



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

“Análisis de exomas completos de pacientes pediátricos Argentinos con deficiencias congénitas hipofisarias”

Tesis presentada para optar al título de Licenciada en Ciencias Biológicas.
Catalina Perticarari

Directora de tesis: Dra. María Inés Pérez Millán

Consejero de estudios: Dr. Marcelo Martí

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética Molecular en Endocrinología (Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología Traslacional (iB3) - Depto FBMC - FCEN - UBA)

Buenos Aires, Febrero 2025

Dra. María Inés Pérez Millán

Perticarari Catalina

ÍNDICE

ÍNDICE.....	2
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	5
ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCIÓN.....	7
1. Glándula hipofisaria.....	7
2. Patologías asociadas al desarrollo de la glándula pituitaria.....	11
3. Secuenciación de exoma completo (WES - Whole Exome Sequencing).....	13
4. Clasificación de variantes.....	13
5. Relación genotipo-fenotipo.....	14
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
Objetivos específicos:.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
Análisis de secuencias de ADN genómico de pacientes con Hipopituitarismo Congénito.....	16
Reclutamiento de Pacientes y Composición de la Cohorte.....	16
Recolección de Muestras.....	17
Secuenciación y Análisis.....	17
Secuenciación por Sanger.....	21
Alineamientos múltiples de secuencias proteicas.....	22
Modelado Estructural.....	22
RESULTADOS.....	23
Descripción de la cohorte.....	23
Detalle de historia clínicas por paciente:.....	24
Secuenciación de exoma completo.....	28
Tabla de variantes relevantes halladas en la cohorte:.....	30
Descripción de variantes relevantes en genes conocidos relacionados con la enfermedad por paciente.....	31
Paciente 5.....	31
Paciente 4.....	32
Paciente 17.....	33
Paciente 7.....	36
Paciente 2.....	38
Paciente 9.....	41
Paciente 11.....	44
Análisis estructural in silico de la variante ARL6 p.(Gly169Alafs*6) c.506delG:.....	46
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

RESUMEN

El hipopituitarismo congénito (HC) es una enfermedad con una incidencia de 1 en 4000 nacidos vivos [1]. Forma parte de un espectro de anomalías hipofisarias, que abarcan de casos severos como la holoprosencefalía (HPE) a moderados como la deficiencia aislada de hormona de crecimiento (IGHD). Las causas genéticas de estas enfermedades se superponen ampliamente. Más de 60 genes han sido implicados en estos trastornos [2][3]. Entre ellos, se encuentran genes implicados principalmente en la señalización celular, las cílias, la matriz extracelular y la adhesión celular, y en la regulación transcripcional durante el desarrollo del hipotálamo y la glándula pituitaria. No obstante, la mayoría de los pacientes diagnosticados clínicamente (~80%) carecen de un diagnóstico molecular certero [4].

El presente proyecto de tesis tuvo como objetivo dilucidar el origen molecular de estas enfermedades en una cohorte de 20 pacientes pediátricos Argentinos, mediante secuenciación de exoma completo (WES) y posterior análisis bioinformáticos.

De los 20 casos analizados, se encontraron variantes relevantes en el 35% de los mismos (7/20). Se encontraron 4 variantes patogénicas (P) o posiblemente patogénicas (LP), y 3 variantes de significado incierto (VUS), las cuales requieren de mayor evidencia para definir su patogenicidad. Tres de estas variantes fueron encontradas en genes previamente asociados a la patología (*GLI2*, *PITX2*, *GLI3*) mientras que otras cuatro en genes nuevos o poco frecuentes (*COL1A1*, *ARL6*, *ARID2*, *WFS1*).

En resumen, en este trabajo hemos identificado variantes responsables del fenotipo parcial o total de 7 pacientes (de 20) con HC de Argentina, ampliando así la evidencia disponible al día de la fecha sobre los diversos genes causantes de la enfermedad.

SUMMARY

Congenital hypopituitarism (CH) is a disease with an incidence of 1 in 4,000 live births [1]. It is part of a spectrum of pituitary abnormalities, ranging from severe cases such as holoprosencephaly (HPE) to moderate cases like isolated growth hormone deficiency (IGHD). The genetic causes of these diseases largely overlap, with more than 60 genes implicated in these disorders [2][3]. Among them are genes primarily involved in cell signaling, cilia function, the extracellular matrix, cell adhesion, and transcriptional regulation during the development of the hypothalamus and pituitary gland. However, the majority of clinically diagnosed patients (~80%) still lack a molecular diagnosis [4].

The objective of this thesis project was to elucidate the molecular origin of these diseases in a cohort of 20 Argentine pediatric patients using whole-exome sequencing (WES) followed by bioinformatic analyses.

Among the 20 analyzed cases, relevant variants were identified in 35% of them (7/20). Four pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) variants were found, along with three variants of uncertain significance (VUS), which require further evidence to determine their pathogenicity. Some of these variants (3/7) were identified in genes previously associated with the disease (GLI2, PITX2, GLI3), while others (4/7) were found in novel or less frequent genes (COL1A1, ARL6, ARID2, WFS1).

In summary, this study identified variants responsible for the partial or complete phenotype in 7 out of 20 Argentine patients with CH, thereby expanding the current evidence on the diverse genetic causes of the disease.

ABREVIATURAS

ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics

ACTH: Corticotropina

AH: Adenohipófisis

B: Benigna

CPHD: Deficiencia combinada de hormonas hipofisaria

CNV: Variaciones en el número de copias

FSH: Hormona estimulante del folículo

GH: Hormona del crecimiento

HC: Hipopituitarismo congénito

HPE: Holoprosencefalia

IGHD: Deficiencia aislada de hormona de crecimiento

KO: knockout

LB: Probablemente benigna

LH: Hormona luteinizante

LP: Variante probablemente patogénica

MRI: Imagen por resonancia magnética

NeEc: Ectodermo Neural

NH: Neurohipófisis

NGS: Secuenciación de siguiente generación

OMIM: Mendelian Inheritance in Man

OrEc: Ectodermo Oral

OXT: Oxitocina

P: Variante patogénica

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PRL: Prolactina

PP: Hipófisis posterior

PSIS: Síndrome de interrupción del tallo

PPP: Proliferación de la bolsa de Rathke

RP: Bolsa de Rathke

SOD: Displasia septo óptica

TSH: tirotropina

VUS: Variante de significado incierto

WES: Secuenciación de exomas completos

Wt: wild-type (salvaje)

INTRODUCCIÓN

1. Glándula hipofisaria.

La glándula pituitaria, también conocida como hipófisis, es una glándula endocrina esencial que regula diversas funciones biológicas fundamentales. Se encuentra ubicada en la base del cerebro, en una estructura ósea llamada silla turca y está presente en todos los vertebrados (Figura 1 A). Dicha glándula desempeña un papel crucial en las primeras etapas del desarrollo, controlando procesos como el crecimiento, el inicio de la pubertad y el mantenimiento del metabolismo. Esto lo logra a través de la producción y secreción de varias hormonas, entre las que se incluyen la hormona del crecimiento (GH), la hormona adrenocorticotropa (ACTH), las hormonas gonadotrópicas (LH y FSH), la hormona estimulante de la tiroídes (TSH), la hormona estimulante de melanocitos (MSH), hormona antidiurética (ADH), oxitocina (OXT) y prolactina (PRL) (Figura 1B). Cualquier alteración en la función de la hipófisis puede tener efectos significativos sobre el desarrollo físico y metabólico [5].

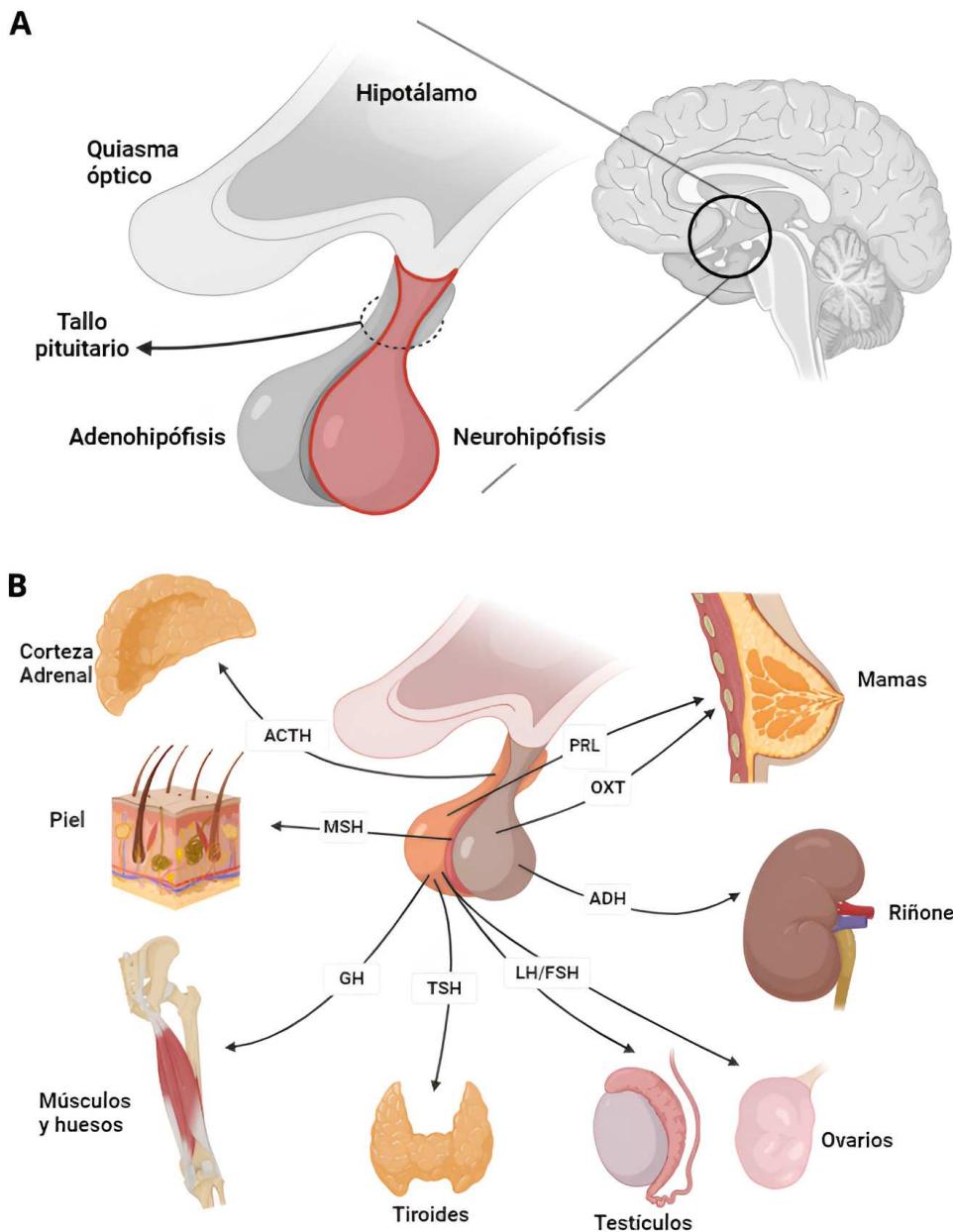


Figura 1: La Glándula Hipofisaria. A. Morfología y ubicación de la hipófisis en el cerebro humano. Ilustraciones realizadas a partir de trabajos sobre fisiología y anatomía de la glándula pituitaria [6][7]. B. Control de la Hipófisis sobre glándulas endocrinas del cuerpo. Abreviaciones: ACTH: Hormona adrenocorticotropa; MSH: Hormona estimulante de melanocitos; GH: Hormona de crecimiento; TSH: Hormona estimulante de la tiroides; LH: Hormona luteinizante; FSH: Hormona foliculoestimulante; ADH: Hormona antidiurética; OXT: Oxitocina; PRL: Prolactina.

El desarrollo de la glándula hipofisaria ocurre temprano durante la embriogénesis y este proceso ha sido y es estudiado en modelos murinos y se presume una cierta correlación en el desarrollo de la hipófisis humana. En embriones de vertebrados, los órganos sensoriales craneales (ojos, nariz, oídos) y los ganglios sensoriales son formados con la contribución de células derivadas de placodas del ectodermo craneal. Las placodas son regiones transitorias de epitelio columnar engrosadas que se forman en posiciones específicas en el ectodermo en el embrión en desarrollo. Entre las placodas olfatorias, señalando probablemente un origen filogenético en común, se desarrolla la placoda Adeno-hipofisaria impar, una evaginación del ectodermo oral [8], que aparece en ratones en el día embrionario (E) 7.5. Para el E9.0 la placoda se invagina y forma la rudimentaria bolsa de Rathke, la cual dará origen a los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis (Figura 2). Por otro lado, en la base del ectodermo neural ocurre una evaginación que dará origen a la hipófisis posterior. Entre los días E10.5 y E12.5, el epitelio de la bolsa de Rathke sigue proliferando y para el E12.5 se separa del ectodermo oral. Luego, las células progenitoras proliferan ventralmente y migran para ocupar la región que formará al lóbulo anterior [5,9]. Las primeras células secretoras de hormonas que empiezan a diferenciarse son los corticotropos, manifestándose por la expresión de *Pomc*, que también es expresado por los melanotropos del lóbulo intermedio. Luego los tirotropos son detectados por la expresión de *Tshb* en algunas células del lóbulo anterior, y para E15.5 la expresión de *Gh* y *Prl* marca la diferenciación de somatotropos y lactotropos respectivamente. Para E18.5 el número de somatotropos aumenta marcadamente, migrando hacia las regiones centrales y laterales del lóbulo anterior, mientras los lactotropos permanecen mayormente localizados en la zona medial, en la zona adyacente al lóbulo intermedio. Los gonadotropos son las últimas células en completar la diferenciación. La distribución de los distintos linajes celulares no es al azar, sino que se mantienen redes estructurales y funcionales que permiten la acción coordinada de las distintas células a estímulos específicos y contribuyen a la plasticidad de la glándula [4].

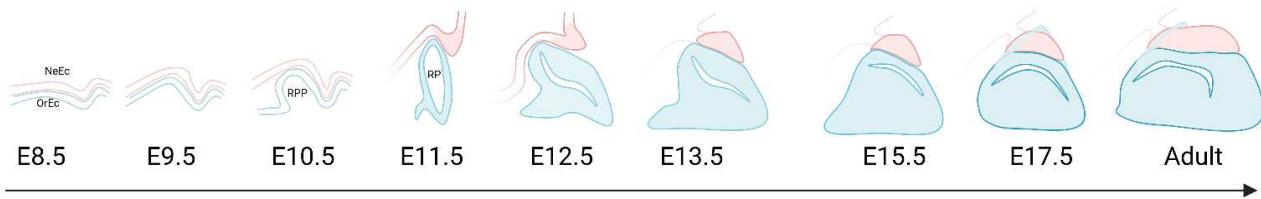


Figura 2: Etapas del desarrollo de la hipófisis en ratón. Luego de recibir moléculas señalizadoras del hipotálamo ventral, el ectodermo oral se invagina hacia el infundíbulo (e10.5) y subsecuentemente se forma una estructura provisoria llamada bolsa de Rathke (e11.5–12.5). Los lóbulos anteriores e intermedios de la hipófisis derivan de la misma, y el lóbulo posterior a partir del infundíbulo (e17.5). Durante este proceso, se expresan diversas moléculas señalizadoras y factores de transcripción de manera ordenada temporal y espacialmente para dar lugar a los distintos linajes celulares productores de hormonas. Ilustración adaptada de trabajos sobre desarrollo de la hipófisis en ratones [7],[10–16]. Abreviaciones: NeEc: Ectodermo Neural. OrEc: Ectodermo Oral. RPP: Proliferación de la bolsa de Rathke. RP: Bolsa de Rathke.

Este proceso de diferenciación de la hipófisis requiere de factores de transcripción y moléculas señalizadoras específicas (Figura 3). Sonic Hedgehog (Shh) se expresa en tejidos de la línea media, como la notocorda y la placa del suelo del tubo neural, y es esencial para la organización del embrión y para la especificación y proliferación de diversos tipos celulares. En este contexto, Shh activa una cascada de señalización a través de su receptor, Patched, que se expresa en la bolsa de Rathke. La señalización de Shh está mediada por tres factores de transcripción con dedos de zinc, Gli1, Gli2 y Gli3, que activan genes diana en el diencéfalo ventral y en la bolsa de Rathke en desarrollo [17]. Gli2, en particular, se expresa en el diencéfalo ventral, donde induce la expresión de Bmp4 y Fgf8, y también en el ectodermo oral, donde activa progenitores hipofisarios [18,19].

Otros factores de transcripción relevantes para el desarrollo hipofisario son los genes de la familia Pitx, en especial Pitx1 y Pitx2 (Figura 3). Estos genes regulan la expresión de hormonas y otros factores de transcripción en la adenohipófisis. Estudios genéticos han demostrado que *Pitx1* y *Pitx2* son necesarios para la proliferación celular, la supervivencia y la diferenciación, siendo sensibles a gradientes de concentración, con *Pitx2* jugando un rol más importante. Ambos genes cumplen funciones redundantes en la activación de la expresión de Lhx3 y en la regulación de otros genes esenciales[18].

