duradouro. Agradeço por acreditarem no potencial da pesquisa científica e por proporcionarem condições para que este trabalho se concretizasse.

## EPIÍGRAFE

Se vai tentar, vá até o fim.

Caso contrário, nem comece.

Se vai tentar, vá até o fim.

Pode perder namoradas, esposas, parentes, empregos e talvez até a cabeça.

Vá até o fim.

Pode ficar sem comer por três ou quatro dias.

Pode congelar no banco do parque.

Pode ser preso.

Pode receber escárnio, gozações, isolamento.

Isolamento é um presente, todo o resto é um teste da sua resistência, de quão forte é a sua vontade.

E você fará a despeito da rejeição e dos piores azares e será melhor do que qualquer coisa que possa imaginar.

Se vai tentar, vá até o fim.

Não há outra emoção como essa.

Você estará sozinho com os deuses e as noites queimarão como fogo.

Faça, faça, faça, faça,

até o fim, até o fim.

Você cavalgará a vida diretamente para o riso perfeito.

Essa é a única boa luta que existe.

Charles Bukowski

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

Referências: seguindo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

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 Julia 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.

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



## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Embriogênese hipofisária.....	1
1.2. Hipopituitarismo congênito.....	2
1.3. <i>HESX1</i> : Da Morfogênese Hipofisária à Complexidade das Variantes Sinônimas.....	3
2. JUSTIFICATIVA.....	6
3. OBJETIVOS.....	7
4. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	7
4.1. Aspectos Éticos.....	7
4.2. Definição da casuística.....	7
4.3. Avaliação clínica dos pacientes.....	8
4.4. Avaliação genética.....	8
4.4.1. Avaliação das sequencias de exoma e painel na Plataforma Franklin.....	8
4.4.2. Avaliação das sequencias obtidas pelo sequenciamento de Sanger.....	10
4.4.3. Avaliação <i>in silico</i> dos achados.....	10
4.4.4. Estudo <i>in vitro</i> .....	12
5. RESULTADOS.....	12
5.1. Avaliação clínica da casuística.....	12
5.2. Análise das sequências genéticas e identificação dos achados.....	13
6. DISCUSSÃO.....	16

7. CONCLUSÕES.....	20
8. ANEXOS.....	21
8.1. ANEXO A – Protocolo de coleta e transformação do RNA em cDNA..	21
8.2. ANEXO B – Protocolos de reação de PCR e ciclo de temperatura para amplificação do gene <i>HESX1</i> no cDNA .....	22
8.3. ANEXO C - Dados clínicos individuais dos pacientes selecionados para compor a casuística deste estudo.....	23
9. REFERÊNCIAS .....	27

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama esquemático da regulação molecular do desenvolvimento da glândula pituitária anterior.....	1
Figura 2	Heredograma da segregação familiar da variante c.460-3T>C no gene <i>HESX1</i> .....	14
Figura 3A	Gel de agarose da reação de amplificação do cDNA da família carreadora variante c.460-3T>C.....	15
Figura 3B	B. Eletroferograma evidenciando a segregação familiar da variante c.374A>G.....	15

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variantes patogênicas previamente documentadas como responsáveis pelo hipopituitarismo congênito identificadas no gene <i>HESX1</i> .....	5
Tabela 2	Parâmetros de avaliação de qualidade Franklin (Genoox).....	8
Tabela 3	Frequência das variantes no gene <i>HESX1</i> identificadas na casuística.....	13

## LISTA DE SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
cDNA	DNA complementar
DGHI	Deficiência isolada de hormônio do crescimento
DHHM	Deficiência combinada de hormônios da hipófise
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSO	Displasia septo-óptica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FSH	Hormônio folículo-estimulante
GH	Hormônio do crescimento
<i>GLI2</i>	<i>GLI Family Zinc Finger 2</i>
<i>HESX1</i>	<i>Homeobox embryonic stem cell</i>
IGF-1	<i>Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1</i>
LH	Hormônio luteinizante
<i>LHX3</i>	<i>LIM Homeobox 3</i>
<i>LHX4</i>	<i>LIM Homeobox 4</i>
MAF	Frequência do alelo menor
<i>OTX2</i>	<i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>POU1F1</i>	<i>POU domain, class 1, of transcription factor 1</i>
PRL	<i>Prolactina</i>
<i>PROP1</i>	<i>Prophet of Pit-1</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação de transcriptase reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SOX2	<i>SRY-box 2</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSH	Hormônio tireoestimulante
VCF	<i>Variant Call Format</i>

## RESUMO

KERTSZ, R. Revisitando o gene *HESX1* na busca por variantes sinônimas. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

**INTRODUÇÃO:** A complexidade do diagnóstico molecular do hipopituitarismo destaca-se na diversidade fenotípica e na variabilidade genética associada à doença. A recente descoberta de variantes sinônimas no gene *HESX1* representa um desafio adicional, enfatizando a necessidade de mais investigações. Neste estudo reexaminamos dados de sequenciamento, previamente realizados no laboratório de hormônios (LIM-42), priorizando a detecção de variantes sinônimas para associação com o fenótipo dos pacientes, contribuindo para uma compreensão mais abrangente do hipopituitarismo e refinamento das estratégias diagnósticas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Dos 218 pacientes incluídos no estudo, 166 foram sequenciados em painel ou exoma, enquanto 51 foram submetidos ao sequenciamento Sanger. As sequências do painel ou exoma foram avaliadas na plataforma Franklin e as sequências Sanger foram verificadas manualmente. As variantes sinônimas identificadas foram confirmadas *in silico*, considerando MAF <1%, utilizando ferramentas como ABraOM, 1000G e gnomAD. Para avaliar resultados em regiões de *splicing* foram utilizados SpliceAI e dbSCSNV Ada, com estudo *in vitro* utilizando primers para amplificação e sequenciamento específico do gene *HESX1* em cDNA. **RESULTADOS:** Evidenciaram-se 3 variantes em 22 pacientes, 2 consideradas polimorfismos c.374A>G (p.N125S), c.385G>A (p.V129I). A variante c.460-3T>C, intrônica e na região de *splicing*, foi encontrada em heterozigotidade em apenas 1 paciente, que também era portador da variante c.374A>G (p.N125S). A avaliação *in silico* da variante c.460-3T>C indicou MAF <1%, mas com baixa probabilidade de impacto no *splicing*. O estudo *in vitro* não mostrou alterações no *splicing* do cDNA no pai, que é portador da variante, nem no paciente afetado. **CONCLUSÃO:** A reanálise das sequências do gene *HESX1* não evidenciou variantes sinônimas, mas revelou variantes missense e intrônicas sem correlação genótipo-fenótipo após validação *in silico* e experimental. **Descritores:** *HESX1*, hipopituitarismo, displasia septo-óptica, deficiência hormonal, glândula pituitária.

## ABSTRACT

KERTSZ, R. Revisiting the *HESX1* gene for synonymous variants [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2023.

**INTRODUCTION:** The complexity of molecular diagnosis in hypopituitarism is highlighted by the phenotypic diversity and genetic variability associated with the disease. The recent discovery of synonymous variants in the *HESX1* gene presents an additional challenge, underscoring the need for further investigations. In this study, we re-examined sequencing data previously conducted in the Hormones and Molecular Genetics Laboratory (LIM-42), prioritizing the detection of synonymous variants for association with patient phenotypes, contributing to a comprehensive understanding of hypopituitarism and refinement of diagnostic strategies. **MATERIALS AND METHODS:** Out of the 218 patients included in the study, 166 underwent panel or exome sequencing, while 51 underwent Sanger sequencing. Panel or exome sequences were evaluated on the Franklin platform, and Sanger sequences were manually verified. Identified synonymous variants were confirmed *in silico*, considering MAF <1%, using tools such as ABraOM, 1000G, and gnomAD. To assess results in *splicing* regions, SpliceAI and dbSNV Ada were employed, with *in vitro* studies using primers for amplification and specific sequencing of the *HESX1* gene in cDNA. **RESULTS:** Three variants were identified in 22 patients, with 2 considered polymorphisms, c.374A>G (p.N125S), c.385G>A (p.V129I). The variant c.460-3T>C, intronic and in the *splicing* region, was found in heterozygosity in only 1 patient, who also carried the variant c.374A>G (p.N125S). *In silico* evaluation of the c.460-3T>C variant indicated MAF <1% but with a low probability of *splicing* impact. *In vitro* studies showed no *splicing* alterations in the cDNA in the carrier father or the affected patient. **CONCLUSION:** The reanalysis of *HESX1* gene sequences did not find synonymous variants but revealed missense and intronic variants without genotype-phenotype correlation after *in silico* and experimental validation.

**Descriptors:** *HESX1*, hypopituitarism, septo-optic dysplasia, hormone deficiency, pituitary gland, o-optic dysplasia, hormonal deficiency.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Embriogênese hipofisária

A glândula hipofisária, localizada na sela túrcica do osso esfenóide abaixo do hipotálamo, desempenha um papel crucial na regulação hormonal. A conexão entre o hipotálamo e a hipófise, estabelecida pela haste hipofisária, é fundamental tanto na embriogênese, garantindo a morfogênese correta do eixo hipotálamo-hipófise, quanto após o nascimento, quando o hipotálamo controla as secreções da glândula por meio dessa estrutura.<sup>1</sup>

A hipófise possui duas regiões que têm origens embriológicas distintas: o lobo posterior ou neuro-hipófise, originado de uma extensão caudal do hipotálamo embrionário, e o lobo anterior ou adenohipófise que é originado da bolsa de Rathke, um divertículo da cavidade bucal primitiva. A adenohipófise é composta por cinco tipos celulares: células gonadotróficas que produzem os hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), tireotróficas que são responsáveis pela produção da tireotropina (TSH), somatotróficas que produzem a somatotropina (GH) e lactotróficas que sintetizam a prolactina (PRL).<sup>1</sup> Figura 1.

