UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Causas genéticas del hipopituitarismo congénito: secuenciación genética de pacientes y estudio del desarrollo hipofisario en ratón (*Mus musculus*) y pez cebra (*Danio rerio*)

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Julián Jorge Martínez Mayer

Directora de tesis: Dra. María Inés Pérez Millán
Consejera de Estudios: Dra. María Belén Almejún
Lugar de trabajo: Instituto de Biociencias, Biotecnología y Biología traslacional, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Buenos Aires, 2025

Causas genéticas del hipopituitarismo congénito: Secuenciación genética de pacientes y estudio del desarrollo hipofisario en ratón (*Mus musculus*) y pez cebra (*Danio rerio*)

Las hormonas hipofisarias están involucradas en diferentes procesos biológicos como crecimiento, metabolismo, reproducción y respuestas frente al estrés. Las deficiencias hormonales hipofisarias son un importante problema en la salud humana. El hipopituitarismo congénito es causado por mutaciones en varios genes involucrados en el desarrollo embriológico, pero la mayoría de los pacientes carece de un diagnóstico genético certero.

En el marco de esta tesis se llevó a cabo un *screening* genético de una cohorte de pacientes pediátricos argentinos con hipopituitarismo congénito (N=137) mediante secuenciación de exoma completo. Un 19.1% de los casos esporádicos recibieron un diagnóstico genético definitivo, un porcentaje mayor que estudios genéticos previos en esta enfermedad. El gen más frecuentemente alterado en esta cohorte fue *ROBO1*, un resultado sorprendente dado que difiere a lo publicado para otras poblaciones. Además, se aportó evidencia a genes nuevos o poco frecuentes como *ARID5B* y *PIBF1*.

También se exploró la base de datos "*Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders*" en búsqueda de dismorfologías hipofisarias en ratones (*Mus musculus*) *knock-out* para 209 genes. Esto resultó en una lista de 51 genes candidatos a causar hipopituitarismo congénito. Se hallaron variantes patogénicas en dos de ellos, *MORC2* y *SETD5*, dentro de los diagnósticos definitivos de la cohorte.

Por último, se desarrolló un reportero *knock-in* para *prop1* en pez cebra (*Danio rerio*) y se generó un set de datos de scRNA-seq. Se logró describir transcriptos específicos de cada linaje celular, así como también analizar la trayectoria de la diferenciación celular. Utilizando este mismo transgénico, se generaron peces *knock-out* para *prop1* que mostraron un fenotipo tipo *dwarf*.

En resumen, en esta tesis doctoral se amplía el diagnóstico genético del hipopituitarismo congénito utilizando diferentes abordajes y se ofrece evidencia sobre la diversa etiología genética de esta enfermedad.

Palabras clave: diagnóstico genético, secuenciación por exoma completo, enfermedades poco frecuentes, PROP1, ROBO1, ratones *knock-out*, pez cebra reportero

Genetic causes of congenital hypopituitarism: Genetic sequencing of patients and study of pituitary development in mouse (*Mus musculus*) and zebrafish (*Danio rerio*)

Pituitary hormones are involved in different biological processes such as growth, metabolism, reproduction and stress response. Pituitary hormone deficiencies are an important human health issue. Congenital hypopituitarism is caused by mutations in many genes involved in embryonic development, however most of these cases still lack a genetic diagnosis.

We screened a cohort of Argentine pediatric patients (N=137) using whole exome sequencing. In this study 19.1% of the sporadic cases received a definitive genetic diagnosis, a result that surpasses previous studies on this same disease. The most commonly affected gene in our cohort was *ROBO1,* a surprising finding given what is known from other populations. We have also gathered evidence about new or rare genes such as *ARID5B* and *PIBF1*.

We also explored the "*Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders*" database, looking for pituitary dysmorphologies in *knock-out* mice (*Mus musculus*) for 209 genes. This resulted in a list of 51 genes considered candidates to cause congenital hypopituitarism. We found pathogenic variants for two of them, *MORC2* and *SETD5*, improving the definitive genetic diagnosis of our cohort.

Finally, we developed a *knock-in* reporter for *prop1* in zebrafish (*Danio rerio*) and generated a scRNA-seq dataset. We were able to describe lineage specific transcripts, and analyze the trajectory of cellular differentiation. We were also able to generate a *prop1 knock-out*, using this same reporter line, which showed a *dwarf*-like phenotype, similar to the one observed in mice.

To conclude, this doctoral thesis has improved the genetic diagnosis using various approaches and offers novel evidence on the diverse etiology of this disease.

Keywords: genetic diagnosis, whole exome sequencing, rare disease, PROP1, ROBO1, *knock-out* mice, zebrafish reporter

Dedicatoria

A mi abuelo, Roberto Martínez, que me enseñó el valor de la paciencia mientras pescabamos mojarritas en los lagos de Palermo y alimentó mi curiosidad a cada momento. Hoy puedo ejercer esa paciencia en el laboratorio, a veces para pescar peces no tan distintos de las mojarritas de los lagos, y puedo satisfacer, al menos en parte, esa curiosidad mediante la investigación.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL....6

1. Anatomía y desarrollo hipofisario en humanos.... 6

2. Linajes hipofisarios....8

3. Genética y señalización del desarrollo hipofisario.... 17

4. Hipopituitarismo congénito....20

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS....22

CAPÍTULO 1: Diagnóstico genético de pacientes pediátricos argentinos con hipopituitarismo congénito....24

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA....24

CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS.... 40

CAPÍTULO 1: RESULTADOS.... 48

CAPÍTULO 1: CONCLUSIONES.... 67

CAPÍTULO 2: Estudio de ratones *knock-out* en genes candidatos a causar hipopituitarismo congénito....69

CAPÍTULO 2: INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA....69

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.... 72

CAPÍTULO 2: RESULTADOS.... 74

CAPÍTULO 2: CONCLUSIONES.... 90

CAPÍTULO 3: Transcriptómica de célula única del desarrollo hipofisario en pez cebra (*Danio rerio*) a partir de animales reporteros para *prop1*.... 92

CAPÍTULO 3: INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA....92

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS.... 96

CAPÍTULO 3: RESULTADOS.... 104

CAPÍTULO 3: CONCLUSIONES.... 124

CONCLUSIÓN GENERAL.... 126

Bibliografía.... 127

Anexo - Capítulo 1....171

Anexo - Capítulo 2....219

Anexo - Capítulo 3....221

INTRODUCCIÓN GENERAL

La hipófisis es una glándula neuroendocrina, ubicada en la base del cerebro, por debajo del hipotálamo y sobre el paladar. Se encuentra situada sobre una estructura ósea denominada silla turca (*sella turcica* en latín), parte del hueso esfenoides. La glándula hipofisaria se divide en dos grandes lóbulos: el lóbulo anterior (*pars distalis*), de origen ectodérmico oral y el lóbulo posterior (*pars nervosa*), de origen ectodérmico neural. Entre ambos lóbulos se encuentra un pequeño lóbulo intermedio (*pars intermedia*), siendo más importante en ratones que en humanos, también de origen ectodérmico oral (Davis et al., 2016).

Esta tesis estará centrada particularmente en el funcionamiento del lóbulo anterior. El mismo produce y secreta diversas hormonas: hormona de crecimiento (GH del inglés ”*growth hormone*”), prolactina (PRL), hormona estimulante de la tiroides (TSH del inglés “t*hyroid stimulating hormone*”), hormona adrenocorticotrópica (ACTH del inglés “*adrenocorticotropic hormone*”), hormonas gonadotrópicas, foliculoestimulante (FSH del inglés “*follicle-stimulating hormone*”) y luteinizante (LH del inglés “*luteinizing hormone*”) y las hormonas estimulantes de melanocitos (MSH del inglés “*melanocyte-stimulating hormones*”). Todas ellas cumplen importantes funciones dentro de distintos procesos, como crecimiento, metabolismo, reproducción y respuestas al estrés, entre otros.

La hipófisis es un órgano central en el sistema endócrino, formando parte del eje Hipotálamo - Hipófisis - Órgano *target*. El hipotálamo es el centro sensorial de los requerimientos hormonales del organismo y libera péptidos/hormonas que regulan la transcripción, síntesis y secreción de las hormonas hipofisarias que luego actúan en sus órganos blancos.

1. Anatomía y desarrollo hipofisario en humanos

En humanos, la hipófisis se encuentra en estrecho contacto con el hipotálamo de manera dorsal, conectada íntimamente por el tallo hipofisario, de origen neural. Ventralmente está rodeada por la silla turca, derivada del paladar. La parte anterior de la hipófisis o *pars distalis* es la responsable de la secreción de GH, PRL, TSH, ACTH, FSH y LH. Mientras que en el lóbulo intermedio o *pars intermedia*, se secreta principalmente α-MSH. La hipófisis posterior o *pars nervosa*, es de origen neural y secreta oxitocina y vasopresina.

El desarrollo hipofisario en humanos comienza previo a la semana 5 de gestación. Durante esta parte del desarrollo el ectodermo neural y el ectodermo oral entran en contacto

y la pre-placoda hipofisaria comienza a ser inducida. Durante la semana 5 (Figura 1a), el ectodermo oral se encuentra ya en contacto con el ectodermo neural, en la zona del diencéfalo, que dará lugar al hipotálamo y ha comenzado su invaginación. Este estadío se designa como RPR por sus siglas en inglés de *Rathke's pouch* (RP) *rudiment*. La invaginación se completa entre las semanas 6 y 8, donde se comienza a estrechar la relación con el diencéfalo y a formar el tallo hipofisario (Figura 1b-c). Es en la semana 7 también donde el ectodermo oral se separa de manera definitiva de la hipófisis anterior, mediante el cierre del cartílago que antecede a la formación del hueso esfenoides. Durante la semana 9 se comienza a dar una expansión anterior del RP y una pérdida de la identidad epitelial. Esta expansión marca el comienzo de la diferenciación de los progenitores, de la zona marginal del RP, hacia el parénquima. A la semana 13 esta expansión anterior continúa y el tallo hipofisario se encuentra robustamente formado (Figura 1d). Ya a la semana 21 el tallo está rodeado por completo de tejido hipofisario anterior y las únicas células epiteliales coinciden con las células madres en la zona marginal, próxima a la pars intermedia (Figura 1e). A partir de esta semana las estructuras generales de la hipófisis se encuentran ya correctamente formadas y deben continuar el proceso de maduración y diferenciación (Ikeda et al., 1988) (Figura 1f).

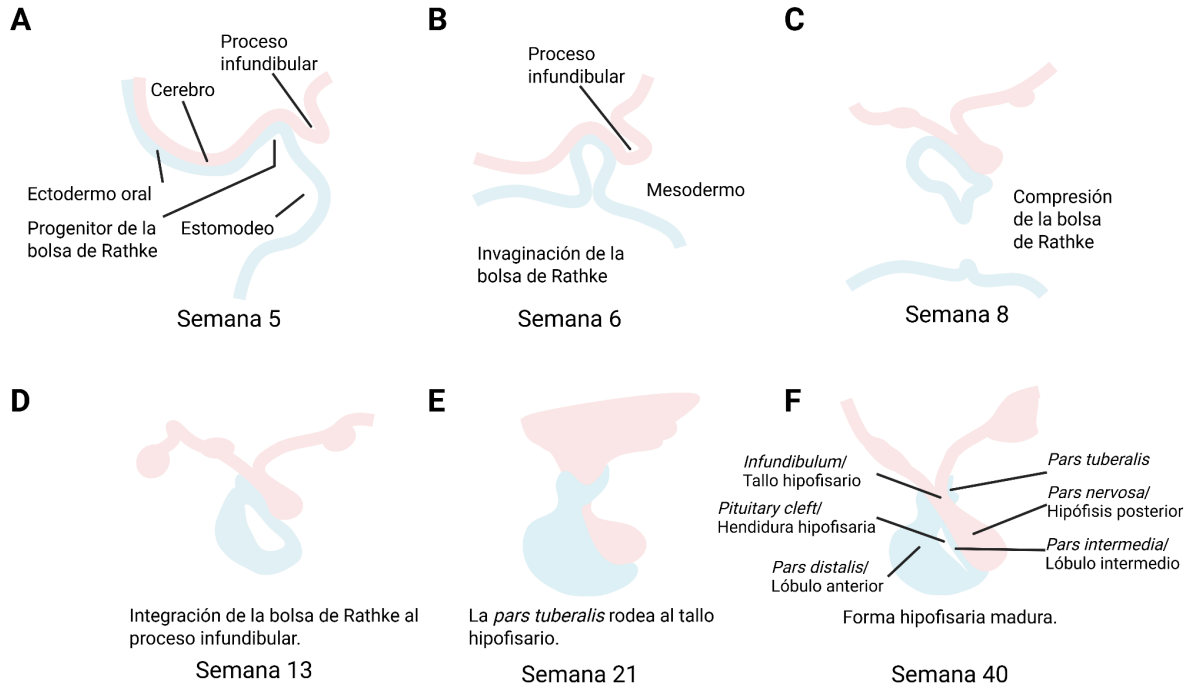

Figura 1. Desarrollo de la hipófisis humana.

La diferenciación celular comienza entre las semanas 9 y 13, como se indicó anteriormente, donde la primera hormona en ser detectada es ACTH y en mucho menor

medida TSH a la semana 9. A la semana 13 son detectables también GH y LH, mientras que FSH y PRL son detectadas recién a la semana 21 (Ikeda et al., 1988).

A continuación se presentan de manera general las funciones de cada una de estas hormonas y las células que las producen, su regulación y las consecuencias de sus deficiencias (Figura 2).

2. Linajes hipofisarios

Cada uno de los linajes hipofisarios se especializa en producir una hormona específica que regula funciones esenciales del organismo y están regulados finamente por su interacción con el hipotálamo (Figura 2). A continuación se describen de manera esquemática las regulaciones de cada uno de estos ejes.

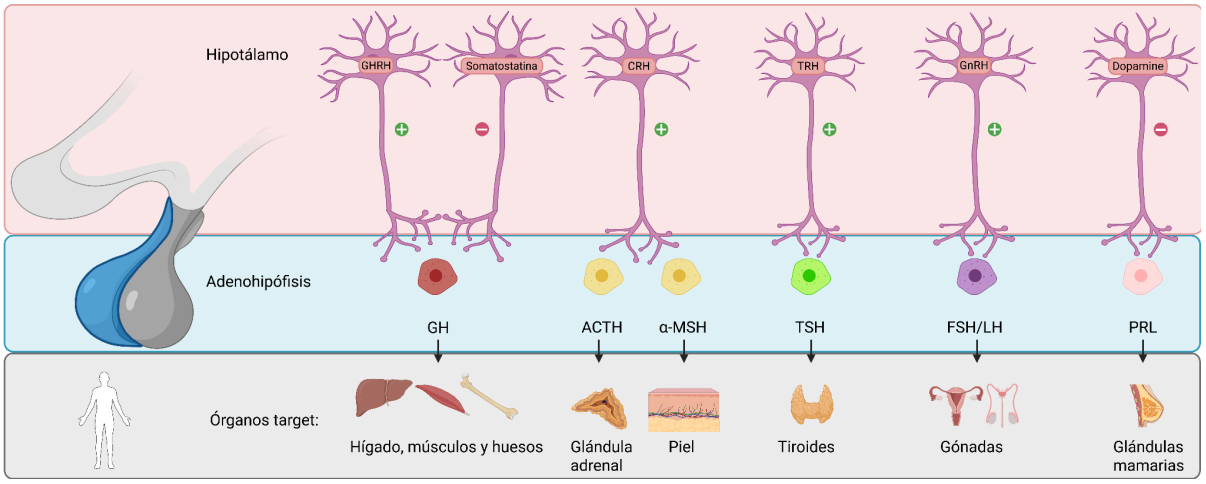

Figura 2. Linajes hipofisarios, su regulación mediada por neuronas hipotalámicas y sus tejidos *target*.

2.a - Eje hipotálamo - hipofisario - GH

La hormona de crecimiento o GH es producida por los somatotropos y es la encargada de estimular el crecimiento postnatal. Su efecto es mediado a través de la unión y activación del receptor de GH (GHR), de expresión ubicua en todas las células del organismo. Este estímulo es especialmente importante para el crecimiento de los huesos y músculos esqueléticos, que determinan el tamaño del individuo adulto (Brinkman et al., 2023). La activación de JAK2 luego de la unión de GH a GHR lleva a la activación de la expresión de IGF-1 mediante la fosforilación de proteínas STAT (Han et al., 1996). Es importante destacar que el hígado es un órgano con una gran contribución a la producción y liberación de IGF-1. Una vez en circulación, IGF-1 se une a diversas proteínas (IGFBPs), que definen su vida media en sangre y ayudan a la acción prolongada sobre el receptor de IGF1 (IGF1R) (Allard et al., 2018). La activación de IGF1R lleva a su vez a la activación de

vías celulares que estimulan el crecimiento, como por ejemplo la vía de mTor (Latres et al., 2005).

La síntesis y secreción de GH están finamente controladas, mediante una serie de *feedback loops*. La principal regulación es a nivel de su secreción, dada por el control hipotalámico. Los somatotropos expresan receptores para la hormona liberadora de GH liberada por neuronas hipotalámicas (GHRH). Una vez que los somatotropos reciben esta señal comienzan a producir y secretar GH. Altos niveles de GH funcionan como un *feedback loop* negativo autocrino, disminuyendo la secreción. Sin embargo, la mayor parte del *feedback loop* negativo está dado por la circulación de IGF-1, como respuesta sistémica a la secreción de GH. Altos niveles de IGF-1 llevan a una reducción de los niveles de GHRH, reduciendo así nuevamente los niveles de secreción de GH. Este ciclo de producción y liberación de GH tiene un patrón pulsátil ultradiano así como circadiano. Es importante notar que hay un segundo jugador hipotalámico que regula la secreción de GH, la somatostatina. Esta hormona tiene el rol inverso, reduciendo la producción de GH al unirse a su receptor en los somatotropos. Del mismo modo, su *feedback* es también inverso, altos niveles de GH e IGF-1 favorecen la producción de somatostatina, reduciendo los niveles de GH (Figura 3). También existe una regulación cruzada entre somatostatina y GHRH, donde altos niveles de somatostatina llevan a una supresión de GHRH, magnificando así su efecto supresor en la secreción de GH (Steyn et al., 2016).

Es evidente que la regulación de la producción de GH y su efecto sobre el crecimiento están finamente regulados. En consecuencia, una desregulación de este eje lleva invariablemente a problemas de crecimiento. Esta deficiencia puede tener orígenes hipotalámicos (GHRH) o hipofisarios (GH), ambos considerados parte del hipopituitarismo congénito, como se discutirá más adelante. Afortunadamente existe un análogo de GH, la GH recombinante (rGH), que se encuentra disponible como tratamiento. Se considera de vital importancia un tratamiento con rGH una vez que se obtiene el diagnóstico de deficiencia de GH, debido a que los pacientes son en su mayoría pediátricos y la compensación o *catch-up* disminuye dramáticamente luego del inicio de la pubertad, etapa en la cual la placa de crecimiento deja progresivamente de responder a GH y se alcanza la altura adulta.

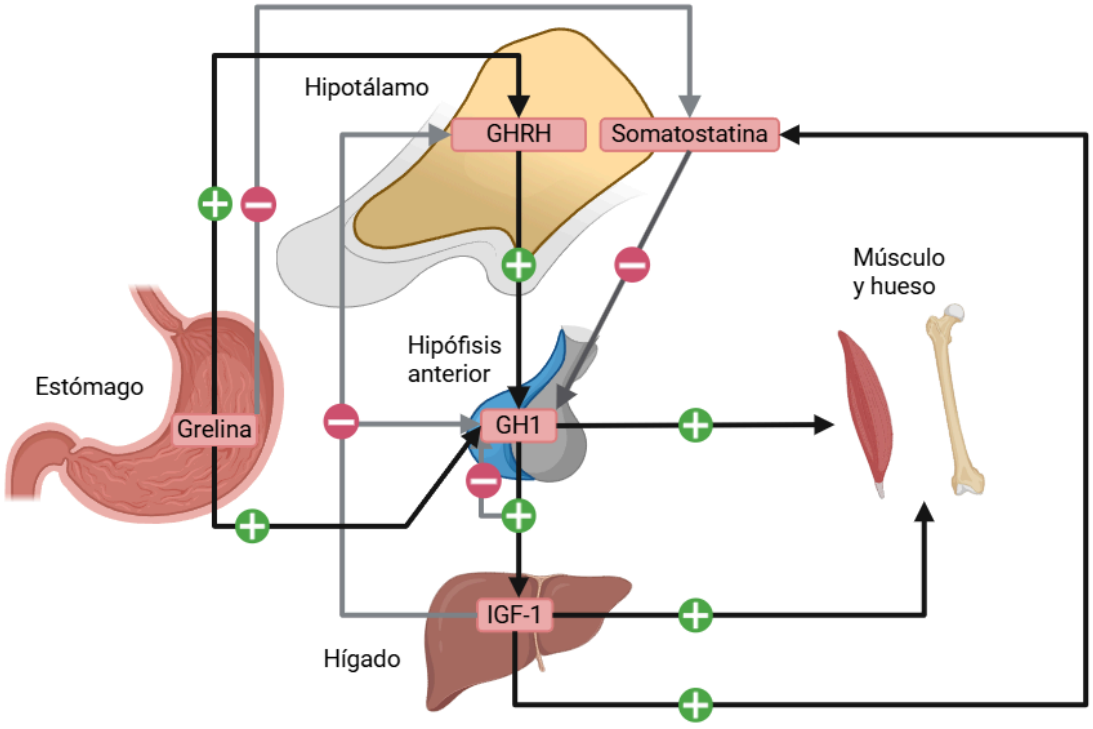

Figura 3. Eje y regulación del eje hipotálamo-hipofisario-GH.

2.b - Eje hipotálamo - hipofisario - adrenal (ACTH)

La producción y liberación de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) están mediadas por la hormona liberadora de corticotropina (CRH), producida en el hipotálamo. La CRH se une a los receptores de hormona liberadora de corticotropina tipo 1 (CRHR1), expresados en los corticotropos de la hipófisis anterior. La ACTH, producida por los corticotropos, deriva del péptido proopiomelanocortina (POMC). Este péptido es procesado en diversos subproductos (Figura 4). En primer lugar la prohormona convertasa 1 (PCSK1) cliva POMC en pro-ACTH y □-LPH. La misma enzima cliva nuevamente pro-ACTH en N-POMC y ACTH. Mientras que N-POMC da ɣ-MSH, ACTH puede salir a circulación o bien ser procesada por la prohormona convertasa 2 (PCSK2) para dar α-MSH (ver eje 2.c hipotálamo-hipofisario-MSH). Una vez liberada, la acción de ACTH es ejercida en la corteza adrenal, donde induce la síntesis y secreción de cortisol. Este sistema de producción de cortisol está también regulado por un *feedback loop* negativo hipotalámico. Altos niveles de cortisol en sangre llevan a una reducción en la producción de CRH, disminuyendo por lo tanto los niveles de ACTH, permitiendo el retorno a la homeostasis (Figura 5).

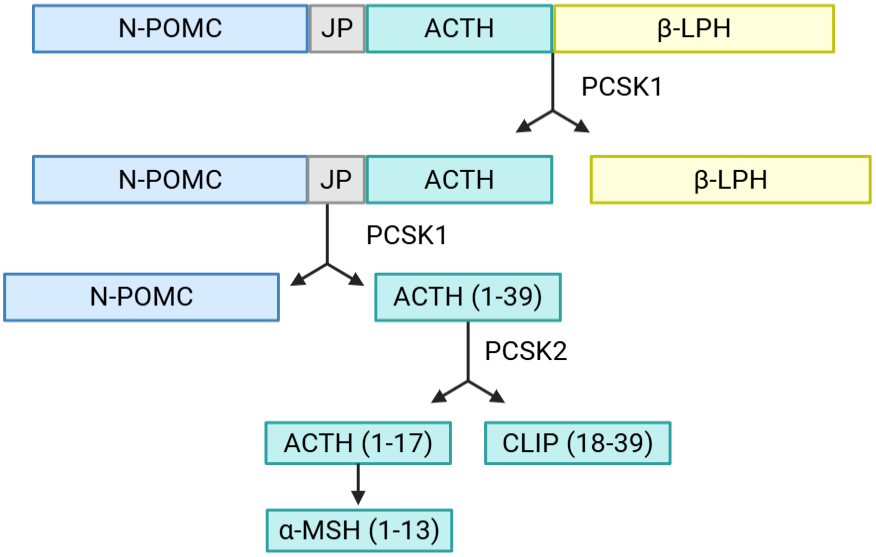

Figura 4. Producción y procesamiento de POMC.

La desregulación del eje hipofisario-adrenal es particularmente peligrosa, especialmente en infantes, pudiendo ser letal si no es debidamente diagnosticada y tratada. En el caso de la insuficiencia adrenal secundaria o central, se ve afectada únicamente la producción de cortisol, lo que la distingue de la insuficiencia primaria, donde la glándula adrenal pierde función por completo. La falta de cortisol en neonatos y pacientes pediátricos puede llevar a ictericia prolongada, vómitos, deshidratación, taquicardia, convulsiones, hipoglucemia e hiponatremia. En estos pacientes es vital una rápida suplementación con corticoides sintéticos, generalmente mediante hidrocortisona oral.

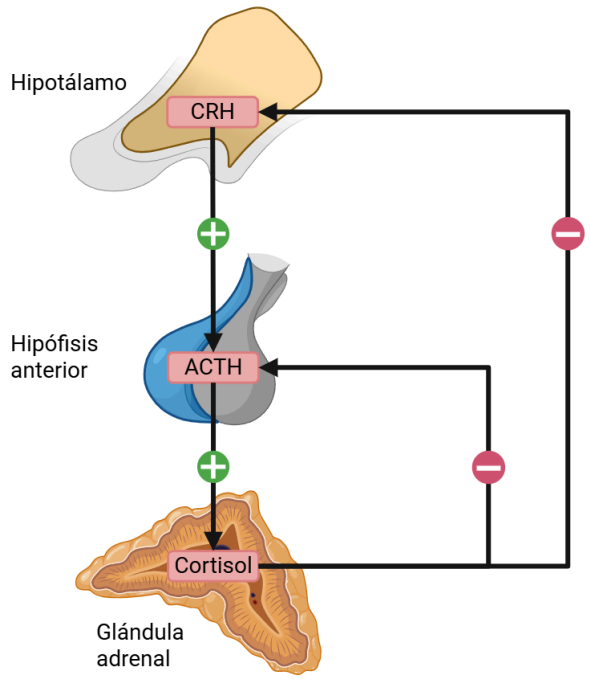

Figura 5. Eje hipotálamo-hipofisario-adrenal.