Un amplio espectro de genes y vías moleculares se ponen en juego durante el desarrollo de la glándula hipofisaria. Es por esto que se requiere un enfoque integral y sistémico a la hora de abordar las patologías subyacentes al eje hipotalamo-hipofisario.

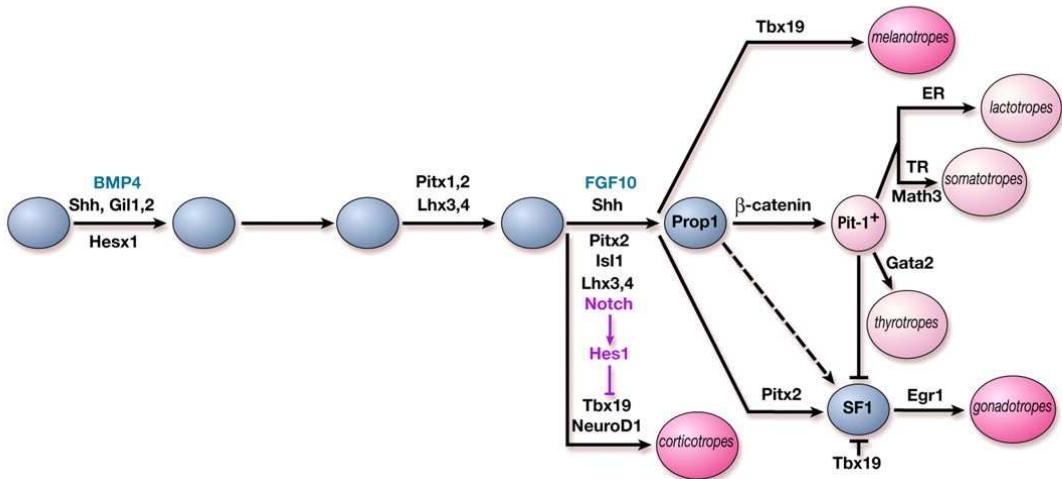


Figura 3: Moléculas señalizadoras y Factores de Transcripción que participan durante el desarrollo hipofisario. Imagen extraída de trabajo sobre el desarrollo fisiológico de la glándula pituitaria [18].

2. Patologías asociadas al desarrollo de la glándula pituitaria.

El hipopituitarismo congénito (HC) es una enfermedad que resulta del desarrollo anormal de la glándula hipofisaria causado en su mayoría por anomalías genéticas (Figura 4). Pacientes con HC generalmente presentan hipoplasia de la adenohipófisis, hipófisis posterior ectópica y tallo hipofisario ausente, delgado o interrumpido (PSIS) (Figura 4).

Bioquímicamente el HC se caracteriza por la deficiencia aislada de al menos una hormona hipofisaria, siendo las más frecuentes la hormona de crecimiento (GH). Cuando una sola hormona está afectada, el paciente es diagnosticado con deficiencia aislada, y cuando más de una hormona está afectada, el diagnóstico es de deficiencia múltiple hormonal o CPHD [5]. La incidencia de HC es de aproximadamente 1/4000 a 1/10000 nacidos vivos, y su prevalencia se estima en 300-455 casos por millón de habitantes [1].

Las manifestaciones clínicas varían ampliamente y pueden ir desde hipoglucemia grave o colestasis neonatal, hipotiroidismo y diabetes insípida, hasta síntomas como retraso en el crecimiento durante la infancia, retardo puberal o infertilidad [1].

El hipopituitarismo congénito se clasifica como sindrómico cuando están afectadas otras estructuras craneofaciales o sistemas neurosensoriales, y no sindrómico cuando solo la glándula pituitaria y sus órganos diana están comprometidos. En los pacientes sindrómicos las deficiencias

hipofisarias suelen presentarse junto con anomalías en estructuras que comparten un origen embrionario común con la hipófisis, como los ojos y el cerebro anterior. Por ejemplo mutaciones en *HESX1*, pueden causar displasia septo óptica (SOD), CPHD o IGHD [20], mutaciones en *OTX2* pueden causar anomalías craneofaciales, incluida anoftalmia con o sin IGHD o CPHD [21] y mutaciones en *GLI2* pueden causar holoprosencefalía, CPHD, o hipogonadismo hipogonadotrópico [22]. Se observa así una escala de fenotipos diferenciados en severidad, de los más leves como IGHD hasta los más graves como holoprosencefalía, en la que mutaciones en el mismo gen puede resultar en distintos fenotipos y más aún, la misma mutación en distintos pacientes puede tener expresividad variable y penetrancia incompleta.

El diagnóstico molecular, es decir, identificar a la o las variantes patogénicas que se asocian al fenotipo clínico del paciente, es crítico para predecir la progresión de la enfermedad y el riesgo de recurrencia familiar. El hipopituitarismo no detectado a tiempo, puede resultar en muerte infantil, mientras que casos de hipopituitarismo progresivos, pueden derivar en peligrosos riesgos a la salud asociados a hipoglucemia e insuficiencia renal [23][24].

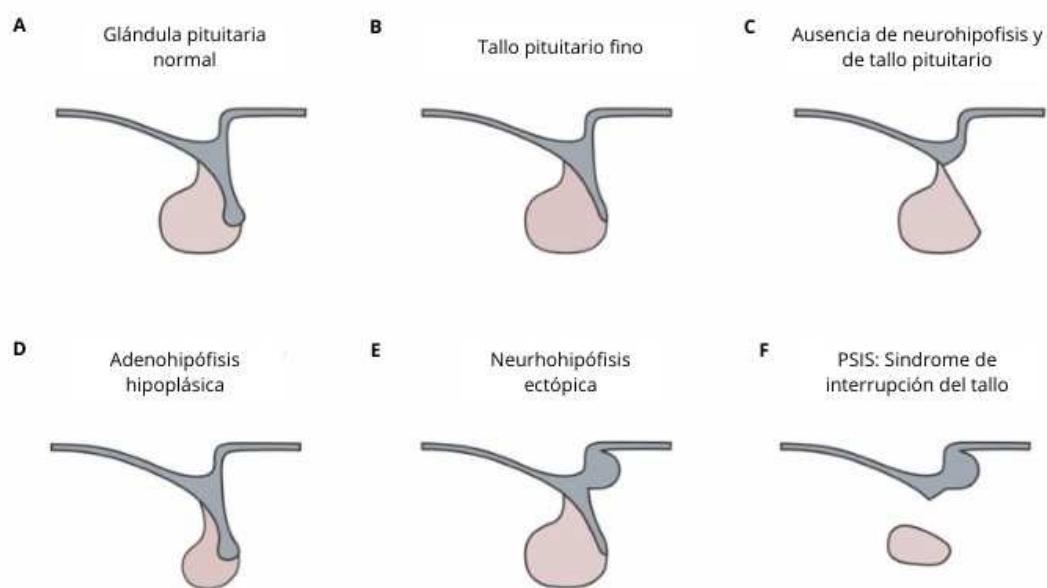


Figura 4: Apariencia lateral de fenotipos morfológicos asociados a un mal desarrollo de la glándula pituitaria. Imagen extraída de artículo sobre la etiología del Hipopituitarismo congénito [25].

3. Secuenciación de exoma completo (WES - Whole Exome Sequencing)

El exoma completo (WES) es una técnica que se centra en la secuenciación de las regiones codificantes del genoma (aproximadamente el 1-2% del ADN total), reduciendo así la cantidad de información generada. Aunque representa solo una pequeña fracción del genoma, el exoma alberga la mayoría de las variantes genéticas asociadas a enfermedades. Este enfoque es particularmente útil en el diagnóstico de enfermedades raras, ya que permite identificar mutaciones que afectan directamente a la función proteica [26][27].

El ADN genómico es fragmentado mecánicamente y se utilizan sondas complementarias a las regiones exónicas de todos los genes codificantes unidas a un soporte sólido, para hibridar y enriquecer la muestra en fragmentos de ADN derivados exclusivamente de los exones (y sus regiones flanqueantes). Esta muestra enriquecida luego es secuenciada por NGS [28]. Se pueden identificar principalmente variantes de nucleótido único o SNVs en regiones codificantes, y algunas delecciones o inserciones (CNVs). Las variantes genéticas puntuales o pequeñas afectan secuencias de nucleótidos dentro de genes o regiones regulatorias, mientras que las variantes cromosómicas pueden alterar segmentos más grandes o cromosomas enteros, afectando la disposición y estructura genética [27].

El estudio de las enfermedades genéticas ha avanzado notablemente en las últimas décadas, particularmente en la comprensión de cómo las mutaciones a nivel molecular contribuyen a la patogénesis. Las herramientas bioinformáticas permiten predecir el impacto funcional de las variantes genéticas, analizando aspectos como la conservación evolutiva, su localización en regiones funcionales y los cambios en la estructura proteica. Estos análisis se complementan con estudios *in vitro* e *in vivo*, que validan los efectos observados a nivel molecular, además de la información clínica y de segregación [29].

4. Clasificación de variantes

La interpretación precisa de variantes genéticas es esencial para el diagnóstico clínico. Las reglas establecidas por organizaciones como el Colegio Americano de Genética Médica y Genómica (ACMG) permiten clasificar variantes según su patogenicidad en cinco categorías: patogénicas (P), probablemente patogénicas (LP), variantes de significado incierto (VUS), probablemente benignas (LB) y benignas (B) [30].

La asignación de patogenicidad requiere un análisis multidimensional que incluye la frecuencia poblacional de la variante mediante el uso de bases de datos de frecuencias poblacionales (gnomAD [31]-[32], 1000 Genomas [33]-[34]), su efecto molecular predicho,

estudios funcionales, datos clínicos y de segregación. Los avances en tecnología de secuenciación y la proliferación de bases de datos como OMIM [35] han permitido que las variantes genéticas sean analizadas en un contexto más amplio, facilitando la identificación de genes causales y su relación con el fenotipo.

5. Relación genotipo-fenotipo

Uno de los grandes retos en la genómica clínica es establecer una correlación clara entre las variantes genéticas y el fenotipo observado en los pacientes. Esta relación puede ser complicada por la penetrancia incompleta de algunas variantes o genes y la expresividad variable entre individuos, factores que dependen en gran medida del contexto genético global así como del ambiente en el que cada individuo está inmerso [36].

El análisis de variantes genéticas es crucial para la medicina de precisión. La capacidad de identificar y caracterizar variantes patogénicas no solo permite un diagnóstico molecular más preciso, sino que también proporciona información esencial para el desarrollo de terapias personalizadas y la toma de decisiones informadas en la planificación familiar [37]. A medida que avanzan las tecnologías de secuenciación y las bases de datos clínicas se expanden, el diagnóstico genético aumenta su precisión, abriendo nuevas oportunidades para el tratamiento y manejo de enfermedades genéticas [38].

En este trabajo de tesis hemos secuenciado exomas completos de 20 pacientes con HC. Hemos procesado y analizado bioinformáticamente estos resultados, obteniendo variantes genéticas relevantes a la enfermedad en un 35% de los casos. A continuación, se describen la hipótesis y los objetivos del trabajo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis general del presente trabajo plantea que mediante el análisis bioinformático de secuenciación de exoma completo (WES) y posterior análisis de las variantes encontradas en genes candidatos es posible arribar a un diagnóstico molecular de pacientes con hipopituitarismo congénito (HC) de manera más efectiva que con los paneles génicos reducidos que se usan habitualmente. Esta estrategia permitiría identificar modificaciones genéticas para explicar las manifestaciones clínicas de esta patología, contribuyendo al diagnóstico y a futuro en el tratamiento personalizado de los pacientes.

Objetivos específicos:

1. **Desarrollo y aplicación de una estrategia de análisis bioinformático para la realización de diagnóstico molecular de HC a partir de la secuenciación de exomas humanos.** Este objetivo se centró en la creación y aplicación de un pipeline bioinformático capaz de procesar y analizar variantes genéticas a partir de VCFs resultantes de la secuenciación por WES. El pipeline incluyó herramientas para la identificación de variantes relevantes, filtrado de datos y anotación.
2. **Validación experimental de las variantes de interés encontradas en los exomas.** Para confirmar las variantes de interés detectadas, se realizó una validación experimental mediante la amplificación de las regiones genómicas de interés usando PCR a punto final. Los productos amplificados fueron secuenciados por el método Sanger, lo que permitió verificar la precisión de las variantes identificadas por WES. Además en los casos que se contaba con ADN de la madre y/o de el padre, se procedió de la misma forma, con el objetivo de obtener información del posible origen de la variante, ya sea *de novo* o heredada de algún parental.
3. **Desarrollo y validación de un método bioinformático para la predicción y comprensión del efecto patogénico de variantes humanas basada en el análisis de la estructura proteica.** En este objetivo se desarrolló una estrategia de análisis que permitió determinar la existencia de cristales de la estructura proteica para luego realizar un modelado de una variante utilizando AlphaFold 2. Finalmente, se evaluó el impacto de la variante en la estructura proteica visualizando la misma en VMD. Esta etapa tiene como fin sumar evidencia para la variante, lo que mejoraría la comprensión de su rol en la enfermedad

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de secuencias de ADN genómico de pacientes con Hipopituitarismo Congénito.

Reclutamiento de Pacientes y Composición de la Cohorte

Los pacientes fueron reclutados de los siguientes hospitales en Argentina (CABA, Buenos Aires, Córdoba, Mendoza, Jujuy y Salta): “Hospital de Niños Dr. Ricardo Gutiérrez,” “Hospital Prof. Dr. Juan P. Garrahan,” “Hospital de Niños de Córdoba,” “Hospital Militar Central Cirujano Mayor Dr. Cosme Argerich,” “Hospital de Niños Sor María Ludovica,” “Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas,” “Hospital General de Niños Pedro de Elizalde,” y “Hospital Pediátrico Dr. Humberto Notti.” La cohorte consistió de 20 casos: 19 esporádicos y uno familiar.

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el comité ético de cada hospital. Los formularios de consentimiento informado fueron firmados por los padres/tutores de los niños con HC. Se incluyeron para el análisis de secuenciación de ADN genómico a niños y niñas pertenecientes a familias no emparentadas, diagnosticados con insuficiencia hipofisaria congénita múltiple, de acuerdo a sus manifestaciones clínicas, determinaciones bioquímicas y estudios por imágenes.

Los pacientes fueron diagnosticados con deficiencias hormonales según los criterios previamente descritos [3]. Brevemente, los pacientes fueron diagnosticados con deficiencia de la hormona de crecimiento (GHD) basándose en una baja velocidad de crecimiento y un pico de GH inferior a 10 ng/mL tras pruebas de estimulación farmacológica con arginina/clonidina. La deficiencia de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) se diagnosticó en individuos con tiroxina libre < 1,0 ng/dL y niveles bajos o normales de TSH, TSH ≤ 10 mU/L en pacientes menores de 2 meses y ≤ 6,5 mU/L en niños mayores. La deficiencia de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) se diagnosticó en función de un cortisol sérico basal bajo: < 30,3 nmol/L en pacientes menores de 2 meses, < 58 nmol/L en pacientes entre 2 y 6 meses, y < 165 nmol/L en niños mayores. La deficiencia de prolactina se consideró en individuos con niveles séricos < percentil 2,5 para sexo y edad. La deficiencia de gonadotropinas se diagnosticó en niños de entre 15 días y 6 meses cuando la hormona luteinizante (LH) sérica y la testosterona estaban < percentil 5, < 0,8 UI/L y < 30 ng/dL, respectivamente. En niñas de entre 15 días y 2 años, se asumió deficiencia de gonadotropinas cuando los niveles de hormona foliculoestimulante (FSH)

eran < 1,0 UI/L. En pacientes mayores, la deficiencia de gonadotropinas se definió como un desarrollo puberal retrasado o ausente con testosterona sérica baja (< 3,47 nmol/L) asociada a niveles inapropiadamente bajos o normales de LH y FSH. La deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (CPHD) se definió como la presencia de deficiencias hormonales que afectan al menos a dos tipos de células productoras de hormonas en la hipófisis anterior.

A todos los pacientes se les realizó una resonancia magnética (MRI) del cerebro para evaluar el tamaño de la adenohipófisis, morfología del tallo hipotálamo-hipofisario y características de la neurohipófisis, buscando signos de alteraciones en otras estructuras del sistema nervioso central, exceptuando un paciente (paciente 3 reportado en Tabla 3) que no pudo someterse al estudio debido a su fallecimiento.

Recolección de Muestras

Se extrajo ADN genómico de células sanguíneas periféricas utilizando el kit Puregene Blood (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el fabricante. El ADN se cuantificó utilizando un Nanodrop 2000. La relación de absorbancia 260/280 nm se utilizó para evaluar la pureza del ADN. Se utilizó una relación entre 1,8 y 2,1 como criterio de inclusión para el procesamiento posterior de las muestras de ADN.

Secuenciación y Análisis

La secuenciación del exoma completo (WES) de los pacientes se realizó en el marco del subsidio de “Redes Federales de Alto Impacto”. La captura del exoma se realizó utilizando sondas diseñadas y producidas por Celemics Inc. (Corea), y la secuenciación se llevó a cabo en NovaSeq X Plus (2x150 ciclos).