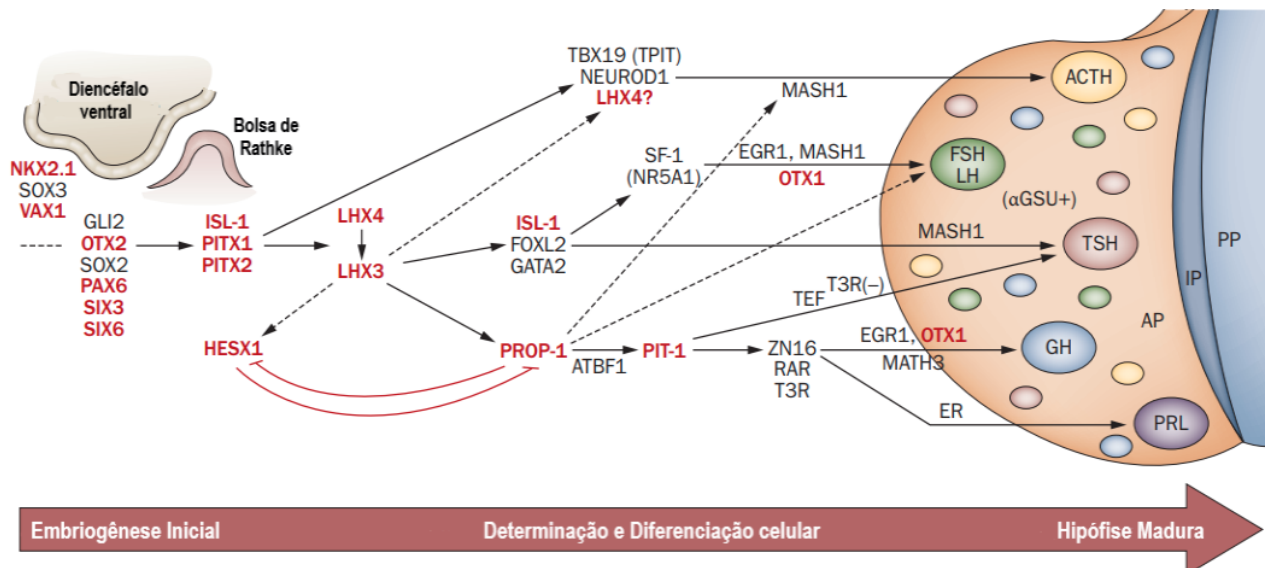


Figura 1. Diagrama esquemático da regulação molecular do desenvolvimento da glândula pituitária anterior, com particular ênfase nos fatores de transcrição, notadamente aqueles que apresentam o homeodomínio. Destaca-se a formação da bolsa de Rathke e a diferenciação das células especializadas, proporcionando uma visão detalhada da cascata de eventos. As setas no diagrama indicam relações em vias de sinalização molecular. (Fonte adaptada: Prince, K. L., Walvoord, E. C., & Rhodes, S. J. (2011). Nature Reviews Endocrinology, 7(12), 727–737.)<sup>2</sup>



Cada um desses hormônios têm uma função diferente, sendo cruciais aos processos fisiológicos. Os hormônios FSH e LH tem funções dependentes do sexo do indivíduo. Nas mulheres, o FSH promove crescimento dos folículos ovarianos e secreção de estrógeno e o LH promove ovulação e secreção de progesterona. Já nos homens, eles promovem o estímulo da espermatogênese, assim como das células de Leydig e secreção de andrógenos, respectivamente. O hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) estimula secreção de glicocorticóides no córtex adrenal, enquanto o TSH tem como função estimular a síntese e secreção do hormônio tireoidiano. O GH promove o crescimento de ossos longos e age no metabolismo em muitos locais do organismo via somatomedinas (IGF-1). Por último, a PRL atua no desenvolvimento da glândula mamária durante a gestação, estimulando a secreção de leite. A função do eixo hipotálamo-hipofisário é garantir que as fases do desenvolvimento como puberdade, gravidez, lactação e a resposta ao estresse ocorram de forma efetiva. Para isso, o sistema tem uma plasticidade, com secreções hormonais sendo constantemente moduladas. Situações patológicas que levam ao desequilíbrio dos hormônios da hipófise têm consequências pleiotrópicas, resultando em morbidade significativa e até mortalidade. As deficiências hormonais podem ser adquiridas ou congênitas. As adquiridas se desenvolvem principalmente como consequência de tumores da hipófise (principalmente prolactinomas) e danos cerebrais, já a anormalidade congênita pode se apresentar de forma isolada, sendo a mais comum em humanos a deficiência isolada de hormônio do crescimento (DGHI), mas pode também se apresentar de forma múltipla, conhecida como deficiência combinada de hormônio da hipófise (DHHM).<sup>3</sup>

## 1.2. Hipopituitarismo congênito

O hipopituitarismo congênito, ou DHHM, pode ser provindo de qualquer comprometimento das vias de sinalização do desenvolvimento hipofisário que acarrete a insuficiência da glândula pituitária em secretar um ou mais hormônios.

A DHHM é clinicamente descoberta quando o indivíduo ainda criança apresenta velocidade de crescimento reduzida, embora a deficiência hormonal no nascimento possa causar hipoglicemia e morte súbita, enfatizando a necessidade de detecção e tratamento precoces. A avaliação clínica inclui a medição da altura sentada e em pé, níveis hormonais circulantes, secreção hormonal em resposta à estímulo, imagens do cérebro e da hipófise e determinação da idade óssea com raios-X das mãos. Às vezes, a ressonância magnética evidencia uma massa hipofisária, e os testes genéticos costumam prever se a massa é

provavelmente benigna, evitando assim cirurgias desnecessárias, em se tratando de alterações genéticas no gene *PROP1*. O histórico familiar também é importante porque a altura média dos pais é usada para calcular a altura alvo da criança. Se não houver histórico familiar de insuficiência de crescimento, o caso é denominado como esporádico e pode ser genético ou ambiental. Nos casos familiares que envolvem vários indivíduos afetados, aumenta a probabilidade de que a causa seja genética, embora fatores ambientais possam desempenhar um papel na expressividade ou gravidade das características.<sup>4</sup>

Defeitos genéticos em genes da cascata do desenvolvimento da adenohipófise normalmente resultam em sua diminuição de tamanho e na deficiência da secreção hormonal. Os genes que atuam mais precoce no desenvolvimento da cabeça estão frequentemente associados a anormalidades craniofaciais, além da disfunção hipofisária (DHHM síndrômica), enquanto os genes expressos no hipotálamo ou intrínsecos à hipófise causam DHHM não síndrômico. A complexidade genética do DHHM pode ser explicada pela heterogeneidade dos fatores subjacentes, que contribuem em parte para o amplo espectro fenotípico.<sup>4</sup> Até o presente momento, foram identificados 44 genes associados ao hipopituitarismo, embora nem todos tenham seus mecanismos completamente elucidados na literatura. Entre esses, *GLI2*, *HESX1*, *LHX3*, *LHX4*, *OTX2*, *POU1F1*, *PROP1* e *SOX2* emergem como os genes mais extensivamente estudados nesse contexto.<sup>5</sup>

### 1.3. *HESX1*: Da Morfogênese Hipofisária à Complexidade das Variantes Sinônimas

O gene *HESX1*, um fator de transcrição da família homeobox, desempenha um papel crucial no desenvolvimento embrionário, especialmente na formação inicial do cérebro e da hipófise. Está localizado no braço curto do cromossomo 3 e possui 4 éxons, enquanto nos camundongos o gene homólogo está localizado no cromossomo 14.

Este gene desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, sendo objeto de estudo desde 1993, quando as primeiras investigações foram dedicadas à compreensão de sua contribuição para o desenvolvimento de murinos. Estes estudos iniciais destacaram sua relevância no processo de formação do fígado embrionário. A expressão altamente específica de *Hesx1*, em conjunto com a função bem estabelecida dos genes com *homeodomain* na determinação da identidade regional, sugere a possível importância deste gene na embriogênese murina. Este gene pode desempenhar um papel

significativo na regulação das decisões de desenvolvimento durante as fases iniciais da embriogênese e na hematopoiese fetal.<sup>6; 7</sup>

A importância funcional desse gene é evidente em estudos com camundongos knockout *Hesx1*<sup>-/-</sup>, nos quais a letalidade pós-natal é observada devido a defeitos no sistema nervoso central, incluindo anoftalmia, prosencéfalo reduzido e displasia da hipófise<sup>8</sup>. A perda de *Hesx1* no neuroectoderma anterior leva à posteriorização, resultante da falta de repressão na via Wnt/ $\beta$ -catenina.<sup>9</sup> Além disso, embriões *Hesx1*<sup>-/-</sup> exibem desenvolvimento anormal da bolsa de Rathke, caracterizado por fendas variáveis e expressão expandida de *Fgf10*, sugerindo um papel crítico do *Hesx1* na morfogênese hipofisária. Após o nascimento, a hipoplasia da hipófise é observada, sugerindo um comprometimento no controle hipotalâmico.<sup>9</sup>

Variantes no gene *HESX1* foram associadas a uma variedade de fenótipos, desde DGHI até DHHM, muitas vezes acompanhada por displasia septo-óptica (DSO). A expressão fenotípica varia amplamente, com mutações recessivas geralmente causando fenótipos mais graves e variantes heterozigóticas associadas a manifestações mais leves e penetrância incompleta, Fang e colaboradores concluíram que as mutações no *HESX1* resultam em manifestações clínicas variáveis, sugerindo a influência de genes modificadores ou fatores ambientais no fenótipo.<sup>4</sup>

Os estudos liderados por Fang e colaboradores<sup>10</sup> indicaram que as mutações no *HESX1* conduzem a manifestações clínicas diversas, sugerindo a possível influência de genes modificadores ou fatores ambientais no fenótipo. Historicamente, o foco na importância das variantes genéticas estava predominantemente nas classificadas como não sinônimas, ou seja, aquelas que provocam uma troca de nucleotídeos em um códon, impactando diretamente o aminoácido a ser incorporado na proteína (TABELA 1).