2.c - Eje hipotálamo - hipofisario - α-MSH

Como se explicó anteriormente, la producción de α-MSH por parte de los melanotropos depende de múltiples clivajes de POMC. Una vez en circulación α-MSH es capaz de unirse a los receptores de melanocortina tipo 1, 3, 4 y 5 (MC1R, MC3R, MC4R y MC5R), presentes principalmente en los melanocitos de la piel. Esta unión lleva a la activación de proteínas G, un elevamiento de los niveles de AMP cíclico, la activación de PKA y la activación del factor de transcripción MITF. MITF es el factor de transcripción responsable de activar la producción de melanina (Figura 6). Por lo tanto α-MSH es responsable de la producción de melanina en la piel, aunque dista de ser el única efector. Si bien los niveles de esta hormona no son marcadamente distintos entre distintos tipos de piel, sí se conocen polimorfismos en *MC1R* que influencian el tono de piel, probablemente modulando la vía de activación mediada por α-MSH (Makova et al., 2005).

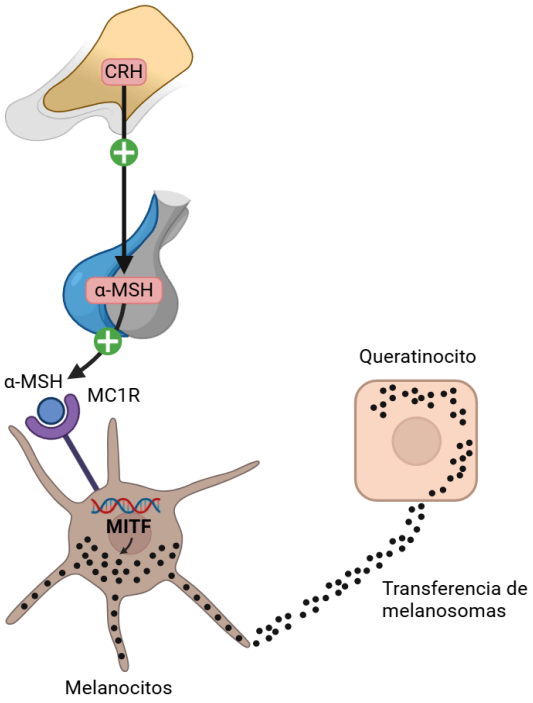

Figura 6. Eje hipotálamo-hipofisario-MSH.

Dado que α-MSH comparte el mismo precursor que ACTH (POMC), no existen ejemplos de desregulación de α-MSH aislada. Algunos ejemplos de desregulación de α-MSH incluyen la enfermedad de Addison y deficiencia de POMC aislada. En la enfermedad de Addison una falla adrenal lleva a una sobreproducción de ACTH y por lo tanto a una sobreproducción de α-MSH e hiperpigmentación. En el caso de la deficiencia de POMC aislada, los pacientes presentan pelo rojizo, además de insuficiencia adrenal y obesidad. Este mismo fenotipo de pelo rojizo es observado en personas que presentan mutaciones inactivantes en MC1R, caso en el que la señalización de α-MSH no puede ser transmitida correctamente (Flanagan et al., 2000).

2.d - Eje hipotálamo - hipofisario - tiroideo (TSH)

La hormona estimulante de la tiroides (TSH), producida por los tirotropos, es la encargada de estimular la producción de hormonas tiroideas en la glándula tiroides. Esta hormona cumple su función en forma de heterodímero entre una subunidad beta (codificada por el gen *TSHB*) y CGA (subunidad alfa). La subunidad alfa forma parte de otros tres heterodímeros (junto con LH, FSH y HCG), mientras que la unidad beta es la que confiere especificidad a la hormona TSH. La liberación de TSH está regulada de forma hipotalámica por la hormona liberadora de tirotropina (TRH). La TRH hipotalámica se une al receptor de TRH (TRHR) en los tirotropos y lleva a la liberación de TSH. La TSH circula hasta la glándula tiroidea, donde se une a su vez al receptor de TSH (TSHR). La activación de este receptor lleva a la activación de proteínas G, lo que estimula la incorporación y organificación del ioduro en la tiroides. Esto es necesario para la síntesis y posterior secreción de triyodotironina (T3) y tiroxina (T4) por parte de la glándula tiroides. La T3 es la versión activa de la hormona y aunque la mayor parte de la secreción tiroidea es en forma de T4, la T4 puede ser convertida a T3 de forma periférica por la 5' deiodinasa (DIO3). La T3 y la T4 ejercen su efecto en la enorme mayoría de las células del cuerpo, a las que ingresan por transportadores específicos. La T3 tiene la capacidad de unirse a los receptores nucleares de hormona tiroidea (TRHA y TRHB). Una vez activados, estos receptores heterodimerizan con el receptor X retinoide (RXR) y se unen a elementos de respuesta tiroideos (TREs). Esto lleva a la transcripción de diversos genes y la elevación general del metabolismo celular. La regulación de este eje también cuenta con un *feedback loop* negativo, en el que niveles elevados de T3 y T4 llevan a menores niveles de liberación de TRH y TSH. De hecho, la hipófisis anterior es muy sensible a modificaciones de los niveles de T3 y T4, por lo que en muchos casos es posible detectar niveles de TSH fuera de lo normal, más tempranamente que niveles anormales de T3 y T4 (Figura 7).

Los niveles bajos de T3 y T4 pueden tener diversas causas, entre ellas enfermedades autoinmunes como tiroiditis de Hashimoto, deficiencia de iodo o hipopituitarismo congénito. Los síntomas más comunes incluyen fatiga, baja tasa metabólica, aumento de peso acompañado de pérdida del apetito, sensibilidad al frío, entre otros. Normalmente el hipotiroidismo es tratado con una suplementación de levotiroxina, un análogo sintético de larga vida de la T4 (Brent, 2012).

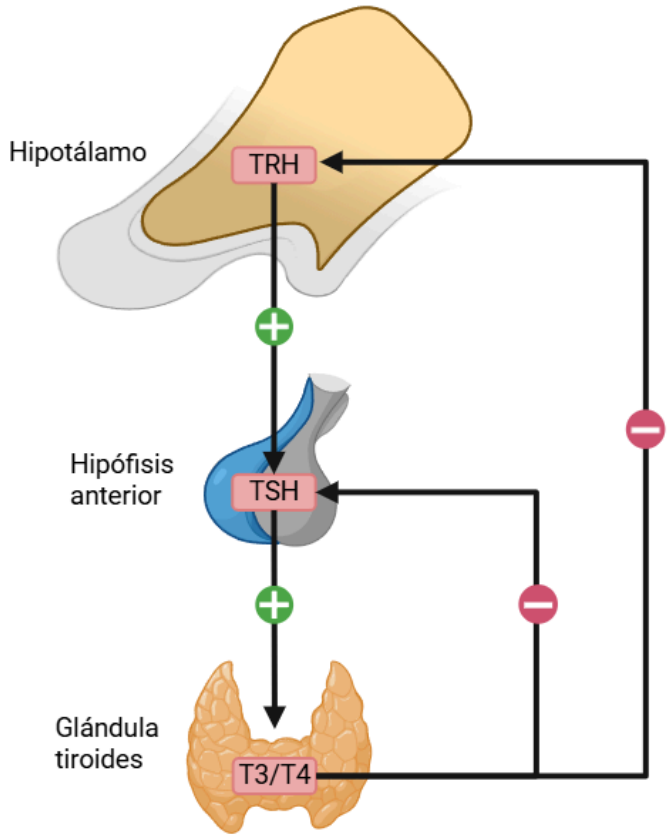

Figura 7. Eje hipotálamo-hipofisario-tiroideo.

2.e - Eje hipotálamo - hipofisario - gonadal (FSH/LH)

El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (HHG) tiene la particularidad de permanecer apagado durante la infancia, excepto por un período breve que recibe el nombre de mini-pubertad. Su posterior activación depende de múltiples factores y lleva al comienzo de la pubertad. A continuación se explorarán la regulación y funcionamiento general de este eje, así como la mini-pubertad, su activación puberal y las diferencias entre sexos.

La regulación del eje HHG viene dada por neuronas hipotalámicas especializadas, que generan un pulso de GnRH. Este pulso de GnRH es secretado hacia la hipófisis, donde los gonadotropos, que expresan el correspondiente receptor (GNRHR), comienzan a expresar hormona foliculoestimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH). Es importante notar que la secreción hipofisaria de FSH y LH es modulada finamente por los pulsos de GnRH, siendo importantes tanto su amplitud como su intensidad. FSH y LH circulan por la sangre hasta encontrar sus receptores (FSHR y LHCGR, respectivamente) en las gónadas, donde inducen la síntesis de esteroides sexuales (Figura 8).

En el caso de los ovarios, la síntesis se da en primer lugar en las células de la teca, donde se produce androstendiona y testosterona, las cuales difunden y son usadas como

precursores para la síntesis de estrógeno en las células de la granulosa, donde también se sintetiza progesterona. En particular FSH estimula la producción de estrógeno, mientras que ese pico de estrógeno coincide con un pico de LH, concordante también con un segundo pico de FSH, generando la ovulación. En la fase lútea, los niveles de FSH y LH disminuyen, y se da un marcado aumento de progesterona. Este es un ejemplo de *feedback loop* negativo, donde altos niveles de progesterona circulantes tienen un efecto directo e inhibitorio sobre la regulación central del eje, a nivel tanto hipotalámico como hipofisario.

En el caso de los testículos, las células de Leydig producen y secretan testosterona en respuesta a LH, mientras que las células de Sertoli responden a FSH, que estimulan la mitosis y meiosis necesaria para la maduración de los espermatozoides. Altos niveles de testosterona tienen un efecto central directo e inhibitorio, generando un *feedback loop* negativo que controla la homeostasis de este eje (Figura 8).

A lo largo de la vida el eje HHG pasa por múltiples instancias de activación. La mini-pubertad es el segundo momento de activación del eje, luego de su activación transiente durante la gestación para determinar las características sexuales primarias. Este período de mini-pubertad ocurre a los pocos meses de nacer, en general entre 2 y 3 meses de edad, y continúa hasta los 6 meses en niños, mientras que en niñas se puede extender hasta los 4 años de edad. Durante esta etapa la hipófisis responde a pulsos de GnRH, liberando FSH/LH y generando esteroides sexuales en niveles comparables con adultos. En niños este período es clave para la maduración inicial de los testículos, permitiendo su maduración completa en la pubertad. Bajos niveles de hormonas sexuales durante esta etapa pueden ser un signo de desórdenes de la vía HHG. Luego de esta mini-pubertad el eje vuelve a un estado inactivo, en el que permanecerá hasta la pubertad.

Durante la pubertad el eje vuelve a activarse, esta vez con mayor intensidad, tanto en la amplitud como la frecuencia de los pulsos de GnRH hipotalámicos. Esta activación depende de múltiples factores, incluyendo factores ambientales como pueden ser la dieta, la masa muscular, la masa adiposa y factores epigenéticos. Los primeros indicadores puberales son la aparición de vello púbico, el aumento del volumen testicular en hombres y el desarrollo mamario en mujeres (Spaziani et al., 2020). Un retraso en la aparición de estos indicadores puede indicar una disrupción del eje HHG. En estos casos se debe intentar distinguir entre un caso de hipogonadismo hipogonadotrófico, que requiere necesariamente de una intervención farmacológica para el inicio de la pubertad, de un retraso constitutivo del crecimiento y la pubertad. En los casos que se requiera un tratamiento farmacológico, el mismo consiste en reemplazos hormonales, usualmente inyecciones de testosterona en hombres y de estrógeno y progesterona en mujeres (Voutsadaki et al., 2022). En el caso de

que los indicadores puberales se presenten anticipadamente, se habla de pubertad precoz. En estos casos es importante una intervención farmacológica para frenar la maduración sexual, que viene acoplada a un cierre de las placas de crecimiento óseas, y de no ser tratada puede generar una baja talla. En estos casos el tratamiento suele consistir en un análogo de GnRH, que compite con el endógeno e impide la estimulación hipofisaria, demorando de este modo la maduración sexual (Lee et al., 2006).

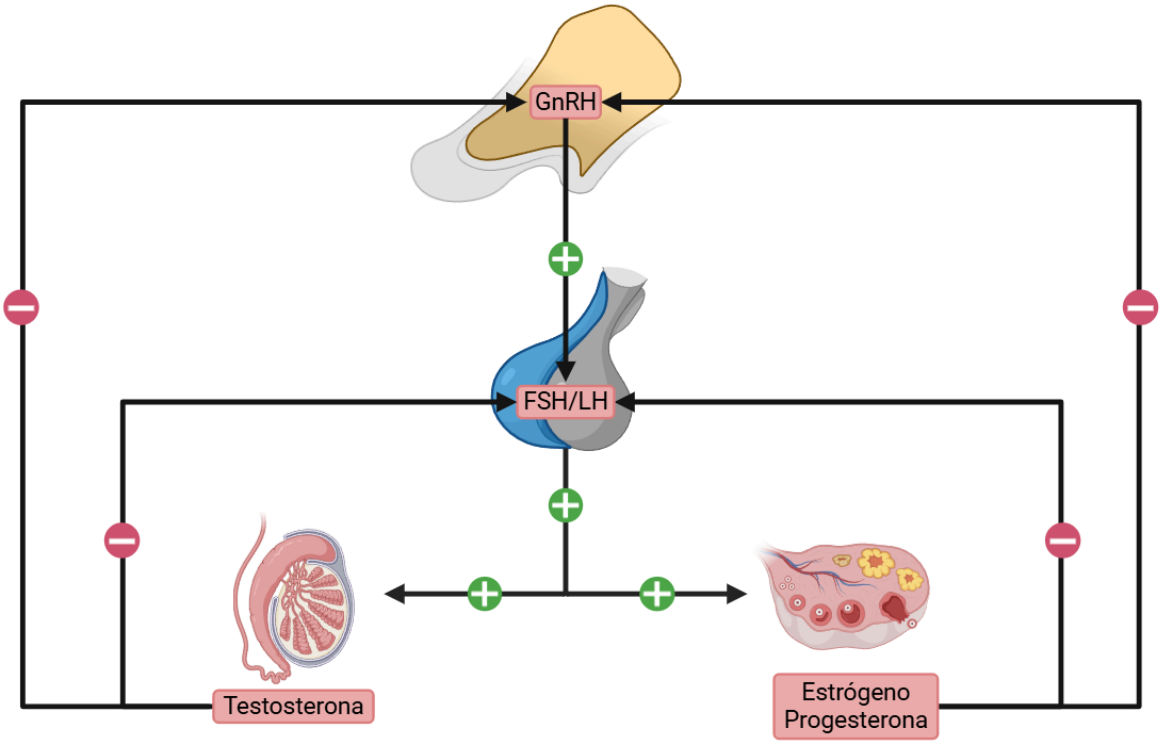

Figura 8. Eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

2.f- Eje hipotálamo - hipofisario - PRL

La prolactina (PRL) es producida por los lactotropos en la hipófisis anterior y ejerce su efecto a través de receptores específicos (PRLR), que se expresan en diversos tejidos, particularmente en gónadas (ovarios) y glándulas mamarias, pero también hay expresión a nivel del sistema nervioso central y tejido adiposo. La activación de PRLR lleva a la fosforilación de JAK2, que a su vez induce la fosforilación de proteínas STAT y lleva a cambios transcripcionales río abajo. Sus efectos biológicos se dan principalmente a nivel mamario y reproductivo. La principal regulación de la liberación y síntesis de PRL es a través de la dopamina liberada por neuronas del hipotálamo, que funciona como un constante supresor. Luego, la prolactina misma actúa sobre el hipotálamo para continuar con esta supresión (Grattan 2015).

En la glándula mamaria, PRL controla su crecimiento, así como la síntesis y secreción de leche. Es importante destacar que PRL no actúa sola en estos procesos, sino

de manera coordinada con otras hormonas, como pueden ser estrógeno, progesterona y glucocorticoides para el crecimiento de la glándula y GH para la secreción de la leche. En humanos, la deficiencia aislada de PRL es muy poco frecuente, siendo más común en casos de deficiencias combinadas hipofisarias. En particular, la deficiencia de PRL es una de las pocas que no cuenta con un tratamiento efectivo.

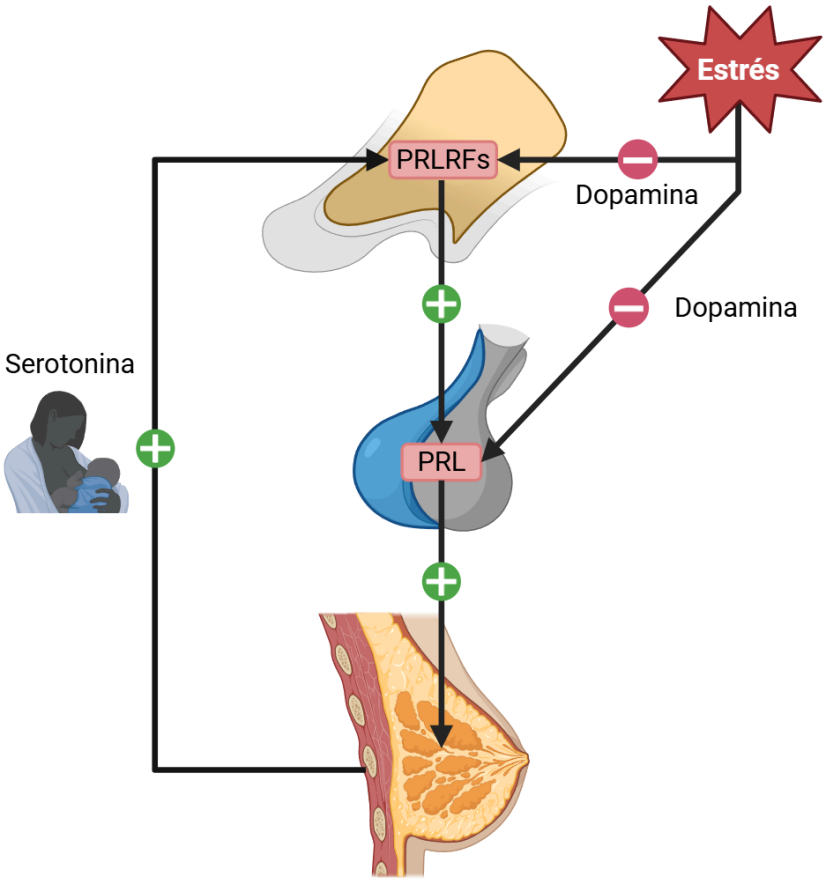

Figura 9. Eje hipotalámico-hipofisario-prolactina. “PRLRFs” = Factores liberadores de prolactina.

3. Genética y señalización del desarrollo hipofisario

Previamente, en la Introducción General, se describieron las etapas de la formación de la hipófisis. En esta sección se abordarán las vías de señalización y los genes involucrados en este proceso.

Las etapas del desarrollo hipofisario se encuentran extremadamente conservadas en mamíferos y en particular la caracterización de este proceso ha sido estudiada en detalle en ratones.

El primer paso del desarrollo hipofisario es la inducción de la placoda hipofisaria a partir del ectodermo pre-oral. Esta inducción se da en el lugar de contacto entre el

ectodermo oral y el ectodermo neural, en la línea media del surco neural anterior. Es en esta posición donde, al día 7.5 en ratones y previo a la semana 5 en humanos, comienza a darse un engrosamiento del ectodermo oral. Durante esta etapa del desarrollo las células de la placoda se encuentran en un estado de célula madre o *stem*, expresando marcadores como *Hesx1*, *Gli2* y *Sox2*. En cuanto al ectodermo neural, la señalización vía BMP4 es importante para la especificación de la placoda durante este período (Davis et al., 2007), mientras que la señalización vía FGF es importante para el *priming* de la evaginación del tallo hipofisario y la hipófisis posterior (Norlin et al., 2000). Al día 8.5 en ratones y semana 4 en humanos, el ectodermo pre-oral es especificado a ectodermo oral, mediante la inducción de factores de transcripción tipo PITX (en particular *PITX2*). De esta manera la placoda queda ubicada en la parte superior del paladar y da origen en primer lugar a la bolsa rudimentaria de Rathke o RPR, alrededor del día 9 en ratones y semana 5 en humanos. Esta RPR se produce luego de que el ectodermo oral *PITX2+* comienza a expresar *LHX3,* que puede considerarse el primer marcador hipofisario (aunque también se expresa en ciertos tipos de neuronas y células del ojo). Esta inducción e invaginación de la placoda para la formación la RP definitiva es altamente dependiente de SHH (Treier et al., 2001), que induce la expresión de *Bmp2*, mientras que la evaginación del ectodermo neural continúa dependiendo de FGFs.

Luego tiene lugar la formación de la RP definitiva, al día 10.5 en ratones y en las semanas 6 y 7 en humanos. Es durante este estadío que se comienza a expresar el factor de transcripción hipofisario específico *Prop1*. Estudios de *lineage tracing* han podido determinar que todas las poblaciones productoras de hormonas de la hipófisis anterior, incluyendo la pars intermedia, derivan de progenitores *Prop1+* (Davis et al., 2016). A partir de este punto se inicia un programa de diferenciación, que involucra una transición de tipo epitelio-mesenquimal o EMT, en el que esta población de progenitores, en principio homogénea, comienza a diferenciarse a los diversos linajes. La hipófisis anterior debe entonces, a partir de este progenitor único, generar seis poblaciones productoras de hormonas, cinco de ellas en el lóbulo anterior (GH, PRL, TSH, ACTH, FSH/LH) y una en el lóbulo intermedio (α-MSH). El proceso por el cual un único progenitor da lugar a todas estas poblaciones celulares ha sido y sigue siendo objeto de estudio.

A la inducción de *Prop1* le sigue la activación de *Pou1f1*, que especifica tres de estos cinco linajes (GH, PRL, TSH), de ahí su nombre *(**Prop1** = **Pro**phet **o**f **P**ou1f1).* Los factores necesarios para la especificación de cada uno de estos tres linajes en particular siguen sin estar completamente dilucidados. Ha sido demostrado que *Neurod4* es necesario para la correcta maduración de los somatotropos, dado que los ratones *knock-out* para este gen sufren retraso del crecimiento postnatal (Zhu et al., 2006). Otro factor relevante para la maduración de los somatotropos es *Foxo1*, posiblemente debido a su capacidad de inducir

la expresión de *Neurod4* (Kapali et al., 2016). Sin embargo, la comprensión de los mecanismos de maduración de este linaje es aún incompleta. Lo mismo puede decirse de la diferenciación de los lactotropos. El factor de transcripción *ZBTB20*, así como el estradiol, son necesarios para la expansión del linaje de PRL (Ogasawara et al., 2008, Cao et al., 2016). La iniciación de la especificación de este linaje sigue sin estar clara. El tercero de los linajes *Pou1f1* dependientes, los tirotropos, es probablemente el mejor estudiado de los tres. Este linaje comparte similitudes con los gonadotropos, dado que ambos expresan los factores de transcripción maestros *Isl1* y *Gata2*, además de compartir la subunidad alfa (CGA) a nivel hormonal. Sin embargo, los tirotropos derivan mayoritariamente de una población *Pou1f1*$^{+}$ mientras que los gonadotropos derivan de progenitores *Pou1f1*$^{-}$. Existe también una población de tirotropos llamados de la punta rostral, que tienen un origen distinto del resto y derivan de progenitores *Pou1f1*$^{-}$, descrito en ratones. Esto sugiere que *Pou1f1* no es estrictamente necesario para la diferenciación de este linaje, aunque sí lo son *Isl1* y *Gata2*.

La diferenciación de los gonadotropos sigue un camino similar al de los tirotropos, pero estos no pasan por un estadío *Pou1f1*$^{+}$. Ese linaje también atraviesa un estadío *Isl1*$^{+}$*/Gata2*$^{+}$, en el que se comienza a expresar *Foxl2* (Ellsworth et al., 2006). *Foxl2* también es un factor de transcripción esencial para el desarrollo de las gónadas (Danti et al., 2025). Esto antecede la expresión del marcador definitivo *NR5A1*, que codifica para el factor de transcripción SF1 (*steroidogenic factor 1*). La expresión de este factor determina por completo el linaje, llevando a la expresión de los genes característicos de gonadotropos como *LHB* y *FSHB*.

Los dos linajes restantes, corticotropos y melanotropos, derivan de un progenitor común. Esta diferenciación dicotómica de este progenitor común fue uno de los primeros paradigmas de diferenciación hipofisarios en estudiarse en profundidad en ratones. El progenitor común a melanotropos y corticotropos comienza a expresar el factor de transcripción *Tbx19* (también conocido como *Tpit*). Esto a su vez estimula la expresión de POMCA, a partir del cual, dependiendo de qué enzimas lo procesen, puede generarse tanto ACTH como α-MSH (ver ejes hipotálamo-hipofisario-ACTH /α-MSH). Este progenitor *Tbx19*$^{+}$ puede dar origen a dos linajes, uno que mantiene la expresión de *Tbx19* y da lugar a corticotropos y un segundo linaje en el que se comienza a expresar *Pax7*. La expresión de *Pax7* lleva a la expresión de genes específicos de melanotropos (e.g. *Pcsk2* u *Oacyl*) (Budry et al., 2012).

Mutaciones en uno o más de uno de estos genes involucrados en el desarrollo hipofisario causan enfermedades en humanos, siendo la más frecuente el hipopituitarismo congénito.