Las lecturas en bruto se alinearon con GRCh38 utilizando el Barrow Wheelers Aligner (BWA) [39] y se procesaron de acuerdo con las recomendaciones del Genome Analysis Toolkit (GATK) [40]. Las lecturas duplicadas se descartaron utilizando PICARD, y la haplotipificación, el genotipado y el llamado de variantes se realizaron utilizando Haplotype Caller. Los archivos VCF fueron luego anotados utilizando dbSNP, GnomAD, ClinVar, Polyphen, SIFT, Mutation Taster, SpliceAI y ANNOVAR [41–46]. Los archivos VCF anotados se cargaron en la plataforma de Bitgenia [47]. Las variantes genéticas se examinaron utilizando varios paneles de genes (Tabla 1) creados por nuestro laboratorio a partir de investigaciones científicas previas y de bibliografía [3,48–50]. Además se realizó filtrado por frecuencia (< 0,01 en GnomAD), por impacto potencial de la variante, en donde se analizaron variante de impacto moderado a alto. Por último se incluyó el

filtrado por evidencia ACMG de variantes clasificadas como P, LP o VUS [30]. Los casos también se examinaron de manera agnóstica (i.e. sin filtrado por panel genético) para variantes altamente disruptivas (codones de terminación prematura, cambios en la pauta de lectura y variantes de empalme) que estaban ausentes en la población sana [31]. Las variantes sólo se informaron si la cigosidad era la esperada para la manifestación clínica de la enfermedad y si el solapamiento del fenotipo con la historia clínica era acertado, lo cual fue previamente discutido entre pares y con los respectivos médicos. A su vez se contemplaron reportes bibliográficos previos y datos reportados en bases de datos como ClinVar [51]. Finalmente en los casos en donde resultaba posible se realizó un análisis de conservación de la zona próxima a la variante en plataformas como Metadome y Decipher [52][53](Figura 5).

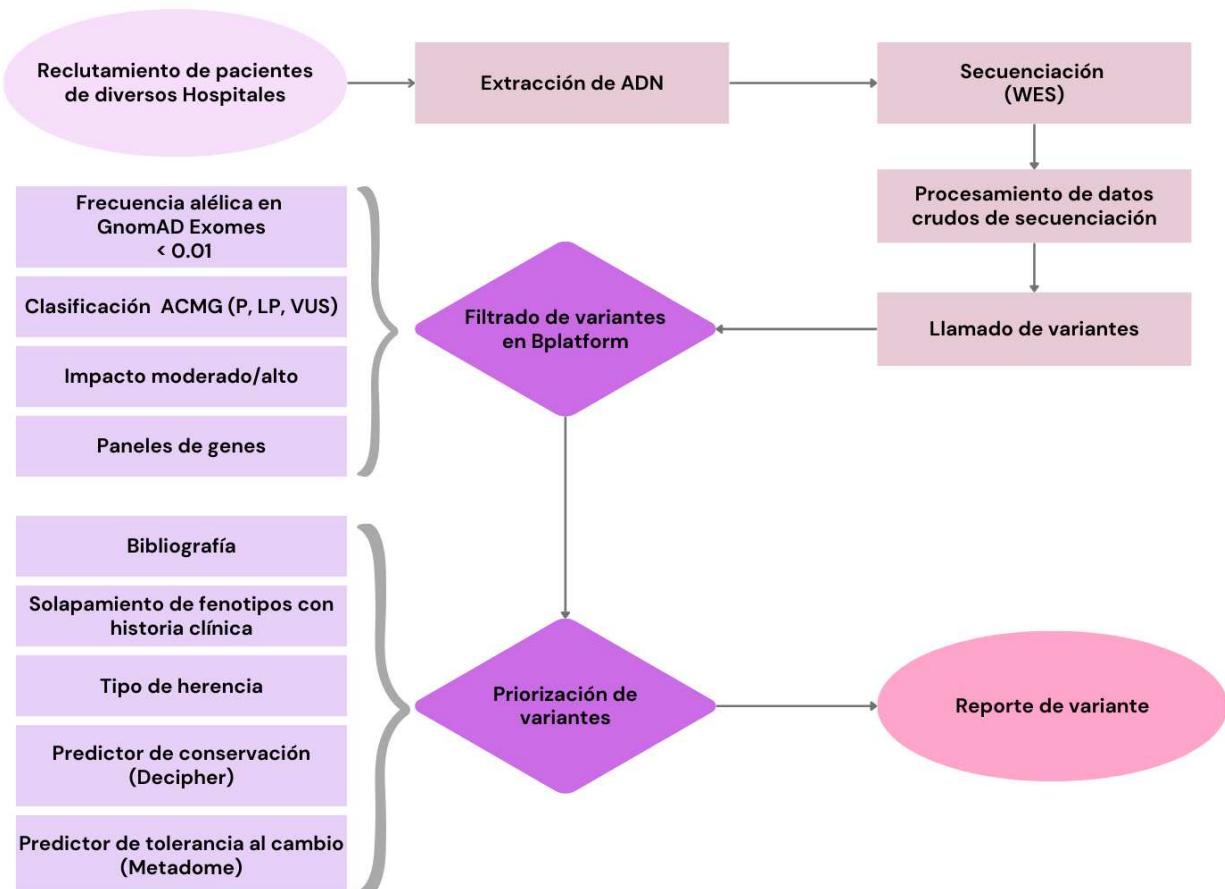


Figura 5: Flujo de trabajo realizado para el procesamiento de los datos de secuenciación, filtrado y priorización de variantes.

Tabla de paneles utilizados para el filtrado de variantes:

Cuerpo calloso
<i>POMT2, GPSM2, FH, CTBP1, POMT1, HCCS, PDHB, C12ORF57, MED12, SLC12A6, SPG11, DIS3L2, FTKN, IGBP1, EOMES, ZNF462, FKRP, PDHA1, CRPPA, NDE1, CASK, L1CAM, POMGNT1, KAT6B, DCX, TCF4, FGF.</i>
Paladar hendido
<i>RPL5, FOXE1, KDM1A, EIF4A3, CHD7, LRRC32, ACTB, PHF8, EFTUD2, PPP3CA, SUMO1, OFC14, PIEZO2, HOXA2, SOX9, TP63, DDX59, MSX2, ESCO2, MID1, TGFBR1, COL2A1, SPECC1L, IRF6, YAP1, AMER1, KMT2D, DLX4, SATB2, COL11A1, PORCN, TBX22, RAD21, ALX3, GPC3, FLNA, MSX1, RBM10, TFAP2A, TBX1, RIC1, TGDS, STAC3, CPLANE1, GRHL3, GDF6, MEIS2, BMP4, MBTPS2, FGFR2, NECTIN1.</i>
Ciliopatías
<i>TRAF3IP1, IFT172, CEP120, CEP164, KIF14, TXNDC15, CCDC28B, TECT1, TCTN3, TCTN2, CSPP1, SUFU, TMEM107, TCTN1, NEK1, BBS9, BBS7, IFT57, CC2D2A, CEP290, BBS5, CEP55, BBS4, IQCB1, MKKS, EXOC8, CFAP418, ARMC9, RPGRIP1L, KIF7, LZTFL1, TOPORS, BBS10, SCNM1, TMEM138, BBS12, TMEM216, TMEM218, WDPCP, SDCCAG8, CEP104, KATNIP, GUCY2D, FAM149B1, ARL6, ARL3, KIAA0556, IFT74, RAI1, PDPR, ARL13B, TMEM67, TTC21B, INPP5E, NPHP1, KIAA0753, PDE6D, NPHP3, TOGARAM1, NPHP4, ZNF423, PIBF1, BBS2, BBS1, WDR19, BBIP1, TMEM231, AHI1, TTC8, TMEM237, KIAA0586, ALMS1, MKS1, HYLS1, IFT27, B9D1, B9D2, CEP41, PTHB1, TRIM.</i>
HPE-Encefalocele-Hidrocefalia
<i>TTC26, C2CD3, SMC3, GLI3, GLI2, SHH, TUBA1A, ZIC2, ZIC3, TUBB3, SIX3, DAG1, ZNF526, CASP2, DENND5A, CDON, TGIF1, EMX2, PPP1R12A, FBXW11, TUBB, NOG, NOSIP, AMPD2, IFT80, TUBG1, SMC1A, RUNX2, TUBB2B, TUBB2A, WDR81, HPE1, INTU, ARX, KATNB1, WDR62, TTBK2, PPP2CA, PPP2CB, NUAK2, B3GALNT2, STIL, PRRX1, GPKOW, PTCH1, HUWE1, FUZ, TUBB4A, ICK, VANGL2, STAG2, CNOT1, CCDC88C, FAT1, PLCH1, TDGF1, RAB3GAP1.</i>
Síndromes con afectación óptica
<i>TENM3, RAX, HMGB3, HDAC6, SOX2, SMCHD1, SIX6, ARD1A, OTX2, OTX1, NDP, STRA6, PITX3, PRRX1, NAA10, NR2F1, PAX6, MITF, VAX1, POMGNT2, PAX2, ALDH1A3, RBP4, FRAS1, SMOC1, MAB21L2, PXDN, RARB, BCOR, PRR12, FREM1, FREM2, VSX2, HM.</i>
CPHD

HHIP, IRS4, HNRNPU, XYLT1, ZBTB20, RBPJ, HID1, SOX1, FGF8, KAT5, CDH2, CDH1, TBC1D32, AKT3, PROK2, PITX2, PITX1, RNF111, GTF2I, GHSR, NKX2-6, FOXH1, WNT5A, SPINK5, AIP, DIO2, HNF1A, SDHA, ISL1, TRHR, DISP1, SMO, GPR161, KCNQ1, MADD, BTK, MAML3, IGFALS, OBSL1, DSC2, CUL7, MAGEL2, BLM, IGSF1, CLCNKB, UBR1, RNPC3, GATA2, GHRHR, PRKAR2B, STK36, PRKAR2A, ZRSR2, EGR4, WFS1, NONO, PTCH2, SMARCA5, HMGA2, NR0B1, BRAF, FUZ, BMP7, PBX1, AICDA, THAP11, NFKB2, NFKBIA, GH1, IGSF10, BMP2, CDK6, EIF2S3, LHX3, DMXL2, FGF18, GNAS, DCHS1, LHX4, SIM1, GPR101, NODAL, FGF10, FGFR1, ACVRL1, ROBO2, PCSK1, RBM28, NRP2, CDKN1B, THRB, SRA1, SIX1, PIK3CD, TRH, GLI1, GLI4, SPR, SIX2, GNRHR, ACP5, ANOP1, GABPA, TSHB, TGIF1, POU1F1, PROP1, NBPF9, CAD, NBPF10, FOXL2, NCOR2, NR5A1, ZEB2, MIR17HG, GAS1, SEMA3A, LRP2, DLL1, NKD2, CDC42, PROKR2, ZSWIM6, IARS2, TBL1X, SLIT2, MUC4, DUOX2, MAPK3, ARNT2, TCF7L2, TCF7L1, B3GAT3, LAMB2, STAT3, ELP4, TBX19, WDR11, POMC, SMOC2, MARCKS, POLR3A, NFIB, GHRH, CTNNB1, PNPLA6, INSM1, FOXA2, CCDC1.

Baja estatura

SMARCAL1, SMARCB1, POP1, RPS6KA3, SCKL3, DPF2, RTTN, SOX9, PRKACA, PRKACB, CDK5RAP2, DYNC2H1, CSNK2A1, TALDO1, SOX11, WDR73, BCS1L, HSPG2, RUNX2, PISD, PRKAR1A, IFT81, DNA2, TP53, SRCAP, CDT1, CREBBP, FZD2, JAG1, XRCC4, INSR, PMM2, FN1, IGF2, AMMECR1, LARP7, PYCR1, CDC6, IGF1, GDF5, SMARCA2, SMARCA4, COL1A1, EXT1, WDR60, COL9A1, COL9A3, COL9A2, ATR, PTH1R, LFNG, MECP2, NIPBL, COL10A1, HRAS, PRMT7, RMI1, IFT140, TOP3A, TET2, RRAS2, WDR34, WDR35, MRAS, CYP21A2, CEP63, NBAS, NFIX, IDUA, PRIM1, COL11A2, DYNLT2B, SGMS2, FGD1, TYMP, RECQL4, NRAS, SLX4, CHRNG, LMNA, SHOX, SHOC2, PCNT.

Hipogonadismo Hipogonadotrófico

WASHC4, KLB, OTUD4, PCSK1, CHD7, HS6ST1, STS, FGF8, SIN3A, HJV, TUBB3, MYO18A, TMEM108, GNRHR, LEPR, PROK2, FEZF1, MAP3K4, GHSR, DCC, FSHB, TCF12, TACR3, SOX11, IL17RD, SOX10, DUSP6, MC3R, ANOS1, NSMF, TLN1, SEMA7A, CTDP1, SEMA3A, LHB, NDNF, SEMA3E, GATA3, NTN1, DCAF17, PROKR2, RNF216, FLRT3, KISS1R, PLXNA1, TAC3, CCDC141, SPRY4, INHBB, NR0B1, TRERF1, TBX3, STXBP5L, WDR11, KISS1, FGF17, IGSF10, POLR3A, TAOK3, POLR3B, AXL, DMXL2, CPE, GNRH1, STUB1, PNPLA6, POLR3K, LGR4, RAB3GAP1, CDK16.

Malformaciones Hipofisarias (DMDD)

SETD5, GLDC, KDM8, SMG9, ADAMTS3, SH3PXD2A, KMT5B, ARID2, JARID2, CC2D2A, PSPH, BRD2, NSUN2, SSR2, USP3, TRAF2, ATP11A, RPGRIP1L, ARID1B, PRKAB1, TENT5C, KIFBP, TRAF6, EZR, RALA, NXN, MBTD1, HIRA, NPAT, DHX35, DPH2, KAT14, SPTBN1, TCF7L2, CHTOP, MARCH5,

PRRC2B, GRIN1, ASXL1, EHD1, MAD2L2, VANGL1, ATG16L1, CNOT1, PSAT1, MKS1, RUNDC1, PLXNB2, ALDH18A1, B9D2, MOR.

Pubertad Precoz

OTUD4, HFE, HS6ST1, SOX2, SOX3, STK11, FGF8, TUBB3, HNRPR, LEPR, PROK2, LHCGR, SUPT16H, CDKL5, GLCE, SOX10, TBC1D20, ANOS1, NSMF, RD3, GRIA1, SEMA7A, NOTCH1, H6PD, ARL6, LHB, KMT2B, CYP19A1, RNF216, FLRT3, HESX1, DHX37, NDN, TAC3, BBS2, BBS1, NR0B1, TRAPPC9, FGF17, CYP11B1, DMXL2, PDE3A, GNAS, NF1, CPE, GNRH1, MKRN3, FGFR1, RBM28, NRP2, DDX3X, CHD7, SRA1, TSPAN11, GLI3, IRF2BPL, GNRHR, BBS9, BBS7, BBS5, FEZF1, BBS4, H3-3B, MKKS, PROP1, FSHB, TACR3, IL17RD, MASTL, DUSP6, GAP43, BBS10, CCKBR, BBS12, CYP21A2, SEMA3A, PALM2, CXCR4, SEMA3E, HDAC8, AMN1, PURA, DCAF17, PROKR2, RAB23, KISS1R, SPEN, SPRY4, PLEKHA5, DLK1, WDR11, KISS1, TTC8, POLR3A, POLR3B, AXL, LEP, RAB18, RAB3GAP2, STUB1, PNPLA6, RAB3GA.

Tabla 1: Paneles utilizados para el filtrado de variantes generados a partir de revisión bibliográfica y de trabajos previos del laboratorio [3,48–50].

Secuenciación por Sanger

Los primers (Tabla 2) se diseñaron utilizando Primer-BLAST [54] y fueron pedidos a IDT (Integrated DNA Technologies). Los productos de PCR se amplificaron en reacciones de 25 µL, utilizando la ADN polimerasa PFU (Inbio Highway, #K1100). Los productos de PCR se purificaron en gel utilizando Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo, cat#D4007) y se enviaron para secuenciación directa.

Gen	Orientación	Reverse	Secuenciado con
<i>COL1A1</i>	Forward Reverse	TCATTGTTCCAGGGCAGTCC TGGTCCCAACAGGCATGAAT	RV
<i>ARL6</i>	Forward Reverse	AGACAATGGAAGCACCCCTGTT TGGAACAAAGGTATTGGATACTTACT	RV
<i>WFS1</i>	Forward Reverse	TGTAGAGACCGTGCCCTAGT CCTACAAAGGGCCTACGCTG	FW
<i>ARID2</i>	Forward Reverse	GGACTTCTGGCAACCAGGTA AGGGCAGGAGAATGGGATACT	RV

Tabla 2: Primers utilizados para secuenciación por Sanger

Alineamientos múltiples de secuencias proteicas

Se realizaron alineamientos múltiples para las variantes correspondientes, descargando las secuencias proteicas desde el Protein Data Bank (PDB) [55]. Los alineamientos se llevaron a cabo utilizando Clustal Omega [56]. Posteriormente, se seleccionó la región de interés del alineamiento múltiple y se visualizó mediante el programa Jalview [57]. Para la generación de las figuras del alineamiento, se utilizó la coloración Clustal con el objetivo de facilitar la identificación de los diferentes aminoácidos.