Esse entendimento baseava-se na premissa de que essas variantes afetavam significativamente a estrutura e a função proteica. No entanto, a evolução do conhecimento científico revelou que mais de cinquenta doenças estão associadas a variantes sinônimas, desafiando essa concepção inicial.<sup>11</sup>

Diversos mecanismos subjacentes podem explicar como essas variantes sinônimas influenciam o funcionamento normal dos genes. Por exemplo, podem provocar alterações nos sítios de *splicing*, resultando na produção de uma proteína truncada, como observado no caso da variante p.S73S do gene *HESX1*. Além disso, essas variantes podem modificar os sítios de ligação a fatores de transcrição e miRNAs, impactando a

regulação da expressão gênica. Outra possibilidade é que as variantes sinônimas alterem a estrutura do mRNA, impedindo o início da tradução ou criando um mRNA menos estável, ambos contribuindo para uma redução na expressão proteica. Essa compreensão mais abrangente destaca a complexidade dos efeitos das variantes sinônimas e sua contribuição para a patogênese de diversas doenças, desafiando paradigmas anteriores.<sup>12</sup>

Recentemente, Coutinho e colaboradores identificaram uma variante heterozigota no gene *HESX1* que, apesar de não alterar o aminoácido codificado (c.219C>T/p.S73S), representa a primeira variante sinônima nesse gene associada ao fenótipo de DHHM em um paciente. Destaca-se que essa variante está localizada em um nucleotídeo evolutivamente conservado em primatas, mas não em outros vertebrados. Uma análise detalhada por RT-PCR revelou que o paciente expressava dois transcritos distintos, sendo um mais curto que excluía a sequência correspondente ao exon 2, resultando na junção direta entre o exon 1 e o exon 3. Essa nova configuração de sequência introduziu uma terminação prematura da proteína após 54 códons. A tradução desse transcrito mais curto resulta em uma proteína truncada, evidenciando o impacto funcional da variante sinônima em questão.<sup>13</sup>

TABELA 1. Variantes patogênicas previamente documentadas como responsáveis pelo hipopituitarismo congênito foram identificadas no gene *HESX1*.

<i>Publicação</i>	<i>Autor</i>	<i>Fenótipo</i>	<i>Variante</i>	<i>Troca Aminoácido</i>	<i>Alelo</i>
1998	Dattani, M T et al. <sup>8</sup>	DHHM	c.476C>T	p.R160C	HM
2001	Thomas, P Q et al. <sup>14</sup>	DSO	c.18G>C	p.Q6H	HT
2003	Tajima, Toshihiro et al. <sup>15</sup>	DGHM	c.301_302A>G	p.L103fs	HT
2003	Cohen, Ronald N et al. <sup>16</sup>	DGHI e DSO	1-bp del/ g.1684delG	-	HT
2003	Carvalho, Luciani R et al. <sup>17</sup>	DHHM	c.77T>C	p.I26T	HM
2007	McNay, David E G et al. <sup>18</sup>	DGHI e DSO	c.445G>A	p.E149K	HT

2011	Durmaz, Burak et al. <sup>19</sup>	DHHM	c.479G>A /	p.R160H	HM
2011	Vivenza, Daniela et al. <sup>20</sup>	DGHI	c.357+3G>A	-	HT
2015	Avbelj Stefanija, Magdalena et al. <sup>21</sup>	DHHM	c.305A>G	p.E102G	HT
2016	Takagi, Masaki et al. <sup>22</sup>	DHHM	c.326G>A	p.R109Q	HT
2016	Fang, Qing et al. <sup>10</sup>	DHHM	c.476C>T	p.R160C	HM
2017	Pozzi, Sara et al. <sup>23</sup>	DHHM e DSO	c.475C>T	p.R159W	HT
2019	Coutinho, Eduarda et al. <sup>13</sup>	DHHM	c.219C>T	p.S73S	HT
2021	V. Alesi et al. <sup>24</sup>	DGHI	c.18G>C	p.Q6H	HM

Legenda: DHHM = deficiência combinada de hormônio da hipófise; DGHI = deficiência isolado de GH; DSO=displasia septo-óptica; HT=Heterozigose; HM=Homozigose.

## 2. JUSTIFICATIVA

Devido à limitada resolução dos diagnósticos moleculares nos genes envolvidos na embriogênese hipofisária, somado com a descoberta de uma variante sinônima no gene *HESX1* que apresenta impacto funcional, surgiu a necessidade de revisitar e reavaliar os dados já gerados do gene *HESX1*, um dos primeiros genes associados ao hipopituitarismo. Essa nova perspectiva visa enriquecer nossa compreensão do papel desse gene crucial no desenvolvimento e na patogênese de distúrbios hipofisários. Nossa revisão se propõe a explorar as nuances genéticas e moleculares associadas ao *HESX1*, oferecendo insights valiosos para aprimorar a precisão diagnóstica e compreender melhor as implicações clínicas das variantes identificadas.

### 3. OBJETIVOS

#### Principal:

Reavaliar as sequências do gene *HESX1* previamente obtidas por meio de sequenciamento, como Sanger, ou em larga escala (painel ou exoma), conduzidos em estudos anteriores.

#### Secundários:

Estabelecer a correlação entre o genótipo e fenótipo das variantes alélicas identificadas.

### 4. CASUÍSTICA E MÉTODO

#### 4.1. Aspectos Éticos

Este estudo não exigiu a aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aos pacientes selecionados, uma vez que os dados analisados foram previamente gerados em projetos anteriores que incluíram o sequenciamento do gene *HESX1* por meio de diferentes metodologias, como Sanger, painel genético ou exoma. A solicitação de dispensa do TCLE foi devidamente aprovada tanto pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo quanto pela Plataforma Brasil, com o número de processo CAAE: 74723823.5.0000.0068.

#### 4.2. Definição da casuística

Do grupo inicial de 384 indivíduos diagnosticados com hipopituitarismo congênito e acompanhados no Ambulatório de Endocrinologia do Desenvolvimento do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, procedeu-se à exclusão da seguinte forma: foram removidos aqueles que já tinham um diagnóstico molecular definido (n=44), os que não dispunham de amostras de DNA disponíveis para testes (n=10) e os que não passaram por sequenciamento genético para o gene *HESX1* utilizando métodos como Sanger, painel genético ou exoma (n=112). Isso resultou na exclusão de um total de 166 indivíduos.

Dentre os 218 pacientes restantes, que foram, portanto, considerados na casuística deste estudo, 166 tiveram seu material genético sequenciado por meio de painel ou exoma

utilizando a plataforma Illumina, nas instalações da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na unidade de Sequenciamento em Larga Escala (SELA)<sup>4; 25; 26</sup>. Os 51 pacientes restantes foram submetidos exclusivamente ao sequenciamento do material genético através da metodologia de Sanger<sup>17</sup>.

#### 4.3. Avaliação clínica dos pacientes

Avaliação clínica dos pacientes selecionados para o estudo, assim como estudos hormonais e de imagem foram feitos como descrito por Otto, 2015<sup>27</sup>.

#### 4.4. Avaliação genética

##### 4.4.1. Avaliação das sequências de exoma e painel na Plataforma Franklin

A metodologia empregada para realizar o sequenciamento das 101 amostras no painel de estudo seguiu os procedimentos detalhados por Nakaguma e colaboradores, conforme descrito em seu estudo de 2019<sup>255</sup>. Para as 67 amostras submetidas à técnica de Exoma, adotou-se o protocolo conforme apresentado nos artigos publicados por França e colaboradores em 2019<sup>26</sup> e por Fang e colaboradores em 2016<sup>4</sup>.

As 168 sequências obtidas a partir dos estudos de exoma e painel foram convertidas em arquivos no formato Variant Call Format (VCF), sem anotações adicionais, a fim de permitir análises conduzidas com o suporte da plataforma Franklin (<https://franklin.genoox.com/>). Franklin é uma plataforma baseada em inteligência artificial empregada para avaliar a relação entre o genótipo e o fenótipo, apresentando uma notável precisão de 99,8% na avaliação do impacto das variantes genéticas. Todas as 168 sequências analisadas atenderam aos critérios de qualidade estabelecidos pela plataforma, conforme detalhado na Tabela 1.

Tabela 2. Parâmetros de avaliação de qualidade Franklin (Genoox)

<i>Parâmetro</i>	<i>Valor de referência</i>
<i>Profundidade média da variante</i>	>20
<i>Razão Homozigoto/Heterozigoto</i>	0.45 – 0.80
<i>Razão transição/transversão</i>	2.60 – 3.20
<i>Qualidade da variante</i>	>97%

A avaliação da qualidade de dados genéticos desempenha um papel fundamental na pesquisa e no diagnóstico clínico, garantindo a confiabilidade das informações genéticas obtidas. A profundidade média da variante é um indicador da quantidade de leituras (sequenciamento) feitas em uma posição específica do genoma. Ela reflete a cobertura do sequenciamento em uma região-alvo e é essencial para identificar a presença de variantes genéticas. Em geral, uma profundidade média alta aumenta a confiabilidade da detecção de variantes, uma vez que mais leituras permitem uma avaliação mais precisa. No entanto, valores excessivamente altos podem indicar regiões de leitura excessiva, aumentando o risco de erros sistemáticos. Portanto, é importante encontrar um equilíbrio entre profundidade e cobertura.<sup>28</sup>

A razão homocigoto/heterocigoto é um indicador da variabilidade genética em uma população. Uma alta proporção de homocigotos sugere homogeneidade genética, enquanto uma alta proporção de heterocigotos indica maior diversidade genética<sup>29</sup>. Já a razão entre transição/transversão é utilizada para avaliar o perfil de alterações genéticas em um conjunto de dados genéticos. Transições representam substituições de bases por outras pertencentes à mesma categoria ( $A \leftrightarrow G$  ou  $C \leftrightarrow T$ ), enquanto as transversões implicam substituições entre categorias diferentes ( $A \leftrightarrow C$ ,  $A \leftrightarrow T$ ,  $G \leftrightarrow C$  ou  $G \leftrightarrow T$ ). Em genomas normais, espera-se que a razão transição/transversão se aproxime de 2, visto que as transições tendem a ocorrer com maior frequência. Variações substanciais nessa razão podem indicar processos de seleção natural ou eventos mutacionais específicos.<sup>30</sup>

Por fim, a avaliação da qualidade da variante é um aspecto crítico na análise de dados genéticos, pois determina a confiabilidade das chamadas de variantes em relação às leituras obtidas durante o sequenciamento<sup>28; 31</sup>. Valores mais elevados na escala, indicam maior confiabilidade nos resultados, sendo, portanto, essenciais para distinguir mutações genuínas de artefatos de sequenciamento<sup>31; 32</sup>.