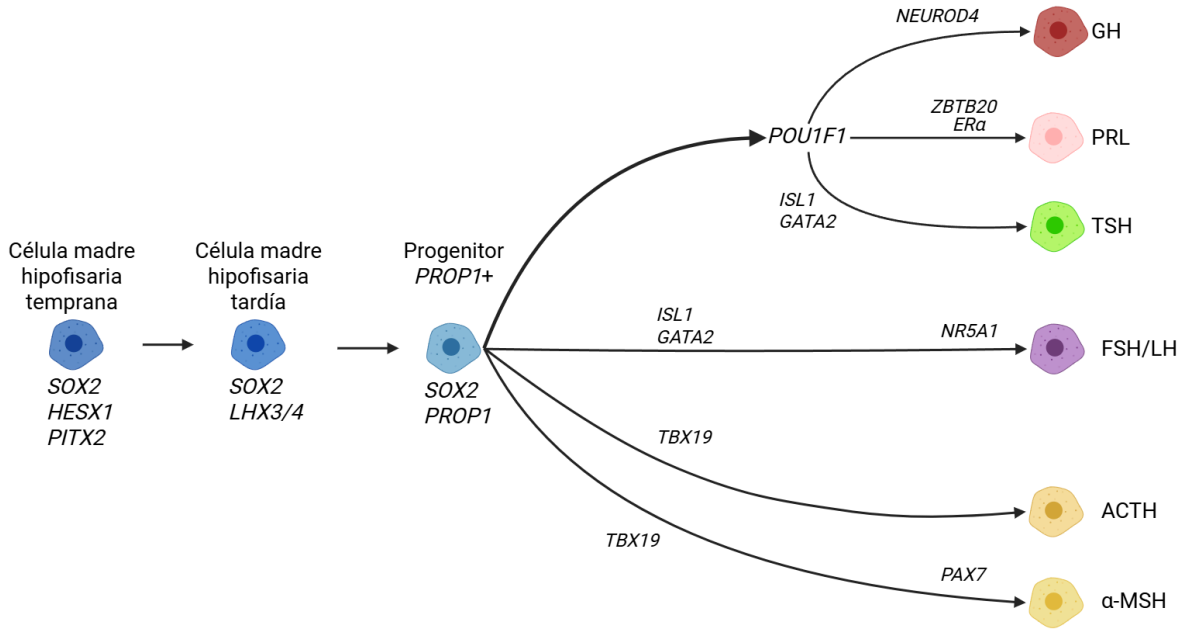

Figura 10. Diferenciación de los linajes de la hipófisis anterior e intermedia en mamíferos. Se muestran los distintos tipos celulares, los estadíos que atraviesan y los principales factores de transcripción involucrados en cada etapa del proceso

4. Hipopituitarismo congénito

El hipopituitarismo es un trastorno caracterizado por el funcionamiento insuficiente de la glándula hipofisaria y tiene como consecuencia la deficiencia de una o varias hormonas. El hipopituitarismo puede tener un origen congénito o adquirido. Los casos congénitos suelen darse en la niñez de forma esporádica mayoritariamente, aunque existen casos familiares. Los casos adquiridos suelen presentarse en adultos, generalmente como consecuencia de traumas, tumores, oncoterapia o infecciones. En esta sección y a lo largo de esta tesis, se discutirá únicamente el hipopituitarismo congénito (HC).

El HC afecta a aproximadamente 1 de cada 4000 nacidos vivos, siendo una enfermedad poco frecuente (Pierce et al., 2016). Dentro del HC existen diferentes categorías dependiendo de qué ejes se encuentren afectados. Normalmente se engloban en dos grandes grupos, las deficiencias aisladas (donde solo una hormona es afectada), generalmente IGHD (*isolated growth hormone deficiency*) o en casos más raros ICeCH

(*isolated central congenital hypothyroidism*) o bien deficiencias combinadas, comúnmente llamadas CPHD (*combined pituitary hormone deficiency*).

A pesar de tratarse de una enfermedad poco frecuente, se considera que el HC tiene un tratamiento efectivo, ya que existen reemplazos hormonales para prácticamente todas las hormonas afectadas. Sin embargo, la etiología a nivel genético de la mayoría de los casos de HC sigue sin comprenderse. Las causas genéticas son múltiples (Tabla suplementaria 1.1), con patrones de herencia de todo tipo. Además, la mayoría de los casos de HC, sean aislados o combinados, suelen tener manifestaciones extra-hipofisarias, que muchas veces tienen orígenes poco claros y no cuentan con tratamientos efectivos (por ejemplo, polidactilia o retraso global del desarrollo). Las manifestaciones extra-hipofisarias van desde leves (como por ejemplo labio leporino) hasta muy graves (como holoprosencefalia - HPE), pasando por fenotipos intermedios, como puede ser la displasia septo-óptica (SOD).

Actualmente menos del 15% de los casos suele recibir un diagnóstico genético certero, con la excepción de poblaciones endogámicas o donde existen efectos fundadores importantes (Fang et al., 2016). **El objetivo central de esta tesis doctoral es la mejora de este porcentaje diagnóstico, a través de tres abordajes: análisis exhaustivo de la secuenciación de exomas completos de una cohorte de pacientes pediátricos argentinos (capítulo 1), análisis morfológicos de hipófisis de ratones *knock-out* (capítulo 2) y estudio del desarrollo hipofisario a nivel de célula única en peces (capitulo 3).** A continuación se describen las hipótesis y los objetivos de trabajo.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La presente tesis doctoral tiene como objetivo general mejorar el diagnóstico genético del hipopituitarismo congénito y aportar conocimiento a la etiología del mismo. Se plantea la hipótesis que genes novedosos, aún no asociados con esta patología pero implicados en el desarrollo hipofisario, pueden causar deficiencias al verse afectados. Para comprobar esta hipótesis, se proponen tres objetivos específicos, que serán divididos en capítulos:

Capítulo 1: Secuenciación y diagnóstico molecular de pacientes pediátricos argentinos con hipopituitarismo congénito.

Con el objetivo de mejorar el rédito diagnóstico para el hipopituitarismo congénito (HC) se propone realizar secuenciación por exoma completo de una cohorte de 143 pacientes pediátricos argentinos.

Capítulo 2: Estudio sistemático de ratones *knock-out* para establecer genes candidatos a causar hipopituitarismo congénito.

Se plantea como objetivo de este capítulo estudiar un set de datos generados por el DMDD (*"Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders")* para 209 ratones *knock-out*. Se buscará evaluar cuáles de ellos presentan malformaciones hipofisarias y por lo tanto cuáles podrían ser buenos candidatos a causar hipopituitarismo congénito en humanos. Se analizarán variantes de interés para estos genes candidatos en nuestra cohorte.

Capítulo 3: Generación de un reportero de *prop1* en pez cebra (*Danio rerio*) como modelo para el estudio del hipopituitarismo congénito.

A lo largo de este capítulo se propone desarrollar un pez cebra reportero para *prop1*, con el objetivo de generar un set de datos de secuenciación de RNA a nivel de célula única (scRNA-seq) durante el desarrollo hipofisario temprano.

A continuación se exponen los tres capítulos. Cada uno presenta una introducción específica, una descripción de los materiales y métodos, los resultados obtenidos y una conclusión parcial. Se finaliza con una discusión que engloba el trabajo completo, evaluando el logro de los objetivos, hallazgos y a su vez, planteando futuras líneas de trabajo que se desprenden de los resultados de esta tesis de doctorado.

CAPÍTULO 1: Diagnóstico genético de pacientes pediátricos argentinos con hipopituitarismo congénito

INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA

1. Diagnóstico clínico

Desde un punto de vista clínico, la primera manifestación del HC es sumamente variable en tiempo y severidad, dependiendo de la hormona que se vea afectada. A continuación se describen brevemente los análisis más comúnmente utilizados para cada una de las hormonas:

1.a Pruebas de GH, IGF1 e IGFBP3

Las pruebas de GH, IGF1 e IGFBP3 (*IGF binding protein 3*) permiten determinar si la baja talla se debe específicamente a una deficiencia hipofisaria de GH. Se han sugerido diferentes valores de corte para distintos ensayos de estimulación de GH. Los más comúnmente utilizados en niños/as son de estimulación con arginina, estimulación con clonidina y la prueba de tolerancia a la insulina (ITT). Los valores de corte sugeridos rondan entre los 5 y los 7µg/L dependiendo de la prueba (Guzzetti et al., 2016). Sin embargo, los valores más conservadores y más comúnmente usados como estándar son 10µg/L (De Fátima Borges et al., 2016). A su vez, este diagnóstico se ve apoyado por bajos niveles de IGF1 e IGFBP3 basales (que deben ser correctamente ajustados según la edad de los pacientes).

1.b Pruebas de TSH, T4 y T3

El eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo cuenta con diversos análisis que permiten un diagnóstico preciso de hipotiroidisimo primario o central. En el caso del hipotirodisimo primario, el eje hipotalámico-hipofisario funciona normalmente pero la tiroides no es capaz de generar suficiente T4 y T3. En el hipotiroidismo central el eje hipotalámico-hipofisario está comprometido y la TSH se encuentra disminuida, ya sea por una disfunción hipotalámica o hipofisaria, junto con una T4 y T3 baja. En este caso se puede distinguir el origen de esta disfunción central mediante una prueba de estimulación de TRH (Sheehan et al., 2016) (Tabla 1.1).

Diagnóstico	TSH	T4 libre	T3 libre
Hipotiroidismo primario	↑ o ↑↑ (≥ 8.0 mIU/mL)	↓ (<0.9 ng/dL)	↓ (<2.8 pg/mL)
Hipotiroidismo secundario	↓↓ (< 0.45 mIU/mL)	↓ (<0.9 ng/dL)	↓ (<2.8 pg/mL)
Hipotiroidismo subclínico	↑ (4.6–8.0 mIU/mL)	Normal (0.9-1.7 ng/dL)	Normal (2.8-4.0 pg/mL)

Tabla 1.1. Manifestaciones del hipotiroidisimo basado en los ensayos de TSH, T4 libre y T3. Adaptado de Gyuricsko et al., 2020.

1.c Análisis de ACTH/cortisol

Un primer indicio de la deficiencia de ACTH son los niveles de cortisol matutino menor a 83 nmol/L (indicativo de insuficiencia adrenal), mientras que niveles superiores a 500 nmol/L la descartan. Si el cortisol matutino es indicativo o sospechoso de deficiencia adrenal, se recomienda un segundo análisis con estimulación (Bowden et al., 2023). Los análisis para diagnosticar insuficiencia adrenal secundaria, debido a falta de ACTH, consisten en análisis en los que se administra ACTH y se espera una respuesta a cortisol, donde el valor de corte suele ser de entre 500 y 550 nmol/L. En caso de que la respuesta sea mayor a este valor de corte se descarta que la insuficiencia adrenal sea primaria (Ospina et al., 2015).

1.d Pruebas de GnRH, FSH, LH e inhibina B

En hombres, el hipogonadismo hipogonadotrófico (HH) se diagnostica por volumen testicular (<4 mL) y bajos niveles de testosterona así como niveles bajos o normales de FSH y LH (Ascoli et al., 2006). En mujeres, el HH se diagnostica por amenorrea o por retraso puberal según la escala de Tanner, con un desvío mayor a -2 SD de la población general (Voutsadaki et al., 2022). Se considera que un valor basal de LH <0.6 IU/L o <0.0.85 IU/L y un pico de LH <9.74 IU/L o <2.43 IU/L tras la administración de GnRH exógeno, resulta en una sensitividad y especificidad moderadas en el diagnóstico de HH en hombres y mujeres, respectivamente. (Sun et al., 2015).

Otra prueba emergente para la función del eje gonadotropina es el de la inhibina B en suero. Niveles de inhibina B correlaciona con volumen testicular en hombres y ha sido sugerido como un predictor para distinguir deficiencias centrales de retraso constitucional del crecimiento y la pubertad. La inhibina B se produce en las células de Sertoli en hombres y en células granulosas en mujeres. Valores de referencia entre 56 y 113 pg/ml para

hombres y 20 pg/ml para mujeres (Gen II ELISA) podrían proveer un valor de corte que permita discriminar entre HH y retraso constitucional del crecimiento y la pubertad (Gao et al., 2021).

1.e Análisis de PRL

El análisis de niveles de prolactina se realiza a partir de sangre periférica mediante kits comerciales que funcionan por la técnica de ELISA o FIA. Hipoprolactinemia se define como una concentración de prolactina por debajo del rango normal (entre 5 y 20 ng/ml) (Matalliotakis et al., 2019).

2. Diagnóstico genético

Como se explicó con anterioridad, el diagnóstico genético para el hipopituitarismo congénito (HC) tiene un bajo porcentaje de casos resueltos. Este porcentaje suele ser de alrededor del 5 al 10% para casos esporádicos, con excepción de regiones donde existe un efecto fundador de variantes patogénicas en *PROP1* (Martinez Mayer et al., 2024a). Esto se debe en parte a que los métodos de secuenciación utilizados suelen ser, aún hoy en día, secuenciación directa (Sanger) para genes específicos o paneles chicos.

A continuación se analizarán los genes que son actualmente considerados como posibles causantes de HC. Se dividen según sus funciones: a) factores de desarrollo y diferenciación, b) genes relacionados al hipogonadismo hipogonadotrófico, c) factores de transcripción y epigenética, d) genes causantes de RASopatías, e) genes relacionados a transporte intracelular, f) vías de degradación, g) transportadores, h) procesamiento del RNA, i) glicosilación, j) inmunidad, k) ciliopatías y l) proteínas estructurales.

2.a Genes que codifican para factores relevantes para el desarrollo y diferenciación hipofisarios *(SHH, GLI2, SOX2, SOX3, SIX1, SIX3, HESX1, LHX3, LHX4, POU1F1, PROP1, PITX2, OTX2, GH1, ROBO1*)

SHH

SHH es una proteína que actúa como morfógeno, activando los receptores de la familia *patched* (Ptch). La vía de *SHH* es central en el desarrollo de la línea media y, como se discutió anteriormente, de la hipófisis anterior (Bian et al., 2023). De este modo, no es sorprendente que mutaciones en *SHH* causen malformaciones severas. Dependiendo de dónde se ubique, la mutación puede generar holoprosencefalia (HPE) (MIM#142945), microftalmia (MIM#611638) o síndrome del incisivo central maxilar único (MIM#147250). Todos estos síndromes pueden presentarse con afecciones hipofisarias, desde tumores hasta deficiencias aisladas, particularmente comunes en el síndrome del incisivo central maxilar único (Richieri-Costa et al., 2006, Tatsi et al., 2013).

GLI2

GLI2 es un factor de transcripción tipo *ZINC finger*. *GLI2* es un efector de la vía de *SHH*, regulada por su *shuttling* de la cilia al núcleo. Como efector de SHH, GLI2 tiene un efecto importante en el desarrollo hipofisario, permitiendo la inducción de genes como *BMP4* y *FGF8* desde el hipotálamo, que son claves para la correcta formación del lóbulo anterior e imprescindibles para la formación del lóbulo posterior (Wang et al., 2010b). Las mutaciones en *GLI2* pueden dar fenotipos muy variables. En los casos más severos pueden dar HPE (MIM#610829), mientras que en casos más leves puede dar síndrome de Culler-Jones (MIM#615849). Este síndrome consiste en anomalías faciales como labio leporino o hipertelorismo ocular, polidactilia post axial, retraso global del desarrollo e hipopituitarismo. Dado que tanto la expresividad como la penetrancia de variantes en *GLI2* es variable, es posible encontrar casos de IGHD o CPHD sin manifestaciones extra-hipofisarias con variantes patogénicas en este gen (Arnhold et al., 2015).

SOX2

SOX2 es un factor de transcripción del tipo *SRY box*, usualmente asociado con células pluripotentes. Su expresión durante el desarrollo se extiende a prácticamente todo el sistema nervioso en formación. Tanto los ojos como la hipófisis derivan a nivel embriológico de la placa neural anterior, cuya progresión depende de *SOX2* (Iwafuchi-Doi et al., 2012). *SOX2* tiene como genes *target* a *HESX1* y a *SIX6*, otros dos factores tempranos importantes para el desarrollo hipofisario, aunque solo el primero de estos ha sido asociado a hipopituitarismo congénito de manera concluyente (Kelberman 2006, Goldsmith et al., 2016). Mutaciones en *SOX2* generan haploinsuficiencia y tienen como consecuencia anoftalmia o microftalmia sindrómica (MIM#206900). En estos pacientes es común encontrar deficiencias hipofisarias, aunque la presentación más común afecta únicamente al eje gonadal (Macchiaroli et al., 2013).

SOX3

Al igual que *SOX2*, *SOX3* es importante para el desarrollo del sistema nervioso, incluyendo la hipófisis. Las variantes patogénicas en *SOX3* son mucho menos frecuentes que las variantes en *SOX2*. Variantes en este gen han sido asociadas a desórdenes del desarrollo intelectual e IGHD o CPHD, sin afectaciones oculares (Laumonnier et al., 2002). Es interesante que en este caso, la herencia es dominante ligada al X, pero las variantes pueden ser tanto de pérdida de función como de ganancia de función (en su mayoría duplicaciones) (Solomon et al., 2004).

SIX1

SIX1 es un factor de transcripción de la familia SIX, que ha sido descripto en el desarrollo hipofisario normal. Variantes en *SIX1* causan síndromes branquio-ótico o branquio-oto-renal de forma AD. Recientemente se ha reportado un caso de síndrome branquio-oto-renal con una variante en *SIX1* que presentaba tanto baja talla como deficiencia de GH (Arai et al., 2023).

SIX3

Otro factor de transcripción de la familia SIX en el que se ha reportado un caso de hipopituitarismo es *SIX3*. Variantes en *SIX3* pueden causar HPE (MIM#157170), por lo que IGHD/CPHD podrían ser parte del espectro (De Castro et al., 2021). El único caso reportado hasta el día de hoy se encontró en conjunción con una variante en *POU1F1*, por lo cual el estatus de los genes *SIX* hasta el momento es de genes candidatos (Bando et al., 2022).

HESX1

HESX1 es un factor de transcripción de la clase *homeobox* que lleva su nombre por expresarse en *embryonic stem cells*. Su expresión en el desarrollo es temprana, previa a la formación de la RP y se localiza en el cerebro anterior. Su expresión se restringe más tardíamente a la placoda hipofisaria y al diencéfalo ventral. Durante el desarrollo su expresión depende, al menos parcialmente, de *SOX2* (Goldsmith et al., 2016). Dado su patrón de expresión similar y su dependencia de *SOX2*, no es sorprendente que variantes en este gen causen fenotipos similares, aunque por lo general más leves. El fenotipo asociado con variantes en *HESX1* es displasia septo-óptica (SOD), donde el paciente presenta al menos dos de estos tres fenotipos: afectación del nervio óptico, defectos en línea media cerebral y/o anomalías hipofisarias (MIM#182230) (Dattani et al., 1998, Reynaud et al., 2011). Sin embargo, se han reportado pacientes con mutaciones *HESX1* que presentaban únicamente CPHD (Carvalho et al., 2003). El modo de herencia para este gen puede ser tanto AD como AR (Thomas et al., 2001).

OTX2

OTX2 es un factor de transcripción de la clase homeobox que se expresa en el cerebro anterior (prosencéfalo y mesencéfalo) y tiene un rol crucial en la formación del organizador ístmico. A pesar de su rol central en el desarrollo del cerebro, las variantes en *OTX2* llevan a fenotipos similares a los que se ven en pacientes con mutaciones en *SOX2* o *HESX1* (Ashkenazi-Hoffnung et al., 2010, Araujo et al., 2023, Del Blanco et al., 2012b). Aunque los mecanismos por los cuales *OTX2* genera defectos hipofisarios no están completamente esclarecidos, se piensa que su expresión en el diencéfalo ventral lleva a la expresión de FGFs fundamentales para el correcto desarrollo de la hipófisis (Matsumoto et

al., 2019). Como consecuencia, pacientes con variantes en *OTX2* pueden presentar fenotipos desde microftalmia hasta SOD (MIM#610125) o incluso únicamente IGHD o CPHD en los casos más leves (MIM#613986) (Nakaguma et al., 2019, Lonero et al., 2016, Griffero et al., 2022).

PITX2

PITX2 es un factor de transcripción con un dominio PITX, relacionado a la familia *bicoid* (Gage et al., 1997). La expresión de *PITX2* se da en el ectodermo oral y es considerado uno de los marcadores tempranos de la formación de la RP, donde su expresión es independiente de SOX2 (Goldsmith et al., 2016). Al igual que *SOX2*, *HESX1* y *OTX2*, *PITX2* también juega un rol en el desarrollo ocular. Variantes en PITX2 pueden dar lugar a diferentes fenotipos clínicos, siempre de manera AD, desde disgenesia del segmento anterior hasta síndrome de Axenfeld-Rieger tipo 1 (MIM#180500). Este síndrome suele presentarse con malformaciones faciales y oculares varias, rara vez problemas gastrointestinales y se asume que podría presentarse también con deficiencias hipofisarias por su rol en el desarrollo hipofisario (Meyer-Marcotty et al., 2008).

LHX3

LHX3 es un factor de transcripción del tipo LIM-homeobox, con expresión hipofisaria y, en menor medida, neuronal. LHX3 es uno de los primeros factores de transcripción importantes para la determinación y diferenciación de los linajes hipofisarios. Su patrón de expresión se encuentra altamente restringido espacialmente a la RP, donde su expresión es independiente de SOX2 (Goldsmith et al., 2016). Las variantes en *LHX3* causan CPHD de manera AR (MIM#221750) y suelen causar rigidez de cuello (Pfaeffle et al., 2007b).

LHX4

LHX4 es un gen parálogo de *LHX3*, que comparte en gran medida su patrón de expresión. También se expresa de forma restringida en la RP durante el desarrollo hipofisario y es importante para la diferenciación de los linajes hipofisarios. Mutaciones en *LHX4* causan CPHD (MIM#262700) de forma AD, a diferencia de las variantes en *LHX3*. Los casos reportados en literatura son menos de veinte a nivel mundial y no presentan fenotipos comunes destacables más allá de malformaciones y deficiencias hipofisarias (Cohen et al., 2016).

PROP1

PROP1 codifica para un factor de transcripción tipo *paired-like homeobox*. Lleva su nombre por ser el “profeta” de *POU1F1*, uno de sus principales targets río abajo en la diferenciación celular. Es el primero de los factores de transcripción en ser un marcador

específico y exclusivo para la hipófisis anterior. Históricamente se consideraba que la causa más común de HC a nivel mundial eran mutaciones en *PROP1* (Kelberman et al., 2009). Hoy en día se sabe que su prevalencia puede ser muy alta, a veces superior al 50% en cohortes europeas y particularmente en cohortes del centro y del este de Europa (Correa et al., 2019). Sin embargo, esto no es cierto para todas las cohortes, especialmente para las cohortes latinoamericanas donde las mutaciones en *PROP1* no explican prácticamente ningún caso (Vishnopolska et al., 2021). Dado que *PROP1* es necesario para la especificación y diferenciación de todos los linajes hipofisarios, las variantes en *PROP1* dan como resultado CPHD no sindrómico (MIM#262600), de herencia AR.

POU1F1

POU1F1 es un factor de transcripción de clase *POU homeobox 1* y es un target directo de *PROP1* durante la diferenciación hipofisaria. Las variantes en *POU1F1* causan IGHD o CPHD no sindrómico (MIM#613038). En el caso de CPHD, las hormonas afectadas son GH, TSH y PRL, que son los linajes *POU1F1-dependientes*. El desarrollo de IGHD o CPHD depende de la variante, aunque también hay variabilidad intra-familiar, por lo que se considera que es un gen con expresividad variable. Su herencia puede ser tanto AD o AR, también dependiendo de la variante. Por ejemplo, variantes dominantes negativas como pueden ser variantes en el dominio POU, que confieren mayor afinidad por el DNA pero anulan la función activadora de la proteína (Aarskog et al., 1997). Otro ejemplo de variantes dominantes son las recientemente descriptas variantes de splicing que alteran el balance entre dos isoformas de POU1F1, una activadora (alfa) y otra represora (beta). Este desbalance, causado por una única variante, es suficiente también para causar enfermedad de manera AD (Gergics et al., 2021). El resto de las variantes (usualmente *missense*) causan la enfermedad de manera autosómica recesiva, al disminuir la capacidad de activación de POU1F1.

GH1

El eje de GH es el más comúnmente afectado en casos de hipopituitarismo congénito. Es también el eje por el que los pacientes suelen ingresar a consulta con los equipos de endocrinología, cuando los padres notan que el progreso de altura es menor al esperado para la edad. *GH1* es el gen que codifica para la hormona de crecimiento y es el hallazgo genético más frecuente en casos de IGHD. Existen diversos tipos de deficiencia de hormona de crecimiento, con herencias tanto AR como AD. La herencia recesiva o tipo I se divide en dos clases, A y B. Los casos tipo IA se caracterizan por presentar grandes deleciones que incluyen al gen de *GH1* y llevan a la falta total de expresión de GH1. Los casos tipo IB presentan mutaciones que llevan a la producción de una versión de la

hormona que no es funcional, como pueden ser mutaciones de *stop* prematuro o *frameshift*. El caso AD, conocido como IGHD tipo II (MIM#173100), es causado por mutaciones que ejercen un efecto dominante negativo. La mayoría de las variantes descriptas son variantes de splicing, que generan una isoforma corta de *GH1*, por *exon skipping* del exon 3. Esta variante corta no puede atravesar la vía secretoria, quedando atascada en el retículo endoplasmático y finalmente interfiere con la secreción de la variante normal de la hormona (Alatzoglou et al., 2011). Un tercer tipo de patología asociada a *GH1*, pero considerada una entidad separada es el caso del síndrome de Kowarski. En este síndrome una variante en *GH1* lleva a la producción de una forma inactiva de GH, pero que se secreta con normalidad. En este sentido es similar a IGHD tipo IB, pero no lleva a una deficiencia de GH, sino a bajo IGF1 y baja talla, a pesar de valores de GH normales.

ROBO1

ROBO1 es un receptor transmembrana de un solo paso de la clase *roundabout*. Las proteínas de esta familia se descubrieron inicialmente en *Drosophila melanogaster* y juegan un rol importante en la guía axonal, junto con los correspondientes ligandos, de la familia *Slit* (Kidd et al., 1999). Recientemente un estudio vinculó por primera vez mutaciones en *ROBO1* con síndrome de interrupción del tallo (PSIS) (MIM#620303). Este síndrome consiste en una adenohipófisis hipoplásica, una neurohipófisis ectópica y un tallo hipofisario interrumpido o fino. Además, varios de estos pacientes presentaban problemas de visión (Bashamboo et al., 2017). Desde entonces se han confirmado una considerable cantidad de casos con variantes de pérdida de función en *ROBO1* y diferentes formas de CPHD o PSIS (Scala et al., 2018, Dateki et al., 2019, Liu et al., 2019, Brauner et al., 2020, Silva et al., 2022, Misgar et al., 2024).