Las especies seleccionadas para el alineamiento fueron *Homo sapiens* (humano), *Mus musculus* (ratón), *Pan troglodytes* (chimpancé), *Danio rerio* (pez cebra) y *Xenopus laevis* (rana africana).

Modelado Estructural

La estructura de ARL6 se obtuvo del Protein Data Bank [55]. Se seleccionó la estructura cristalina con ID PDB 2H57 para modelar la variante p.Gly169Ala, identificada en el análisis de secuenciación. La estructura cristalina modificada se generó alterando manualmente la secuencia proteica tipo silvestre (wild type). Para el modelado in silico, se utilizó la herramienta AlphaFold a través de la plataforma Galaxy [58], que permite el modelado de proteínas a partir de archivos en formato FASTA.

RESULTADOS

Descripción de la cohorte

Las manifestaciones clínicas del hipopituitarismo congénito son muy diversas (Tabla 3). Con la finalidad de sintetizar la información de las historias clínicas de los pacientes, analizados en este trabajo, se categorizaron los fenotipos observados dentro de 7 grupos:

- Anomalías en el sistema nervioso central (SNC); el cual incluye manifestaciones conductuales como autismo, conductas agresivas, retraso en el habla y retraso neuromadurativo. También fue considerado como afectado si el paciente presentaba episodios convulsivos y/o malformaciones estructurales del sistema nervioso central.
- Malformaciones craneofaciales, las cuales contemplan dismorfias faciales (frente abombada, puente nasal ancho, hipoplasia del tercio medio de la cara, entre otras).
- Dismorfias en manos/pies y/o orejas
- Anomalías en el sistema ocular; el cual incluye afecciones en los ojos como cataratas, displasias iridocorneales, estrabismo, displasia septo óptica (SOD) o displasia del nervio óptico.
- Anomalías en el sistema óseo; el cual contempla patologías asociadas al desarrollo de la estructura ósea como la osteogénesis imperfecta cuyos fenotipos más frecuentes son: múltiples fracturas, dolores óseos, baja estatura y escleróticas azules.
- Anomalías en el sistema reproductivo; donde se incluyeron diagnósticos de pubertad tardía, micropene, macroorquidismo, oligomenorrea, criotorquidía y hipogonadismo hipogonadotrófico.
- Anomalías del sistema auditivo; el cual incluye hipoacusia.

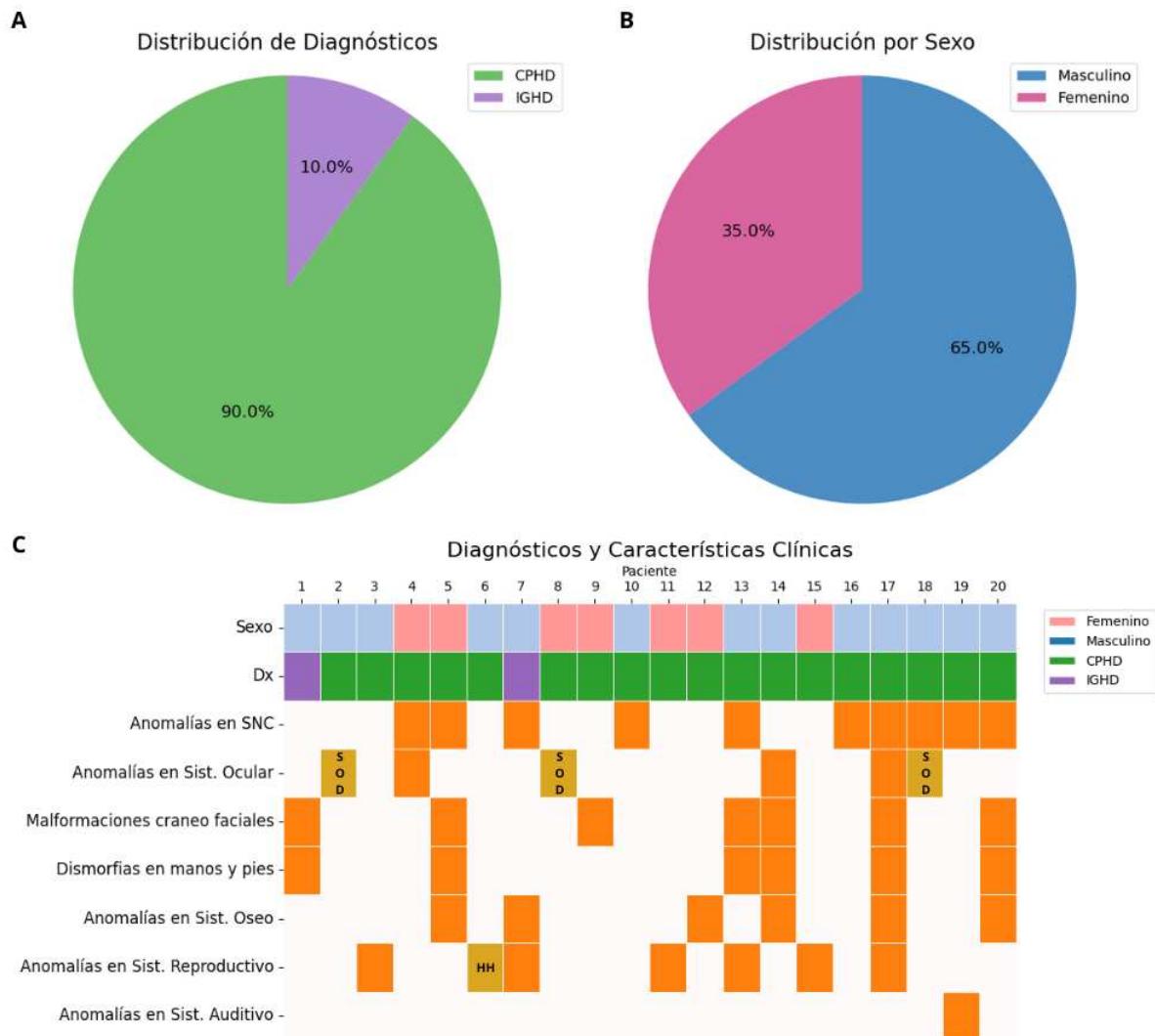


Figura 6: Descripción visual de la cohorte. A. Distribución de diagnóstico de pacientes de la cohorte. B. Distribución de sexos de la cohorte. C. Resumen visual de fenotipos observados en pacientes. Realizado a partir de historias clínicas de pacientes y reuniones con sus respectivos médicos.

Detalle de historia clínicas por paciente:

Paciente	Sexo	Diagnóstico	MRI	HC	Tipo de caso
1	M	IGHD	AH hipoplásica NH e hipotálamo normal Silla turca parcialmente vacía	Intelectualmente sano. Orejas en asa. Leve depresión del macizo medio facial.	Esporádico
2	M	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica	Ciego. SOD Obesidad hipotalámica y diabetes insípida.	Esporádico
3	M	CPHD	-	Micropene. Mala oxigenación Falleció	Esporádico
4	F	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica Tallo interrumpido	Displasia iridocorneal. Nistagmus, síndrome convulsivo. Afectación ocular (sme iridocorneal endotelial= afectación de iris y córnea, coloboma bilateral de iris)	Esporádico
5	F	CPHD	AH hipoplásica	Sospecha de Pallister Hall (GLI3). Convulsiones. Hipertelorismo ocular. Hendiduras palpebrales anchas, nariz con narinas antevertidas. Manos y pie izquierdo con hexadactilia medioaxial.	Familiar
6	M	CPHD	NH ectópica AH hipoplásica Tallo ausente	Buen desarrollo intelectual Hipoglucemia postnatal e ictericia directa y prolongada. Hipogonadismo hipogonadotrópico.	Esporádico
7	M	IGHD	AH hipoplásica NH ectópica Tallo ausente	Osteogénesis imperfecta de tipo 1 Criotorquidía unilateral. Hipertelorismo mamario. Soplo sistólico funcional. Retraso madurativo.	Esporádico

8	F	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica Tallo ausente	Hipoplasia del nervio óptico izquierdo. SOD	Esporádico
9	F	CPHD	Agenesia de hipófisis	Orejas bajas. Mamelón preauricular. Talla baja.	Esporádico
10	M	CPHD	NH ectópica AH hipoplásica	Chiari. Olfato normal.	Esporádico
11	F	CPHD	AH hipoplásica Tallo ausente NH ectópica	Oligomenorrea/poliartralgias. Oftalmológicamente sana.	Esporádico
12	F	CPHD	AH hipoplásica Tallo fino NH ectópica	Asimetría de miembros inferiores. Talla baja.	Esporádico
13	M	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica Tallo ausente	Micropene. Macroorquidismo. Ojos separados. Labio fino superior. Autismo.	Esporádico
14	M	CPHD	AH hipoplásica	Frente abombada, puente nasal chato, hipoplasia medio facial, cuello corto, filtrum largo, paladar completo. Tórax algo ensanchado. Manos y pies pequeños. Pies planos, genu valgo severo. Catarata.	Esporádico
15	F	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica Tallo fino	Talla baja. Retardo puberal.	Esporádico
16	M	CPHD	AH hipoplásica Tallo ausente	Sin dismorfias faciales. Visión normal. Episodio convulsivo a los 2 meses. Talla baja.	Esporádico

17	M	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica Tallo ausente	Micropene, criptorquidia. Ausencia de minipubertad. Hipoplasia de tercio medio de la cara. Estrabismo, cejas abundantes. Chiari. Siringomielia. Trigonocefalia Hipoplasia malar, paladar ojival completo. Hiperlaxitud metacarpofalángica, braquidactilia, finger pads, hallux ancho.	Esporádico
18	M	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica	Hipoplasia de nervio óptico derecho con microftalmia. SOD Hipospadía balanica Trastorno de aprendizaje y conducta. Chiari Hidrosiringomielia segmentaria C2-C3 Hipotiroidismo central al mes de vida. Estrabismo, olfato normal.	Esporádico
19	M	CPHD	AH hipoplásica NH ectópica	Hipoacusia bilateral. Retardo madurativo.	Esporádico
20	M	CPHD	AH hipoplásica NH no visible Tallo fino	Talla baja. Puente nasal chato, frente amplia. Manos y pies pequeños. Hipotiroidismo central. Retraso del lenguaje.	Esporádico

Tabla 3: Recopilación de historias clínicas de los 20 pacientes que integran la cohorte. AH: Adenohipófisis, NH: Neurohipófisis, SOD: Displasia septo óptica.

El 90% de los pacientes fueron diagnosticados con CPHD, dado que padecen de déficit de múltiples hormonas, mientras que sólo el 10% fueron diagnosticados con IGHD (Figura 6 A). La cohorte se compuso de 7 pacientes de sexo femenino (35%) y 13 de sexo masculino (65%) (Figura 6 B).

Todos los casos de esta cohorte presentan hipopituitarismo junto con algún otro fenotipo asociado, y fueron todos esporádicos salvo un caso que fue familiar (Figura 6 C).

Secuenciación de exoma completo

Del total de los 20 casos índice, se encontraron variantes relevantes en 7 (Tabla 4). El 10% presentó variantes patogénicas (P), el 10% variantes probablemente patogénicas (LP), el 15% variantes de significado incierto (VUS), y un 65% no presentó hallazgos clínicamente relevantes (Figura 7 A). Una variante P/LP encontrada corresponden a un nuevo gen candidato y 3 a genes ya vinculados con HC.

Dentro de las mutaciones causales putativas 2 fueron de tipo *missense*, mientras que una fue de tipo *frameshift*. Por otro lado dentro de las variantes diagnósticas P/LP halladas 3 fueron de tipo pérdida de función, una de ganancia de codón stop prematuro y 2 de tipo *frameshift*. La variante diagnóstica restante fue de tipo *missense* (Figura 7 B).

Los nuevos genes candidatos encontrados en este estudio representan diversas familias de proteínas y funciones (Figura 7 C), mientras que los genes conocidos cumplen todos función de factores de transcripción.

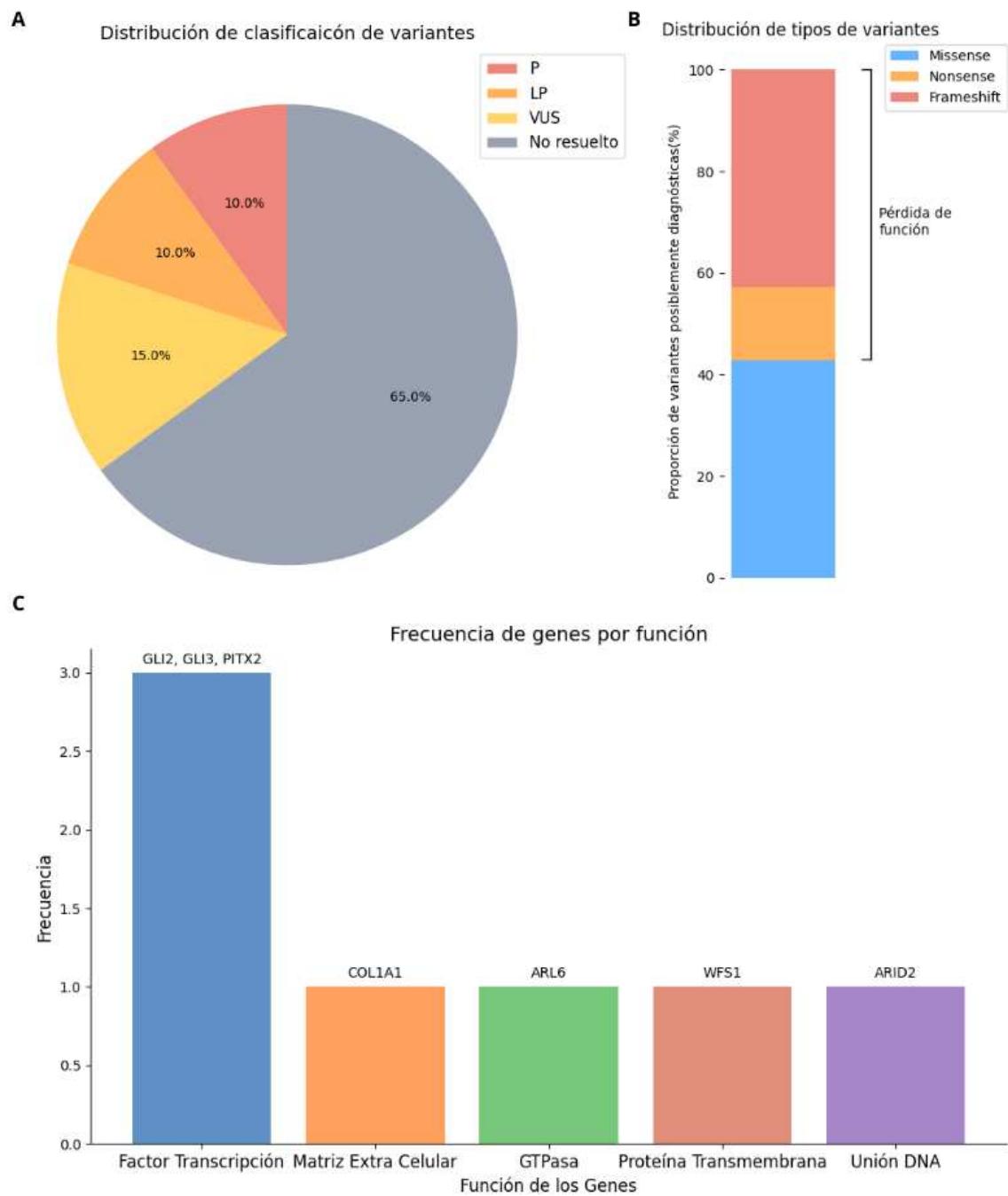


Figura 7: Resumen visual de las variantes halladas. **A.** distribución de clasificación ACMG de variantes hallas en la cohorte. P: variantes patogénicas. LP: variantes posiblemente patogénicas. VUS: variantes de significado incierto. **B.** Proporción de tipo de variantes halladas. Se obtuvieron 42.8% (3/7) de variantes de tipo *missense*, se obtuvo el mismo valor para variantes de tipo *frameshift* y un 14.2% (1/7) de variantes de tipo stop gained (ganancia de codón stop). **C.** Frecuencia de genes por función molecular.