Após a importação dos arquivos em formato VCF para a plataforma Franklin e a avaliação do controle de qualidade, um painel específico foi criado para realizar a chamada de variantes no gene *HESX1*. As variantes alvo, eram aquelas sinônimas com frequência do alelo menor (MAF) <0,01% na população<sup>13</sup>, porém não usamos filtros específicos para chamada apenas destas variantes, sendo assim, todas aquelas encontradas na análise estão descritas neste trabalho.



#### 4.4.2. Avaliação das sequencias obtidas pelo sequenciamento de Sanger

O sequenciamento do gene *HESX1* utilizando a metodologia de Sanger foi realizada de acordo com os procedimentos previamente estabelecidos por Carvalho e colaboradores em estudo publicado no JCI de 2003<sup>17</sup>.

No caso dos 51 pacientes, desta casuística, submetidos ao estudo de Sanger, a análise dos eletroferogramas foi realizada de forma manual, uma vez que os resultados estavam disponíveis apenas em formato impresso. Essa abordagem demandou uma minuciosa inspeção visual dos gráficos e das sequências de DNA, garantindo uma avaliação precisa das variantes genéticas presentes.

A busca por variantes foi conduzida de maneira abrangente, incluindo todos os quatro éxons do gene. Para efeito de comparação, uma sequência de referência normal foi empregada, permitindo a identificação e a caracterização de quaisquer desvios genéticos nesses locais específicos.

#### 4.4.3. Avaliação *in silico* dos achados

As variantes sinônimas identificadas na análise dos pacientes foram submetidas a análises *in silico* para avaliação da MAF. Foram consideradas relevantes aquelas variantes com MAF inferior a 1%, indicando sua raridade. As ferramentas utilizadas para calcular a MAF incluíram o ABraOM, o 1000G e o gnomAD.

Para avaliar o impacto de uma variante localizada em uma região de *splicing*, foram utilizadas as ferramentas SpliceAI e dbSNV Ada. A SpliceAI (<https://spliceailookup.broadinstitute.org/>) é uma ferramenta projetada para prever eventos de *splicing*, visando uma análise detalhada do impacto específico de uma variante genética no processo de remoção de íntrons e união de éxons durante a transcrição do mRNA. Por meio de técnicas de inteligência artificial, a SpliceAI oferece insights sobre como variações genéticas podem afetar padrões de *splicing*, contribuindo para uma compreensão mais profunda desse fenômeno molecular. A ferramenta entrega dois scores diferentes (SpliceAI e Pangolin) para inferir a possibilidade de uma variante afetar o processo de *splicing*. O SpliceAI score varia de 0 a 1 e representa a probabilidade de que uma variante influencie o processo de *splicing* em qualquer posição dentro de uma janela circundante (+/- 500 pares de bases por padrão), com uma caracterização minuciosa considerando cortes específicos. Esses cortes, estabelecidos em 0,2 (indicando uma

chamada de alta probabilidade), 0,5 (recomendada) e 0,8 (alta precisão), servem como pontos de referência fundamentais. Uma chamada de alta, representada pelo corte de 0,2, sugere uma probabilidade considerável de que a variante impacte o *splicing*. A recomendação de corte em 0,5 destaca um valor que, ao ser alcançado ou excedido, indica uma probabilidade substancial de impacto, sendo considerado um ponto de referência útil. O corte de 0,8, designado para alta precisão, representa um limiar onde a probabilidade de impacto é ainda mais elevada, garantindo uma avaliação mais criteriosa.

O Pangolin *score* não recomenda limiares de pontuação específicos; no entanto, as pontuações de 0,2 ou superiores aparecem em verde, pontuações de 0,5 ou superiores aparecem em amarelo e pontuações de 0,8 ou superiores aparecem em vermelho. Essa abordagem escalonada, com cortes específicos, não apenas oferece uma visão detalhada das probabilidades associadas aos *escores* delta, mas também fornece uma estrutura robusta para a interpretação dos resultados, permitindo uma análise mais refinada do potencial efeito da variante no *splicing* genético<sup>33</sup>.

Por outro lado, o dbScSNV (<http://www.liulab.science/dbScSNV.html>) fornece uma pontuação específica para cada alteração genética, indicando a probabilidade de influenciar o processo de *splicing* do gene em questão. Cada alteração genética é acompanhada por dois *escores*, denominados "Ada" e "RF", que são resultantes de cálculos realizados por diferentes algoritmos de inteligência artificial. A significância desses *escores* reside na capacidade de prever o impacto da alteração genética no processo de *splicing*. Notavelmente, valores elevados, superiores a 0,6, sugerem uma maior probabilidade de que a referida alteração genética exerça efetivamente influência no *splicing* do gene em avaliação. Essa abordagem refinada, utilizando algoritmos avançados, confere maior precisão à análise, ampliando assim a compreensão sobre como as variantes genéticas podem modular os eventos de *splicing* e, conseqüentemente, afetar a expressão gênica.<sup>34; 35</sup>

#### 4.4.4. Estudo *in vitro*

Para avaliar o impacto de variantes intrônicas no cDNA, primers para a amplificação e sequenciamento do cDNA do gene *HESX1* foram meticulosamente projetados com o auxílio da ferramenta Primer3 (disponível em <https://primer3.org/>). Os primers utilizados foram os seguintes: F (5'-3' GCAGACCACGAGAGGATGTC) e R (5'-3' TGACTAAGTGATTCCACAAGCTG). Antecipa-se que a amplificação resultará em um fragmento com o tamanho projetado de 885 pares de bases. O procedimento detalhado para a coleta do material, transformação de RNA em cDNA e amplificação está descrito no Anexo A.

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi submetida a um processo de otimização a fim de aprimorar o desempenho e a eficiência da enzima envolvida, bem como para estabelecer um perfil de ciclos de temperatura ideal para a amplificação do fragmento alvo. Para a execução desta etapa, foram empregados os reagentes GoTaq® DNA Polymerase, Promega (Madison, WI, EUA).

Os parâmetros e condições para a padronização da reação de PCR e o ciclo de temperaturas otimizado utilizado durante a amplificação encontram-se descritos no Anexo B. Os processos de otimização e padronização garantem a confiabilidade e a eficácia da técnica de PCR, fundamental para a amplificação específica do fragmento de interesse.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação clínica da casuística

No processo de exclusão, os pacientes com hipopituitarismo congênito que já possuíam diagnóstico molecular previamente definido, aqueles cujas amostras de DNA não estavam disponíveis em nosso banco e os que não haviam sido incluídos em estudos prévios de sequenciamento de exoma, painel ou Sanger para o gene *HESX1* foram eliminados do grupo de estudo. Isso resultou em um total de 218 pacientes elegíveis para a realização deste estudo.

Dentro deste grupo, observamos que 173 indivíduos apresentavam múltiplas deficiências hormonais, enquanto 46 pacientes manifestaram exclusivamente deficiência de hormônio de crescimento (GH). A idade média dos participantes foi de 35,4 anos, com

um desvio padrão de  $\pm 12$  anos. Além disso, notou-se uma predominância significativa de indivíduos do sexo masculino, totalizando 134 pacientes.

Quanto à avaliação antropométrica, a média do *escore Z* para altura inicial dos participantes foi de -1,5, com um desvio padrão de  $\pm 1,4$ . Análises de ressonância magnética, revelaram que 169 indivíduos apresentavam neurohipófise ectópica, enquanto 146 apresentavam adenohipófise hipoplásica. Os dados clínicos dos pacientes que compõe a casuística, estão descritos individualmente no Anexo C.

Um dado notável foi a taxa de consanguinidade entre os pacientes, que atingiu um elevado patamar de 43,7%. Essa elevada taxa pode ser atribuída ao foco específico do estudo de exoma conduzido por Ferreira, Nathalia (2020)<sup>36</sup>, que se concentrou na análise por exoma de pacientes provenientes de famílias com pais consanguíneos.

## 5.2. Análise das sequências genéticas e identificação dos achados

A avaliação das 51 sequências geradas por meio de Sanger não revelou a presença de nenhuma variante. No entanto, ao analisar as sequências obtidas a partir de estudos de painel ou exoma, no formato VCF, conduzidos na plataforma Franklin, identificaram-se um total de 3 variantes em 22 pacientes, sendo duas delas presentes em homozigose e concomitantes em 6 pacientes, c.374A>G (p.N125S)/ c.385G>A (p.V129I). Dessas, uma variante foi classificada como polimorfismo c.374A>G (p.N125S), devido à sua MAF elevada, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Frequência das variantes no gene *HESX1* identificadas na casuística

Troca no <i>cDNA</i>	Troca de aminoácidos	Tipo	1000 Genomes	Exac	GnomeAD	ABRaOM
c.374A>G	p.Asn125Ser	Missense	7.59%	2.16%	7.02%	NE
c.385G>A	p.Val129Ile	Missense	0.06%	0.08%	0.06%	0.08%
c.460-3T>C	-	Intrônica/Região de Splicing	NE	<0.01%	<0.01%	0.04%

NE=Não encontrado.

A variante c.374A>G (p.N125S) foi identificada exclusivamente em 14 pacientes, dos quais 7 a apresentavam em homozigose e 7 em heterozigose. Esta é uma variante missense localizada no terceiro éxon do gene, catalogada sob rs9878928 e possui uma alta frequência nos bancos de dados, exceto no ABRaOM.

De maneira similar, a variante c.385G>A (p.V129I) também é uma missense e está localizada no éxon 3 do gene (rs143057250) e apresenta uma MAF baixa nos bancos

conforme a análise *in silico* realizada, contudo identificamos a variante em 7 pacientes, sendo que 6 deles são homocigotos.

A terceira variante, c.460-3T>C (rs112703580) foi encontrada em heterocigose, em conjunto com o polimorfismo c.374A>G (p.N125S) em um paciente do sexo masculino, filho de pais não consanguíneos e sem histórico de hipopituitarismo ou problemas de desenvolvimento na família. Ele nasceu a termo por cesariana, com relato de asfixia perinatal e convulsões. Apresenta deficiência dos hormônios GH, TSH, ACTH e LH/FSH, mas alcançou uma altura dentro da faixa esperada para sua família, atingindo uma altura final de 172 cm, pós-tratamento. Em sua ressonância magnética, foi observada uma adenohipófise normal e uma neurohipófise ectópica com transecção da haste. Além do hipopituitarismo, o paciente também apresenta epilepsia. Ele foi submetido a um estudo de exoma realizado em trio, junto com seus pais, pois sua irmã mais velha não era acometida pela doença e não estava disponível para testes. Essa análise evidenciou a segregação familiar de ambas as variantes genéticas. O pai, que é saudável, também é portador de ambas as variantes em heterocigose, como demonstrando na figura 2.