2.b Genes relacionados a hipogonadismo hipogonadotrófico y desarrollo sexual

El hipogonadismo hipogonadotrófico es el subdesarrollo de las gónadas por deficiencias hormonales del eje gonadal. Dado que los casos de CPHD suelen presentar deficiencias en este eje, normalmente acompañadas de hipogonadismo hipogonadotrófico, no es extraño pensar que, al menos en algunos casos, los genes causantes de hipogonadismo hipogonadotrófico pueden también ser causantes de CPHD. El gen más paradigmático de esta idea es *FGFR1*.

FGFR1 es un receptor de factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), que son sumamente importantes para el desarrollo hipofisario. Variantes en *FGFR1* han sido asociadas a una gran variedad de enfermedades, que van desde casos severos sindrómicos, como puede ser la lipomatosis encefalocraneocutánea (MIM#613001) (Bennett et al., 2006), hasta hipogonadismo hipogonadotrófico no sindrómico (MIM#147950) (Dodé et

al., 2003). Sin embargo, reportes recientes han asociado variantes en este gen con casos de CPHD con herencia AD (Raivio et al., 2012).

Este mismo patrón se ha observado para diversos genes (*FGF8*, *ANOS1*, *KISS1R*, *PROKR2*, *PROK2*, *SEMA3A*, *WDR11*, *SOX11*, *TBX3*, *MAP3K1*), que se describen en el anexo.

2.c Factores de transcripción y epigenética

Además de los factores de transcripción caracterizados como cruciales para el desarrollo hipofisario, existen muchos otros factores de transcripción relevantes para el desarrollo del organismo en general. Es relativamente común observar HC en algunos síndromes causados por estos factores de transcripción, en particular en los que se ve afectado el sistema nervioso central, la línea media y el paladar, dada la ubicación de la hipófisis anterior, que depende de la correcta formación de todas estas estructuras.

Un ejemplo de este tipo de factores de transcripción es *CHD7*. CHD7 es una proteína tipo CHD (cromodominio-helicasa con capacidad de unión al ADN). Es un factor clave para la migración de las células de la cresta neural y mutaciones en este gen causan síndrome de CHARGE (***C****oloboma,* ***H****eart defects,* ***A****tresia choanae,* ***R****etardation of growth and development,* ***G****enital abnormalities and* ***E****ar anomalies* - MIM#214800) (Schulz et al., 2014). Aunque el retraso en el crecimiento y anormalidades genitales son comunes en estos casos, solo recientemente se ha empezado a establecer una relación entre pacientes con variantes en *CHD7* y deficiencias hipofisarias (Costa et al., 2020). En particular existen incluso casos reportados que presentan únicamente CPHD (Obata et al., 2023), sin características sindrómicas. Dada la gran variabilidad fenotípica de los casos de CHARGE, *CHD7* emerge como un gen candidato de sumo interés.

Otros factores de transcripción para los cuales se han descripto casos de HC incluyen *ARID1B*, *TGIF1*, *TCF7L1*, *ARNT2*, *ARX*, *KMT2A*, *KMT2D*, *KDM6A*, *KAT5*, *KAT6A*, KAT6B, *DNMT1*, *KANSL1*, *PHF6*, *FOXA2, FOXL2*, *SALL1, SALL4, AHDC1*, *TRPS1*, *CREBBP*, *HNF1A*, *ZNF462*, *ZSWIM6*. Una descripción más detallada de las funciones y casos reportados se encuentra en el anexo.

2.d RASopatías

Las RASopatías son un conjunto de patologías que afectan la vía de RAS. Estas enfermedades son raras individualmente, pero en conjunto resultan relativamente comunes. La vía de RAS es una de las principales vías de comunicación intracelular, regulando la fosforilación de factores de transcripción clave mediante la vía de las MAPKs. Entre las RASopatías más comunes se encuentran el síndrome de Noonan, el síndrome similar a

Noonan y los síndromes cardio-facio-cutáneos (CFC). Estos órganos suelen ser los más afectados en RASopatías, donde suele haber defectos cardíacos, manchas en la piel, piel seca, así como afecciones oculares y de los párpados.

BRAF es una quinasa de la vía de fosforilación de las MAP quinasas (MAPKs). Variantes en genes de esta vía causan diversas RASopatías del tipo CFC (MIM#115150 - *BRAF*, MIM#615278 - *KRAS*, MIM#615279 - *MAP2K1*, MIM#615280 - *MAP2K2*). Estos pacientes presentan dismorfias faciales, retraso en el crecimiento, problemas en la ingesta, malformaciones cardíacas, retraso global del desarrollo y anormalidades del sistema nervioso central. Recientemente se han descripto casos donde pacientes con CFC presentaban además características de displasia septo-óptica (SOD), con alteraciones del perfil hormonal hipofisario. Todos estos pacientes presentaban variantes adquiridas de novo en *BRAF* (Gualtieri et al., 2021), por lo que es posible que el CFC desencadene además problemas hipofisarios.

Algo similar se ha observado para múltiples genes causantes de otras RASopatías, a saber *PTPN11*, *LZTR1*, *MAP2K1* y *SHOC2* (ver anexo).

2.e Transporte intracelular

La hipófisis anterior produce hormonas constantemente, con cambios dinámicos lentos durante el día, siguiendo el ritmo circadiano, y con cambios rápidos, respondiendo a estímulos puntuales. Esta producción dinámica de gran cantidad de proteínas que deben ser secretadas, pone un gran estrés sobre el mecanismo intracelular de transporte y producción de proteínas. Aunque hay pocos casos reportados de genes que causen HC en estas vías de señalización, una producción defectuosa de proteínas o un tráfico defectuoso de proteínas y vesículas podría afectar la producción de hormonas hipofisarias.

Un ejemplo de esto son las mutaciones en *WFS1*. WFS1 es una glicoproteína de membrana del retículo endoplasmático, con actividad endoglicosidasa. Esta actividad es importante para el procesamiento de proteínas glicosiladas, como son la mayoría de las hormonas hipofisarias. Defectos en este gen pueden generar síndrome de Wolfram AR (MIM#222300) o síndrome tipo Wolfram AD (MIM#614296). El síndrome de Wolfram también es conocido como DIDMOAD (diabetes insipidus, diabetes mellitus, atrofia óptica y sordera). Además, de estas afecciones endócrinas típicas, pacientes con síndrome de Wolfram pueden presentar deficiencias hipofisarias aisladas y combinadas (Medlej et al., 2004).

Otros genes que forman parte de la red de transporte intracelular también pueden causar HC, aunque estos genes no han sido hasta el momento estudiados de forma

detallada. Entre estos genes se encuentran *MADD*, *DNAJC3*, *PORCN*, *CCDC186*, *NBAS*, *SEC31A*, *EXOC3L2*, *HID1* y *OCRL* (ver anexo).

2.f Vías de degradación

Así como la producción y el transporte de proteínas es fundamental para el correcto funcionamiento de la hipófisis anterior, también lo es el correcto funcionamiento de las vías de degradación de proteínas. La producción de proteínas lleva a un estrés celular elevado, que tiene como consecuencia la producción de proteínas mal plegadas que deben ser degradadas para evitar su acumulación. Si este balance entre producción y degradación se rompe puede dar lugar a diversas patologías.

Una de estas patologías es el síndrome de Schaaf-Yang, causado por variantes en *MAGEL2*. MAGEL2 modula la de ubiquitinación de diversas proteínas para el reciclado endosómico de proteínas. Variantes en *MAGEL2* causan el síndrome de Schaaf-Yang. En particular el locus de *MAGEL2* sufre imprinting, por lo que su herencia es AD, pero únicamente cuando la variante patogénica se ubica en el locus paterno. Los pacientes suelen presentar retraso del desarrollo, hipotonía, características autísticas y artrogriposis. En esta misma línea, hay cada vez más evidencia de que estos pacientes pueden presentar fenotipos endócrinos variables, incluyendo HC (Gregory et al., 2019). Otros genes asociados a vías de degradación que han sido asociados a HC son *SPINK5*, *MYCBP2*, *UBR1* y *BRCC3* (descriptos en anexo).

2.g Transportadores

Para mantener la homeostasis celular, uno de los balances que la célula debe mantener es el de iones y solutos. Para esto existen diversos transportadores específicos y generales, que se expresan de manera específica en cada tipo celular.

Uno de estos transportadores es KCNQ1, un canal de potasio activado por voltaje de la subfamilia *KQT-like*. Hasta hace poco había sido asociado a síndromes cardíacos como el síndrome de QT-largo o de QT-corto. Sin embargo, recientemente se han descripto tres casos en los que variantes en *KCNQ1* llevan a IGHD combinada con fibromatosis gingival de manera AD. Aunque no es claro a qué se debe esta asociación de fenotipos, se demostró que *KCNQ1* se expresa en neuronas hipotalámicas *GHRH*$^{+}$, lo que podría al menos explicar la deficiencia de GH (Tommiska et al., 2017).

Existen reportes de otros transportadores asociados a HC, aunque se trata de transportadores diversos (*SLC12A3*, *CLCNKB*, *CLCN5*, *SLC7A7*, *ABCD1)*, en principio sin mecanismos patológicos en común.

2.h Procesamiento del RNA

Así como existen factores de transcripción que pueden causar síndromes con fenotipos hipofisarios, también existen factores relacionados al procesamiento del RNA que causan cuadros clínicos acompañados de HC. El ejemplo más común es el caso de *RNPC3*. *RNPC3* codifica para una proteína de 65kDa con capacidad de unión al ARN, que forma parte del spliceosoma tipo U-12 (no canónico). Variantes en este gen han sido asociadas a IGHD y CPHD, con retraso global del desarrollo variable y facies dismórficas (Argente et al., 2014).

Otros genes que forman parte del procesamiento del RNA son *POLR3A* y *POLR3B*, *HNRNPU*, *PRPF8*, *WDR4*, *VARS1*, *RBM28*, *EIF2B5*, *EIF2S3*, *NONO y SON* (ver anexo).

2.i Desórdenes de glicosilación

Los desórdenes de glicosilación son extremadamente raros. Dada la importancia que tiene la glicosilación para diversos procesos biológicos, estos desórdenes suelen generar cuadros sindrómicos graves y variables. En algunos casos estos pacientes presentan HC, siendo IGHD particularmente común. Es probable que esto se deba a una falta de acción de las hormonas hipofisarias por una glicosilación defectuosa, pero se han comprobado incluso casos con deficiencias en la secreción de GH, por lo que es posible que también esté afectado su tránsito secretorio.

Un ejemplo de este tipo de desórdenes son los causados por variantes en *PMM2*. PMM2 es una fosfomanomutasa, responsable del desorden de glicosilación tipo Ia (MIM#212065). Recientemente variantes en PMM2 han sido asociadas con un caso de HC sindrómico (Plachy et al., 2024) y en otro caso se ha encontrado una única variante, aunque el desorden esperado es AR, por lo que podría tratarse de un caso bi-alélico donde el segundo alelo no fue capturado por la secuenciación (Brauner et al., 2020).

Existen reportes similares para *PGM1*, *TMEM165*, *ALG1* y *DPM1* (ver anexo).

2.j Desórdenes inmunes

La combinación de desórdenes inmunes y HC es extremadamente rara. Sin embargo, existen vías en común entre el sistema inmune y la respuesta a GH, especialmente la vía de STAT, que media tanto la respuesta a GH como ciertos aspectos de la maduración de los glóbulos blancos. Sin embargo, es difícil distinguir los casos de HC en estos casos de los de hipopituitarismo adquirido, dado que los pacientes suelen presentar infecciones recurrentes, necesitar transfusiones de sangre y pueden sufrir problemas nutricionales graves.

El primer caso descripto de un síndrome inmune con HC fue el así llamado IGHD de tipo III (MIM## 307200). Esta clase de IGHD es sindrómica y es producto de mutaciones inactivantes en el gen *BTK*, una tirosina-quinasa clave para el desarrollo de los linfocitos B, con un modo de herencia ligada al X recesiva (XLR). En este caso el cuadro viene además acompañado por agammaglobulinemia. Los motivos moleculares por los cuales las variantes en *BTK* causan IGHD no han sido dilucidados aún y su relevancia en IGHD tipo III ha sido incluso puesta en duda (Stewart et al., 2005, Stewart et al., 2008).

Existen otros reportes para otras enfermedades inmunes asociadas tanto a HC como a resistencia a GH, que son exploradas en el anexo (*STAT5B*, *STAT3*, *ACP5*, *RGS10, PIK3CA, PIK3CD, NFKB2, NFKBIA, AICDA*, *G6CP3*).

2.k Ciliopatías

Las ciliopatías son un grupo emergente de enfermedades vinculadas por tener fenotipos similares, aunque variables, producidos por mutaciones en componentes de la cilia primaria. Un ejemplo que conecta ciliopatías con HC es *TBC1D32*. TBC1D32 lleva su nombre por presentar motivos tipo TBC, que están asociados a la función activadora de GTPasas, acelerando la tasa de hidrólisis de GTP (Pan et al., 2006). Esta proteína en particular está involucrada en la morfología ciliar y es causante de ciliopatías, al alterar el tráfico ciliar de proteínas (Noguchi et al., 2021). Variantes en *TBC1D32* fueron inicialmente descriptas como causantes de síndrome orofaciodigital tipo IX (Adly et al., 2013). Este tipo de síndromes es siempre causado por alteraciones ciliares. Recientemente se ha demostrado que variantes en este gen están asociadas a formas de hipopituitarismo sindrómico (Hietamäki et al., 2020).

Otros componentes ciliares que se han asociado a HC incluyen *ALMS1*, *IFT172*, *KIAA0753*, *KATNIP*, *TMEM67*, *PIBF1*, *CELSR2* y *TTC26* (ver anexo).

2.l Proteínas estructurales de membrana y matriz extracelular

Las membranas de las células endócrinas hipofisarias tienen la particularidad de estar sometidas a un estrés constante por la liberación ininterrumpida de vesículas. Además, los capilares que las rodean también presentan la particularidad de estar fenestrados, lo que permite la circulación de las hormonas liberadas. Estas particularidades hacen pensar que algunas proteínas estructurales de membrana y de matriz extracelular podrían estar involucradas en la etiología del HC, aunque al día de hoy son necesarios más estudios funcionales como evidencia.

Uno de los genes que emerge como candidato para el HC dentro de este grupo es el de *COL1A1*. COL1A1 es la subunidad alfa 1 del colágeno tipo 1, que se compone por dos

subunidades alfa 1 y una subunidad alfa 2. Variantes en este gen generan osteogénesis imperfecta, osteoporosis, síndrome de Ehlers-Danlo y enfermedad de Cassey, todos desórdenes esqueléticos. Hasta el momento hay reportados solo tres trabajos donde presentan una combinación de alguna de estas enfermedades en conjunto con PSIS (Wang et al., 2019b, Kitamura et al., 2023). Una teoría de por qué se dan estas enfermedades en conjunto tiene que ver con una disrupción mecánica del tallo hipofisario durante el nacimiento, desencadenada por una debilidad ante la falta de COL1A1, que se expresa en este tejido y podría darle robustez (Li et al., 2023a).

2.m Anomalías cromosómicas

Las anomalías cromosómicas no son consideradas una causa común de HC, pero tampoco han sido estudiadas de manera sistemática en cohortes extensas. La mayoría de los reportes consisten en reportes de casos aislados, que presentan síndromes que incluyen HC dentro de su espectro fenotípico. A continuación se detallan los rearreglos cromosómicos reportados en conjunto con HC hasta la fecha.

El síndrome de Kearns-Sayre es una encefalomiopatía que se hereda de manera materna, por rearreglos mitocondriales, aunque su origen genético aún no ha sido determinado. Existen múltiples reportes de pacientes con este síndrome e IGHD, pero el motivo de esta deficiencia aislada no ha sido estudiado (Barberi et al., 2004, Matsuzaki et al., 2002).

Aunque muchas de las deleciones y duplicaciones cromosómicas que causan hipopituitarismo congénito están relacionadas con genes cuya pérdida o ganancia de función ya ha sido reportada como hipopituitarismo congénito, muchas han sido encontradas en regiones sin genes causantes aparentes (ver Tabla 1.2 y anexo para más detalle). Esto abre la posibilidad de encontrar los genes candidatos en estas regiones y mejorar de este modo el diagnóstico genético del HC.

Cromosoma	Región	Deleciones/ Duplicaciones	Gen	Gen causante de HC
1	1q23-1q31.1	Deleciones	*LHX4*	Sí
2	2p21	Deleciones	*SLC3A1* y *PREPL*	No
		Duplicaciones	*SIX3*	Sí
	2p25	Duplicaciones	ND	No
	2q37	Deleciones	*HID1A* y *HDAC4*	No
	2q14	Deleciones	*GLI2*	Sí
3	3p14	Duplicaciones	*HESX1*	Sí
	3q13	Deleciones	*LSAMP*	No
5	5q35	Deleciones	*PROP1*	Sí
6	6q24-q25	Deleciones	ND	No
7	7q11	Ambas	ND	No
8	8q23-q24	Deleciones	*TRPS1*	No
9	9p	Trisomía parcial	ND	No
	9q	Trisomía parcial	ND	No
11	11q23-q25	Deleciones	ND	No
12	12p	Tetrasomía mosaico	ND	No
	12q14	Deleciones	*HMGA2*	No
13	13q12-q14	Deleciones	ND	No
	13q31	Deleciones	*MIR17HG*	Sí
14	14q22	Deleciones	*OTX2* y *BMP4*	Sí
15	15q11-q13	Deleciones	ND	No
	15q24	Deleciones	ND	No
	15q26	Deleciones	*IGF1R*	Sí
16	16p13	Deleciones	*MYH11*	No
17	17p11	Duplicaciones	ND	No
	17p13	Duplicaciones	ND	No
	17q12	Deleciones	ND	No
	17q21	Deleciones	ND	No

	17q22	Deleciones	ND	No
18	18	Trisomía completa	ND	No
	18p11	Duplicaciones/Deleciones	*TGIF*	Sí
	18q12	Deleciones	ND	No
	18q23	Deleciones	ND	No
19	19q13	Deleciones	ND	No
20	20p11	Deleciones	*FOXA2*	Sí
	20p12	Deleciones	*PROKR2* y *BMP2*	Sí
22	22q11	Deleciones/ Inv-Dup.	ND	No
X	Xq21	Deleciones	ND	No
	Xq27-qter	Deleciones	*SOX3*	Sí
	X	Duplicaciones/Deleciones	ND	No

Tabla 1.2. Deleciones y duplicaciones reportadas asociadas a HC por cromosoma y región. En caso de existir un gen asociado se indica si el mismo se considera causante de HC en la literatura. (ND = no determinado)

CAPÍTULO 1: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reclutamiento de pacientes y composición de la cohorte

Se reclutaron pacientes de los siguientes hospitales a lo largo de Argentina (CABA, Buenos Aires, La Plata, 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 consiste en 143 individuos, correspondientes a 131 casos esporádicos y 6 casos familiares (en todos los casos de hermanos afectados, 12 pacientes en total), con una relación de hombres a mujeres de 1.6:1 (88 hombres versus 55 mujeres).

El trabajo fue aprobado por el comité de ética del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez. Se obtuvo para cada caso/paciente el consentimiento informado de los padres y, en el caso que corresponda, el asentimiento de los pacientes incluídos en el estudio.

Los pacientes fueron diagnosticados con deficiencias hipofisarias de acuerdo a criterios internacionales previamente descriptos (ver introducción específica del presente capítulo) y aceptados por los hospitales argentinos participantes. Brevemente, los pacientes fueron diagnosticados con deficiencia de GH a partir de una velocidad de crecimiento baja y un pico de GH menor a 10 ng/mL luego de pruebas farmacológicas secuenciales de arginina/clonidina. La deficiencia de TSH fue diagnosticada en individuos con tiroxina libre <1.0 ng/dL con niveles de TSH bajos o normales (TSH ≤10 mU/L en pacientes de menos de 2 meses de edad y ≤ 6.5 mU/L a partir de los dos meses). La deficiencia de ACTH fue diagnosticada según niveles basales en suero de cortisol menores a <30.3 nmol/L en pacientes de menos de 2 meses de edad y <58 nmol/L en pacientes de entre 2 y 6 meses y <165 nmol/L a partir de los 6 meses). La deficiencia de PRL se diagnosticó según percentiles menores a 2,5 según sexo y edad. Las deficiencias de gonadotropinas fueron diagnosticadas en hombres de entre 15 días y 6 meses si los niveles de LH y testosterona eran menores al quinto decil, <0.8 IU/L y <30 ng/dL, respectivamente. En mujeres de entre 15 días y 2 años la deficiencia de gonadotropinas se asumió cuando los niveles de FSH fueron menores a <1.0 IU/L. Luego de esa edad la deficiencia de gonadotropinas se definió como desarrollo puberal retrasado o ausente (<3.47 nmol/L), con bajos niveles de testosterona, asociada a niveles bajos o normales de LH y FSH.

En todos los casos se realizó una imagen por resonancia magnética (MRI) del cerebro en general y en particular de la región hipotálamo-hipófisis. Todos los estudios mencionados anteriormente fueron llevados a cabo en los hospitales donde los pacientes fueron reclutados.

2. Extracción de ADN genómico

Se extrajo ADN a partir de muestras de sangre periférica mediante el kit de purificación Puregene Blood kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo el protocolo recomendado.

El ADN fue cuantificado utilizando un Nanopore 2000c (ThermoFisher). La relación de absorbancia 260/280 nm fue utilizada para analizar la pureza del ADN obtenido. Se consideró como criterio de inclusión para este estudio una relación 260/280 nm entre 1.8 y 2.1.

3. Secuenciación, procesamiento, anotación y filtrado

La secuenciación del exoma completo fue realizada en 3Billion, una empresa radicada en Seúl, Corea del Sur, que financió este proyecto con un subsidio para investigación. La captura de los exomas fue realizada usando un panel “xGen Exome Research Panel v2” (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA) y la secuenciación fue realizada en un instrumento NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, CA, USA). Las lecturas crudas fueron alineadas al genoma humano de referencia GRCh38 usando el alineamiento de Barrow Wheelers (BWA) (Li et al., 2009) y procesadas de acuerdo a las recomendaciones del Genome Analysis Toolkit (GATK) (McKenna et al., 2010). Las lecturas duplicadas fueron descartadas utilizando PICARD y el haplotipado, genotipado y llamado de variantes fueron realizados utilizando Haplotype Caller.

El archivo VCF fue anotado utilizando dbSNP, GnomAD, ClinVar, Polyphen, SIFT, Mutation Taster, SpliceAI y ANNOVAR (Sherry et al., 2001, Karczewski et al., 2020, Adzhubei et al., 2013, Ng et al., 2003, Schwarz et al., 2014, Jaganathan et al., 2019, Wang et al., 2010a). Los VCFs anotados fueron subidos a la plataforma Bitgenia (https://www.bitgenia.com/b-platform/) para su análisis. En un primer análisis, se evaluaron variantes genéticas en ciertos genes, previamente seleccionados, asociados a HC (ver introducción y anexo), filtrados por frecuencia (<0.01 en GnomAD). En una segunda instancia, todos los casos que resultaron negativos o inconclusos luego de este filtrado, fueron analizados de manera agnóstica para variantes altamente disruptivas (codones de terminación prematuros, cambios en el marco de lectura y variantes de splicing proximales), que además estuvieran ausentes en la población sana (GnomAD v4.0.0) o variantes que

fueran clasificadas de manera automática como patogénicas o probablemente patogénicas en genes con LOEUF menor a 0.350 o pLI (intolerancia a la pérdida de función) mayor a 0.90 o si existía evidencia adicional (i.e. reportes de casos recientes, expresión en tejidos relevantes, etc.) (Seaby et al., 2021). Por otro lado, las variantes de splicing fueron además analizadas utilizando SpliceAi-visual para estudiar los efectos posibles a nivel de los transcriptos en mayor detalle (De Sainte Agathe et al., 2023).

4. Análisis de *copy number variations*

Para la detección de copy number variations (CNVs) se usó el pipeline germline GATK-CNV (gGATK-CNV), aplicado a 137 archivos tipo BAM secuenciados por 3Billion, de acuerdo con las recomendaciones de GATK (Babadi et al., 2023). El modelo fue entrenado con 76 muestras control de la misma población, también secuenciadas por 3Billion y procesadas del mismo modo. En gATK-NCV la profundidad de lecturas es determinada en cada intervalo del kit de captura, que es luego anotado para intervalos con niveles de GC extremadamente altos y regiones con baja mapabilidad, que son luego excluidas de manera bioinformática. Muestras con más de 100 CNVs fueron consideradas outliers y también fueron excluidas. Entre las muestras restantes se calculó la mediana de la profundidad de lectura y se consideró únicamente regiones con una mediana mayor a 10 como regiones correctamente capturadas para el análisis posterior. Todos los CNVs con frecuencia mayor a 1% fueron excluidos. Luego se utilizó Bedtools para buscar la intersección de los CNVs de alta calidad remanentes sobre el genoma, usando los intervalos génicos del kit de captura exómico (Quinlan et al., 2010).

5. Clasificación de variantes

Para la clasificación de variantes se siguieron los criterios del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (Richards et al., 2015) (Tabla 1.3).

	Benignas		Patogénicas			
Evidencia	Fuerte	Secundaria	Secundaria	Moderada	Fuerte	Muy fuerte
Frecuencia poblacional	Frecuencia demasiado alta para el desorden (BS1) u observado en controles de forma inconsistente con la penetrancia de la enfermedad (BS2)			Frecuencia baja o ausente (PM2)	Prevalencia elevada sobre controles (PS4)	
Predictiva		Variante missense en gen donde solo se han reportado variantes nulas (BP1) Indels que no cambian el marco de lectura en regiones repetitivas (BP3)		Mismo residuo afectado que otras variantes patogénicas conocidas (PM5) Cambio predicho en el largo de la proteína (PM4)	Resulta en el mismo cambio que otras variantes patogénicas conocidas (PS1)	Resulta en una variante nula en un gen donde la pérdida de función es un mecanismo de enfermedad conocido (PVS1)
Computacional		Múltiples líneas de evidencia computacional no sugieren impacto (BP4) Variante sinónima sin efecto en splicing predicho (BP7)	Múltiples líneas de evidencia computacional sugieren un impacto (PP3)			
Funcional	Ensayos establecidos demuestran que la función no se ve afectada (BS3)		Variante missense en un gen con pocas variantes missense LB/B y muchas LP/P (PP2)	Hot-spot mutacional o dominio funcional crítico sin variación benigna (PM1)	Ensayos establecidos demuestran un efecto funcional (PS3)	
Segregación	No segrega con la enfermedad (BS4)	Observada en con una variante LP/P en *trans* en una enfermedad AD o en *cis* en una enfermedad AR (BP2)	Segrega con múltiples familiares afectados (PP1)	De novo sin test de paternidad (PM6) En trans con una variante LP/P en una enfermedad AR (PM3)	De novo con test de paternidad (PS2)	
Reportes previos		Considerada LB/B (BP6)	Considerada LP/P (PP5)			
Otra información		En paciente con otra explicación para la enfermedad (BP5)	Fenotipo sumamente específico para un gen (PP4)			

Tabla 1.3. Criterios ACMG utilizados para evaluar la patogenicidad de las variantes.