Tabla de variantes relevantes halladas en la cohorte:

Paciente	2	4	5	7	9	11	17
Sexo	M	F	F	M	F	F	M
Gen	WFS1	PITX2	GLI3	COL1A1	ARID2	ARL6	GLI2
Posición (GRCh38)	4:6291980 G > A	4:110618528 AG > A	7:41966506 G > T	17:50197976 A > AG	12:45852190 C > T	3:97791795 AG > A	2:120986563 G > A
DX	CPHD	CPHD	CPHD	IGHD	CPHD	CPHD	CPHD
Exon	6	3	15	8	15	8	12
Cambio en proteína	p.(Arg232His)	p.(Thr192 Hisfs*16)	p.(Ser856*)	p.(Gly206Trpfs *2)	p.(Pro1356Leu)	p.(Gly169fs Alafs*6)	p.(Gly731Arg)
Clase Funcional	Missense	Frameshift	Stop gained	Frameshift	Missense	Frameshift	Missense
Frecuencia alélica	0.0000920	ausente	ausente	ausente	0.0000100	0.0000131	0.0001577
RefSeq	NM_006005.3	NM_000325.6	NM_000168.6	NM_000088.4	NM_152641.4	NM_001278 293.3	NM_0013743 53.1
Puntaje ACMG	VUS (PP2, PM1, PM3, BP6)	LP (PVS1, PM2)	LP (PVS1, PM2)	P (PVS1,PS4,P M2)	VUS (PP2,,BP1)	P (PM2, PVS1)	VUS (PM2,PM1,B P4)
Herencia	AD	AD	AD	AD	AD	AR	AD
Resuelto	Si	Si	Si	Si	Putativo	Putativo	Putativo
WGS	Si	No	No	No	Si	Si	No
Tabla 4: Resumen de variantes halladas. La frecuencia alélica fue obtenida de GnomAD v4 [31]. El código de Ref seq fue obtenido de la base de datos del NCBI [59].							

Descripción de variantes relevantes en genes conocidos relacionados con la enfermedad por paciente

Paciente 5

La paciente recurre al hospital al mes de vida por hipoglucemias y convulsiones, atribuidas a un déficit de hormonas hipofisarias. Presentaba hipertelorismo ocular, hendiduras palpebrales amplias, narinas antevertidas y hexadactilia medioaxial en la mano y pie izquierdo. Inicialmente, los médicos sospecharon padecimiento de síndrome de Pallister-Hall, ya que dos de sus hermanos habían sido diagnosticados con esta condición.

El análisis genético reveló la variante ***GLI3: c.2567C>A***, que genera un codón *stop* prematuro. Esta variante tiene una frecuencia poblacional nula en GnomAD (PM2) y su efecto es de pérdida de función, ya que se pierde más del 40% de la proteína (Figura 8 A) (PVS1), lo que es consistente con las variantes deletéreas del gen *GLI3*. La variante fue clasificada como probablemente patogénica (LP) según los criterios ACMG.

El gen *GLI3* codifica para un factor de transcripción zinc finger que se une al ADN y actúa como mediador de la señalización de Sonic hedgehog. Dichas proteínas desempeñan un papel importante durante la embriogénesis. Las mutaciones en este gen se han asociado con varias enfermedades en humanos, incluyendo el síndrome de Greig de cefalopolisindactilia y el síndrome de Pallister-Hall [60]. En particular, las variantes patogénicas relacionadas con el síndrome de Pallister-Hall se han identificado principalmente en la región central del gen, siendo en su mayoría de tipo *nonsense* o *frameshift* [61]. La variante detectada en nuestro caso también se encuentra en esta región, lo que refuerza la sólida correlación entre el genotipo y el fenotipo en este paciente.

El síndrome de Pallister-Hall presenta herencia del tipo autosómico dominante (AD) y sus manifestaciones clínicas incluyen la polidactilia, la sindactilia, el retraso en el crecimiento, algunas dismorfias faciales y panhipopituitarismo (MIM: 146510) [62]. Con esta información se propone la variante identificada como la causante del síndrome de Pallister-Hall manifestado en la paciente.

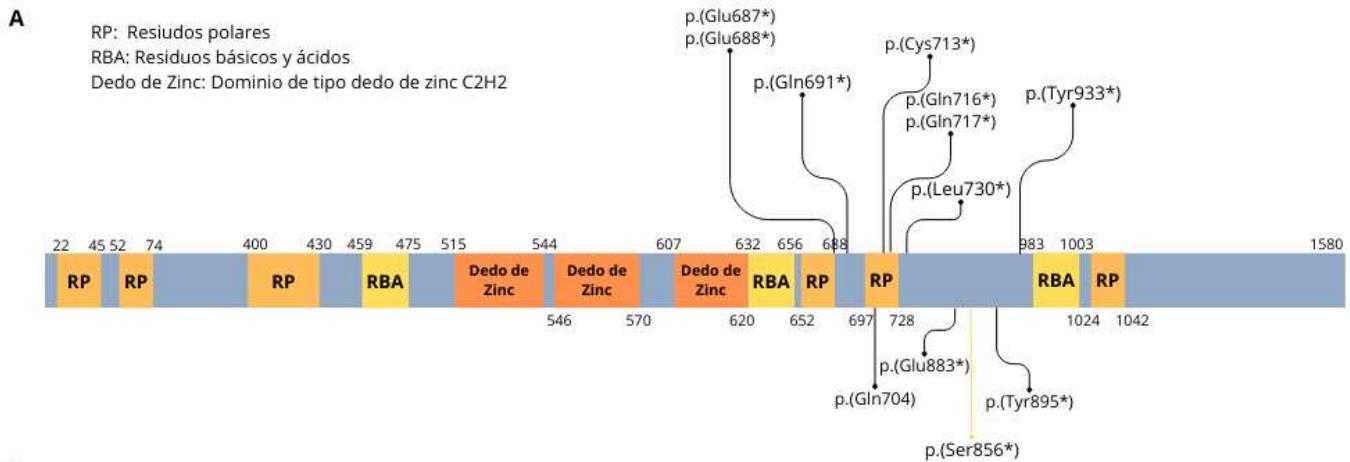


Figura 8: Síntesis de información asociada a la variante. A. Representación gráfica de la proteína obtenida a partir del gen *GLI3*. Las variantes señaladas fueron recopiladas de trabajos donde reportan variantes asociadas al fenotipo presentado por el paciente [61]. La variante de nuestro caso está señalada por una flecha amarilla.

Paciente 4

La paciente fué derivada al servicio endocrinología a los 4 meses de vida por nistagmus, convulsiones, hipoglucemias e hipotonía. Es diagnosticada con CPHD y displasia iridocorneal. Comenzó tratamiento sustitutivo multihormonal con muy buena respuesta.

Mediante secuenciación de exoma completo de esta paciente, identificamos una variante en el gen **PITX2: c.571delC**, que produce un corrimiento del marco de lectura (*frameshift*) y posterior ganancia de un codón *stop* prematuro 16 aminoácidos río abajo. Esta variante fue clasificada como probablemente patogénica (LP) de acuerdo con los criterios ACMG. El corrimiento afecta aproximadamente al 40% de la proteína (Figura 9) (aunque no se espera que la proteína resultante sea degradada por el mecanismo de NMD) (PVS1). Además, su frecuencia poblacional es nula en GnomAD (PM2).

PITX2 codifica para un miembro de la familia homeobox RIEG/PITX. La proteína resultante actúa como un factor de transcripción y regula la expresión del gen de la lisil hidroxilasa del procolágeno. Esta proteína desempeña un papel importante en la diferenciación terminal de los fenotipos celulares somatotropos y lactotropos, está involucrada en el desarrollo del ojo, los dientes y los órganos abdominales, y actúa como un regulador transcripcional implicado en la actividad basal y regulada por hormonas de la prolactina. Las mutaciones en este gen están

asociadas con el síndrome de Axenfeld-Rieger, el síndrome de iridogoniodisgénésis y casos esporádicos de la anomalía de Peters [63].

El síndrome de Axenfeld-Rieger es una condición rara con herencia autosómica dominante (AD), caracterizada por displasia del iris, hipoplasias genitales, baja talla, entre otras manifestaciones (MIM: 180500) [64]. Con base en esta información, se propone que la variante identificada en *PITX2* es la causante de la enfermedad manifestada en la paciente.

A

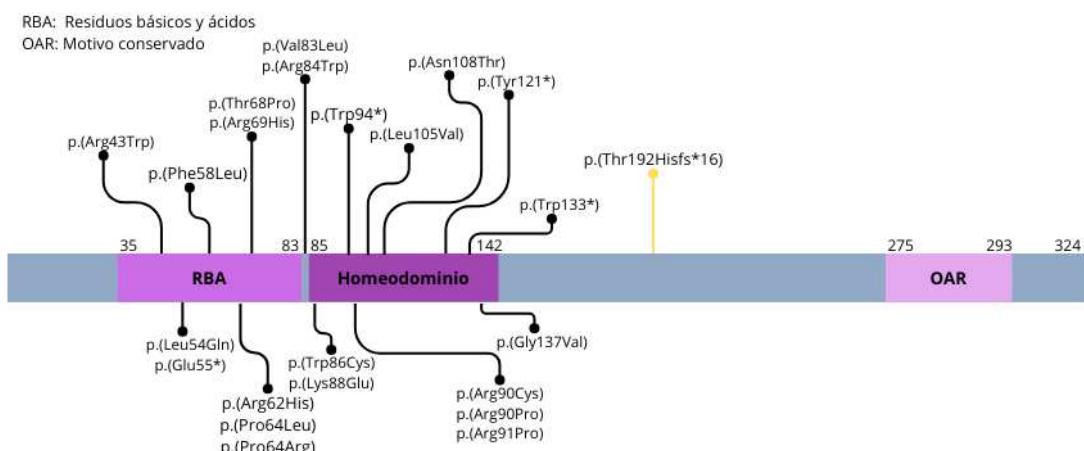


Figura 9: Síntesis de información asociada a la variante. A. Representación gráfica de la proteína obtenida a partir del gen *PITX2*. Las variantes señaladas fueron recopiladas de trabajos que informan variantes causantes de Síndrome de Axenfeld-Rieger [65]. La variante de nuestro caso está señalada por una flecha amarilla.

Paciente 17

El paciente recurrió a la consulta del servicio de Endocrinología por hipoglucemias e ictericia neonatal. Fue diagnosticado como CPHD. Dentro de su descripción fenotípica se detalló la presencia de micropene, criotorquidia y ausencia de minipubertad. Además se observó hipoplasia de tercio medio de la cara, malformación de Arnold Chiari, craneosinostosis, siringomielia, trigonocefalia, estrabismo, cejas abundantes, hipoplasia malar, paladar ojival completo, hiperlaxitud metacarpofalángica, braquidactilia y hallux ancho.

Post filtrado y priorización de variantes de su exoma, se encontró una variante en el gen ***GLI2:c.2191G>A***. Este gen codifica una proteína que pertenece a la subclase de proteínas con

dedos de zinc tipo C2H2 de la familia Gli. Los miembros de esta subclase se caracterizan por ser factores de transcripción que se unen al ADN a través de motivos de dedos de zinc, los cuales contienen enlaces H-C conservados. Las proteínas con dedos de zinc de la familia Gli son mediadores de la señalización de Sonic hedgehog (Shh) y están implicadas como oncogenes potentes en las células de carcinoma embrionario. La proteína codificada por este gen se localiza en el citoplasma y activa la expresión del gen homólogo a patched de *Drosophila* (PTCH). También se cree que desempeña un papel durante la embriogénesis. La proteína codificada está asociada con varios fenotipos, como el síndrome de Greig de cefalopolisindactilia, el síndrome de Pallister-Hall, la polidactilia preaxial tipo IV y las polidactilias postaxiales tipos A1 y B [66].

La variante hallada **p.(Gly731Arg)** genera un cambio aminoacídico de una Glicina (aminoácido cargado positivamente) en la posición 748 por una Arginina (aminoácido cargado negativamente). Si bien el cambio no cae en una zona de restricción mutacional para variantes sin sentido o missense, el polimorfismo se da en una zona donde se ubican una serie de aminoácidos polares (Figura 10 A), algo conservados (Figura 10 B) y donde no hay variantes benignas reportadas (PM1). También es considerado de relevancia para el análisis que la variante posee baja frecuencia poblacional (Frecuencia en GnomAD: 0.0001577) (PM2). A su vez algunos predictores de patogenicidad bioinformáticos predicen la variante como benigna (BP4), aunque predictores como Metadome indican la zona como intolerante al cambio (Figura 10 C). Dicho esto, la clasificación asignada a la variante encontrada, siguiendo los criterios ACMG, es de significado incierto o VUS, por lo que se propone seguir profundizando la evidencia, por ejemplo con ensayos funcionales.

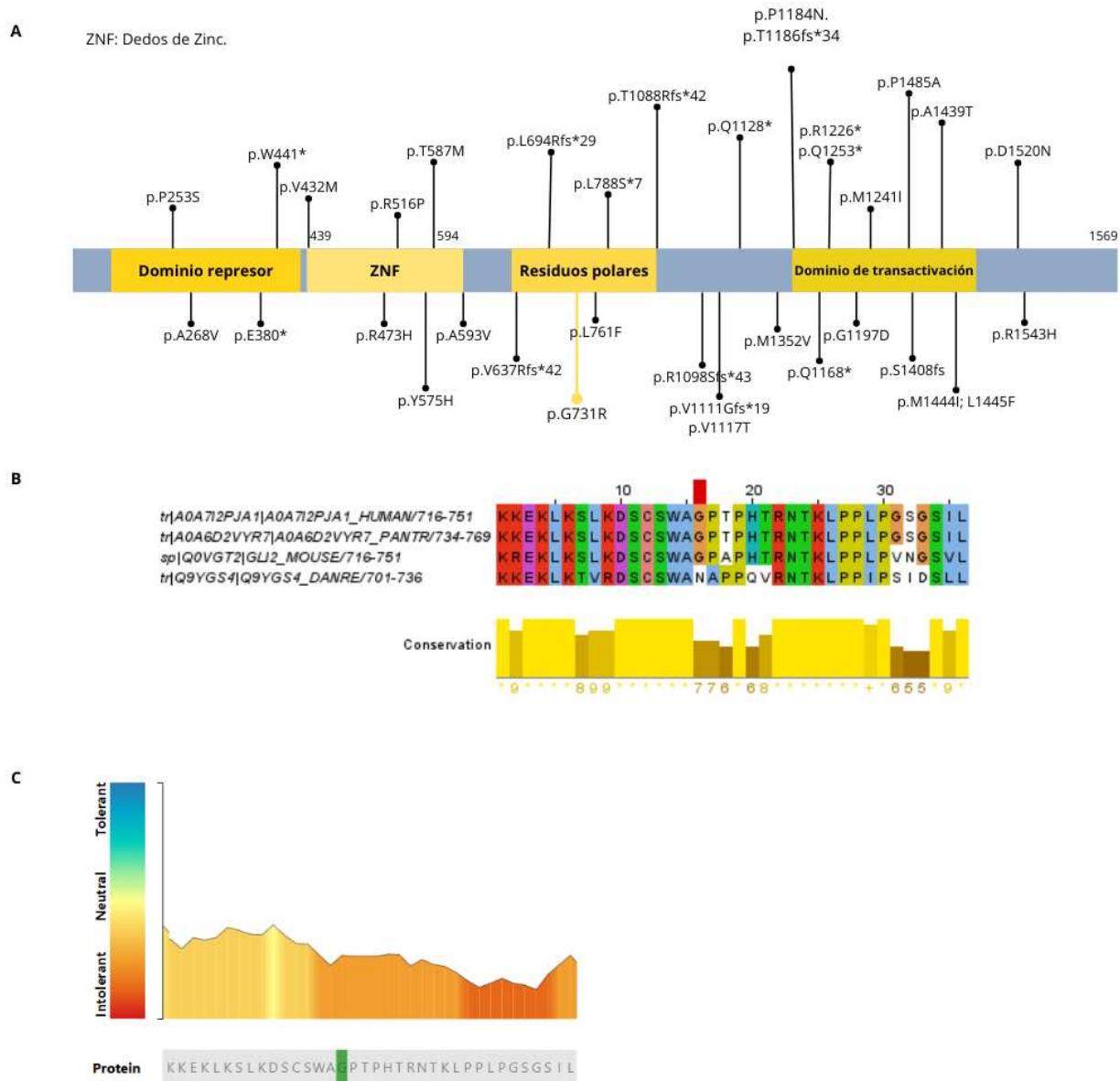


Figura 10: Síntesis de información asociada a la variante. **A.** Representación gráfica de la proteína a partir del gen *GLI2*. Las variantes señaladas fueron recopiladas de un trabajo previo de nuestro laboratorio [48]. La variante de nuestro caso está señalada por una flecha amarilla. **B.** Alineamiento múltiple visualizado en Jalview [57] junto con gráfico de conservación de la posición. El aminoácido mutado se encuentra señalado por un rectángulo rojo. **C.** Gráfico de tolerancia al cambio realizado en Metadome [52]. El aminoácido cambiado se encuentra señalado por un rectángulo verde.

Descripción de variantes en genes recientemente relacionados con la enfermedad

Paciente 7

El paciente fué diagnosticado a los 5 años de edad con IGHD. También presenta osteogénesis imperfecta de tipo 1, manifestándose con escleróticas azules, dedos finos, alteración de la dentina y mal estado bucodental en general. El estudio de MRI mostró disminución global del tamaño de la adenohipófisis, neurohipófisis ectópica y visualización poco clara del tallo hipofisario. En estudios complementarios se le diagnosticó criptorquidia unilateral e hipertelorismo mamario.