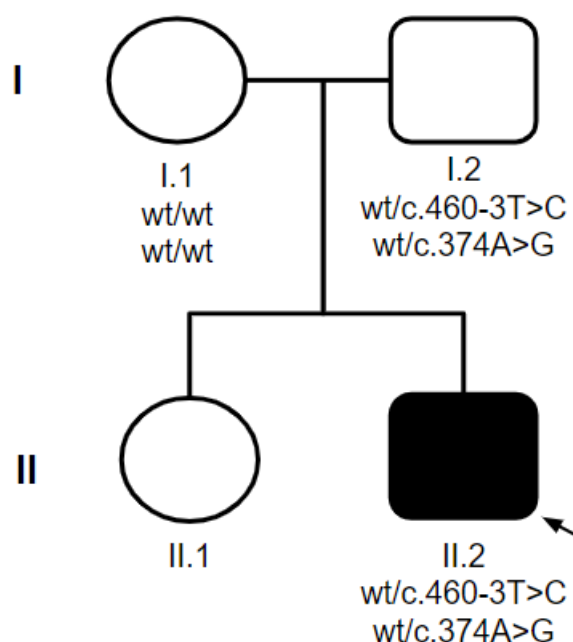


Figura 2. Heredograma da segregação familiar da variante c.460-3T>C no gene *HESX1*.

A variante c.460-3T>C é de natureza intrônica e está localizada na região de *splicing* canônica aceitadora, e no trato de polipirimidina, sendo estas regiões cruciais para o processo de *splicing* do RNA, pois atuam no reconhecimento e remoção precisa dos íntrons<sup>37; 38</sup>.

Ao realizar uma análise abrangente do impacto da variante c.460-3T>C no processo de *splicing*, evidenciou-se uma probabilidade substancialmente baixa de influenciar significativamente esse intricado mecanismo molecular. No âmbito do SpliceAI e dbSNV Ada, a variante exibiu um *score* notadamente baixo de 0.01 (para a região de ganho do acceptor, situando-se consideravelmente abaixo da pontuação de corte que seria necessária para inferir qualquer impacto significativo no processo biológico de *splicing*). Em uma análise comparativa com o score Pangolin, a variante registrou uma pontuação de 0.06 para a perda de *splicing*, coerente com as conclusões derivadas da avaliação detalhada do gene no cDNA da família que se mostrou intacto. Figura 3



Figura 3. **A.** A imagem representa um gel de agarose, com disposição da direita para a esquerda: marcador de peso molecular Low DNA, paciente heterozigoto para a variante c.460-3T>C, pai do paciente também heterozigoto para a mesma variante, mãe do paciente, controle positivo normal e controle negativo da reação. São evidenciadas bandas de tamanho correspondente ao fragmento esperado para a amplificação completa do cDNA, aproximadamente 835 pares de base, nas amostras da família em estudo e no controle positivo. **B.** O eletroferograma resultante do sequenciamento do cDNA da família em análise revelou a manutenção do tamanho e sequência do cDNA. O paciente, portador da variante intrônica c.460-3T>C, também apresentou heterozigose para a variante c.374A>G; p.N125S, observação congruente com o estado genético do seu pai.

## 6. DISCUSSÃO

Na vanguarda da pesquisa médica, a Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo enfrenta o desafio significativo de desvendar a causalidade subjacente ao hipopituitarismo congênito em seus pacientes. Atualmente, apenas 15% da população afetada sob acompanhamento nesta instituição recebeu um diagnóstico molecular definido, e a frequência mundial de mutação para os cinco genes calculados em uma metanálise de 21 estudos foi de 4 a 12%, variando de 2 a 11% em casos esporádicos e até 63% em casos familiares<sup>39</sup>. Este cenário destaca a complexidade inerente a essa comorbidade e sublinha a necessidade urgente de avanços na compreensão de suas bases genéticas.

Dentre os 44 genes identificados como causadores do hipopituitarismo congênito<sup>5</sup>, o *HESX1* emerge como uma peça fundamental neste intricado quebra-cabeça. Aprofundar-se na relação e no impacto desse gene no desenvolvimento humano e animal não apenas amplia nosso entendimento sobre os mecanismos envolvidos no hipopituitarismo, mas também lança luz sobre novas perspectivas diagnósticas e terapêuticas. Sua influência estende-se desde as fases iniciais do desenvolvimento embrionário até a maturação neuronal, exercendo impactos significativos em vários aspectos do crescimento e diferenciação celulares.

No contexto da embriogênese, o *Hesx1* desempenha um papel na especificação do neuroectoderma anterior, contribuindo para a formação do prosencéfalo e, por conseguinte, para a definição das bases do desenvolvimento cerebral.<sup>8</sup> A regulação precisa do *Hesx1* é crucial para equilibrar adequadamente a proliferação celular e a diferenciação neuronal, garantindo a formação adequada de estruturas cerebrais críticas, como o córtex cerebral e os nervos ópticos. Na hipófise, a expressão precisa do gene *Hesx1* é necessária para a formação adequada da bolsa de Rathke, uma estrutura precursora para a regulação hormonal ao longo da vida<sup>8</sup>.

Os camundongos *knockout Hesx1*<sup>-/-</sup> oferecem insights valiosos sobre o impacto do gene na morfologia cerebral. A letalidade pós-natal observada nesses animais, juntamente com anomalias como anoftalmia e prosencéfalo reduzido, destaca a importância crítica do *Hesx1* no desenvolvimento cerebral normal. Além disso, a displasia da hipófise observada nos camundongos *knockout* evidencia a relação direta entre o *Hesx1* e o correto desenvolvimento do sistema endócrino. Esses achados reforçam a significativa

contribuição do *Hesx1* para a intrincada rede regulatória que governa o desenvolvimento cerebral e endócrino, oferecendo pistas valiosas para futuras investigações e abordagens terapêuticas<sup>9</sup>. Defeitos genéticos em genes cruciais para a cascata do desenvolvimento da adenohipófise geralmente resultam na diminuição do tamanho da glândula e na deficiência da secreção hormonal. Genes ativos nas fases iniciais do desenvolvimento craniofacial frequentemente associam-se a anormalidades nessas regiões, juntamente com disfunções hipofisárias (DHHM sindrômica). Em contraste, genes expressos no hipotálamo ou intrínsecos à hipófise causam DHHM não sindrômico. A complexidade genética do DHHM é notável devido à heterogeneidade dos fatores subjacentes, contribuindo para um amplo espectro fenotípico.<sup>4</sup>

Este cenário complexo destaca a necessidade contínua de uma abordagem abrangente e multidisciplinar para entender e manejar efetivamente essa condição clínica desafiadora. Até o momento, a maioria dos genes humanos de DHHM foi identificada pelo sequenciamento de Sanger de genes candidatos individuais, o que não é uma abordagem eficiente para doenças com grande heterogeneidade genética. Além disso, é improvável que a triagem gene a gene identifique doenças digênicas ou multigênicas, a menos que todos os genes conhecidos sejam investigados em cada paciente.<sup>4</sup>

Uma grande variedade de variantes autossômicas dominantes e recessivas no *HESX1* foi descrita em pacientes com um amplo espectro de fenótipos que variam desde DGHI a DHHM, com ou sem a displasia septo-óptica (DSO). A hipófise anterior pode ser hipoplásica ou aplásica e a hipófise posterior pode ser tópica ou ectópica. Nenhuma correlação clara de genótipo-fenótipo é óbvia entre os casos com variantes no gene *HESX1*, mas há uma tendência de que as alterações genéticas recessivas causem fenótipos mais graves e pareçam ser totalmente penetrantes, enquanto variantes heterozigóticas podem estar associadas a fenótipos mais leves e penetrância incompleta<sup>4</sup>.

Como concluído no estudo de Qing Fang e colaboradores<sup>4</sup>, as alterações genéticas no *HESX1* causam manifestações clínicas variáveis, o que sugere uma influência de genes modificadores ou fatores ambientais no fenótipo. Recentemente, Coutinho e colaboradores<sup>13</sup> identificaram uma variante heterozigota no gene *HESX1* que não altera o aminoácido codificado (c.219C>T; p.S73S), sendo assim a primeira variante sinônima nesse gene relacionada ao fenótipo de DHHM em um paciente. A variante encontra-se em um nucleotídeo evolutivamente conservado em primatas, mas não em outros vertebrados.



Através de uma análise feita por PCR, foi evidenciado que o paciente expressava dois transcritos diferentes, sendo um mais curto que não possuía a sequência correspondente ao exon 2, devido a uma junção do exon 1 ao exon 3. A nova sequência introduziu uma finalização prematura da proteína após 54 códons e, quando traduzida, produz uma proteína truncada.<sup>13</sup>

O código genético é redundante, o que significa que diferentes trincas de nucleotídeos, também conhecidos como códon, podem resultar no mesmo aminoácido sendo incorporado na proteína<sup>12</sup>. Quando se tem uma troca de um nucleotídeo levando à um códon que não altera o aminoácido a ser incorporado, se tem o que chamamos de variantes sinônimas. Historicamente, essas substituições foram vistas como de pouca significância por não afetarem estrutura e função proteica, mas hoje em dia sabe-se de mais de 50 doenças que estão associadas a esse tipo de variante<sup>11</sup>. Dentro das 261 variantes encontradas no gene *HESX1* no GnomAD, apenas 38 são sinônimas. O número de variantes sinônimas encontradas no gene com MAF <0,1% foi 31, que é menor do que o número esperado de 36,2 de acordo com cálculos, concedendo então uma razão *oe* de 0,86, que está entre os valores encontrados para variantes missense (1,05) e para variantes de perda de função (0,63). Quanto mais próximo de zero a razão *oe*, maior o impacto da variante no funcionamento do gene. Além disso, o *Z score* das variantes sinônimas é de 0,68, enquanto o das missense é de -0,16. Ambas as medidas sugerem que variantes sinônimas são menos toleradas no gene *HESX1* do que variantes missenses.