Los criterios considerados se detallan a continuación:

i) Una variante fue considerada **patogénica (P)** si la variante presentaba:

- 1 evidencia muy fuerte (PVS1) y:
  - 1 evidencia fuerte (PS1-PS4) o
  - 2 evidencias moderadas (PM1-PM6) o
  - 1 evidencia moderada (PM1-PM6) y una secundaria (PP1-PP5)
  - 2 evidencias secundarias (PP1-PP5)
- 2 evidencias fuertes (PS1-PS4)
- 1 evidencia fuerte (PS1-PS4) y:
  - 3 evidencias moderadas (PM1-PM6) o
  - 2 evidencias moderada (PM1-PM6) y 2 secundarias (PP1-PP5) o
  - 1 evidencia moderada (PM1-PM6) y 4 secundarias (PP1-PP5)

ii) Una variante fue considerada **probablemente patogénica (LP)** si la variante presentaba:

- 1 evidencia muy fuerte (PVS1) y 1 evidencia moderada (PM1-PM6) o
- 1 evidencia fuerte (PS1-PS4) y
  - 1 evidencia moderada (PM1-PM6) o
  - 2 evidencias secundarias (PM1-PM6)
- 3 evidencias moderadas (PM1-PM6) o
- 2 evidencias moderadas (PM1-PM6) y 2 evidencias secundarias (PP1-PP5) o
- 1 evidencia moderada y 4 evidencias secundarias (PP1-PP5

iii) Una variante fue considerada **probablemente benigna (LB)** si:

- La variante presentaba una variante fuerte (BS1-BS4) y una secundaria (BP1-BP7) o
- 2 variantes BP1-BP7

iv) Una variante fue considerada **benigna (B)** si:

- La variante presentaba dos variantes fuertes (BS1-BS4)

v) Una variante fue considerada de **significado incierto (VUS)**:

- La variante no cumplía ninguno de los criterios anteriores o
- Los criterios de benignidad y patogenicidad se contradecían

6. Secuenciación por Sanger

Los *primers* para la secuenciación por Sanger fueron diseñados utilizando Primer-BLAST (Ye et al., 2012) y encargados a IDT (Integrated DNA Technologies) (Tabla 1.4). Los productos de PCR fueron amplificados en reacciones de 25 uL, utilizando PFU DNA polimerasa (Inbio Highway, #K1100). Los productos de PCR fueron purificados usando Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo, cat#D4007) y enviados a secuenciación directa.

Gen	Variante a confirmar	Orientación	Secuencia	Tamaño del producto
MKS1	c.323G>A	Forward	ATGTTCTTGGTTCCCCTGCC	507
MKS1		Reverse	CAGCCTCACCACCTGTAGAC	
MKS1	c.1436G>A	Forward	CACACCCTGACAGTCTCCAC	1196
MKS1		Reverse	GCACTGGCCTCAGATATCCC	
ALG1	c.773C>T	Forward	CCTGATTGGCTGCAGTGAGA	1469
ALG1				
ALG1	c.826C>T	Reverse	TGAATGTCAGGGGCCTGTTT	
ALG1				
PIBF1	c.157C>T	Forward	CCCTGACCAACTCAGACGTG	710
PIBF1		Reverse	TACCTGCCGTTTGAAGACAA	
PIBF1	c.1214G>A	Forward	GGCTAAAAGATCACGGTGTGG	882
PIBF1		Reverse	TGTCCTCAATCTGAACTGAAGCA	
PIBF1	c.1356_1360del AGTAA	Forward	AATAGCAAGCTGGGAAACAATGC	588
PIBF1		Reverse	TGTACTTAGGGAGTTTACATGCCA	
ROBO1	c.2647C>T	Forward	CCTGCAAACCTCTTTGGTTCG	631
ROBO1		Reverse	CGCAGCACAATAAACGCACT	
GH1	c.119T>G	Forward	TTCTCTAACACAGCTCTCAAAGTC	962
GH1		Reverse	TATCGCCATGTAAGCCCAGTA	
PROP1	c.46C>T	Forward	GTCTCACATCCCCACTGCAA	644
PROP1		Reverse	GAAGGGCCAGGCAGAGAAAA	
PROP1	c.343-1G>A	Forward	TCCACTCACCAGCAACTGTC	801
PROP1		Reverse	GGGACAAGTCTGTGGGTTCC	
CDON	c.1063_1065del TCT	Forward	ATGTTGTGGGGAGTTAAGTGG	642
CDON		Reverse	CCGTTCTTGTACGGTGCTAGG	
FGFR1	c.992T>C	Forward	GCACCCCATTTGCCAGAAAG	622
FGFR1		Reverse	AGTGCCTCCTCTCCCATCTT	
PTPN6	c.1717A>T	Forward	GGCCTGGACTGTGACATTGA	964
PTPN6		Reverse	GGGAAGCACAGAATGAGGCT	

Tabla 1.4. *Primers* utilizados para secuenciación directa.

7. Modelado estructural de proteínas

Las estructuras de ROBO1 fueron descargadas de https://www.rcsb.org/. El cristal con pdbid 2V9T fue elegido para modelar la variante p.Ile78Met debido a su alta resolución y su representación de la interacción con el ligando SLIT2. El cristal pdbid 2V9R fue elegido

como modelo para la variante p.Asn244Asp debido a su alta resolución en la posición de interés (Morlot et al., 2007). Estructuras alternativas fueron generadas a partir de estos cristales utilizando Modeller y visualizadas utilizando VMD (Webb et al., 2016, Humphrey et al., 1996).

8. Revisión sistemática de la literatura

Se llevó a cabo una búsqueda bibliográfica de acuerdo a las recomendaciones de PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis*). Las publicaciones de PubMed y SCOPUS fueron examinadas de manera sistemática, utilizando las palabras clave “sequencing” y “hormone deficiency”. En cada caso se registró: el número total de pacientes índice, número de casos esporádicos, número de casos familiares, origen del paciente, número de variantes encontradas en cada publicación relevante. Reportes con menos de diez casos o sin información suficiente respecto a las variantes encontradas fueron excluidos. Las variantes reportadas fueron clasificadas de acuerdo a los criterios ACMG utilizando Franklin (https://franklin.genoox.com/clinical-db/home), en caso de que no hubieran sido reportadas en base a estos criterios o que los criterios para llegar a la clasificación reportada no fueran transparentes. Variantes reportadas en genes no asociadas a HC no fueron consideradas a menos que el motivo hubiese sido explicitado en el artículo o en la información suplementaria (i.e. los autores consideraron a ese gen como un posible gen candidato).

CAPÍTULO 1: RESULTADOS

Los resultados del capítulo 1 fueron publicados en *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* (Martinez-Mayer et al., 2024a). doi: 10.1210/clinem/dgae320.

Se secuenciaron 137 casos índice mediante secuenciación de exoma completo (WES por *whole exome sequencing*), correspondientes a 131 casos esporádicos y 6 casos familiares de hipopituitarismo congénito (HC). Todos los casos familiares fueron de dos hermanos/as afectados/as, por lo que el total de pacientes de la cohorte fue de 143, compuestos de 88 hombres y 55 mujeres con una relación de 1.6 hombres por cada mujer afectada, valores en línea con lo reportado en literatura (Jagtap et al., 2011) (Figura 1.1).

La mayoría de los casos estudiados (68%) presentaban deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (CPHD), mientras que 30% deficiencia aislada de GH (IGHD) o hipotiroidismo centra congénito (ICeCH, 1.4%). El 21% de los pacientes con CPHD presentaron también displasia septo-óptica (SOD), mientras que este mismo fenotipo no se observó prácticamente en casos de IGHD. La mayoría de los probandos presentaron además afecciones en otros sistemas, siendo los más frecuentes, el sistema nervioso central (37.6%), el sistema visual (27.8%) y anomalías craneofaciales (25.4%) (Figura 1.1).

Para estos 137 casos índice se encontraron variantes LP/P concluyentes en 28 casos, mientras que se encontraron variantes LP/P no concluyentes o VUS relevantes en 71 casos (Figura 1.1). Las variantes encontradas comprenden genes con alta evidencia de asociación al HC así como variantes en genes candidatos o recientemente asociados a HC (Figura 1.2a). Dentro del grupo de genes previamente reportados como causantes de HC, los más frecuentemente alterados en las muestras fueron *ROBO1* (4 casos, 1 familiar), *CHD7* (3 casos), *GH1* (2 casos, 1 familiar) y *SOX2* (2 casos). También se encontraron variantes LP/P para *FGFR1*, *GHR*, *GLI2*, *LHX4*, *PROP1*, *PTPN11* y *TGIF1.*

Respecto a genes candidatos, se encontraron variantes LP/P en más de un caso en *ACAN* (2 casos), *PIBF1* (2 casos) y en un caso familiar para *ALG1*. También se encontraron variantes LP/P en casos individuales para los genes *GNAS* y *KDM6A*.

Por último, se encontraron variantes LP/P en casos individuales, en genes sin evidencia suficiente para dar por concluido el caso: *ARID5B*, *CACNA1E*, *CC2D2A*, *CNN3*, *COL1A1*, *PPM1D*, *CPLANE1*, *DOT1L*, *FGFR2*, *FOXP1*, *LTBP3*, *PELI1*, *PLPPR4*, *POU5F1*, *PTPN6*, *PTPN13*, *RBM4*, *RICTOR*, *RIMBP2* y *TIPARP*.

Interesantemente, se encontraron cinco casos con deleciones cromosómicas consideradas patogénicas, de las cuales cuatro están asociadas a deleciones en genes conocidos causantes de HC (Figura 1.2b).

Es importante destacar que el número de casos resueltos es alto y se encuentra por encima de la media de todos los estudios realizados hasta el momento para esta patología. Como es de esperarse, la proporción de casos resueltos familiares es muy superior respecto a los esporádicos. De los seis casos familiares se encontró un diagnóstico genético certero para cuatro de ellos (66,6%), mientras que para el resto de los 131 casos esporádicos, se encontró un diagnóstico genético para 25 casos (19.1%).

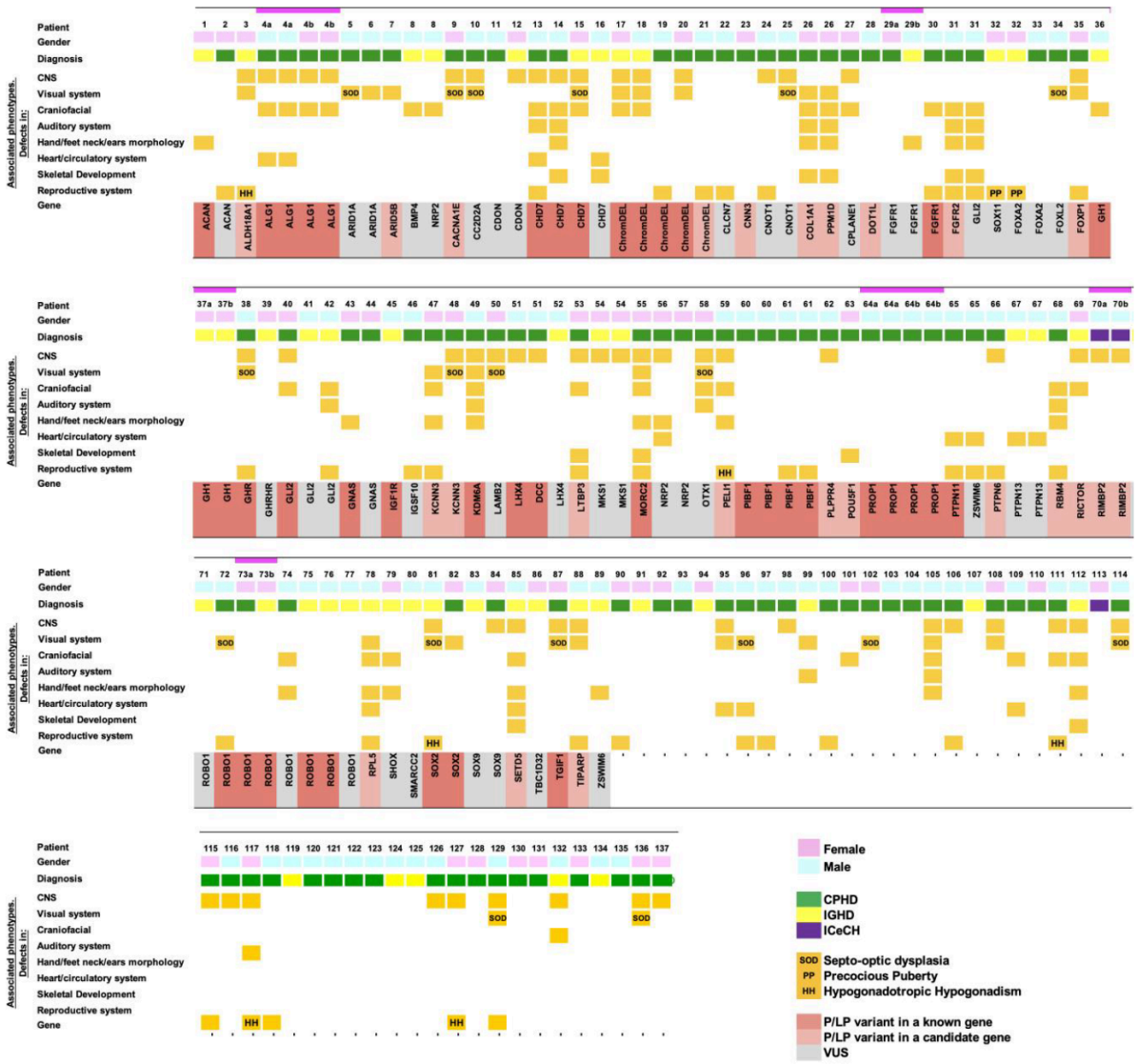

Figura 1.1. Resumen clínico y genético de la cohorte. Se secuenciaron un total de 137 casos (143 pacientes) con CPHD, IGHD o ICeCH. Los pacientes se muestran por columna de izquierda a derecha. Se encontraron variantes candidatas en 89 casos, de las cuales 58 mutaciones fueron clasificadas como LP o P y 31 fueron clasificadas como VUS. Se detallan además fenotipos extra-hipofisarios: en sistema nervioso central (CNS), sistema visual, anomalías craneofaciales, en sistema auditivo, en la morfología de manos y pies, en sistema circulatorio y corazón, en desarrollo esquelético y en sistema reproductivo. Los casos familiares se indican con líneas color magenta. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024a. CPHD = *combined pituitary hormone deficiency*; IGHD, = *isolated growth hormone deficiency*; ICeCH = *isolated central congenital hypothyroidism*; LP = *likely pathogenic*; P = *pathogenic*; VUS = *variant of unknown significance*.

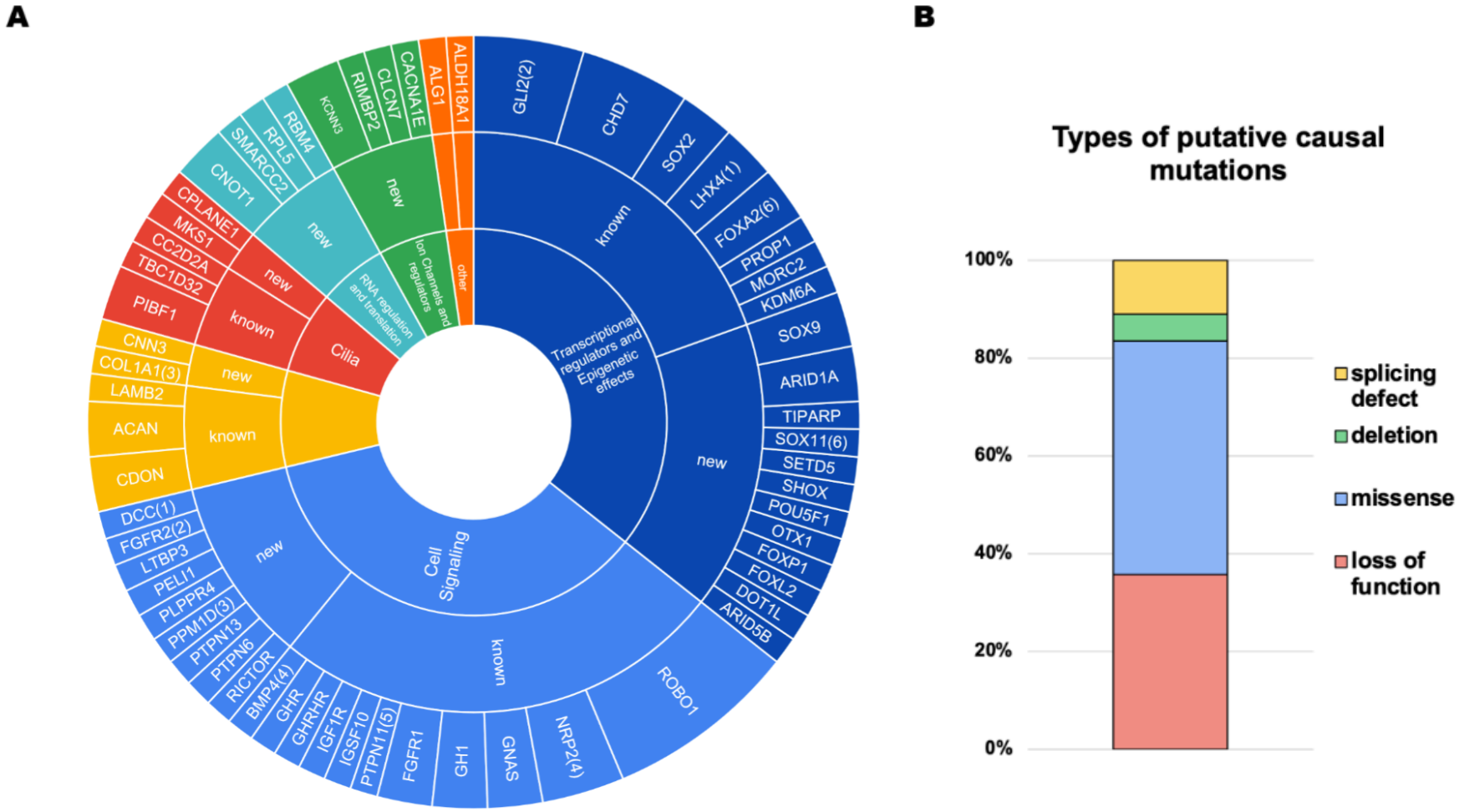

Figura 1.2. (A) Resumen de todos los genes encontrados, agrupados por función celular y distinguidos entre conocidos y nuevos. El ancho de cada gen incluido se corresponde con el número de casos en los que se encontró una variante VUS, LP o P en dicho gen. **(B)** Proporción entre categorías de variantes encontradas, divididas entre variantes de pérdida de función (stop codon prematuros y frameshifts), variantes missense, deleciones y defectos de splicing. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024a.

A continuación se discutirán en más detalle los casos que cuentan con diagnóstico definitivo mencionados anteriormente, a excepción de *MORC2* y *SETD5* que se discutirán en el capítulo 2.

1. Casos con variantes en genes conocidos

ROBO1

Uno de los hallazgos más sorprendentes de este estudio fue el elevado número de variantes encontradas en *ROBO1*. Se reportan un total de ocho pacientes afectados en siete familias, incluyendo un caso gemelar (Figura 1.3). Las gemelas (pacientes 73a y 73b) comparten la variante c.2647C>T, p.Gln883* en *ROBO1* (ENST00000464233.6), pero sus fenotipos no son idénticos. La paciente 73a presentaba CPHD (GH, TSH, ACTH, FSH y LH), baja talla y PSIS. En cambio, la paciente 73b presentaba únicamente IGHD, con un aracnoidocele intraselar, APH, tallo fino, pero una PP eutópica. En este caso la mutación fue confirmada como *de novo* mediante Sanger (Figura 1.3b). Es el primer caso gemelar con variantes en *ROBO1* y demuestra la variabilidad fenotípica como consecuencia de variantes en este gen y sugiere la existencia de alelos modificadores.

De los seis casos restantes, tres tienen variantes LP/P y tres VUS. El paciente 75 presentó la duplicación c.1529dupT, que lleva al frameshift p.Gln511fs, y el paciente 76 un codón stop prematuro (c.1463G>A, p.Trp488*). Ambos casos fueron de IGHD, APH y EPP con diagnóstico de PSIS. La tercer mutación LP/P fue encontrada en el paciente 72, también siendo codón stop prematuro (c.4510C>T, p.Arg1504*). Este paciente presentaba CPHD, con síndrome de interrupción del tallo (PSIS, APH, EPP y tallo fino) y displasia septo-óptica (SOD, con hipoplasia del nervio óptico).

Los últimos tres pacientes presentaban variantes missense (Paciente 71: c.234T>G, p.Ile78Met; Paciente 77: c.730A>G, p.Asn244Asp; Paciente 74: c.4821G>A, p.Met1607Ile). Dos de estas variantes, p.Ile78Met yp.Asn244Asp, están ausentes de GnomAD y los aminoácidos se encuentran conservados, formando parte de los dominios Ig1 e Ig2 respectivamente (Figura 1.3a). En particular Ig1 ha sido comprobado como el dominio más importante para la transducción de señales en *Drosophila* (Spitzweck et al., 2010). El modelado proteico de la variante p.Ile78Met sugiere una posible disrupción de la unión de SLIT1 dado un mayor impedimento estérico (Figura 1.3c). El modelado de p.Asn244Asp muestra una pérdida de un puente de hidrógeno que podría ser clave para la estabilidad del giro en el dominio Ig2 (Figura 1.3c). La tercera variante missense tiene una frecuencia baja en GnomAD (<0.0001) y cae cercana al N-terminal del final de la proteína y podría por lo tanto afectar la señalización intracelular.

La alta prevalencia de variantes en *ROBO1* en esta cohorte y la expansión de fenotipos asociados a las mismas arroja nueva luz sobre su rol en las deficiencias hipofisarias congénitas.

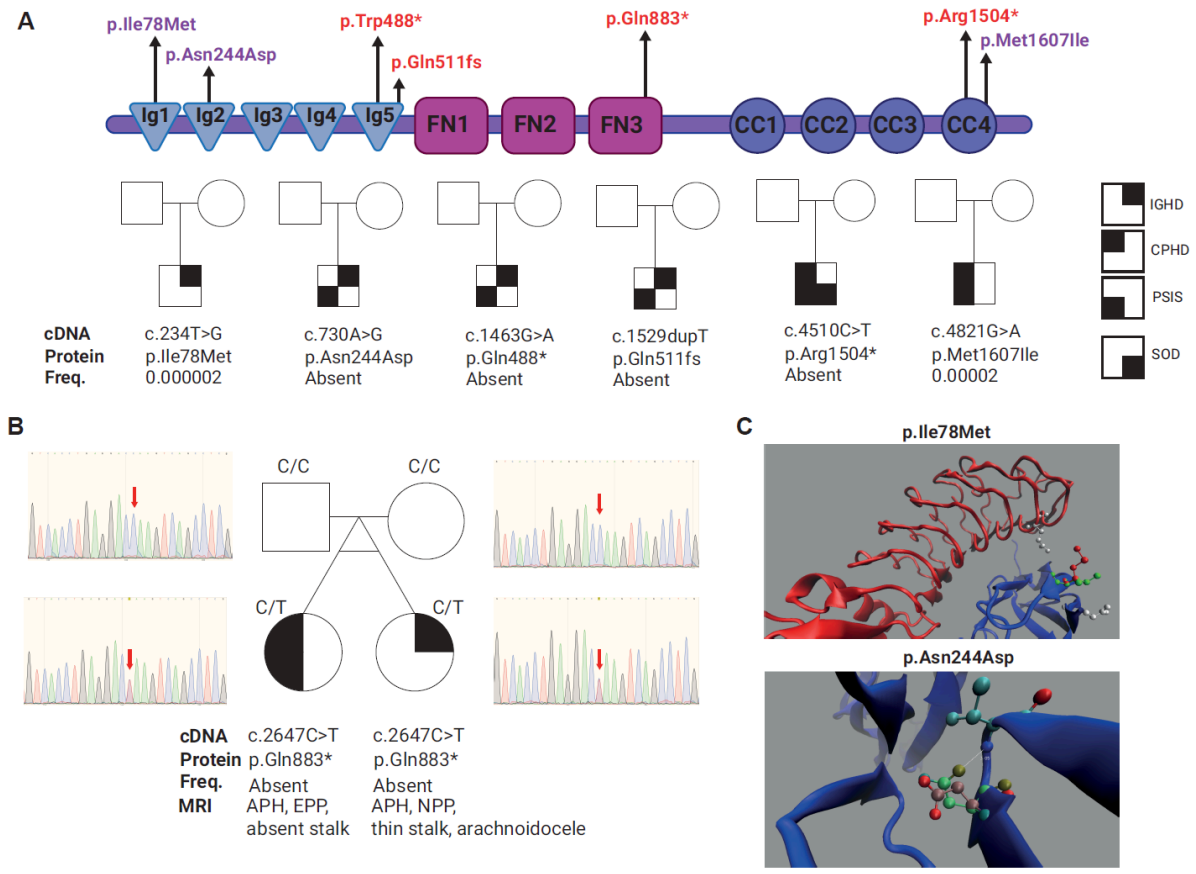

Figura 1.3. *ROBO1* es el gen más frecuentemente mutado en la cohorte. **(A)** Esquema de los dominios de ROBO1 y las variantes encontradas en la cohorte con sus correspondientes pedigrees y fenotipos. Abreviaturas: CC = dominio citoplasmático conservado; FN = dominio tipo fibronectina; Ig= dominio tipo inmunoglobulina. **(B)** Pedigree y detalle clínico de dos gemelos monocigóticos secuenciados en esta cohorte. Ambos presentaban la variante *de novo* *ROBO1*:c.2647C>T, p.Gln883*. **(C)** Modelado proteico de las variantes p.Ile78Met y p.Asn244Asp. SLIT1 se muestra en rojo (panel superior) y ROBO1 se muestra en azul (ambos paneles). Los aminoácidos originales se muestran en verde, mientras que los aminoácidos mutados se muestran en rojo. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024a.