Como resultado del filtrado y la priorización de variantes se encontró una variante *frameshift* relevante en el gen ***COL1A1: c.614dupC***, gracias a la variante se produce la ganancia de un codón *stop* prematuro 2 aminoácidos río abajo. La variante es clasificada como patogénica (P) según los criterios ACMG dado que altera gran porcentaje de la proteína (PVS1) (Figura 11 A), presenta frecuencia poblacional nula en GnomAD (PM2) y se encuentra reportada previamente en ClinVar con la misma clasificación (PS4).

El gen ***COL1A1*** codifica para las cadenas pro-alfa1 del colágeno tipo I, el cual es un colágeno formador de fibrillas que se encuentra en la mayoría de los tejidos conectivos y es abundante en huesos, córnea, dermis y tendones. Las mutaciones en este gen están asociadas con osteogénesis imperfecta tipos I-IV, el síndrome de Ehlers-Danlos tipo VIIA entre otras [67].

La osteogénesis imperfecta (OI) es una enfermedad hereditaria poco frecuente, la cual afecta a 6-7 de cada 100,000. Su herencia es de tipo autosómica dominante (AD), aunque presenta penetrancia incompleta. La mayoría de individuos con OI no son diagnosticados y son asintomáticos a lo largo de su vida [68]. Se decidió incluir este gen dentro de los paneles de filtrado dado a que uno de los fenotipos asociados a la osteogénesis imperfecta es baja talla (MIM: 166210) [69], coincidente con un fenotipo frecuente en casos de HC. Además al realizar búsqueda bibliográficas se encontraron reportes que señalan la coexistencia del diagnóstico de OI junto con el IGHD o CPHD [70]. Diversos estudios revelan que pacientes con variantes causantes de OI pueden presentar complicaciones en los partos, lo que podría llevar a la interrupción mecánica del tallo hipofisario y en consecuencia a déficit de hormonas hipofisarias [71][72].

Al indagar más en la clínica del caso obtuvimos un reporte de parto por cesárea por presentación podálica (de nalgas) del feto. Además se reportó como antecedentes familiares una madre con dolores óseos y un tío materno con múltiples fracturas, ambos fenotipos coincidentes con padecimientos de OI. Con la finalidad de sumar evidencia se realizó un análisis de

secuenciación por Sanger para la madre. Como resultado del análisis se obtuvo que la madre es portadora de la misma variante hallada en el paciente (Figura 11 B).

Debido a la evidencia mencionada anteriormente se podría hipotetizar que la complicación en el parto causada por la variante en *COL1A1*, responsable del diagnóstico de OI, contribuyó a la interrupción mecánica del tallo hipofisario, lo que posteriormente generó una deficiencia de hormona de crecimiento adquirida.

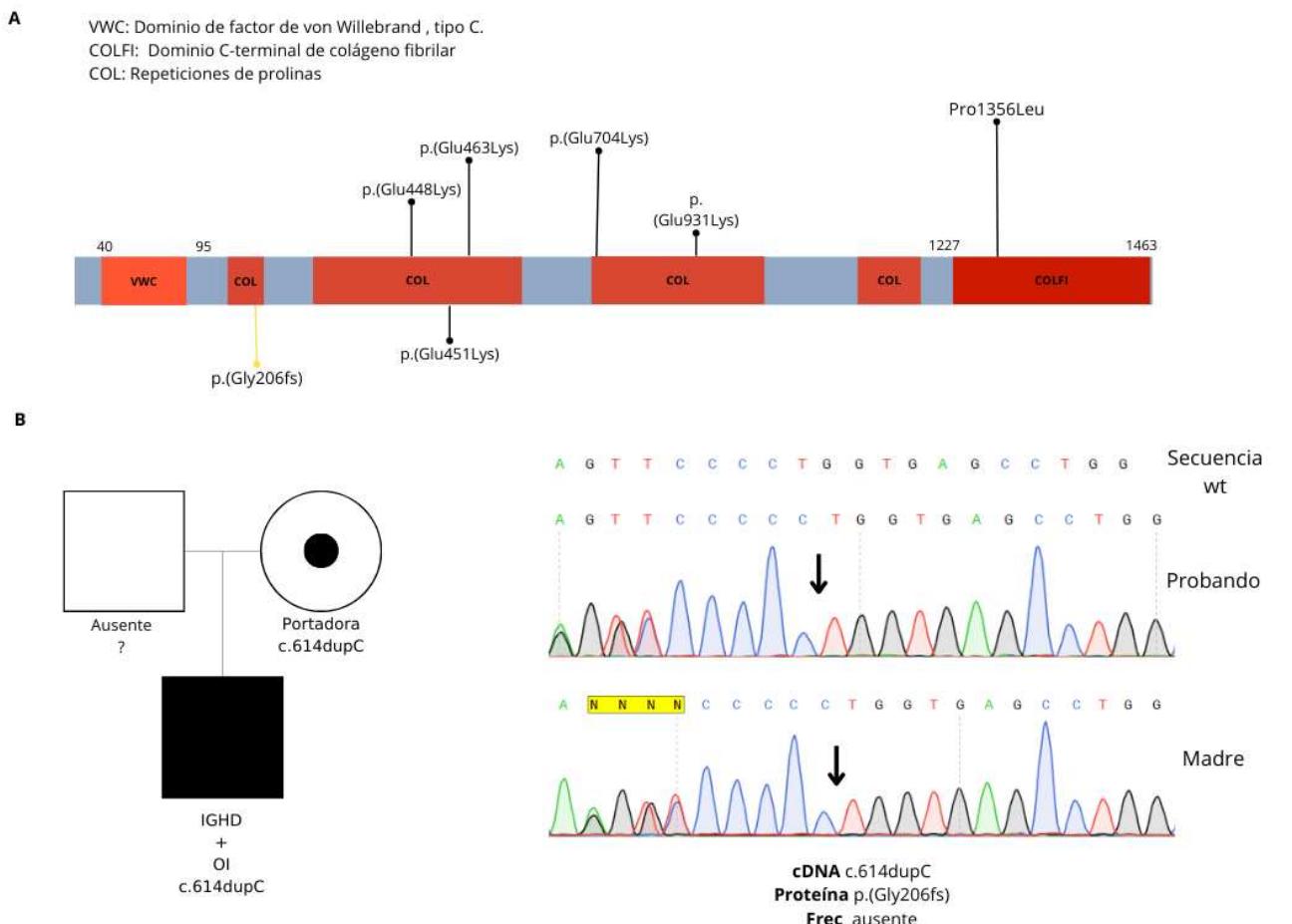


Figura 11: Síntesis de información asociada a la variante. A. Representación gráfica de la proteína obtenida a partir del gen *COL1A1*, donde la variante de nuestro caso se encuentra identificada con una flecha amarilla. Las variantes señaladas fueron recopiladas de trabajos que reportan variantes en paciente con fenotipos parecidos al de nuestro caso [73]. B. Pedigree, detalle clínico y secuenciación de paciente portador de la variante *COL1A1* c.614dupC p.(Gly206fs) y su madre.

Paciente 2

El paciente 2 comenzó con manifestaciones de déficit de ADH al mes de vida, lo que luego evolucionó a déficit multihormonal, diagnosticándolo así con CPHD. Al avanzar en su desarrollo comenzó a presentar signos de SOD, resultando en ceguera. Tiene pseudomicropene, comportamiento agresivo y dificultades para dormir. También ha desarrollado una obesidad severa y diabetes insípida.

Como resultado del análisis bioinformático se obtuvo una variante en el gen **WFS1: c.695G>A**. Este gen codifica una proteína transmembrana, que se localiza principalmente en el retículo endoplasmático y se expresa de manera ubicua, con los niveles más altos en el cerebro, el páncreas y el corazón. Las mutaciones en este gen están asociadas con el síndrome de Wolfram (WFS, MIM: 222300) [74], también llamado DIDMOAD (Diabetes Insípida, Diabetes Mellitus, Atrofia Óptica y Sordera), un trastorno AR. La enfermedad afecta al cerebro y al sistema nervioso central [75].

El síndrome de Wolfram también puede darse de manera autosómica dominante (AD) y se lo denomina Síndrome similar al Wolfram (WFLS, MIM: 614296) [76]. Aunque ambos síndromes comparten algunas características clínicas, como la atrofia óptica y la sordera neurosensorial. El síndrome de Wolfram clásico se distingue por la presencia de diabetes mellitus e insípida, y tiene un curso más severo y multisistémico, en cambio el síndrome similar al Wolfram tiene manifestaciones gastrointestinales características y no incluye diabetes [77].

Dicho gen se incluyó en el filtrado de genes del exoma por panel dado a que se han reportado casos de pacientes con WFS asociado a hipopituitarismo [78][79].

La evidencia disponible de la variante hallada sugiere una clasificación de tipo VUS, según criterios ACMG, dado que posee una baja frecuencia poblacional en GnomAD (PM2), varios predictores *in silico*, como DANN y M-CAP, predicen la variante como deletérea para la función proteica (PP3). Además la variante se encuentra ubicada en un dominio funcional del tipo mano de wolframina, conservado en varias especies (PM1) (Figura 12 A y B). A su vez la variante aparece reportada por diversas fuentes en ClinVar, pero con conflictos de clasificaciones (BP6) [80].

Dado que la clínica descrita para el paciente es solapante en mayor medida con el WFS, se decidió realizar un análisis de la variante para la madre (única parental disponible) con el fin de conocer la etiología de la mutación. Los resultados del análisis de Sanger demostraron que la madre del paciente es portadora de la variante, pero no manifiesta síntomas (Figura 12 C y D). Según bibliografía la penetrancia de WFLS y de WFS es difícil de dilucidar dado a la grán

heterogeneidad en las presentaciones de estas patologías [77]. Es por esto que se propone profundizar el análisis genómico del par madre-hijo con el fin de descartar la posibilidad de no estar detectando variantes intrónicas en el análisis por WES.

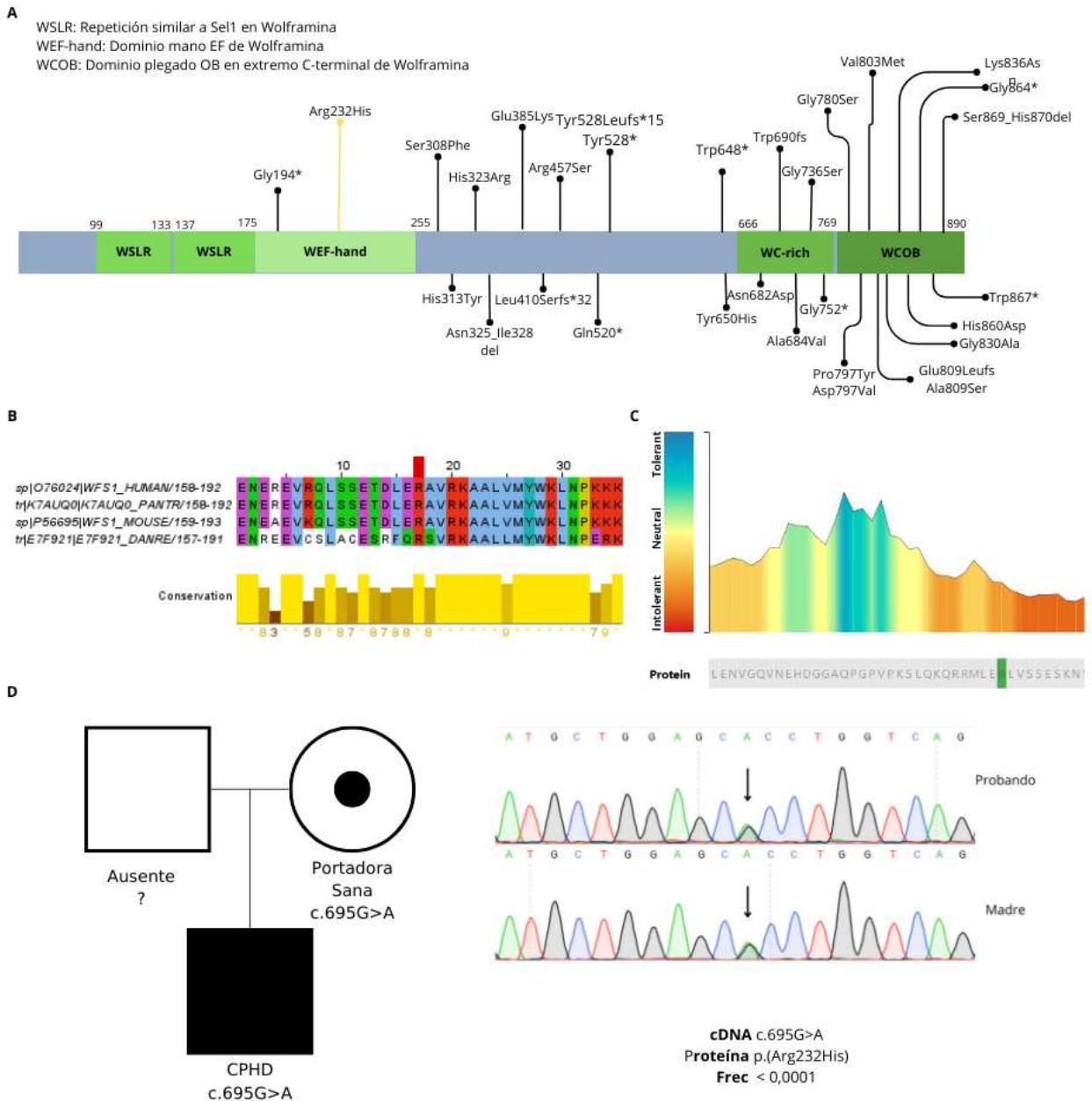


Figura 12: Síntesis de información asociada a la variante. **A.** Representación gráfica de la proteína obtenida a partir del gen WFS1. Las variantes señaladas fueron recopiladas a partir de un trabajo que reporta variantes de casos con fenotipo similar al de nuestro paciente [77]. La variante de nuestro caso está señalada por una flecha amarilla. **B.** Alineamiento múltiple visualizado en Jalview [57] junto con gráfico de conservación de la posición. El aminoácido mutado se encuentra señalado por un rectángulo rojo. **C.** Gráfico de tolerancia al cambio realizado en Metadome [52]. El aminoácido cambiado se encuentra señalado por un rectángulo verde. **D.** Pedigree, detalle clínico y secuenciación del paciente portador de la variante WFS c.695G>A p.(Arg232His) junto con su madre (portadora de la misma variante).

Paciente 9

La paciente fue llevada al hospital al mes de vida por hipoglucemias neonatales, recibió diagnóstico de CPHD y comenzó con tratamiento multihormonal. Al continuar su crecimiento manifestó baja talla armónica, implantación baja de orejas y mamelón preauricular. Los resultados de MRI revelaron agenesia de la hipófisis.

Como resultado del filtrado y la priorización de variantes se encontró una variante en el gen **ARID2: c.4067C>T**. Este gen codifica para un miembro de la familia de proteínas que contienen el dominio interactivo rico en AT (ARID) que se une al ADN. Los miembros de la familia ARID desempeñan funciones en la organización del patrón embrionario, la regulación de genes de linaje celular, el control del ciclo celular, la regulación transcripcional y la modificación de la estructura de la cromatina. Esta proteína funciona como una subunidad del complejo remodelador de cromatina asociado a polibromo y BRG1, o PBAF (SWI/SNF-B), que facilita la activación transcripcional dependiente de ligandos por receptores nucleares [81].

Estudios recientes demostraron que ratones KO para dicho gen presentan hipófisis dismórficas [49], por lo que se decidió incluirlo en el filtrado de variantes.

Variantes en este gen están asociadas al síndrome de Coffin-Siris 6 (MIM: 617808), de herencia AD. Este síndrome se caracteriza por ocasionar baja estatura, cabello escaso, desarrollo intelectual de leve a gravemente afectado, rasgos faciales toscos y anomalías conductuales variables. Algunos pacientes presentan clinodactilia del quinto dedo con uñas pequeñas. Pueden estar presentes otras anomalías congénitas y convulsiones [82].

La variante hallada tiene como consecuencia el cambio de una prolina en la posición 1356 por una leucina (Figura 13 A). Si bien Alpha missense predice el cambio aminoacídico como probablemente benigno [83], otros predictores bioinformáticos predicen el cambio como patogénico o de significado incierto. La zona de la variante no tiene un alto grado de conservación y Metadome predice la zona como probablemente tolerante al cambio (Figura 13 B y C). Por otro lado, la variante presenta baja frecuencia poblacional en GnomAD (PM2). Es importante mencionar que las variantes truncantes son el principal mecanismo de enfermedad para este gen (BP1). Todas estas evidencias llevan a una clasificación VUS.