Este estudo se concentrou em verificar a existência de variantes genéticas no gene *HESX1* em pacientes com hipopituitarismo congênito que já foram analisados em estudos anteriores pelas técnicas de sequenciamento de exoma, painel ou Sanger, mas que até então tinham como foco analisar apenas aquelas variantes que levavam a uma troca proteica e que não se atentaram para aquelas variantes silenciosas que agora se sabe poder causar impacto na função proteica.

Identificamos três variantes no gene *HESX1*, sendo uma delas (c.374A>G, p.N185S) classificada como polimorfismo caribenho<sup>14</sup>. Em um estudo anterior conduzido por Vivenza, Daniela e colaboradores em 2011<sup>20</sup>, que abrangeu uma amostra de 244 pacientes com hipopituitarismo (156 com deficiência isolada de GH e 88 com deficiências hormonais múltiplas) e 646 indivíduos controle, evidenciou as variantes c.374A>G,

p.N185S e c.385G>A, p.V129I. A variante c.374A>G foi encontrada exclusivamente em heterozigose em 3 (2,1%) pacientes e em 5 (1,7%) indivíduos controle. Da mesma forma, a variante c.385G>A foi observada apenas em heterozigose, presente em 2 (2,6%) pacientes e em 4 (0,6%) indivíduos controle. Em um estudo conduzido por K. Newbern e colaboradores em 2013<sup>40</sup>, que analisou uma coorte de pacientes com síndrome de Kallman, também foram identificadas essas mesmas variantes, c.374A>G, p.N185S e c.385G>A, p.V129I a primeira sendo considerada um polimorfismo por sua alta frequência na população afro-caribenha<sup>41</sup> e a segunda também descartada por ter sido observada nos indivíduos controle do estudo de Vivenza, Daniela e colaboradores em 2011.<sup>20</sup>

Corroborando com os achados evidenciados na literatura, estas variantes também foram encontradas em nossa casuística, porém um ponto de destaque em nossos resultados é que seis pacientes apresentaram ambas as variantes missense, c.374A>G, p.N185S e c.385G>A, p.V129I, em homozigose, embora ambas tenham sido classificadas como benigna/conflituosa com espectro de benignidade/VUS de acordo com os critérios do American College of Medical Genetics (ACMG) e Gnomad, respectivamente. Na literatura, apesar da alteração c.374A>G, p.N125S ser considerada um polimorfismo, o estudo funcional de ensaios de *eletromobility shift assay* (EMSA) evidenciou uma migração alterada da proteína<sup>14</sup>, por outro lado a variante c.385G>A (p.V129I) apesar de não ter estudo funcional de EMSA apresenta uma classificação conflituosa desde VUS a benigna, sendo necessário uma abordagem funcional dessa alteração genética, que se concomitante em um mesmo paciente poderá contribuir para o fenótipo de hipopituitarismo congênito, como no caso de 6 pacientes da coorte do presente estudo. Apenas um paciente da casuística carrega a variante c.460-3T>C em região de *splicing*, em conjunto com a variante c.374A>G, p.N125S em região exônica, considerada polimorfismo MAF >1%. A análise de frequência da variante c.460-3T>C evidenciou uma MAF <0.01% nos principais bancos de dados, o que nos chamou atenção. Por ser uma variante alocada na região do trato de pirimidina podem ter diversos impactos no processamento do RNA e, por conseguinte, na expressão e funcionalidade das proteínas. Ao fazer a análise da segregação da variante na família, evidenciou-se que ambas as variantes foram herdadas do pai do paciente, que é um indivíduo não acometido pela doença. Ao analisar a predição do impacto desta variante nos bancos de dados que utilizam da inteligência artificial para calcular o *score*, evidenciou-se uma baixa probabilidade de que a variante c.460-3T>C altere o *splicing*, resultado este corroborado com achados *in vitro* ao amplificar e

sequenciar o cDNA do paciente, sua família e um indivíduo normal, que demonstram uma perfeita amplificação de toda a sequência dos 4 exons do gene *HESX1*.

Esses resultados solidificam consistentemente a conclusão de que há uma probabilidade mínima da variante c.460-3T>C exercer um impacto substancial no processo de *splicing*. Esta interpretação, respaldada por análises de múltiplas ferramentas e naturezas, fortalece a confiança em nossas conclusões sobre a influência biológica limitada dessa alteração genética específica no contexto do *splicing* no fenótipo do paciente.

Com este estudo, aprofundamo-nos na natureza previamente não explorada das variantes genéticas, anteriormente consideradas silenciosas e pouco relevantes. Atualmente, reconhecemos que essas variantes podem desempenhar um papel significativo na alteração da função proteica. Portanto, é imperativo que estudos subsequentes considerem esse tipo de variante como candidatas, garantindo que nenhum dado seja negligenciado no futuro e que taxas mais elevadas de diagnósticos moleculares sejam reveladas.

## **7. CONCLUSÕES**

O presente estudo teve como objetivo a reanálise das sequências do gene *HESX1* obtidas por meio de métodos de sequenciamento automático (Sanger) e de larga escala (painel ou exoma) e que evidenciou a presença de variante intrônica rara não correlacionada com o fenótipo após a validação experimental.

## 8. ANEXOS

### 8.1. ANEXO A – Protocolo de coleta e transformação do RNA em cDNA

As amostras de RNA foram obtidas a partir de 15 a 20 mL de sangue periférico coletado em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), seguindo uma metodologia criteriosa. A lise das hemácias foi executada mediante a adição de um volume equivalente ao dobro do sangue de uma solução de lise (NH<sub>4</sub>C 1 mM, NaHCO<sub>3</sub> 1mM), com subsequente incubação a 4°C por 30 minutos. O material resultante foi então centrifugado a 4°C por 10 minutos a 1200G, e o sobrenadante foi cuidadosamente descartado para preservar o precipitado. Posteriormente, o sedimento foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido da adição de 200 uL de clorofórmio. O frasco foi vigorosamente agitado por 15 segundos para efetuar a separação entre debris celulares, RNA e DNA, culminando em uma incubação adicional à temperatura ambiente por 10 minutos. Após a incubação, uma nova centrifugação a 4°C a 1200G por 15 minutos foi realizada, seguida da transferência do sobrenadante para um novo tubo, marcando o início do protocolo de precipitação do RNA.

Para a precipitação do RNA, 500 uL de isopropanol foram adicionados ao tubo, seguido de incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e subsequente centrifugação a 4°C a 1200G por 10 minutos. O sobrenadante foi removido com cuidado, preservando o precipitado, e então procedeu-se à etapa de purificação do RNA. Nesta etapa, o precipitado foi lavado pela adição de 1 mL de etanol 75% gelado a -20°C, seguido de vórtex, e subsequente centrifugação a 4°C a 7500G por 5 minutos. Como passo conclusivo, realizou-se a evaporação do álcool à temperatura ambiente por 20 minutos, seguida pela ressuspensão do precipitado em 50 uL de H<sub>2</sub>O RNase free e denaturação a 65°C por 10 minutos.

Um cDNA de fita única foi sintetizado a partir do mRNA por meio do ensaio *SuperScript first-strand synthesis system for RT-PCR*, desenvolvido e comercializado pela Invitrogen (Waltham, MA, EUA). O protocolo de reação foi estritamente conduzido em estrita conformidade com as orientações fornecidas pelo fabricante.

## 8.2. ANEXO B – Protocolos de reação de PCR e ciclo de temperatura para amplificação do gene *HESX1* no cDNA

Para a condução da reação de PCR com um volume final de 25 uL, foram empregados com precisão os seguintes componentes: 2 uL de cDNA, 0,5 uL de dNTP Mix 10mM, 5 uL de tampão Green GoTaq Reaction 5x Buffer, 0,5 uL da enzima GoTaq DNA Polymerase 100u da Promega (Madison, WI, EUA). Adicionalmente, foram acrescentados 1 uL de cada um dos primers específicos (Primer F e R), os quais foram projetados para flanquear a região de interesse e estavam presentes em uma concentração de 10 pmol/uL. Visando completar o volume final da reação, foram adicionados 15 uL de água (SRW).

As condições adotadas para a reação de PCR foram as seguintes: uma etapa inicial de desnaturação a 96°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos que consistiram em desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 61°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Para a extensão final, uma temperatura de 72°C foi mantida por 10 minutos. Os produtos resultantes da reação de PCR foram submetidos a um procedimento de pré-tratamento enzimático, empregando a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2U/ $\mu$ l) e exonuclease I (10U/ $\mu$ l). Posteriormente, os produtos desse tratamento foram submetidos a eletroforese em um sequenciador automático, garantindo a obtenção de dados.

### 8.3. ANEXO C - Dados clínicos individuais dos pacientes selecionados para compor a casuística deste estudo.

Caso	Sexo	Idade	PARTO		DEFICIÊNCIAS HORMONAIS						Ressonância Magnética da Hipófise			HESX1	
			Tipo	Complicações	GH	TSH	ACTH	LH/FSH	PRL	ADH	Anterior	Haste	Posterior	Variante	Perfil Alélico
1	F	30	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	-
2	F	31	C	SIM	+	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	-
3	F	32	C	SIM	+	-	-	+	-	-	SV	ES	T	c.374A>G / c.385G>A	HM/HM
4	M	26	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
5	M	71	ND	ND	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
6	F	25	C	SIM	+	+	-	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
7	F	39	C	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
8	M	10	C	NÃO	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
9	M	10	C	SIM	+	-	-	-	-	-	H	A	E	c.374A>G	HT
10	M	24	V	NÃO	+	+	+	+	-	+	H	I	NV	NE	NE
11	F	25	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	I	T	c.385G>A	HT
12	M	46	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
13	M	47	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	A	E	NE	NE
14	F	54	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	N	TR	E	NE	NE
15	F	61	C	NÃO	+	+	+	+	-	+	H	NV	E	NE	NE
16	M	44	V	SIM	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
17	F	39	V	NÃO	-	-	+	-	-	-	H	NV	NV	c.374A>G / c.385G>A	HM/HM
18	F	46	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
19	M	36	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
20	M	15	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	c.374A>G / c.385G>A	HM/HM
21	M	53	ND	ND	+	-	+	+	-	-	H	A	NV	NE	NE
22	M	33	V	NÃO	-	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
23	F	42	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
24	F	27	F	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	A	E	NE	NE
25	F	28	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
26	F	41	F	SIM	+	-	-	+	-	-	H	NV	NV	NE	NE
27	M	5	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
28	F	18	C	NÃO	-	-	+	-	-	-	N	I	T	NE	NE
29	M	23	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	E	c.374A>G / c.385G>A	HM/HM
30	M	32	C	SIM	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
31	F	31	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
32	M	55	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
33	F	19	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
34	M	14	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	E	NE	NE
35	M	18	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
36	F	43	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
37	M	21	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
38	M	33	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
39	M	36	C	SIM	+	+	+	+	-	-	N	TR	E	c.460-3T>C / c.374A>G	HT
40	M	46	C	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
41	M	33	ND	ND	+	+	-	-	-	-	H	NV	E	c.374A>G	HT
42	F	52	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
43	M	15	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	TR	E	NE	NE
44	M	33	ND	ND	+	+	-	+	-	-	H	NV	NV	c.374A>G	HT
45	M	36	V	NÃO	+	+	-	+	+	-	H	I	NV	NE	NE
46	F	51	F	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
47	F	59	V	NÃO	+	-	+	+	-	-	H	I	E	NE	NE
48	F	25	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	A	E	NE	NE
49	M	66	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
50	M	43	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
51	F	53	C	SIM	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
52	M	51	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE

53	M	19	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
54	M	35	V	SIM	+	+	+	+	-	-	N	NV	E	NE	NE
55	F	39	ND	ND	-	-	+	-	-	-	N	I	E	NE	NE
56	M	41	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
57	M	38	C	SIM	+	+	-	+	-	-	H	NV	E	c.374A>G / c.385G>A	HM/HM
58	F	45	V	NÃO	+	+	-	-	-	-	H	A	NV	NE	NE
59	F	15	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
60	F	40	C	NÃO	-	-	-	+	-	-	H	A	E	NE	NE
61	M	25	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
62	M	36	C	SIM	+	-	-	+	-	-	H	I	E	NE	NE
63	M	40	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
64	M	19	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	E	NE	NE
65	M	33	V	NÃO	+	+	-	+	-	+	H	NV	NV	c.374A>G / c.385G>A	HM/HM
66	M	32	V	NÃO	+	+	+	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
67	M	32	C	SIM	+	+	-	+	+	-	SV	I	T	NE	NE
68	M	32	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	I	NV	NE	NE
69	M	37	F	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
70	M	42	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	c.374A>G	HT
71	M	30	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
72	F	32	C	NÃO	+	+	+	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
73	M	37	V	NÃO	+	+	+	-	-	-	N	I	T	c.374A>G	HT
74	F	33	C	NÃO	+	+	+	-	-	-	H	A	E	NE	NE
75	F	24	V	SIM	+	+	+	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
76	F	14	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
77	F	32	V	SIM	+	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
78	M	41	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
79	M	45	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
80	M	37	C	SIM	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
81	F	31	C	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
82	M	21	ND	ND	+	-	+	+	-	-	N	I	T	NE	NE
83	F	52	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
84	F	36	C	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
85	M	21	C	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	NV	NE	NE
86	F	37	V	NÃO	+	+	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
87	F	26	C	NÃO	+	-	+	-	-	-	H	I	E	NE	NE
88	F	21	ND	ND	-	-	+	-	-	-	N	TR	E	NE	NE
89	M	38	F	SIM	-	-	+	+	-	-	H	A	E	NE	NE
90	M	41	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	I	E	NE	NE
91	F	41	ND	ND	+	+	+	+	-	+	H	NV	E	NE	NE
92	F	41	V	NÃO	+	+	-	+	-	-	N	I	NV	c.374A>G	HT
93	M	65	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
94	F	29	C	NÃO	+	-	+	+	+	-	H	NV	E	NE	NE
95	M	17	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
96	M	30	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	E	NE	NE
97	M	35	C	SIM	+	+	-	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
98	M	35	V	NÃO	-	-	+	-	-	-	N	I	T	NE	NE
99	M	35	ND	ND	+	+	-	+	-	+	H	A	T	NE	NE
100	M	30	C	NÃO	-	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
101	F	45	V	SIM	+	+	+	+	-	-	N	TR	E	NE	NE
102	F	62	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
103	M	44	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
104	M	48	ND	ND	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
105	M	35	V	NÃO	+	+	+	+	+	-	H	TR	E	NE	NE
106	M	51	V	SIM	+	+	+	+	+	-	H	TR	E	NE	NE
107	M	23	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	c.374A>G	HT
108	F	20	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
109	F	33	C	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	A	E	NE	NE
110	F	38	V	NÃO	+	+	+	+	+	+	H	A	NV	NE	NE

111	M	20	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	A	E	NE	NE
112	F	23	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	c.374A>G	HT
113	F	50	V	SIM	+	+	-	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
114	M	39	ND	ND	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
115	M	46	F	SIM	+	+	+	+	+	+	H	TR	E	NE	NE
116	F	32	C	NÃO	+	-	-	+	+	-	H	I	E	NE	NE
117	M	39	F	SIM	+	+	+	+	-	-	H	A	NV	c.374A>G	HT
118	M	26	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
119	M	26	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
120	M	25	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	TR	E	NE	NE
121	M	50	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
122	M	29	V	NÃO	+	+	+	+	+	-	H	I	E	NE	NE
123	F	22	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
124	M	11	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	c.374A>G	HM
125	F	47	C	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
126	M	25	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
127	M	49	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
128	F	40	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	A	E	NE	NE
129	M	23	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	A	T	NE	NE
130	F	15	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
131	M	30	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	E	NE	NE
132	F	49	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
133	F	51	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
134	F	25	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
135	F	21	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
136	F	26	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
137	M	27	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
138	F	38	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
139	F	33	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	I	NV	NE	NE
140	F	52	V	NÃO	+	+	+	+	+	-	H	A	NV	NE	NE
141	F	39	C	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	c.374A>G	HT
142	M	34	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
143	f	23	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
144	M	27	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
145	M	38	V	NÃO	+	+	-	+	-	+	H	NV	E	NE	NE
146	F	26	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
147	M	18	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
148	M	14	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
149	F	38	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
150	F	28	ND	ND	+	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
151	M	33	C	NÃO	+	+	-	+	-	-	H	I	E	NE	NE
152	M	59	ND	ND	+	+	-	+	-	-	N	I	T	NE	NE
153	M	51	V	SIM	+	+	+	+	+	-	H	TR	E	NE	NE
154	M	32	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	I	E	NE	NE
155	F	45	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
156	F	26	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	TR	T	NE	NE
157	M	44	C	SIM	+	-	+	-	-	+	H	I	T	NE	NE
158	M	39	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
159	F	5	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
160	F	33	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	A	NV	NE	NE
161	M	36	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	I	T	NE	NE
162	M	4	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	I	NV	NE	NE
163	M	58	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
164	F	49	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	A	E	NE	NE
165	M	31	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	I	E	NE	NE
166	M	15	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
167	F	27	V	SIM	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
168	M	35	V	SIM	+	+	+	+	+	-	SV	TR	E	NE	NE
169	M	44	V	NÃO	+	-	-	-	-	+	SV	A	E	NE	NE
170	M	40	C	SIM	+	-	-	-	-	-	SV	NV	E	NE	NE



171	M	42	C	NÃO	+	+	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
172	F	48	ND	ND	+	-	-	-	-	-	H	TR	T	NE	NE
173	M	23	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
174	M	37	V	SIM	+	+	-	-	-	+	H	I	T	NE	NE
175	M	35	V	NÃO	-	-	+	-	-	-	H	I	E	NE	NE
176	M	48	F	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
177	M	38	C	NÃO	+	-	-	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
178	F	42	C	SIM	+	-	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
179	M	41	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
180	M	29	V	SIM	+	-	-	-	-	+	N	A	NV	NE	NE
181	M	43	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	NV	NE	NE
182	M	22	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
183	M	40	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
184	M	40	ND	ND	-	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
185	F	42	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	NV	E	NE	NE
186	F	25	V	SIM	+	+	+	-	-	+	H	I	E	NE	NE
187	M	30	V	SIM	+	+	+	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
188	M	33	C	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
189	M	52	V	SIM	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
190	M	65	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
191	M	52	V	NÃO	+	+	-	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
192	F	37	V	SIM	-	-	+	-	-	-	H	I	E	NE	NE
193	M	38	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
194	F	32	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	NV	E	NE	NE
195	F	41	C	SIM	+	-	-	-	-	-	H	A	E	NE	NE
196	F	39	V	NÃO	-	-	+	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
197	F	43	V	NÃO	+	+	+	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
198	M	26	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
199	M	45	ND	ND	+	+	-	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
200	M	33	V	SIM	+	+	-	-	+	-	H	I	T	NE	NE
201	M	46	V	NÃO	+	+	+	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
202	M	25	ND	ND	-	-	+	-	-	-	N	I	T	NE	NE
203	M	44	V	SIM	+	-	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
204	M	34	C	NÃO	-	+	-	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
205	M	40	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	N	NV	E	NE	NE
206	M	48	C	SIM	+	+	-	+	-	-	N	I	E	NE	NE
207	M	46	C	NÃO	-	+	+	-	-	-	H	NV	E	NE	NE
208	M	38	ND	ND	-	-	-	-	-	-	N	I	T	NE	NE
209	M	43	V	NÃO	-	+	-	-	-	-	H	TR	E	NE	NE
210	F	20	C	SIM	+	+	+	-	-	+	N	I	T	NE	NE
211	M	49	F	SIM	+	-	-	-	-	-	H	TR	NV	NE	NE
212	M	35	V	SIM	+	+	-	-	-	+	H	NV	NV	NE	NE
213	M	38	V	SIM	+	-	-	-	-	-	N	I	E	NE	NE
214	M	39	V	SIM	-	-	+	-	-	-	H	I	E	NE	NE
215	F	46	V	SIM	+	+	+	+	-	-	N	I	E	NE	NE
216	M	60	C	SIM	+	+	-	+	-	-	H	TR	E	NE	NE
217	M	39	V	NÃO	+	-	-	-	-	-	H	I	E	NE	NE
218	F	35	C	SIM	-	-	-	+	-	-	N	NV	NV	NE	NE