CHD7

En esta cohorte tres pacientes presentaban características de síndrome de CHARGE y variantes nonsense en *CHD7*. La madre del paciente 13 tuvo un desprendimiento de placenta y fue sometida a cesárea. El paciente presentaba anomalías del pabellón auricular, labio leporino severo con paladar hendido, un paladar blando extenso y disfagia. Presentaba también baja talla, hipoplasia de genitales externos, criptorquidismo

bilateral y una hernia inguinal. Asimismo, presentaba ductus arteriosus sin consecuencias hemodinámicas, epilepsia y retraso global del desarrollo. La variante hallada en este caso fue P c.5101C>T, p.Gln1701* en *CHD7* (ENST00000423902.7).

El paciente 14 tuvo un gran número de anormalidades esqueléticas, incluyendo escoliosis, polidactilia y dientes supernumerarios. También fue diagnosticado con labio leporino, baja talla y CPHD. Además, presentaba un quiste faríngeo y una malformación coclear que resultaba en hipoacusia. El paciente fue positivo para la variante P c.6208dupC, p.His2070fs en *CHD7*.

El paciente 15 presentaba paladar hendido severo, agenesia del cuerpo calloso, estrabismo y ptosis del ojo derecho. También sufría de baja talla y fue diagnosticado con CPHD. Este paciente portaba la variante P c.5951delT, p.Phe1985fs en *CHD7*.

Un cuarto caso, el paciente 16, portaba la variante c.1112G>A, p.Gly371Asp. Dado que es una variante missense (y no LOF) y que debido a que no se contaba con con ADN de los padres, no se pudo comprobar su herencia, se la considera VUS. El fenotipo del paciente incluía una comunicación interventricular, siringomielia, secuencia de disrafismo espinal oculto y un sacro displásico. Además, fue diagnosticado con IGHD y PSIS.

Estos hallazgos demuestran que las mutaciones en *CHD7,* en pacientes con HC, pueden ser una causa más común de lo anticipado. Además, es posible que mutaciones missense en este gen podrían causar HC, incluso con pocos o ningún fenotipo típico de CHARGE (Obata et al., 2023).

SOX2

Dos pacientes, 81 y 82, presentaron la misma variante P previamente reportada en *SOX2* (ENST00000325404.3: c.70_89del, p.Asn24fs). La variante cae en un hot-spot mutacional, también previamente reportado (Amlie-Wolf et al., 2021). Sus fenotipos clínicos eran similares, presentando ambos anoftalmia sindrómica y CPHD (GH, FSH, LH).

GH1

En el paciente 36, que presentaba IGHD, se encontró la variante de splicing c.291+1G>C en *GH1* (ENST00000323322.10), predicha por spliceAI como donor loss (score = 0.93) (Jaganathan et al., 2019) y que ha sido reportada previamente (Cogan et al., 1995). En un caso familiar de IGHD se encontró una variante missense compartida por ambas hermanas afectadas (pacientes 37a y 37b). No se contaba con ADN de la madre, pero el padre fue negativo para la variante LP c.119T>G, p.Met40Arg y se espera que la variante actúe de manera AD (Figura suplementaria 1.1). El aminoácido, en la posición 40,

está altamente conservado y muy próximo al sitio de unión entre GH1 y GHR (Pandey 2012), donde una variante (p.Arg42Cys) ya ha sido descripta (Millar et al., 2003). Ambas hermanas presentaban además una variante en *LHX3* (ENST00000371746.9: c.935G>C, p.Arg312Pro), pero esta variante ha sido encontrada en homocigosis en la población sana por lo que se la consideró benigna.

GHR

El paciente 38 sufría de IGHD, como resultado de presentar la variante LP c.1405delG, p.Glu469fs en *GHR* (ENST00000620156.4). La variante está ausente en GnomAD y no ha sido reportada previamente. Aunque este caso se trata técnicamente de un caso de insensibilidad a la GH, el paciente fue inicialmente diagnosticado con IGHD debido a una mala respuesta ante las pruebas de estimulación.

FGFR1

En dos familias con una presentación clínica similar, que consistía en CPHD con una deficiencia de GH parcial e hipogonadismo, se encontraron mutaciones en *FGFR1*. Ambas mutaciones eran missense (ENST00000447712.6:c.899T>C, p.Ile300Thr y c.1080A>C, p.Glu360Asp), clasificadas como VUS y LP respectivamente. La variante p.Ile300Thr, a pesar de ser una VUS, correspondía a un caso familiar, siendo la variante compartida tanto por el hermano del paciente índice, que presentaba un fenotipo similar, como por la madre sana (Figura suplementaria 1.1). La variante LP p.Glu360Asp está ausente en GnomAD y se ubica en el exón 8 de *FGFR1*, que es reconocido como un hot-spot mutacional.

GLI2

Las mutaciones en GLI2 son frecuentes en esta cohorte, aunque solo una de ellas puede considerarse LP/P hasta el momento.

El paciente 40 presentaba retraso global del desarrollo, epilepsia, apiñamiento dental, hernia umbilical, piel seca y baja talla. Fue diagnosticada con CPHD y su resonancia mostró una AP severamente hipoplásica, además de un tallo interrumpido y PP ectópica. Se encontró en este paciente la variante LP c.1108del, p.Ala370fs en *GLI2* (ENST00000361492.8).

El paciente 42 presentaba una VUS c.1493C>T, p.Thr498Met en *GLI2*. Sus fenotipos incluían frente amplia, macrocefalia, un puente nasal hipoplásico, criptorquidismo, fimosis, baja talla, con peso bajo y bronquitis recurrente. Fue diagnosticado con IGHD y una MRI normal, excepto por un cuerpo calloso levemente fino.

El tercer caso es posiblemente oligogénico, con una VUS en *GLI2* (c.1717A>G, p.Lys556Glu) y otra en *LHX4*. Se describe en la siguiente sección. Otros tres pacientes presentaron variantes en *GLI2* con baja frecuencia en GnomAD, pero que se especula que no explican todo el fenotipo y además poseen variantes LP en otros genes (el paciente 33 tiene una variante LP en *ACAN* y el paciente 42 variantes heterocigotas compuestas en *PIBF1*). Esto apoya la idea de que las variantes en *GLI2*, si bien comunes en paciente con HC, no siempre son la causa, al menos primaria, del fenotipo de estos pacientes.

LHX4

En el paciente 51 se encontraron dos variantes patogénicas: *LHX4* (ENST00000263726.4, c.569T>C, p.Leu190Pro) y *DCC* (ENST00000442544.7: c.942delT, p.Tyr314fs). El fenotipo del paciente abarca baja talla, retraso en el desarrollo del habla, extremidades pequeñas y voz aguda. Su resonancia mostró un quiste hipofisario con expansión supraselar, una PP ausente y una tallo malformado, además de un quiasma óptico desplazado, sin afectación de la visión. Si bien el cambio p.Leu190Pro no ha sido reportado anteriormente, comparte la posición con la variante previamente reportada p.Leu190Arg, en el homeodominio de la proteína (Pfaeffle et al., 2007a). La única otra variante reportada hasta la fecha previamente asociada con quistes hipofisarios en *LHX4* es p.Arg210Pro (Pfaeffle et al., 2007a, Tajima et al., 2013), también en el homeodominio y también un cambio a prolina, lo que sugiere que una disrupción severa del homeodominio de LHX4 podría predisponer a la formación de quistes hipofisarios. Es interesante que la presentación de retraso del desarrollo cognitivo pueda deberse a la segunda variante en el gen *DCC*, que puede causar movimientos en espejo y anormalidades en el cuerpo calloso (MIM#120470). Algunos pacientes con variantes en este gen presentan además retraso en el desarrollo del lenguaje, pero la penetrancia para este desorden es incompleta (Marsh et al., 2017).

PROP1

En esta cohorte, contrario a lo esperado según la literatura, se encontró únicamente un caso con variantes en *PROP1*, tratándose de un caso familiar. El paciente 64a presentaba dos variantes heterocigotas compuestas (P) en *PROP1* (ENST00000308304.2), confirmadas por secuenciación de Sanger (Figura suplementaria 1.1). Una de ellas es una variante *novel* de splicing c.343-1G>A y la otra es de pérdida de función, c.46C>T, p.Arg16*, que presenta muy baja frecuencia en la población sana (0,000007 en GnomAD v4.1.0). Su hermano (paciente 64b), tenía la misma combinación de variantes patogénicas. Sus características clínicas eran similares, donde ambos fueron diagnosticados con CPHD (GH, TSH, ACTH), pero el paciente 64a presentaba una deficiencia de acetilhidrolasa del factor

activador de plaquetas de origen desconocido (no se encontraron variantes en el gen causal *PLA2G7*).

TGIF1

El paciente 87 tuvo un diagnóstico de SOD, con discapacidad intelectual y anomalías cerebrales, incluyendo polimicrogiria. Su resonancia mostraba además hipoplasia del nervio óptico, del quiasma óptico y del tracto óptico, junto con APH e interrupción del tallo. En su exoma se encontró la variante ENST00000330513.9: c.228delG, p.Ser77fs, ausente en la población sana y considerada P. La variante genera un frameshift en la isoforma C de la proteína, que utiliza un codón de iniciación alternativo, río arriba de la isoforma canónica (Hamid et al., 2008). El rol de las distintas isoformas de TGIF1 en HPE no ha sido estudiado en profundidad, pero se cree altamente probable que el frameshift en este caso explique el fenotipo del paciente.

2. Casos con variantes en Genes candidatos

ACAN

ACAN es un gen candidato para HC, que ha sido habitualmente asociado a baja talla (ver anexo). En la cohorte se encontraron dos pacientes con variantes LP en *ACAN*. La paciente 1 fue diagnosticada a los 4 años de edad con IGHD parcial (6.7 ng/mL de pico post estimulación con arginina). Presentaba además dedos levemente dismórficos y la resonancia mostraba una AP hipoplásica. En el análisis de su exoma se encontró además una variante VUS en *GLI2* (ENST00000361492.8, c.3348C>G, p.Asn1116Lys), pero dado que la variante en ACAN se considera diagnóstica para este paciente, esta variante estaría funcionando como un modificador o simplemente no tener efecto. El segundo paciente presentaba un codón *stop* prematuro en *ACAN* (c.6883G>T, p.Glu2295*), pero que afecta solo un pequeño porcentaje de la proteína y su clínica no era la esperada, dado que presentaba CPHD y no IGHD, por lo que esta variante no se considera diagnóstica.

PIBF1

En esta cohorte se encontraron dos pacientes con variantes heterocigotas compuestas en *PIBF1* (Figura suplementaria 1.1). El paciente 60 presentaba un frameshift novel (ENST00000326291.11, c.1356_1360delAGTAA, p.Lys452fs) junto con una variante missense poco frecuente (c.1214G>A, p.Arg405Gln). Esta variante missense ha sido reportada previamente en conjunto con una variante también de frameshift (Wheway et al., 2015). Una combinación similar de variantes fue encontrada en el paciente 61, que tenía un codón stop prematuro (c.157C>T, p.Arg53*) en combinación con la misma missense (c.1214G>A, p.Arg405Gln). El cambio p.Arg405Gln está presente en homocigosis en la

población sana (GnomAD = 0.0003), sin embargo, solo estos dos pacientes la presentaron en la cohorte estudiada. Esta variante produciría entonces un alelo hipomorfo leve, que solo causa enfermedad cuando se ve acompañado de otra variante de pérdida de función completa. Por lo tanto la variante sería benigna cuando se encuentra en heterocigosis u homocigosis, pero debe ser clasificada como LP cuando se encuentra en heterocigosis compuesta con una variante LP/P.

Estos dos casos, junto con un reporte clínico (Gippert et al., 2023) y evidencia reciente que indica que los ratones *knock-out* para *Pibf1* presentan hipófisis dismórficas (comunicación personal de la Dra. Buffy Ellsworth), cementan el rol de *PIBF1* como un gen causante de dismorfogénesis hipofisaria e hipopituitarismo.

ALG1

Variantes de pérdida de función en *ALG1*, involucrado en la N-glicosilación, causan un desorden de glicosilación (Figura suplementaria 1.1). En los 73 casos reportados hasta la fecha, únicamente dos reportaban deficiencias de hormonas hipofisarias (Öncül et al., 2021, Xue et al., 2023). Se encontró un caso familiar (pacientes 4a y 4b) de deficiencia de ALG1 asociado a HC. Ambos hermanos presentaban retraso en el desarrollo, plagiocefalia, convulsiones, microcefalia adquirida, además de deficiencia de TSH y ACTH. El caso 4a, tiene baja talla (-3.8 SDS), y aunque la deficiencia de GH no pudo ser confirmada, sus niveles de IGF1 eran bajos, sugiriendo resistencia a GH, algo común en desórdenes de glicosilación (Verheijen et al., 2019). La hermana, paciente 4b, tuvo que ser tratada de manera neonatal por hipoglucemia. Presentaba hepatomegalia y baja talla, pero tenía valores normales de GH e IGF1. La morfología hipofisaria era normal en ambos pacientes.

Se hallaron dos variantes en heterocigosis compuesta *ALG1* c.773C>T, p.Ser258Leu y c.826C>T, p.Arg276Trp (ENST00000262374.9, Q9BT22). Ambas variantes fueron reportadas previamente y son consideradas LP y P respectivamente. *ALG1* c.773C>T fue heredada del padre y c.826C>T de su madre (Figura suplementaria 1.1). Aunque los desórdenes de glicosilación afectan sistemas endócrinos (Miller et al., 2003, Medrano et al., 2019), estos genes no son normalmente evaluados en casos de hipopituitarismo, incluso en los análisis por WES/WGS. Este caso familiar de CPHD demuestra que *ALG1* es una causa rara de HC.

GNAS

Variantes inactivantes en *GNAS* causan pseudopseudohipoparatiroidismo (P)PHP). En algunos casos los pacientes presentan además IGHD y resistencia a otras hormonas (ver anexo). En esta cohorte dos pacientes presentaban variantes missense en *GNAS*. El

paciente 43 con CPHD (GH y TSH), tiene una variante LP c.2620C>T, p.Arg874Cys (en ENST00000371100.8 o ENST00000371085.8: c.691C>T, p.Arg231Cys), que ha sido reportada previamente en ClinVar (VCV000816910). El paciente 44 con CPHD (GH, TSH, ACTH) e hipogonadismo, tiene una VUS, c.1457A>C, p.His486Pro (ENST00000371100.8), ausente de GnomAD. El primero de estos casos se considera resuelto, dada la patogenicidad de la variante y los reportes que vinculan a *GNAS* con deficiencia de GH.

KDM6A

Mutaciones en *KDM6A* causan síndrome de Kabuki (MIM#300867, ver anexo). En el paciente 49 se encontró una variante P, que codifica para un codón stop prematuro (ENST00000611820.4: c.421C>T, p.Arg141*). El paciente presentaba baja talla y CPHD (GH y TSH). La resonancia mostró APH y una hipoplasia del cuerpo calloso. Además, sufría retraso global del desarrollo, ventriculomegalia y retraso de la mielinización periventricular. Sus características faciales incluían microcefalia, frente ancha, puente nasal deprimido, narinas antevertidas, orejas con aumento de la rotación posterior y estrabismo convergente con ojos hundidos. Anormalidades de las manos incluían sindactilia entre el segundo y tercer dedo, punta de los dedos ancha e hiperlaxitud metacarpofalángica. Dado que la descripción clínica del paciente se asemeja a un caso de Kabuki típico y la variante encontrada se considera P, el caso se considera resuelto.

ARID5B

ARID5B pertenece a la misma familia que *ARID1A*, *ARID1B* y *ARID2*, todos causantes de síndrome de Coffin-Siris AD (ver anexo) y es un efector de PDGF (Schmahl et al., 2006). Además, es un gen altamente intolerante a la pérdida de función (pLI = 1, LEOUF = 0.212) sin enfermedades asociadas hasta el momento. Los ratones *knock-out* para *Arid5b* son *dwarf*, aunque su fenotipo ha sido atribuido a problemas en el desarrollo del cartílago y no a un problema hipofisario (Schmahl et al., 2006, Hata et al., 2013). El paciente 7 presentaba una codón stop prematuro LP en *ARID5B* (ENST00000279873.12: c.250C>T, p.Gln84*). Fue diagnosticado con CPHD (con baja talla severa) con APH y EPP, SOD, con hipoplasia del nervio óptico y miopía. Se reportaron episodios de epilepsia, con un encefalograma normal. También presentaba retraso del neurodesarrollo y del habla. Este es, hasta donde sabemos, el primer y único caso descripto con una variante LP/P en *ARID5B*, por lo que es necesaria más información para determinar su rol en el HC.

TIPARP

La enzima TIPARP (también conocida como PARP7), es la responsable de la mono-ADP-ribosilación de histonas y factores de transcripción (MacPherson et al., 2012).

Actualmente no se ha descripto una asociación a enfermedad con este gen, a pesar de su alta intolerancia a la pérdida de función (pLI = 1, LOEUF= 0.346). Los ratones *knock-out* para *Tiparp* presentan compromiso hematológico, hepático y defectos esqueléticos, que incluyen un hocico corto y ancho. Es particularmente interesante la descripción de una malformación del paladar, una característica compartida con los *Arid5b knock-outs*, dada la íntima relación entre la formación del paladar y la formación de la hipófisis (Schmahl et al., 2006, McCabe et al., 2014). El paciente portaba la variante LP de corrimiento del marco de lectura en *TIPARP* (ENST00000295924.12: c.27dupG, p.Pro10fs). El cuadro clínico del paciente se encuentra dentro del espectro de SOD, dada su hipoplasia bilateral del nervio óptico y del quiasma óptico, además de presentar nistagmus y CPHD. Su resonancia también mostró una AP ausente, una EPP y un tallo fino, además de agenesia del septum pellucidum, hipoplasia del cuerpo calloso y algunas características compatibles con HPE. Su talla era extremadamente baja (-4.79 SDS) y presentaba hipoplasia del maxilar, una característica coincidente con el modelo en ratones. Es interesante que PDGF se expresa en el cerebro y la hipófisis posterior, y ambos pacientes presentan anomalías en el cerebro y EPP. Se considera que el estudio de esta vía de señalización en el desarrollo hipofisario merece más estudios.

COL1A1 y *PPM1D*

La paciente 26 exhibía retraso global del desarrollo con hiperquinesia, rizomelia y baja talla severa. Su cuello es corto, su boca pequeña con labios finos y macrodontia, una raíz nasal deprimida, hipertelorismo ocular y distensión abdominal. Presentaba además hipotonia severa, con manos desproporcionadamente chicas y con clinodactilia leve en el quinto dedo. Fue diagnosticada con CPHD (GH, TSH) y pubertad precoz. Además, presentaba pérdida de audición y una historia familiar de fracturas. Se encontró una combinación de dos variantes probablemente patogénicas. La primera variante es un frameshift LP en *PPM1D*, que ha sido reportado previamente en ClinVar (VCV001705672, (NST00000305921.8: c.1249_1250insA, p.Pro417fs). Mutaciones en *PPM1D* causan síndrome de Jansen de Vries, una forma compleja de discapacidad intelectual. Al mismo tiempo se encontró otra variante LP en *COL1A1* (ENST00000225964.9, c.2362G>A, p.Gly788Ser), un gen vinculado a osteogénesis imperfecta. Es probable que algunos de los síntomas del paciente, como la rizomelia, se deban a esta variante, mientras otras, como el retraso global del desarrollo y la hiperquinesia, se deban a la variante en *PPM1D*. La deficiencia de GH probablemente sea también producto de esta última variante, en línea con reportes previos (Tuiskula et al., 2023).

FGFR2

El paciente 31 presentaba pliegue palmar transverso único y tuvo que ser tratado por hipoglucemia e ictericia neonatal antes de ser diagnosticado con CPHD, llegando a presentar baja talla extrema (-4.0 SDS). Presentaba además un surco del filtrum marcado, un puente nasal deprimido, una nariz bulbosa y orejas en taza (microtia grado II). Interesantemente también presentaba ausencia completa de cejas. Se encontraron dos variantes de interés, una en *FGFR2* y otra en *GLI2.* La variante de *GLI2* es una VUS (ENST00000361492.8: c.1717A>G, p.Lys573Glu), que cae en el quinto dominio de *zinc finger* y está ausente de GnomAD. La variante *FGFR2* (ENST00000457416.6: c.1994G>A, p.Arg665Gln) es considerada LP y ha sido reportada previamente en ClinVar (VCV000521431). En este caso se considera probable que el fenotipo complejo de este paciente se deba a la interacción de ambas variantes.

PLPPR4

El paciente 62 nació con bajo peso e ictericia prolongada, dada una atresia biliar que fue corregida quirúrgicamente. Presentaba además baja talla extrema (-5.7SDS) y facies peculiares con orejas de implantación baja y filtrum elongado. Fue diagnosticado con IGHD (7.8 ng/mL en respuesta a la prueba de arginina, IGF1 = 20 ng/mL) y respondió bien al tratamiento con rGH. Además, presentaba baja T4 a pesar de presentar TSH normal, lo que sugiere una afectación hipotalámica. Tiene un fenotipo no endócrino complejo, incluyendo retraso intelectual severo con problemas graves de lenguaje y dificultades en el movimiento. Además, presentaba pie bot (talipes equinovarus), cifosis dorsal, un pene curvado, testículos retraídos y malformaciones vasculares, incluyendo una coartación de la aorta y una pequeña comunicación interventricular. Su piel también exhibía anormalidades, incluyendo xantomatosis eruptiva, livedo reticularis y prurito persistente.

Se encontró una variante LP tipo frameshift en *PLPPR4* en este paciente (c.1756C>T, p.Gln538* ENST00000370185.7). Este gen codifica para una fosfatasa fosfolipídica, importante para el crecimiento axonal normal (Bräuer et al., 2003). Más recientemente se ha sugerido que la haploinsuficiencia en este gen podría causar deficiencia intelectual debido a la activación aberrante de mTor. De los tres pacientes reportados hasta la fecha, dos presentaron baja talla, pero no hay detalles clínicos endócrinos (Li et al., 2023b). Es posible entonces que, al menos en parte, el fenotipo del paciente se deba a la mutación encontrada y forme parte de un espectro fenotípico de este nuevo síndrome que aún no ha sido caracterizado en detalle.

RICTOR

RICTOR es el principal componente del complejo mTOR 2, un switch metabólico clave para la homeostasis celular. A pesar de su clara intolerancia a la pérdida de función (pLI = 1), *RICTOR* no ha sido asociado aún con enfermedad. El paciente 69 de esta cohorte tiene una variante LP (c.3813delG, p.Pro1272fs; ENST00000296782.9) en *RICTOR*. El paciente nació de manera extremadamente prematura, a las 27 semanas, por una ruptura de bolsa prematura y subsecuente oligoamnios. El aumento de peso fue dificultoso y permaneció internada en terapia intensiva por un período prolongado. Sus síntomas comprenden un retraso del desarrollo intelectual severo, hipertelorismo ocular, cuello corto y baja talla, posiblemente en consecuencia de su IGHD. La resonancia mostró una PAH, un tallo extremadamente fino y un quiste pineal. Además, presentó hipertrigliceridemia e hipercolesterolemia moderada. Hasta donde sabemos, este es el primer caso reportado de un paciente con una variante en *RICTOR*, llevando a un cuadro neurológico y metabólico complejo, con involucramiento hipofisario.

PTPN11

El paciente 65 inició la consulta debido a baja talla e hipotonía y fue diagnosticado con CPHD (GH, ACTH, TSH). Además, exhibía criptorquidismo, indicando una posible deficiencia de gonadotrofinas. Respecto a fenotipos extra hipofisarios, tiene cuello corto y facies peculiares con narinas antevertidas e hipertelorismo mamario. Tiene además una coartación de la aorta, una presentación rara del síndrome de Noonan (Marino et al., 1999). Se encontró en este caso una mutación P (ENST00000351677.7: c.1472C>T, p.Pro491Leu) en *PTPN11*, previamente reportada como P en ClinVar (VCV000040552). El paciente también presentaba una variante que lleva a un codón stop prematuro en *ZSWIM6* (pLI = 1), ausente de la población sana. Sin embargo, esta variante cae en el primer exón de *ZSWIM6* que es mucho más tolerante que el resto del gen y por lo tanto fue clasificada como VUS en lugar de LP. Además, la variante recurrente de novo encontrada en *ZSWIM6* en individuos con disostosis frontonasal es considerada de ganancia de función y no de pérdida de función (Smith et al., 2014).

PTPN13

El paciente 67 manifestaba IGHD con una AP normal, tallo fino y EPP. Además, de su baja talla, presentaba retorno venoso pulmonar anómalo y una comunicación interventricular que tuvo que ser corregida quirúrgicamente. Otros rasgos fenotípicos son pelo corto y escaso, características del síndrome tipo Noonan (NSLH, *Noonan like syndrome with loose anagen hair*), que ha sido reportado con IGHD (Mazzanti et al., 2003). El síndrome tipo Noonan es causado por variantes en *SHOC2* y *PPP1CB*, pero variantes en

estos genes fueron excluidas. El paciente porta dos variantes en *PTPN13*, posiblemente en heterocigosis compuesta. *PTPN13,* al igual que *PTPN6*, carece de asociaciones en OMIM, pero tiene un LOEUF mayor (0.738). Las variantes son un frameshift (ENST00000436978.5: c.2793dupT, p.Leu932fs) y una variante de splicing putativa (c.1195+27A>C). Ambas están ausentes en GnomAD v4.0.0 y son clasificadas como LP y VUS respectivamente. Dado el pathway en común entre SHOC2 y proteínas de la familia PTPN, y las características distintivas del paciente, se considera que *PTPN13* es un gen candidato para NSLH con IGHD.