Dado que la clínica de la paciente era solapante, en algunos aspectos, con el fenotipo descrito para el síndrome de Coffin-Siris, se decidió realizar un análisis de herencia de la variante mediante el método de sanger. Como resultado de dicho análisis se obtuvo que la variante fué heredada de la madre (Figura 13 D), lo cual no era lo esperado para dicha patología ya que las variantes reportadas en general son *de novo* [84]. Al profundizar en la búsqueda bibliográfica se

halló un reporte previo en que la variante es heredada de una madre cuyo fenotipo es distinto al de su descendencia (rasgos faciales parecidos y retraso en el aprendizaje), sugiriendo así una penetrancia incompleta de la variante [85].

Como conclusión se considera la evidencia obtenida para la variante insuficiente para catalogarla como patogénica, por lo que se sugiere profundizar el análisis de variantes por WGS.

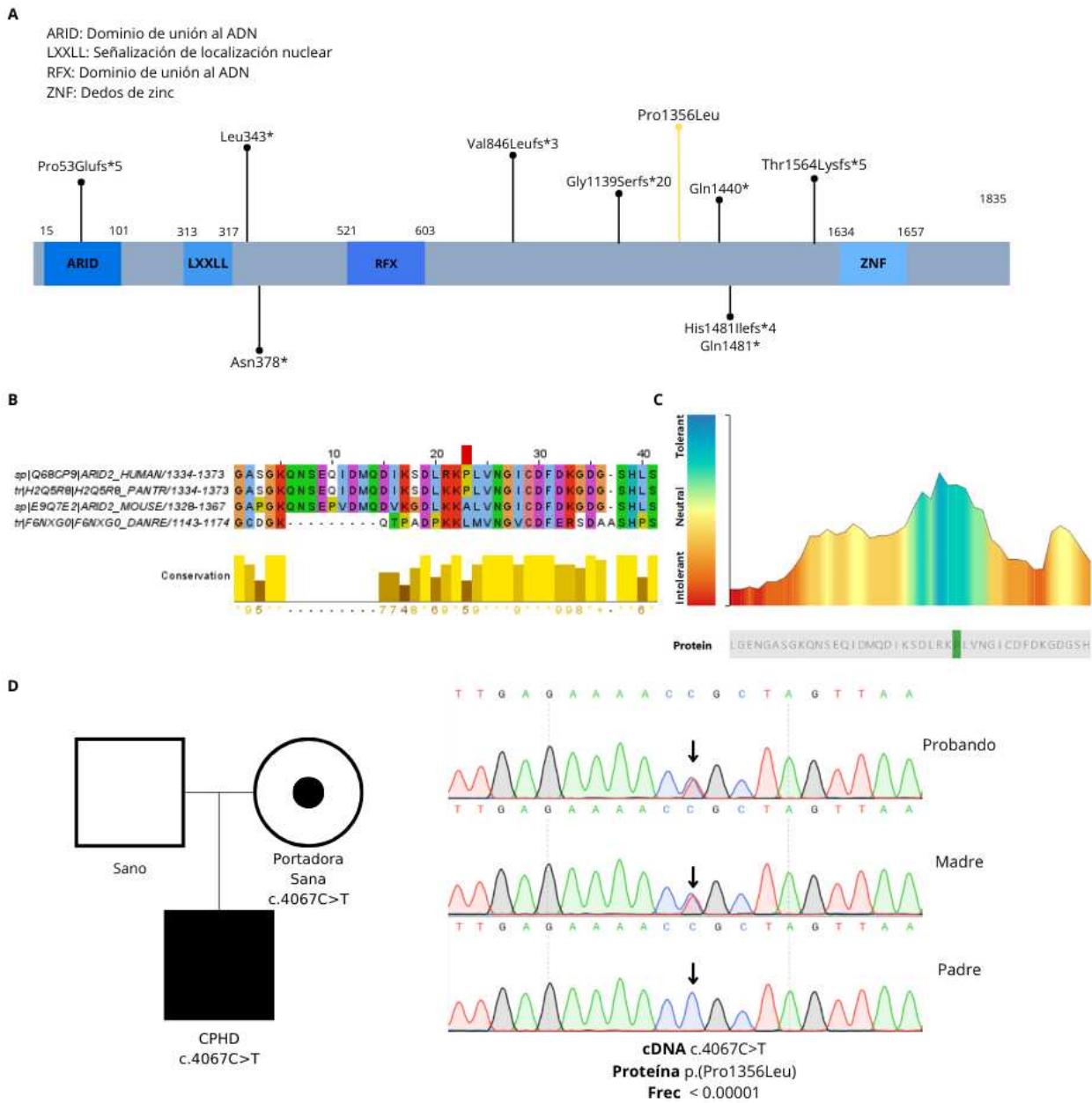


Figura 13: Síntesis de información asociada a la variante. **A.** Representación gráfica de la proteína obtenida a partir del gen ARID2. Las variantes señaladas fueron recopiladas a partir de un trabajo que reporta variantes patogénicas de casos con fenotipo similar al de nuestro paciente[86]. La variante de nuestro caso está señalada por una flecha amarilla. **B.** Alineamiento múltiple visualizado en Jalview [57] junto con gráfico de conservación de la posición. El aminoácido mutado se encuentra señalado por un rectángulo rojo. **C.** Gráfico de tolerancia al cambio realizado en Metadome [52]. El aminoácido cambiado se encuentra señalado por un rectángulo verde. **D.** Pedigree, detalle clínico y secuenciación del paciente portador de la variante ARID2 c.406C<T p.(Pro1356Leu) junto con su madre (portadora de la misma variante) y su padre (sano).

Paciente 11

La paciente 11 presenta CPHD. Su MRI muestra anomalías en la glándula hipofisaria y durante su pubertad presentó oligomenorrea.

El análisis genético identificó una delección en heterocigosis en el gen **ARL6: c.506delG**, que provoca un *frameshift* en la proteína resultante, generando así un corrimiento del marco de lectura y la aparición de un *codón stop* 6 aminoácidos río abajo.

La proteína codificada por este gen pertenece a la subfamilia ARF-like (similar al factor de ADP-ribosilación) de la familia ARF de proteínas que se unen a GTP conocidas como GTPasas, las cuales están involucradas en la regulación del tráfico intracelular. Mutaciones en este gen han sido asociadas con patologías como la retinitis pigmentosa 55 y el síndrome de Bardet-Biedl tipos 1 y 3 (MIM: 600151, 613575). Parte del fenotipo asociado a este último síndrome es el hipogonadismo [87].

La variante encontrada fue clasificada como patogénica (P) según los criterios ACMG, debido a su baja frecuencia poblacional (PM2) y al hecho de que la mutación afecta más del 10% del transcripto (Figura 14 A) (PVS1). Además la variante se encuentra reportada en clinvar con la misma clasificación (PM3) [88].

Si se observa el alineamiento múltiple realizado se puede notar un alto nivel de conservación de la secuencia proteica en la región en donde cae la mutación (Figura 14 B).

Dado que la herencia asociada a este síndrome es AR o de tipo digénica, y que no se hallaron otras variantes relevantes, la variante se reporta como un resultado putativo y se propone completar el análisis genético realizando secuenciación de genoma completo (WGS).

A

ARF: Factor de ribosilación ADP

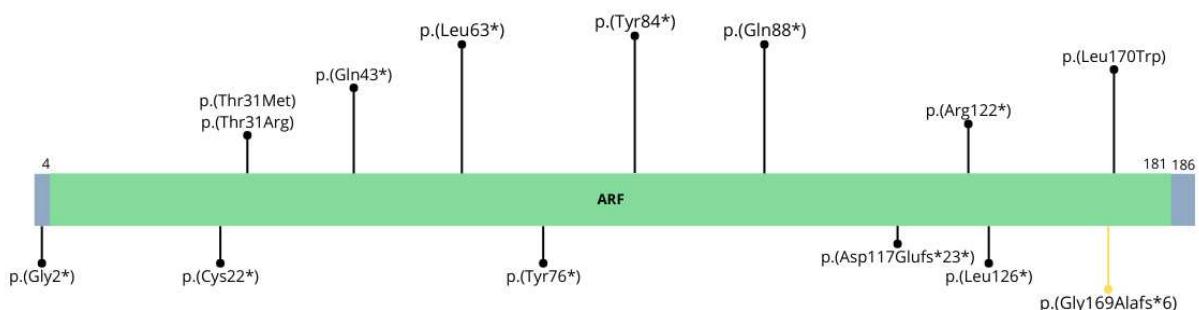
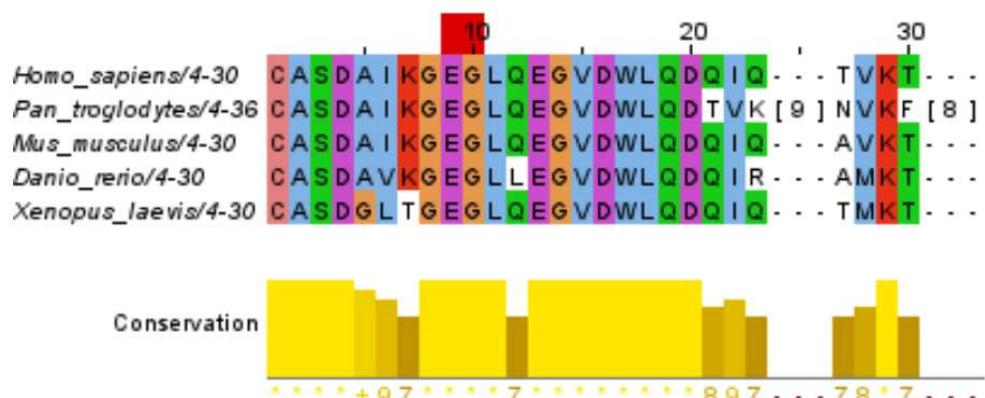
**B**

Figura 14: Síntesis de información asociada a la variante. A. Representación gráfica de la proteína obtenida a partir del gen ARL6, donde la variante de nuestro caso se encuentra identificada con una flecha amarilla. Las variantes señaladas fueron recopiladas de trabajos que reportan variantes en paciente con fenotipo parecido al de nuestro caso y variantes de pérdida de función reportadas en GnomAD [89][90].

Análisis estructural in silico de la variante ARL6 p.(Gly169Alafs*6) c.506delG:

Como se describió anteriormente en la introducción, uno de nuestros objetivos es profundizar, en los casos que sea posible, en el análisis estructural de las proteínas resultantes de las variantes. Dado que la cantidad de proteínas cristalizadas en las condiciones óptimas de análisis no era abundante, se eligió a la variante en el gen ARL6 para realizar modelado in silico (Tabla 5).

ARL6 wt	166 KGEGLQEGVDWLQDQIQTVK 192
ARL6 mutada	166 KGEACKV* 179
Tabla 5: Secuencia wt de la proteína y secuencia con el corrimiento de marco de lectura	

El primer cambio notable en la estructura proteica que se visualiza al comparar la proteína wt contra la proteína mutante es la pérdida de la última alfa hélice de la proteína ARL6. Este cambio se puede observar en la comparación de las estructuras, en donde la hélice se encuentra coloreada en naranja (Figura 15 A wt, Figura 15 B mutante). La pérdida es ocasionada por la delección mencionada anteriormente.

Otro cambio notable en la estructura es la disposición espacial de otra alfa hélice que es generada por la primera parte del transcripto (aminoácidos 1 al 15 marcados el color violeta). Dicha estructura secundaria se ubica hacia el exterior de la molécula proteica en la estructura wt (Figura 15 C) mientras que en la proteína mutante pareciera ocupar el espacio disponible resultante de la delección, por lo que su ubicación es hacia adentro de la proteína (Figura 15 D).

Dado que la mutación se ubica dentro de los últimos 50 a 54 pares de bases del penúltimo exón se predice que el ARNm escapará el NMD (Nonsense mediated decay), por lo que esta evidencia iría en contra de la etiqueta PVS1. Sin embargo, se cuenta con evidencia proveniente de ensayos funcionales de variantes causantes de BBS, en donde al analizar la vida media de la proteína en cultivos celulares con la variante p.(Gly169Ala) observaron una disminución en los niveles de proteína cuantificados. Al agregar inhibidor de proteasoma los niveles de proteína en cultivo celular se restablecen, sugiriendo degradación por dicha vía de la proteína [90]. De manera complementaria agregaron cloroquina al medio, con la finalidad de inhibir la vía de degradación lisosomal, pero los niveles de proteína mutante no se vieron afectados. Estos resultados nos

indican que el producto proteico es degradado vía proteasoma, favorecido por la desestabilización que les da no poder unirse correctamente a los nucleótidos de guanina.

Con base en esta evidencia, aunque la variante reportada en estos estudios no es exactamente la misma (la nuestra es una delección que produce un corrimiento del marco de lectura en la proteína mientras que la publicada produce un cambio de aminoácido en la misma posición 169), es razonable suponer que la variante frameshift p.(Gly169Alafs*6) sigue un mecanismo de degradación similar, ya que también afectaría la capacidad de la proteína para unirse a los nucleótidos de guanina, favoreciendo su eliminación por la vía proteasomal.

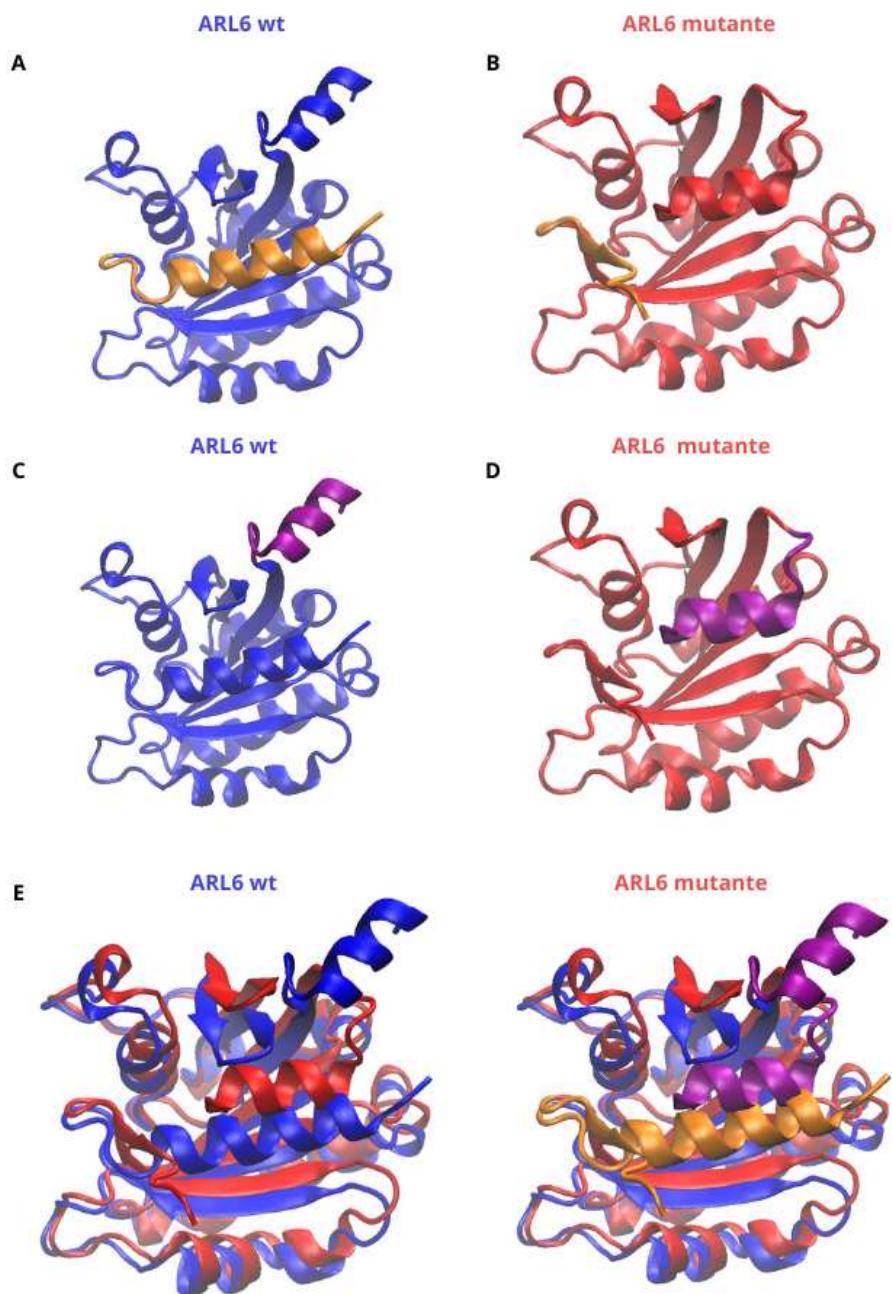


Figura 15: Modelado de proteína ARL6. Proteína wt coloreada en azul y mutante p.(Gly169Alafs*6) coloreada en rojo. Las zonas relevantes se encuentran coloreadas en violeta (hélice inicial) y naranja (hélice terminal).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo de tesis hemos analizado los exomas de 20 casos de hipopituitarismo congénito. Este grupo de pacientes forma parte de una cohorte de 150, que están siendo procesados en el laboratorio en conjunto con otros becarios/as. Asimismo, ya hemos publicado anteriormente dos cohortes de aproximadamente 150 casos cada una [3][48], demostrando que el grupo de investigación tiene una gran trayectoria en el estudio molecular de esta enfermedad.