Legenda: F=Feminino; M=Masculino; C=Cesária; V=Vaginal; + = deficiente; - = normal; N= Normal; H=hipoplásica; SV=Sela Vazia; TR=Transecção de haste; NV= Não visualizada; I=Íntegra; A= Afilada; ES = Espessamento; E=Ectópica; T=Tópica; NE= Não Encontrado; HT=Heterozigoto; HM=Homozigoto

## 9. REFERÊNCIAS

- 1 JUNQUEIRA, L. C. **Histologia Básica - Texto e Atlas**: Guanabara Koogan: 568 p. 2017.
- 2 PRINCE, K. L.; WALVOORD, E. C.; RHODES, S. J. The role of homeodomain transcription factors in heritable pituitary disease. **Nat Rev Endocrinol**, v. 7, n. 12, p. 727-37, Jul 26 2011. ISSN 1759-5029.
- 3 MELMED, S. et al. **Williams textbook of endocrinology E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2015. ISBN 0323341578.
- 4 FANG, Q. et al. Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. **Endocr Rev**, v. 37, n. 6, p. 636-675, Dec 2016. ISSN 0163-769X (Print)  
0163-769x.
- 5 BANDO, H. et al. Novel genes and variants associated with congenital pituitary hormone deficiency in the era of next-generation sequencing. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 13, p. 1008306, 2022. ISSN 1664-2392 (Print)  
1664-2392.
- 6 THOMAS, P. Q. et al. Sequence, Genomic Organization, and Expression of the Novel Homeobox Gene *Hesx1*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 8, p. 3869-3875, 1995-02-01 1995. ISSN 0021-9258. Acesso em: 2023-11-06T12:21:15.
- 7 WEBB, G. C. et al. *Hesx1*, a homeobox gene expressed by murine embryonic stem cells, maps to mouse chromosome 14, bands A3-B. **Genomics**, v. 18, n. 2, p. 464-6, Nov 1993. ISSN 0888-7543 (Print)  
0888-7543.
- 8 DATTANI, M. T. et al. Mutations in the homeobox gene *HESX1*/*Hesx1* associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. **Nature Genetics**, v. 19, n. 2, p. 125-133, 1998-06-01 1998. ISSN 1061-4036. Acesso em: 2023-01-18T16:45:42.
- 9 SAJEDI, E. et al. DNMT1 interacts with the developmental transcriptional repressor *HESX1*. **Biochim Biophys Acta**, v. 1783, n. 1, p. 131-43, Jan 2008. ISSN 0006-3002 (Print)  
0006-3002.

<sup>10</sup> FANG, Q. et al. *HESX1* mutations in patients with congenital hypopituitarism: variable phenotypes with the same genotype. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 85, n. 3, p. 408-14, Sep 2016. ISSN 0300-0664 (Print)

0300-0664.

<sup>11</sup> HUNT, R. C. et al. Exposing synonymous mutations. **Trends Genet**, v. 30, n. 7, p. 308-21, Jul 2014. ISSN 0168-9525 (Print)

0168-9525.

<sup>12</sup> SUPEK, F. The Code of Silence: Widespread Associations Between Synonymous Codon Biases and Gene Function. **J Mol Evol**, v. 82, n. 1, p. 65-73, Jan 2016. ISSN 0022-2844.

<sup>13</sup> COUTINHO, E.; BRANDÃO, C. M.; LEMOS, M. C. Combined Pituitary Hormone Deficiency Caused by a Synonymous *HESX1* Gene Mutation. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 104, n. 7, p. 2851-2854, Jul 1 2019. ISSN 0021-972x.

<sup>14</sup> THOMAS, P. Q. et al. Heterozygous *HESX1* mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. **Hum Mol Genet**, v. 10, n. 1, p. 39-45, Jan 1 2001. ISSN 0964-6906 (Print)

0964-6906.

<sup>15</sup> TAJIMA, T. et al. Sporadic heterozygous frameshift mutation of *HESX1* causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 1, p. 45-50, Jan 2003. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972x.

<sup>16</sup> COHEN, R. N. et al. Enhanced repression by *HESX1* as a cause of hypopituitarism and septo-optic dysplasia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n. 10, p. 4832-9, Oct 2003. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972x.

<sup>17</sup> CARVALHO, L. R. et al. A homozygous mutation in *HESX1* is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. **J Clin Invest**, v. 112, n. 8, p. 1192-201, Oct 2003. ISSN 0021-9738 (Print)

0021-9738.

<sup>18</sup> MCNAY, D. E. et al. *HESX1* mutations are an uncommon cause of septo-optic dysplasia and hypopituitarism. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 2, p. 691-7, Feb 2007. ISSN 0021-972X (Print)

0021-972x.

- 19 DURMAZ, B. et al. A novel homozygous *HESX1* mutation causes panhypopituitarism without midline defects and optic nerve anomalies. **J Pediatr Endocrinol Metab**, v. 24, n. 9-10, p. 779-82, 2011. ISSN 0334-018X (Print)

0334-018x.

- 20 VIVENZA, D. et al. A novel *HESX1* splice mutation causes isolated GH deficiency by interfering with mRNA processing. **Eur J Endocrinol**, v. 164, n. 5, p. 705-13, May 2011. ISSN 0804-4643.

- 21 AVBELJ STEFANIJA, M. et al. Novel Mutations in *HESX1* and *PROP1* Genes in Combined Pituitary Hormone Deficiency. **Horm Res Paediatr**, v. 84, n. 3, p. 153-8, 2015. ISSN 1663-2818.

- 22 TAKAGI, M. et al. A novel mutation in *HESX1* causes combined pituitary hormone deficiency without septo optic dysplasia phenotypes. **Endocr J**, v. 63, n. 4, p. 405-10, Apr 25 2016. ISSN 0918-8959.

- 23 POZZI, S.; TAN, W. H.; MARTINEZ-BARBERA, J. Characterization of a novel *HESX1* mutation in a pediatric case of septo-optic dysplasia. In: (Ed.). **Clin Case Rep**. England, v.5, 2017. p.463-470. ISBN 2050-0904 (Print)

2050-0904 (Electronic)

2050-0904 (Linking).

- 24 ALESI, V. et al. Homozygous *HESX1* and *COL1A1* Gene Variants in a Boy with Growth Hormone Deficiency and Early Onset Osteoporosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 750, 2021-01-13 2021. ISSN 1422-0067. Acesso em: 2023-11-18T20:34:19.

- 25 NAKAGUMA, M. et al. Genetic diagnosis of congenital hypopituitarism by a target gene panel: novel pathogenic variants in *GLI2*, *OTX2* and *GHRHR*. **Endocrine Connections**, v. 8, n. 5, p. 590-595, 2019-05-01 2019. ISSN 2049-3614. Acesso em: 2023-09-20T19:46:27.

- 26 FRANÇA, M. M. et al. Two rare loss-of-function variants in the *STAG3* gene leading to primary ovarian insufficiency. **Eur J Med Genet**, v. 62, n. 3, p. 186-189, Mar 2019. ISSN 1769-7212.

- 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**, v. 18, n. 4, p. 561-7, Aug 2015. ISSN 1386-341x.

- 28 DEPRISTO, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 491-498, 2011-05-01 2011. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3083463> >. Acesso em: 2023-09-27T15:15:07.
- 29 PRITCHARD, J. K.; PRZEWORSKI, M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. **Am J Hum Genet**, v. 69, n. 1, p. 1-14, Jul 2001. ISSN 0002-9297 (Print) 0002-9297.
- 30 LI, W.-H. **Molecular Evolution**. Sinauer Associates Inc, 1997. 487 ISBN 0878934634.
- 31 EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v. 8, n. 3, p. 186-94, Mar 1998. ISSN 1088-9051 (Print) 1088-9051.
- 32 REUMERS, J. et al. Optimized filtering reduces the error rate in detecting genomic variants by short-read sequencing. **Nat Biotechnol**, v. 30, n. 1, p. 61-8, Dec 18 2011. ISSN 1087-0156.
- 33 JAGANATHAN, K. et al. Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. **Cell**, v. 176, n. 3, p. 535-548.e24, 2019-01-01 2019. ISSN 0092-8674. Acesso em: 2023-11-06T13:22:12.
- 34 JIAN, X.; BOERWINKLE, E.; LIU, X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 22, p. 13534-13544, 2014-12-16 2014. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <http://europepmc.org/articles/pmc4267638?pdf=render> >. Acesso em: 2023-11-06T13:24:19.
- 35 BICKFORD, A. Looking Beyond the Exons: Splice Altering Variants. The Golden Helix Blog, 2015. Disponível em: < <https://www.goldenhelix.com/blog/looking-beyond-the-exons-splice-altering-variants/> >. Acesso em: 18/11/2023.
- 36 FERREIRA, N. G. B. P. **Investigação molecular por exoma em pacientes consanguíneos com hipopituitarismo congênito**. 2020. 95 (Dissertação de Mestrado). Endocrinologia Universidade de São Paulo - Faculdade de Medicina

- 37 REED, R. The organization of 3' splice-site sequences in mammalian introns. **Genes & Development**, v. 3, n. 12b, p. 2113-2123, 1989-12-01 1989. ISSN 0890-9369. Acesso em: 2023-09-29T02:16:44.
- 38 HASTINGS, M. L.; KRAINER, A. R. Pre-mRNA *splicing* in the new millennium. **Curr Opin Cell Biol**, v. 13, n. 3, p. 302-9, Jun 2001. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674.
- 39 DE RIENZO, F. et al. Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 83, n. 6, p. 849-60, Dec 2015. ISSN 0300-0664.
- 40 NEWBERN, K. et al. Identification of *HESX1* mutations in Kallmann syndrome. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 7, p. 1831-1837, 2013-06-01 2013. ISSN 0015-0282. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3888813> >. Acesso em: 2023-09-28T17:05:18.
- 41 BRICKMAN, J. M. et al. Molecular effects of novel mutations in *Hesx1/HESX1* associated with human pituitary disorders. **Development**, v. 128, n. 24, p. 5189-5199, 2001-12-15 2001. ISSN 1477-9129. Acesso em: 2023-11-21T12:36:35.