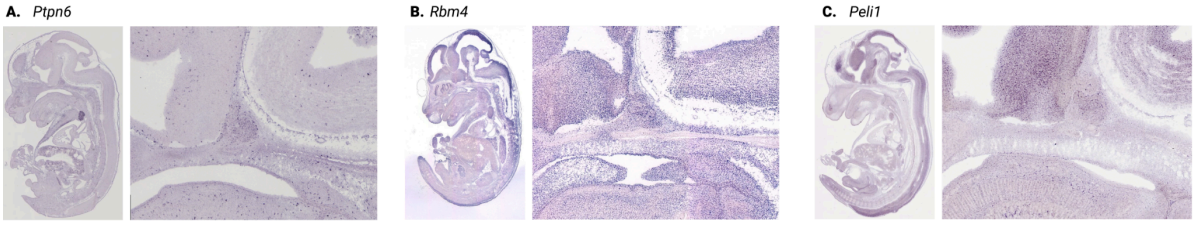

Figura 1.4. Hibridaciones *in situ* para los homólogos de los genes candidatos **(A)** *PTNP6*, **(B)** *RBM4*, **(C)** *PELI1*, en ratones *wild-type*, extraídos de la base de datos GenePaint (Visel et al., 2003).

PTPNP6

El gen de la protein-tirosin-fosfatasa *PTPN6* se ubica en el mismo cromosoma (12p13.31) que *PTPN11* (12q24.13) y cumple funciones similares en la regulación del crecimiento celular, la diferenciación, el ciclo mitótico y la transformación oncogénica (Kiratikanon et al., 2022). *PTPN6* presenta altos niveles de expresión en la hipófisis así como en el timo del ratón (Figura 1.4a). Es interesante que los ratones *knock-out* para *PTPN6*, conocidos como *motheaten*, presentan lesiones de pigmentación en la piel como resultado de un defecto autoinmune, pero también son *dwarf*. Este segundo fenotipo no ha sido estudiado en profundidad, aunque se lo ha atribuido a anemia. Además, *PTPN6* presentaba una alta intolerancia a la pérdida de función (pLI = 1, LOEUF = 0.13). paciente 66 tiene un codón stop prematuro en *PTPN6* (ENST00000456013.5: c.1717A>T, p.Arg573* - Figura suplementaria 1.1). Su cuadro clínico comprendía hipoglucemia neonatal severa, epilepsia e ictericia prolongada. También exhibía paladar ojival, micropene y criptorquidismo. Fue diagnosticado con CPHD (GH, TSH, ACTH) e inició el tratamiento con rGH a -2.29 SDS, con una respuesta relativamente buena. La resonancia mostró una APH, un tallo interrumpido y EPP. Además, presentaba broncoespasmos recurrentes, lo que podría indicar algún grado de deficiencia inmune.

RBM4

RBM4 es una proteína de unión al RNA involucrada en varios procesos relacionados a transcripción y traducción, incluyendo splicing. Este gen es altamente intolerante a la

pérdida de función (pLI = 0.998, LEOUF = 0.423), pero sin asociaciones a enfermedad aún. Los ratones *Rbm4a knock-out* muestran peso corporal reducido, mientras que el doble *knock-out Rbm4a/b* muestra anormalidades cerebrales (Lin et al., 2012, Tsai et al., 2023). El paciente 68 tiene una variante LP en *RBM4* (ENST00000310092.11: c.539C>A, p.Ser180*). El paciente presentaba una clínica compleja, con múltiples malformaciones. Tiene cuello corto con orejas de implantación baja y despegadas, un filtrum elongado y un paladar alto. Además, presentaba el segundo metatarsal acortado y clinodactilia del quinto dedo, micropene, criptorquidismo bilateral, riñón en forma de herradura y una malrotación renal. Fue diagnosticado con CPHD, con baja talla extrema (-4.7 SDS) Su resonancia mostró una AP casi ausente con un tallo hipoplásico y malformación de Chiari tipo 1, pero su desarrollo intelectual es normal. Se cree que esta asociación fenotipo-genotipo merece estudios más profundos.

PELI1

El paciente 59 presentaba un hemangioma gigante con compromiso de labio, pabellón auricular y paladar al nacer, que remitió ante el tratamiento con corticoides. El paciente presentó CPHD (GH, TSH, ACTH, FSH/LH) de diagnóstico tardío, debido al hallazgo de hipogonadismo hipogonadotrófico. Además, presentaba retraso psicomotor y del lenguaje, así como obesidad. El paciente presentaba la variante c.223delC, p.His75fs en *PELI1* (ENST00000358912.5, pLI = 0.91). Esta variante no está presente en Gnomad. El gen *PELI1* codifica para una ubiquitin-ligasa-E3, que no ha sido asociado a enfermedades aún, pero se sabe que está involucrado principalmente en la respuesta inflamatoria (Jin et al., 2012).

3. Revisión bibliográfica

Históricamente el diagnóstico genético para HC ha sido bajo, cerca del 10% de los casos cuenta con una relación genotipo-fenotipo (Figura 1.5). Los estudios con mayor tasa de diagnóstico suelen ser aquellos con presentaciones más severas (PSIS) o en los que se llevan a cabo estudios de WES en tríos (Brauner et al., 2020, Fang et al., 2020, Brauner et al., 2023). La cohorte estudiada, en la que se realizó WES únicamente en probandos con paneles de genes amplios, análisis detallados de CNVs y predicción de variantes de splicing llevaron a un rédito diagnóstico muy superior a la media en casos esporádicos. Se encontraron variantes LP o P en genes conocidos en 19.1% de los casos, 16% de los casos presentaron variantes LP o P en genes candidatos y 28.2% presentaron variantes VUS en genes tanto conocidos como candidatos. Esto representaba hasta el momento el mejor rédito diagnóstico hasta la fecha para pacientes con HC esporádico, en una cohorte de este tamaño, sin efectos fundacionales para *PROP1* y sin casos consanguíneos (Figura 1.5).

Además, ofrece evidencia de que la secuenciación de exoma completo únicamente de probandos, acompañado de un análisis exhaustivo, es una herramienta efectiva para el diagnóstico genético de HC.

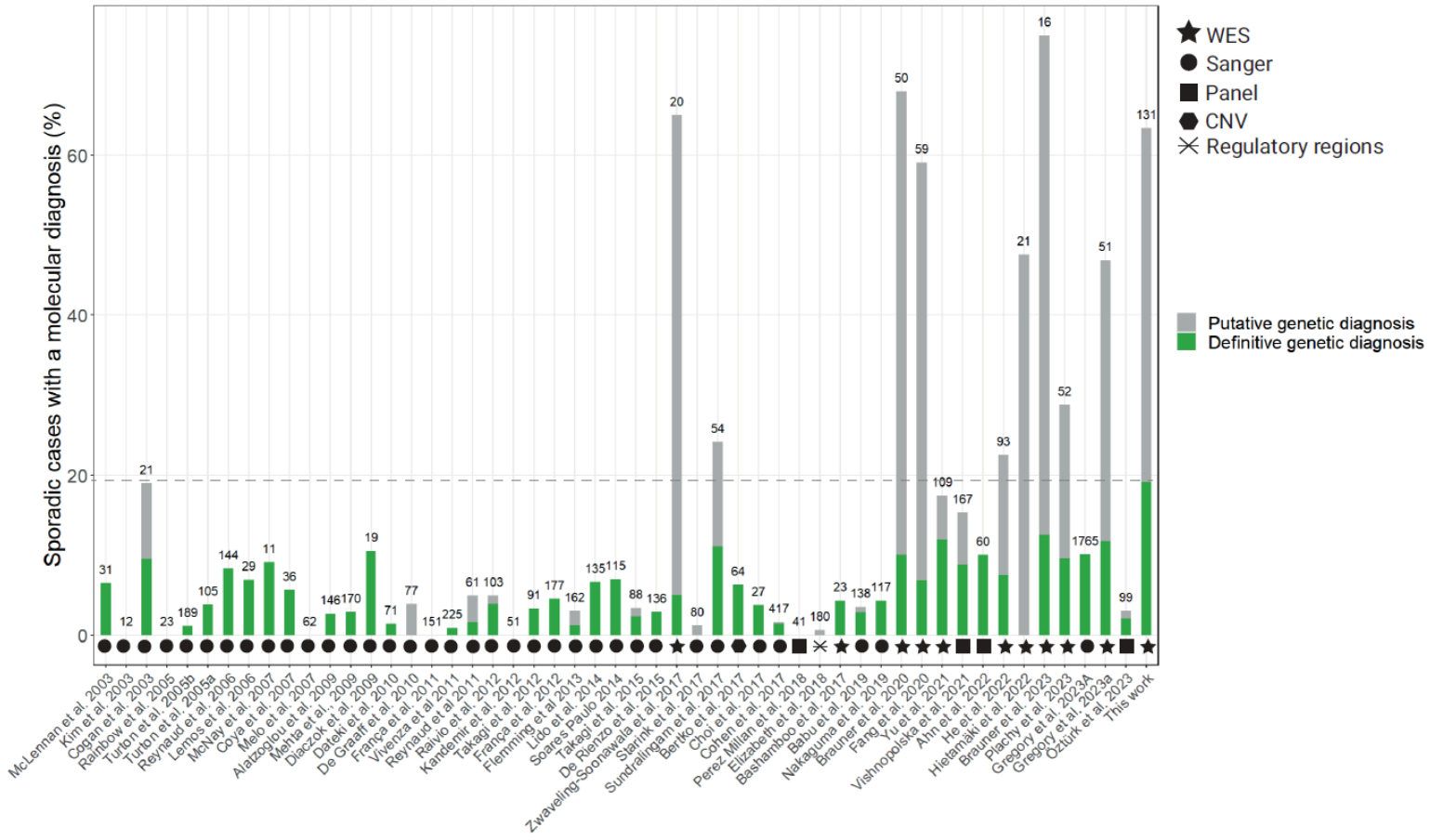

Figura 1.5. Revisión sistemática de la literatura de todos los reportes que refieren diagnóstico genético de pacientes con hipopituitarismo congénito. El porcentaje de casos con variantes LP/P en genes conocidos para hipopituitarismo congénito (barras verdes) o variantes VUS o en genes candidatos (barras grises) fue calculado para los estudios mostrados, ordenados por fecha de publicación. El método de secuenciación es mostrado bajo cada estudio con el correspondiente símbolo (ver referencia). El número que se encuentra por arriba de cada barra muestra el número total de individuos involucrados en cada uno de estos estudios. Casos familiares, cohortes con menos de 10 pacientes, cohortes con alta cantidad de pacientes consanguíneos o cohortes con alta incidencia de efecto fundador fueron excluidas de la revisión. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024a.

CAPÍTULO 1: CONCLUSIONES

El trabajo realizado en este capítulo aporta conocimiento sobre las causas genéticas del hipopituitarismo congénito (HC). En particular, se trata de la primera cohorte de más de 100 casos pediátricos de HC secuenciados por el método de *whole exome sequencing* (WES). Esta cohorte, compuesta íntegramente por pacientes pediátricos argentinos, aporta información clave sobre los orígenes genéticos de las afecciones hipofisarias en nuestro país. En particular, surgen dos resultados interesantes relacionados a la población local: i) la prevalencia de casos de HC causados por mutaciones en *PROP1* es sumamente baja (menor al 1% considerando el total de los casos y 0% considerando únicamente los casos esporádicos) y ii) la prevalencia de casos debidos a variantes en *ROBO1* es mucho más alta de lo anticipado, explicando alrededor del 5% de los casos. Además, se proporcionó evidencia que las variantes en *ROBO1* pueden presentar expresividad variable, afectando de modo distinto incluso a pacientes con una composición genética prácticamente idéntica (gemelas monocigóticas). Del mismo modo, las variantes encontradas en *ROBO1* no siempre causan el síndrome de interrupción del tallo (PSIS), al que ha sido mayoritariamente asociado, sino que también causan casos de HC sin PSIS e incluso se encontraron asociaciones con fenotipos oculares.

Otra conclusión importante de este capítulo es la mejora sustancial que representa la secuenciación por WES frente a los paneles genéticos tradicionales o la secuenciación directa que siguen siendo, incluso al día de hoy, los métodos de secuenciación más prevalentes para el diagnóstico genético del HC. A diferencia de estos métodos, la secuenciación por WES permite hallar variantes de splicing, tanto en genes conocidos como en genes candidatos o poco frecuentes. En la cohorte estudiada alrededor del 15% de las variantes encontradas se corresponden con variantes de splicing. La secuenciación por WES también permitió explorar genes por fuera de paneles tradicionales, en particular genes con baja tolerancia a la pérdida de función, donde una variante patogénica podría explicar el fenotipo del paciente. En ese sentido, se encontraron variantes en 13 genes intolerantes a la pérdida de función, que se consideran candidatos a causar HC (*RICTOR*, *SETD5*, *TIPARP*, *RBM4*, *PTPN6*, *PELI1*, *CNN3*, *POU5F1*, *CACNA1E*, *KCNN3*, *FOXP1*, *ARID5B*, *DOT1L*). Por último, este método de secuenciación permitió también aplicar algoritmos para identificar posibles CNVs. Este abordaje brindó una mejora sustancial en el rédito diagnóstico y resalta la importancia de realizar un abordaje completo y profundo para

el estudio de la etiología genética del HC, cuyo origen genético suele ser extremadamente variado.

Por último, es importante resaltar que un gran porcentaje (80.9%) de los pacientes siguen sin contar con un diagnóstico genético definitivo. Por un lado, esto se debe a que las variantes de significado incierto o VUS no pueden ser consideradas diagnósticas hasta no contar con evidencia funcional. Por otro lado, también se hipotetiza que variantes en regiones regulatorias (como promoters o enhancers) pueden causar enfermedad y no están siendo abarcadas en la secuenciación por exoma completo. A futuro será de vital importancia generar datos funcionales que ayuden a definir la patogenicidad de las VUS, así como también realizar secuenciación de genoma completo o WGS en los casos no resueltos por otros métodos.

CAPÍTULO 2: Estudio de ratones *knock-out* en genes candidatos a causar hipopituitarismo congénito

INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA

Los ratones (*Mus musculus*) son el modelo animal más utilizado en investigación básica y la mayoría de los estudios sobre el desarrollo hipofisario han sido realizados en este modelo. De hecho, el gen *Prop1* fue descubierto en ratones con crecimiento reducido o *dwarf* (Sornson et al., 1996). Sin embargo, a diferencia de otros organismos modelos como *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*, para los que existen librerías de mutantes y constructos para todos los genes de su genoma, el tamaño del genoma de *Mus musculus* ha hecho que el costo de este tipo de proyectos sean prohibitivos. Han habido importantes esfuerzos en los últimos años por realizar estudios sistemáticos de la genética de *Mus Musculus* como se ha hecho en otras especies. En el marco de esta tesis doctoral se decidió dar uso a uno de ellos: el "*International Mouse Phenotyping Consortium*" o IMPC. Este consorcio cuenta actualmente con 9277 líneas de ratones transgénicos (Cacheiro et al., 2020) y tiene el objetivo a largo plazo de generar una librería de *knock-outs* fenotipados de la totalidad de genes del genoma.

Los ratones del IMPC fueron generados mediante transgénesis, insertando un cassette del tipo '*knock-out first*' en el gen de interés (inicialmente por recombinación homóloga, luego por CRISPR-Cas9). Estos alelos contienen un cassette IRES:lacZ, seguido de un cassette *neo* floxeado y un exón floxeado, incorporados al alelo de manera artificial, donde tanto el elemento IRES:lacZ como el cassette de *neo* están encapsulados por elementos Frt (alelo *tm1a*, figura 2.1). De este modo, el alelo normalmente interrumpe la función y expresión del gen, expresándose LacZ en su lugar, permitiendo ver su patrón de expresión mediante este reportero. La flipasa *Flp* convierte este alelo '*knock-out first*' a un alelo condicional, devolviendo la actividad funcional al gen (alelo *tm1c*, ver figura 2.1). A su vez, la recombinasa Cre puede ser usada para delecionar el cassette de selección *neo* y generar así una línea tagueada con lacZ (alelo *tm1b*, figura 2.1), o bien para delecionar el exón floxeado a partir del alelo *tm1c*, generando un *knock-out* (alelo *tm1d*) (Skarnes et al., 2011).

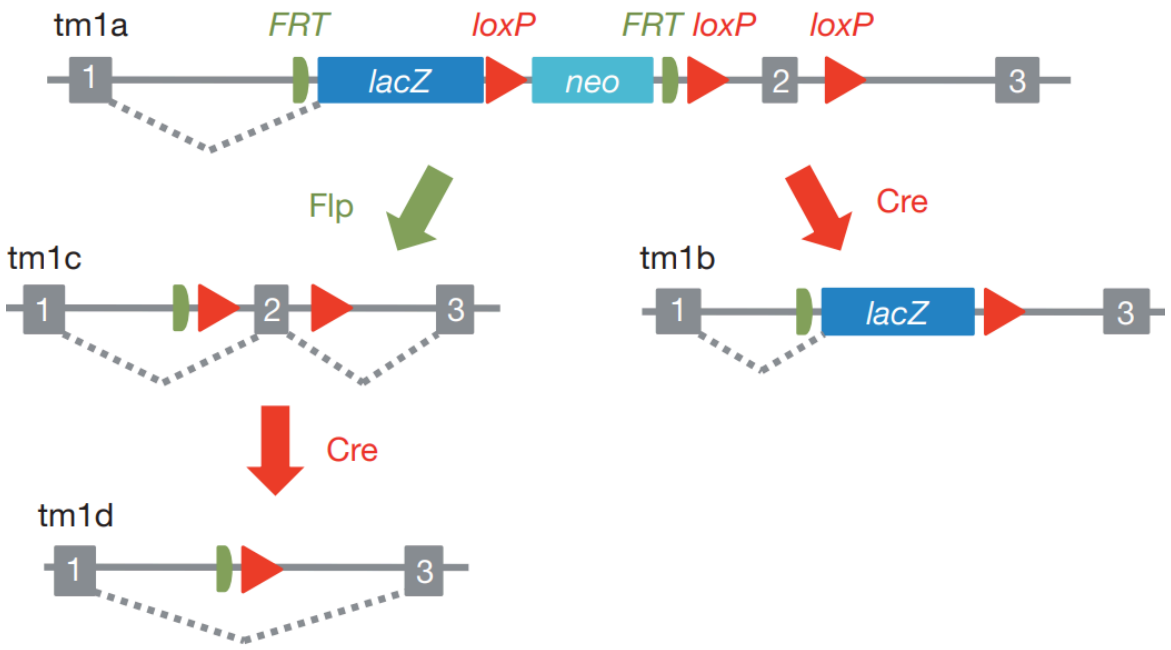

Figura 2.1. Descripción esquemática del alelo artificial utilizado para generar los alelos *knock-out* dentro del programa del IMPC. Extraído de Skarnes et al., 2011.

Los ratones *knock-out* obtenidos fueron analizados en heterocigosis, homocigosis o hemicigosis durante el desarrollo embrionario y, en caso de ser viables, durante la adultez temprana y tardía (Figura 2.2). La evaluación de cada mutante intenta ser comprensiva a todos los sistemas de órganos del embrión y el adulto, incluyendo los órganos endócrinos, entre ellos la hipófisis.

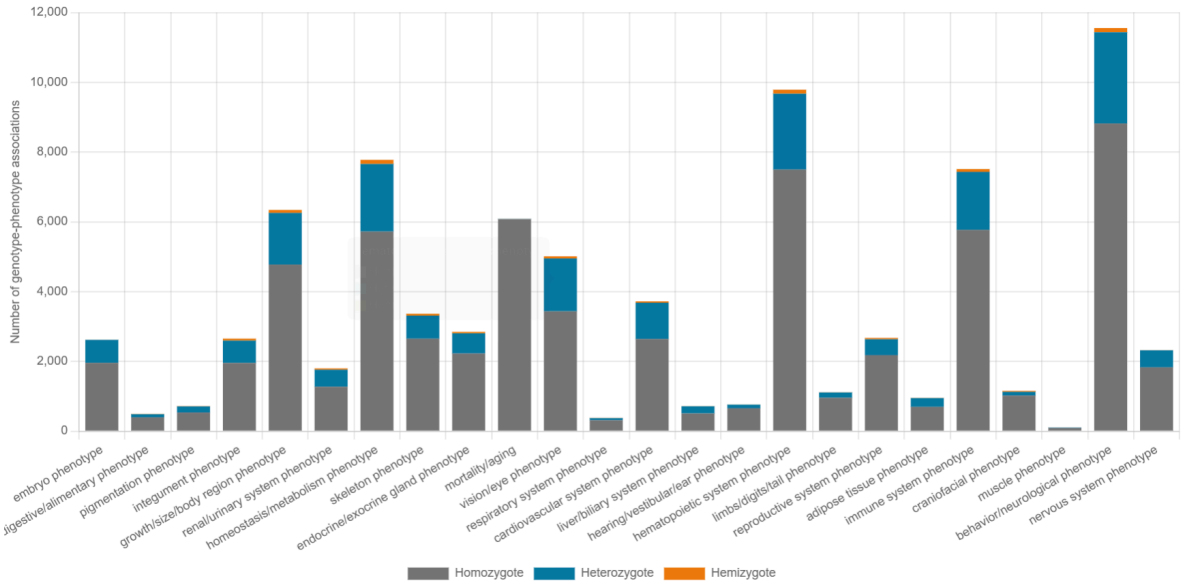

Figura 2.2. Número de ratones *knock-out* con fenotipos en los distintos órganos estudiados. Extraído de https://www.mousephenotype.org/.

El esfuerzo del IMPC se vio complementado por otros programas que hicieron uso de los ratones obtenidos por este proyecto. Uno de estos programas fue llevado a cabo por el grupo “Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders” o DMDD (Mohun et al., 2013). Este consorcio se concentró en un subgrupo de embriones *knock-out* letales tardíos o sub-viables. En particular el DMDD analizó embriones *knock-out* homocigotas post organogénesis en el estadío E14.5, o en el caso de que no hubiera embriones homocigotas viables en este estadío, se analizaron los embriones heterocigotas a E14.5 y los homocigotas a E9.5 (Figura 2.3).

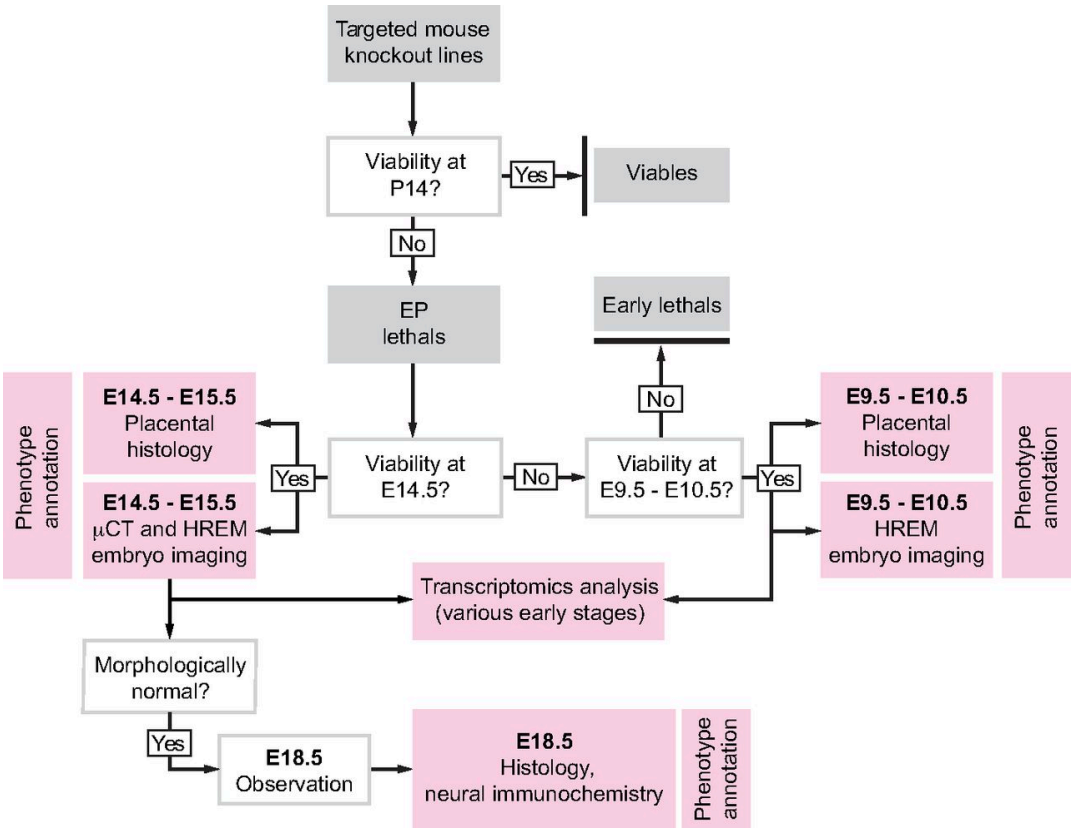

Figura 2.3. Flujo de trabajo empleado por el DMDD para generar el set de datos de 209 ratones *knock-outs*. Extraído de Mohun et al., 2013.

Los embriones seleccionados para su estudio como letales embrionarios tardíos o sub-viables fueron sometidos a *high-resolution episcopic microscopy* (HREM) (Geyer et al., 2009). Esta técnica permite generar imágenes en 3D de una resolución lo suficientemente alta para estudiar las alteraciones de los órganos a nivel histológico. Los resultados de HREM de los 209 *knock-outs* estudiados fueron subidos a una base de datos para que sus detalles anatómicos fueran fácilmente analizables. En este capítulo se utilizó esta base de datos para determinar qué porcentaje de estos *knock-outs* presentaban malformaciones hipofisarias y en consecuencia, qué genes podrían resultar candidatos a causar hipopituitarismo congénito.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Búsqueda en base de datos

A través de la página del DMDD se obtuvieron los datos de 209 líneas de *knock-outs* disponibles generados por el Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. Se analizaron las secciones sagitales de los embriones con el objetivo de identificar malformaciones hipofisarias. De estos 209 *knock-outs* solo 15 habían sido previamente anotados como portadores de hipófisis dismórficas por el DMDD (búsqueda por las palabras claves *pituitary*, *adenohypophysis* y *neurohypophysis*). En todos los casos en donde se han encontrado malformaciones hipofisarias, se procedió a buscar información de dichos genes: en la base de datos *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) para identificar asociaciones previas con enfermedades en humanos y en la base de datos GenePaint para obtener información de su expresión durante el desarrollo embrionario (Visel et al., 2003). Las secciones sagitales medias fueron descargadas, recortadas y sus niveles de contraste ajustados en Photoshop.