En particular, en el presente trabajo del total de 20 casos analizados, se identificaron variantes relevantes en 7 de ellos, todas en heterocigosis. Cuatro de ellas fueron clasificadas como P o LP, mientras que las otras 3 fueron VUS. Dentro de las variantes P o LP, 3 reúnen los requisitos necesarios para ser consideradas variantes diagnósticas, dado que están presentes en genes con herencia de tipo autosómica dominante (***GLI3: c.2567C>A***, ***PITX2: c.571delC***, ***COL1A1: c.614dupC***). La cuarta variante P, hallada en el gen ***ARL6***, no clasifica como diagnóstica certera dado que su patrón de herencia es autosómico recesivo. Por lo tanto, es necesario complementar el análisis con la identificación de una segunda variante en este gen que respalde la relación genotipo-fenotipo. En otros tres casos hemos encontrado variantes de tipo VUS, por lo que es necesario recopilar más evidencia funcional y poblacional para dilucidar su patogenicidad (***GLI2:c.2191G>A***, ***WFS1: c.695G>A***, ***ARID2: c.4067C>T***)(Figura 16).

Un resultado interesante, es la variante identificada en el gen *PITX2*. Variantes en este gen asociadas a hipopituitarismo son particularmente inusuales, sólo existe un reporte previo en la literatura de síndrome de Axenfeld-Reiger con CPHD [91]. Considerando que PITX2 actúa como factor de transcripción involucrado en la diferenciación de somatotropos y lactotropos, se esperaría que esta combinación de fenotipos en pacientes portadores de mutantes en dicho gen fuera más frecuente. Sin embargo, la baja cantidad de casos reportados sugieren que este hallazgo contribuye significativamente al conocimiento actual sobre su papel en la enfermedad.

Otro hallazgo importante del presente trabajo es la variante hallada en el gen *COL1A1*. La asociación entre osteogénesis imperfecta (OI) y síndrome de interrupción del tallo (PSIS) ha sido reportada muy brevemente en solo dos *papers* hasta la fecha [71,72]. Este hallazgo es relevante, ya que brinda evidencia de la implicancia de COL1A1 en CPHD/IGHD, sugiriendo la existencia de nuevas vías moleculares aún por caracterizar.

En resumen, el porcentaje de casos resueltos con variantes certeras es consistente con investigaciones previas realizadas por el laboratorio, donde se obtuvo una alta tasa de diagnóstico para pacientes con hipopituitarismo congénito (HC) analizados por WES [48][3]. Este resultado subraya que, si bien el HC es una enfermedad de origen poligénico que dificulta la determinación de su base genética, la implementación de un protocolo de análisis bioinformático sólido es fundamental para mejorar o mantener una tasa de diagnóstico elevada.

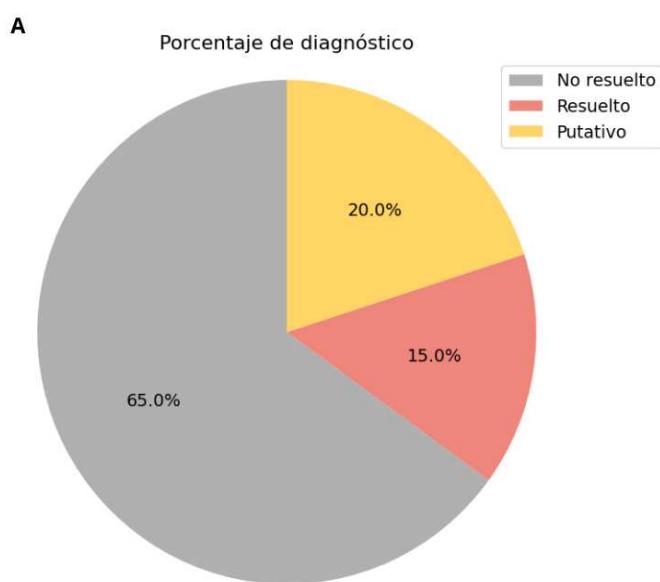


Figura 16: Análisis variantes halladas en la cohorte. A. Porcentaje de diagnóstico con variantes causales putativas (20%), variantes diagnósticas certeras (15%) y casos no resueltos (65%).

A medida que avanzan las investigaciones, se genera mayor evidencia que permite fortalecer la correlación entre el fenotipo clínico y las variantes genéticas. Paralelamente, los análisis genéticos se han vuelto más sofisticados, incorporando estrategias como el uso de paneles ampliados para incluir nuevas variantes, la búsqueda especializada de variantes que afectan el *splicing*, el análisis de variantes estructurales (CNVs) y la secuenciación del genoma completo (WGS), que permite la detección de variantes intrónicas y otras alteraciones genéticas previamente inaccesibles. Todos estos avances contribuyen a incrementar la tasa de diagnóstico y mejorar la comprensión de la etiología del HC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parks JS. Congenital Hypopituitarism. *Clin Perinatol.* 2018;45: 75–91.
2. Gregory LC, Cionna C, Cerbone M, Dattani MT. Identification of genetic variants and phenotypic characterization of a large cohort of patients with congenital hypopituitarism and related disorders. *Genet Med.* 2023;25: 100881.
3. Martinez-Mayer J, Vishnopska S, Perticarari C, Iglesias Garcia L, Hackbart M, Martinez M, et al. Exome Sequencing Has a High Diagnostic Rate in Sporadic Congenital Hypopituitarism and Reveals Novel Candidate Genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2024;109: 3196–3210.
4. Alatzoglou KS, Gregory LC, Dattani MT. Development of the Pituitary Gland. *Compr Physiol.* 2020;10: 389–413.
5. Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LYM, et al. Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. *Endocr Rev.* 2016;37: 636–675.
6. Amar AP, Weiss MH. Pituitary anatomy and physiology. *Neurosurg Clin N Am.* 2003;14: 11–23, v.
7. Scientific Image and Illustration Software. [cited 1 Feb 2025]. Available: <https://www.biorender.com/>
8. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Naturales F y. *Revista de la Academia colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales.* 2003.
9. Ward RD, Raetzman LT, Suh H, Stone BM, Nasonkin IO, Camper SA. Role of PROP1 in pituitary gland growth. *Mol Endocrinol.* 2005;19: 698–710.
10. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, et al. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development.* 1998;125: 4835–4840.
11. Cox B, Roose H, Vennekens A, Vankelecom H. Pituitary stem cell regulation: who is pulling the strings? *J Endocrinol.* 2017;234: R135–R158.
12. Treier M, Gleiberman AS, O'Connell SM, Szeto DP, McMahon JA, McMahon AP, et al. Multistep signaling requirements for pituitary organogenesis in vivo. *Genes Dev.* 1998;12: 1691–1704.
13. Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, et al. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development.* 2001;128: 377–386.
14. Brinkmeier ML, Potok MA, Davis SW, Camper SA. TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. *Dev Biol.* 2007;311: 396–407.
15. Charles MA, Mortensen AH, Potok MA, Camper SA. Pitx2 deletion in pituitary gonadotropes is

compatible with gonadal development, puberty, and fertility. *Genesis*. 2008;46: 507–514.

16. Andoniadou CL, Matsushima D, Mousavy Gharavy SN, Signore M, Mackintosh AI, Schaeffer M, et al. Sox2(+) stem/progenitor cells in the adult mouse pituitary support organ homeostasis and have tumor-inducing potential. *Cell Stem Cell*. 2013;13: 433–445.
17. Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL. Expression of three mouse homologs of the *Drosophila* segment polarity gene *cubitus interruptus*, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol*. 1994;162: 402–413.
18. Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG. Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. *Physiol Rev*. 2007;87: 933–963.
19. Wang Y, Martin JF, Bai CB. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Dev Biol*. 2010;348: 199–209.
20. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IL, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet*. 1998;19: 125–133.
21. Tajima T, Otake A, Hoshino M, Amemiya S, Sasaki N, Ishizu K, et al. OTX2 loss of function mutation causes anophthalmia and combined pituitary hormone deficiency with a small anterior and ectopic posterior pituitary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94: 314–319.
22. França MM, Jorge AAL, Carvalho LRS, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95: E384–91.
23. Couture C, Saveanu A, Barlier A, Carel JC, Fassnacht M, Flück CE, et al. Phenotypic homogeneity and genotypic variability in a large series of congenital isolated ACTH-deficiency patients with TPIT gene mutations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97: E486–95.
24. Glaser B, Kesavan P, Heyman M, Davis E, Cuesta A, Buchs A, et al. Familial hyperinsulinism caused by an activating glucokinase mutation. *N Engl J Med*. 1998;338: 226–230.
25. Cullingford DJ, Siafarikas A, Choong CS. Genetic Etiology of Congenital Hypopituitarism. In: Feingold KR, Anawalt B, Blackman MR, Boyce A, Chrousos G, Corpas E, et al., editors. *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2023.
26. Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet*. 2011;12: 745–755.
27. Rabbani B, Mahdieh N, Hosomichi K, Nakaoka H, Inoue I. Next-generation sequencing: impact of exome sequencing in characterizing Mendelian disorders. *J Hum Genet*. 2012;57: 621–632.
28. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9: 387–402.
29. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation

sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17: 333–351.

30. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, 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. *Genet Med*. 2015;17: 405–424.
31. gnomAD. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://gnomad.broadinstitute.org/>
32. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016;536: 285–291.
33. 1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Auton A, Brooks LD, DePristo MA, Durbin RM, et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*. 2012;491: 56–65.
34. Schofield PN, Hancock JM. Integration of global resources for human genetic variation and disease. *Hum Mutat*. 2012;33: 813–816.
35. Amberger JS, Bocchini CA, Schietecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res*. 2015;43: D789–98.
36. Nakaguma M, Ferreira NGBP, Benedetti AFF, Madi MC, Silva JM, Li JZ, et al. Allelic variants in established hypopituitarism genes expand our knowledge of the phenotypic spectrum. *Genes (Basel)*. 2021;12: 1128.
37. Popova L, Carabetta VJ. The use of next-generation sequencing in personalized medicine. ArXiv. 2024. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38495572>
38. Cecchin E, Stocco G. Pharmacogenomics and Personalized Medicine. *Genes (Basel)*. 2020;11. doi:10.3390/genes11060679
39. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009;25: 1754–1760.
40. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2013;43: 11.10.1–11.10.33.
41. Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29: 308–311.
42. Gudmundsson S, Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, et al. Addendum: The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2021;597: E3–E4.
43. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7: Unit7.20.
44. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31: 3812–3814.

45. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014;11: 361–362.
46. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res*. 2010;38: e164.
47. Bitgenia platform. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://apps3.bitgenia.com/>
48. Vishnopska SA, Mercogliano MF, Camilletti MA, Mortensen AH, Braslavsky D, Keselman A, et al. Comprehensive Identification of Pathogenic Gene Variants in Patients With Neuroendocrine Disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2021;106: 1956–1976.
49. Martinez-Mayer J, Brinkmeier ML, O'Connell SP, Ukagu A, Marti MA, Miras M, et al. Knockout mice with pituitary malformations help identify human cases of hypopituitarism. *Genome Med*. 2024;16: 75.
50. Pérez Millán MI, Vishnopska SA, Daly AZ, Bustamante JP, Seilicovich A, Bergadá 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;6: 514–525.
51. ClinVar. ClinVar. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
52. MetaDome web server. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://stuart.radboudumc.nl/metadome/dashboard>
53. DECIPHER v11.29: Mapping the clinical genome. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.deciphergenomics.org/>
54. Primer designing tool. [cited 2 Feb 2025]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?INPUT_SEQUENCE=%20EU563945.2LINK_LOC=nuccore
55. Website. Available: <https://www.rcsb.org/>
56. [No title]. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>
57. Website. Available: <https://www.jalview.org/>
58. Galaxy. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://usegalaxy.eu/>
59. Home - Nucleotide - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>
60. GLI3 GLI family zinc finger 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2737>
61. Courtney E, Swee DS, Ishak D, Ngeow J. A delayed diagnosis of Pallister-Hall syndrome in an adult male following the incidental detection of a hypothalamic hamartoma. *Human Genome Variation*. 2018;5: 1–5.
62. Entry - #146510 - PALLISTER-HALL SYNDROME; PHS - OMIM. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://omim.org/entry/146510>

63. PITX2 paired like homeodomain 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5308>
64. Entry - #180500 - AXENFELD-RIEGER SYNDROME, TYPE 1; RIEG1 - OMIM. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://omim.org/entry/180500?search=180500&highlight=180500>
65. Tümer Z, Bach-Holm D. Axenfeld–Rieger syndrome and spectrum of PITX2 and FOXC1 mutations. *European Journal of Human Genetics*. 2009;17: 1527–1539.
66. GLI2 GLI family zinc finger 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2736>
67. COL1A1 collagen type I alpha 1 chain [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277>
68. Website. Available: <https://omim.org/entry/166210>
69. Entry - #166210 - OSTEOGENESIS IMPERFECTA, TYPE II; OI2 - OMIM. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://omim.org/entry/166210?search=166210&highlight=166210>
70. de Carlos João Marques Luciana Naves G. Osteogenesis Imperfecta and Hypopituitarism: A Life-Long Consequences Case Report. *Journal of the Endocrine Society*. April-May 2019;3. doi:10.1210/js.2019-SUN-440
71. Kitamura T, Ishihara Y, Kusakabe T, Tsuiki M, Nanba K, Hiroshima-Hamanaka K, et al. A case of osteogenesis imperfecta caused by a COL1A1 variant, coexisting with pituitary stalk interruption syndrome. *Endocr J*. 2023;70: 839–846.
72. Wang D, Zhang M, Guan H, Wang X. Osteogenesis Imperfecta Due to Combined Heterozygous Mutations in Both COL1A1 and COL3A1, Coexisting With Pituitary Stalk Interruption Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019;10: 193.
73. Colman M, Castori M, Micale L, Ritelli M, Colombi M, Ghali N, et al. Atypical variants in COL1A1 and COL3A1 associated with classical and vascular Ehlers-Danlos syndrome overlap phenotypes: expanding the clinical phenotype based on additional case reports. *Clin Exp Rheumatol*. 2022;40 Suppl 134: 46–62.
74. Entry - #222300 - WOLFRAM SYNDROME 1; WFS1 - OMIM. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://omim.org/entry/222300?search=222300&highlight=222300>
75. WFS1 wolframin ER transmembrane glycoprotein [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7466>
76. Entry - #614296 - WOLFRAM-LIKE SYNDROME, AUTOSOMAL DOMINANT; WFSL - OMIM. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://omim.org/entry/614296?search=614296&highlight=614296>
77. de Muijnck C, Brink JBT, Bergen AA, Boon CJF, van Genderen MM. Delineating Wolfram-like syndrome: A systematic review and discussion of the WFS1-associated disease spectrum. *Surv Ophthalmol*. 2023;68: 641–654.
78. Medlej R, Wasson J, Baz P, Azar S, Salti I, Loiselet J, et al. Diabetes mellitus and optic

atrophy: a study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89: 1656–1661.

79. Inukai K, Awata T, Inoue K, Kurihara S, Nakashima Y, Watanabe M, et al. Identification of a novel WFS1 mutation (AFF344-345ins) in Japanese patients with Wolfram syndrome. *Diabetes Res Clin Pract.* 2005;69: 136–141.
80. VCV000907358.11 - ClinVar - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/907358/>
81. ARID2 AT-rich interaction domain 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/196528>
82. Entry - #617808 - COFFIN-SIRIS SYNDROME 6; CSS6 - OMIM. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://omim.org/entry/617808?search=617808&highlight=617808>
83. Database APS. AlphaFold Protein Structure Database. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/Q68CP9>
84. Shang L, Cho MT, Retterer K, Folk L, Humberson J, Rohena L, et al. Mutations in ARID2 are associated with intellectual disabilities. *Neurogenetics.* 2015;16: 307–314.
85. Wang X, Wu H, Sun H, Wang L, Chen L. ARID2, a Rare Cause of Coffin-Siris Syndrome: A Clinical Description of Two Cases. *Front Pediatr.* 2022;10: 911954.
86. Sobol M, Thuresson A-C, Palmberg N, Soussi Zander C. Proximal deletion 12q with a new insight to growth retardation. *Mol Syndromol.* 2020;11: 115–124.
87. ARL6 ARF like GTPase 6 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84100>
88. VCV000861499.4 - ClinVar - NCBI. [cited 2 Feb 2025]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/861499/>
89. gnomAD. [cited 2 Feb 2025]. Available: https://gnomad.broadinstitute.org/gene/ENSG00000113966?dataset=gnomad_r4
90. Kobayashi T, Hori Y, Ueda N, Kajihara H, Muraoka S, Shima F, et al. Biochemical characterization of missense mutations in the Arf/Arl-family small GTPase Arl6 causing Bardet-Biedl syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;381: 439–442.
91. Sadeghi-Nejad A, Senior B. Autosomal dominant transmission of isolated growth hormone deficiency in iris-dental dysplasia (Rieger's syndrome). *J Pediatr.* 1974;85: 644–648.