2. Inmunofluorescencia

Los embriones fijados fueron deshidratados, permeabilizados y embebidos en parafina y seccionados cada 6 µm previamente en el laboratorio de la colaboradora Sally Camper en la Universidad de Michigan, USA. Los cortes de parafina seleccionados fueron procesados para inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo contra EZR (Abcam, cat# ab4069) o SSR2 (Fisher Scientific, cat# 50–172-6174) diluidos 1:100 en PBS-1% suero de cabra toda la noche a 4°C, seguido de anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado con biotina (Life Technologies, cat# A16033) diluido 1:100 y detectado con DyLight 488 conjugado a estreptavidina (Thermo Scientific, cat# 21832) para EZR y con Alexa 488 conjugado a estreptavidina (Jackson ImmunoResearch, cat# 016–540-084) para SSR2, también diluidos en 1:100. Las secciones fueron teñidas con DAPI antes de ser montadas en medio de montaje ProLong Gold (Invitrogen cat# p36930). Las fotos fueron obtenidas en un microscopio de fluorescencia confocal Leica Stellaris 5.

3. Single-cell RNA sequencing

Se utilizaron datos de scRNA-seq de hipófisis embrionarias E12.5 y E14.5, de un experimento realizado en el laboratorio de la Dra. Camper. Las muestras fueron secuenciadas desde el 3’ utilizando la plataforma 10X Genomics (v2 para E12.5, v3 para E14.5) por el grupo de Genómica Avanzada de la Universidad de Michigan. Los resultados

de la secuenciación han sido depositados en el Gene Expression Omnibus bajo el número de acceso GSE246211. Para la muestra E12.5 se secuenciaron 1701 células y el promedio de lecturas por célula fue de 121,698. Para la muestra E14.5 se secuenciaron 19.625 células, con un promedio de lecturas por célula de 27.387. Las lecturas fueron procesadas y las células agrupadas utilizando Seurat 4.1.0. El *cluster* hipofisario es definido por los factores de transcripción *Lhx3*, *Pitx1*, *Pitx2*, *Pou1f1*, *Prop1* y *Pomc*. El *cluster* neuronal está definido por los factores de transcripción *Rax*, *Nkx2.1* y *Nkx2.4*, así como *Fgf8* y *Fgf10*. El perfil de vasculatura incluye a *Pecam1*, *Hba-x*, *Rgs5*, *Igfbp7*, *Ramp2* y *C1qc*, mientras que el mesénquima expresa *Penk*, *Lgals1*, *Dan* y *Foxd1*.

CAPÍTULO 2: RESULTADOS

Los resultados del capítulo 2 fueron publicados en *Genome Medicine* (Martinez-Mayer et al., 2024b). doi: 10.1186/s13073-024-01347-y

1. Identificación de ratones *knock-outs* letales o sub-viables con malformaciones hipofisarias

El consorcio DMDD caracterizó morfológicamente 209 líneas de ratones *knock-out* con fenotipos letales o sub-viables (definidas como líneas de transgénicos sin homocigotas a día postnatal 14 o día postnatal 21) mediante imágenes de alta resolución de embriones de ratón (HREM). Estas imágenes permitieron la visualización de las secciones sagitales del estadío embrionario E14.5 para estas 209 líneas y encontrar aquellas que presentaban malformaciones hipofisarias. Este análisis arrojó 51 *knock-outs* (24.4%) con malformaciones hipofisarias (Tabla 2.1). De estos 51 genes candidatos, únicamente uno (*Tcf7l2*) ha sido estudiado previamente en el desarrollo hipofisario murino (Brinkmeier et al., 2007). Una de las limitaciones principales de este análisis es que los datos de HREM estaban disponibles únicamente en E14.5, por lo que no se puede descartar la existencia de malformaciones hipofisarias en estadíos posteriores, así como tampoco se podrían distinguir afecciones más leves, como defectos de especificación celular que no causen consecuencias anatómicas obvias.

Es importante destacar que la penetrancia de los fenotipos fue variable (Tabla 2.1). En 47 de los 51 *knock-outs* se contó con tres o más embriones para la evaluación. De estos, el 40% fueron completamente penetrantes, 34% fueron fuertemente penetrantes (penetrancia ≥50%) y 26% fueron débilmente penetrantes (<50% penetrance). La variabilidad en penetrancia para malformaciones hipofisarias es comparable con la variabilidad fenotípica observada en la base de datos de DMDD para otras malformaciones, a pesar de haber utilizados una línea endocriada C57BL/6N para la generación de los ratones *knock-out* (Wilson et al., 2017). Como sucede en muchos de los pacientes, las malformaciones hipofisarias en ratones o el hipopituitarismo congénito en pacientes, suelen presentarse junto con otras malformaciones, que suelen afectar particularmente los ojos, el cerebro, las gónadas y regiones craneofaciales (Martinez Mayer 2024a). En el caso de los ratones evaluados, solo 21 de los 51 habían sido oficialmente anotados por expertos del DMDD. Todos estos 21 *knock-outs* presentaban malformaciones en al menos algún otro órgano: corazón (95%), ojos (86%), cerebro (81%), gónadas (71%), región craniofacial (62%) y 38% tenía defectos en el conjunto de estos cinco órganos evaluados (ver Tabla 2.1). Es probable que la alta incidencia de defectos cardíacos contribuya a la baja viabilidad

de estos *knock-outs*. Esto también indica que los ratones letales embrionarios recesivos exhiben defectos estructurales complejos que afectan los mismos tejidos que en pacientes con HC, pero la penetrancia de los defectos en otros órganos es más alta en estos ratones *knock-out*, seleccionados por su baja viabilidad.

Basado en estos datos se hipotetizó que estos 51 genes que causan malformaciones hipofisarias en ratones serían excelentes genes candidatos para el HC en humanos. Como un primer paso para entender el rol que podría llegar a tener cada uno de estos genes en la organogénesis hipofisaria, se buscó información relevante a nivel clínico para cada gen en la base de datos OMIM, que presenta asociaciones con enfermedades humanas (Tabla 2.1). De los 51 genes, 32 de ellos (63%) estaban asociados a una enfermedad en humanos y solo uno de ellos, *Arid1b*, ha sido previamente asociado a HPE, SOD o HC (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Líneas letales de ratones con malformaciones hipofisarias

Gen	Descripción / Función	Malformaciones hipofisarias (b) AHD	AHH	AHA	NHD	NHA	Penetrancia (c) Afectados	Total	Otras malformaciones (d) Ojos	CF	Br	Go	He	OMIM (e)	Descripción de la enfermedad
Epigenética y reguladores transcripcionales															
Arid1b	AT rich interactive domain 1B (SWI-like)	x					5	7	x	x	x	x	x	614556	Coffin-Siris syndrome 1
Arid2	AT rich interactive domain 2 (ARID, RFX-like)	x					3	3	NR					609539	Coffin-Siris syndrome 6
Asxl1	ASXL transcriptional regulator 1	x				x	3	3	NR					612990	Bohring-Opitz syndrome, Myelodysplastic syndrome
Brd2	Bromodomain containing 2	x			x		5	5	x	x	x	x	x	601540	NR
Chtop	Chromatin target of PRMT1	x			x		4	4	x	x	x	x	x	614206	NR
Hira	Histone cell cycle regulator	x					2	3	NR					600237	NR
Jarid2	Jumonji, AT rich interactive domain 2	x					3	3	NR					601594	Microcephaly
Kat14	Lysine acetyltransferase 14, Likely a histone lysine demethlase	x					3	3	NR					617501	Global developmental delay, Seizures
Kdm8	Lysine (K)-specific demethylase 8	x					3	3	NR					610881	Intellectual disability
Kmt5b	Lysine methyltransferase 5B	x					3	3	NR					610881	Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 51
Mbtd1	Mbt domain containing 1	x					3	3	NR					618705	NR
Npat	Nuclear protein, co-activator of histone transcription	x					1	1	NR					601448	NR
Setd5	SET domain containing 5, Likely a Histone-Lysine N-Methyltransferase	x					1	4	x				x	615743	Intellectual developmental disorder, autosomal dominant 23
Tcf7l2	Transcription factor 7 like 2, T cell specific, HMG box; responsive to WNT signaling	x			x		5	5			x	x	x	602228	susceptibility to diabetes mellitus, type 2
Regluación del RNA y la traducción															
Cnot1	CCR4-NOT transcription complex, subunit 1	x			x		2	6	x	x	x	x	x	604917	Holoprosencephaly 12, with or without pancreatic agenesis; Vissers-Bodmer syndrome
Dhx35	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 35, Putative ATP dependent RNA helicase	x			x		1	1	x	x	x		x	none	NR
Nsun2	NOL1/NOP2/Sun domain family member 2, RNA methyltransferase	x					4	6	x		x	x	x	610916	intellectual disability
Prrc2b	Proline-rich coiled-coil 2B, Enables RNA binding activity	x					1	9	x		x		x	619544	NR
Smg9	SMG9 nonsense mediated mRNA decay factor	x			x		4	6	x	x			x	613176	Heart, brain, ocular malformation; Neurodevelopmental disorder, Tremor, pyramidal signs, dyspraxia
Tent5c	Terminal nucleotidyltransferase 5C, Enables RNA adenylyltransferase activity,mRNA stability	x					5	9		x	x	x	x	613952	NR
Procesamiento, tráfico, regulación y metabolismo de proteínas															
Adamts3	Disintegrin-like metallopeptidase With thrombospondin type 1 motif, 3						1	7	NR					605011	Hennekam lymphangiectasia-lymphedema syndrome 3
Aldh18a	Aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	x					1	3	NR					138250	Cutis laxa, Spastic paraplegia
Atg16l1	Autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)	x					2	5	NR					610767	Inflammatory bowel disease (Crohn disease) 10
Dph2	DPH2 homolog, dipthamide biosynthesis Modifies histone for RNA transcription elongation	x					3	3	NR					603456	Developmental delay with short stature, Dysmorphic facial features, and sparse hair 2
Ezr	Ezrin,binds plasma membrane and cytoskeleton	x					1	3	NR					123900	NR
Gldc	Glycine decarboxylase	x			x		3	3	NR					238300	Glycine encephalopathy
Kifbp	Kinesin family binding protein, Localizes to mitochondria, maybe involved in transport	x					1	3	x	x	x	x	x	609367	Goldberg-Shprintzen megacolon syndrome
Marchf5	Membrane associated ring-CH-type finger 5	x					2	3	NR					610637	NR
Morc2a	Microrchidia 2A	x		x			4	14	x	x	x	x	x	616661	Charcot-Marie-Tooth disease
Nxn	Nucleoredoxin, redox dependent regulator of WNT signaling	x					2	3		x		x	x	612895	Robinow syndrome
Prkab1	Protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	x					3	3	NR					602740	NR

Psat1	Phosphoserine aminotransferase 1	x					3	3	NR					610936	Phosphoserine aminotransferase deficiency, Neu-Laxova syndrome
Psph	Phosphoserine phosphatase	x			x	x	7	8	x	x	x	x	x	172480	Intellectual disability; Seizures; Deficiency of phosphoserine phosphatase
Rundc1	RUN domain containing 1, May negatively regulate p53 transcriptional activity	x					2	7	x					619250	NR
Sh3pxd2a	SH3 and PX domains 2A, Likely a superoxide-generating NADPH oxidase activator	x					10	11	x		x	x	x	619455	NR
Ssr2	Signal sequence receptor, beta; Protein translocation across the ER membrane	x					3	3	x		x	x	x	600867	NR
Traf2	TNF receptor-associated factor 2	x					6	6	NR					601895	NR
Traf6	TNF receptor-associated factor 6	x					4	9	x		x	x	x	602355	NR
Usp3	Ubiquitin specific peptidase 3	x					1	3	NR					604728	NR
Señalización celular, cilia, proteínas transmembrana y extracelulares															
Atp11a	ATPase, class VI, type 11A	x					4	4	NR					605868	Leukodystrophy, hypomyelinating, 24; Deafness, autosomal dominant 84
B9d2	B9 protein domain 2	x		x	x		4	4	NR					611951	Meckel syndrome 10; Joubert syndrome 34
Cc2d2a	Coiled-coil and C2 domain containing 2A	x	x		x	x	6	10	x	x	x	x	x	612013	COACH syndrome, Joubert Syndrome type 9; Meckel Syndrome type 6
Ehd1	EH-domain containing 1,vesicle trafficking, Receptor recycling, cilia	x					2	3	NR					605888	NR
Grin1	Glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1)	x					1	3	NR					138249	Developmental and epileptic encephalopathy 101; Neurodevelopmental disorder, seizure
Mks1	MKS transition zone complex subunit 1	x	x			x	2	2	NR					609883	Bardet-Biedl syndrome; Joubert syndrome; Meckel syndrome
Plxnb2	Plexin B2, transmembrane, axon guidance	x			x		1	3	NR					604293	NR
Rala	V-ral simian leukemia viral oncogene A (ras related), Transmembrane signaling, mitochondrial fission	x					6	8	NR					179550	Hiatt-Neu-Cooper neurodevelopmental syndrome
Rpgrip1l	Rpgrip1-like, localizes to basal body centrosome, cilia	x				x	6	6	x	x	x		x	610937	Joubert Syndrome. Meckel Gruber Syndrome
Sptbn1	Spectrin beta, non-erythrocytic 1, Actin binding transmembrane protein	x					2	3	NR					182790	Developmental delay, impaired speech, And behavioral abnormalities
Vangl1	VANGL planar cell polarity 1	x					3	3	NR					610132	Caudal regression syndrome; Susceptibility to neural tube defects
Otras															
Mad2l2	MAD2 mitotic arrest deficient-like 2	x					2	2	NR					604094	Fanconi anemia, complementation group V

Tabla 2.1. Descripción de los genes identificados, su función, el fenotipo hipofisario causado ((b) AHD = dismorfología adenohipofisaria, AHH = hipoplasia adenohipofisaria, AHA = adenohipofisis ausente, NHD = dismorfología neurohipofisaria, NHA = neurohipófisis ausente), la penetrancia del fenotipo hipofisario ((c) expresado como número de ratones afectados respecto al total), presencia de otras malformaciones ((d) CF = craniofacial, Br = cerebro, Go = gónadas, He = corazón), número de gen en OMIM (e) y sus asociaciones a enfermedades humanas en OMIM en caso de haberlas. NR = No reportado

2. Análisis de las malformaciones hipofisarias

Las malformaciones observadas en los datos de HREM para los distintos genes candidatos del DMDD incluyen casos con lóbulos posteriores y/o anteriores hipofisarios hipoplásicos, dismórficos o ausentes.

Los embriones con una hipófisis anterior ausente o sumamente pequeña pueden deberse a defectos en la señalización de inducción entre el diencéfalo ventral y el ectodermo oral. Dentro de los genes candidatos, muchos presentaron un fenotipo compatible con una reducción de la señalización paracrina del diencéfalo. Al dia E14.5, una hipófisis *wild-type* presenta un infundíbulo bulboso dorsal a los lóbulos anteriores e intermedios, que están separados por un *cleft* sigmoide (Figura 2.4a y figuras suplementarias 2.1a y 2.2a). Por ejemplo, los embriones *knock-out* para *Rpgrip1l* tienen una hipófisis anterior ausente, mientras que los *knock-outs* para *Mks1*, *Cc2d2a* y *B9d2* presentaron lóbulos anteriores hipoplásicos (Figura 2.4c-d y figura suplementaria 2.1b). Interesantemente, todos estos genes candidatos corresponden a genes involucrados en la formación de la cilia primaria, lo que sugiere probablemente una deficiencia de la vía de Shh.

Es interesante también que existe un gran grado de variabilidad fenotípica para estos genes, incluso para embriones *knock-outs* para el mismo gen. Por ejemplo, un embrión *Cc2d2a*$^{-/-}$ parece tener una inducción inicial de los progenitores hipofisarios, seguido de una falla en la proliferación o supervivencia de los mismos (Figura 2.4d), mientras que otros embriones presentan hipoplasia variable del lóbulo anterior (Figura suplementaria 2.1c-e).

Las malformaciones hipofisarias también pueden resultar de una expansión del centro de señalización en el diencéfalo ventral, lo que causa una inducción exacerbada del ectodermo oral hacia un destino hipofisario. Este es el caso para *Tcf7l2,* donde los *knock-outs* presentan una inducción expandida de los progenitores hipofisarios (Figura 2.4e). Los embriones *knock-out* para *Gldc*, *Psat1* y *Psph* presentan lóbulos anteriores expandidos que no logran separarse del ectodermo oral (Figura 2.4f-h). Todos estos genes tienen funciones relacionadas con el metabolismo de aminoácidos, lo que apunta a un posible mecanismo común en la organogénesis hipofisaria.

Asxl1 es un regulador epigenético que resulta en una expansión similar de los progenitores hipofisarios (Figura 2.4f). La organización de la cromatina mediante reguladores epigenéticos como *Asxl1* impacta la expresión génica de una manera

generalizada y la pérdida de estos reguladores puede generar diversos fenotipos. En los 15 genes candidatos clasificados dentro de esta categoría se encontró una gran variedad de fenotipos. En contraste con la dismorfología hipofisaria de *Asxl1*, las hipófisis de *knock-out* para *Morc2a*, *Mbdtd*, *Brd2*, *Npat* y *Jarid2* son hipoplásicas (Figura 2.4i y figura suplementaria 2.1g-j). Los *knock-outs* para *Arid1b*, *Kat14* y *Kdm8* no presentan hipoplasia, pero tienen una morfología alterada en el *cleft* (Figura 2.4j-l). Para *Arid1b* y *Kat14* el lóbulo intermedio se ve más afectado, con las células epiteliales extendiéndose hacia el lado dorsal del lóbulo posterior. En embriones *knock-outs* para *Kdm8* el *cleft* tiene una apariencia ramificada, con un efecto más prominente sobre el lóbulo anterior. Los embriones nulos para *Mad2l2*, *Cnot1* y *Hira* presentan *clefts* dismórficos similares a *Kat14*, donde las células epiteliales se extienden hacia el lado dorsal del lóbulo posterior (Figura suplementaria 2.1k–m). En cambio los reguladores transcripcionales y epigenéticos *Kmt5b* y *Chtop* son más similares a *Kdm8*, con una dismorfología del lóbulo anterior (Figura suplementaria 2.1n-o). Es importante notar que el fenotipo en los mutantes para *Hira* es observado para embriones heterocigotas. Los *knock-outs* homocigotas para *Hira* son letales embrionarios a E11, como resultado de defectos de gastrulación y placenta (Roberts et al., 2002).

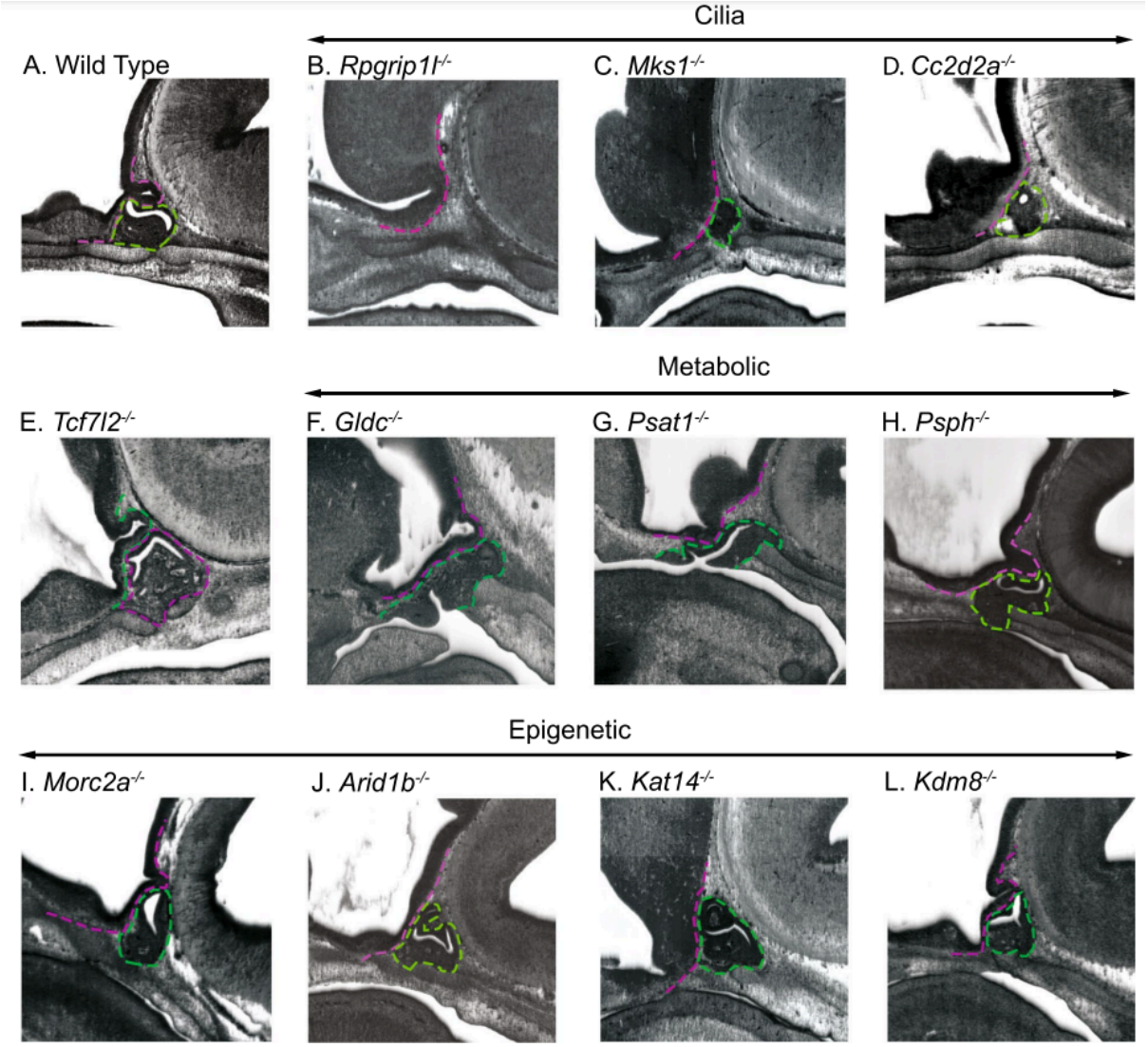

Figura 2.4 Malformaciones hipofisarias observadas en los genes candidatos a causar HC. Se muestran imágenes de HREM sagitales, capturadas del *stackviewer* de DMDD a E14.5. Se muestran las hipófisis de un embrión *wild-type* **(A)** y de embriones nulos para **(B)** *Rpgrip1l*, **(C)** *Mks1*, **(D)** *Cc2d2a*, **(E)** *Tcf7l2*, **(F)** *Gldc*, **(G)** *Psat1*, **(H)** *Psph*, **(I)** *Morc2a*, **(J)** *Arid1b*, **(K)** *Kat14*, y **(L)** *Kdm8*. En todos los casos la hipófisis anterior y el lóbulo intermedio se delinean con una línea verde punteada y el diencéfalo ventral cercano a la hipófisis con una línea magenta punteada. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024b.

Los genes discutidos en los párrafos anteriores fueron presentados primero por su asociación con términos GO (*Gene ontology*) enriquecidos en la lista de genes candidatos. Sin embargo, hay varios genes con dismorfologías hipofisarias que no están relacionados a ninguno de estos términos. Se observó un lóbulo anterior pequeño para *Atg16l1*$^{-/-}$, mientras que *Smg9*$^{-/-}$ presentaba un lóbulo posterior dismórfico (Figura suplementaria 2.2b-c).

Los ratones *Atp11a*$^{-/-}$, *Arid2*$^{-/-}$, *Dph2*$^{-/-}$, *Edh1*$^{-/-}$, *Grin1*$^{-/-}$, *Plxnb2*$^{-/-}$ y *Usp*$^{-/-}$ tienen extensiones del lóbulo intermedio hacia el *cleft*, que se acercan al lóbulo anterior (Figura

suplementaria 2.2d-j). Los *knock-outs* para *Adamts3* y *Prkab1* tienen lóbulos intermedios que se extienden de manera dorsal hacia el lóbulo posterior (Figura suplementaria 2.2k-l). *Aldh18a*$^{-/-}$ y *Dhx35*$^{-/-}$ tienen *clefts* donde el lóbulo anterior se ve más afectado (Figura suplementaria 2.2m-n). Varios *knock-outs*, *Kifbp*, *Rala*, *Rundc*, *Sptbn1*, *Tent5c* y *Vangl*, presentaban *clefts* ramificados (Figura suplementaria 2.2o-t), mientras que *Nsun2* presentaba un *cleft* ramificado en combinación con una adenohipófisis hipoplásica (Figura suplementaria 2.2u). Por último, los *knock-outs* para *Nxn* y *Prrc2b* parecen presentar un lóbulo anterior que protruye hacia el *cleft* (Figura suplementaria 2.2v-w).

3. Patrones de expresión de genes candidatos

Las malformaciones evidenciadas a nivel hipofisario a E14.5 podrían deberse a la expresión de los genes candidatos en el tejido hipofisario mismo o en el tejido circundante. Con el objetivo de responder esta pregunta, se analizaron datos de scRNA-Seq de embriones *wild-type* E12.5 y E14.5 (Figura 2.5a). Se incluyeron siete factores de transcripción y dos subunidades hormonales específicas de la hipófisis anterior para obtener una idea cualitativa del nivel de expresión de los genes candidatos (ver materiales y métodos). Todos los genes candidatos fueron identificados en alguno de los dos estadíos analizados por scRNA-seq. La mayoría de los genes presentan mayores niveles de expresión a E14.5 vs E12.4 (por ejemplo *Plxnb2*, *Sptbn1* y *Ssr2*). Otros al contrario, como por ejemplo *March5*, *Nsun2* y *Rala* se expresan más a E12.5 que a E14.5.

El set de datos de scRNA-seq de E14.5 fue utilizado para determinar la expresión tejido específica de los genes candidatos, identificando poblaciones celulares del diencéfalo ventral (neural), del lóbulo anterior, del mesénquima y correspondientes a sangre y vasculatura. Se encontró que algunos de los genes candidatos se expresan en subtipos celulares altamente específicos. Por ejemplo, *Gldc* presentaba una mayor expresión en el diencéfalo ventral, *Sh3pxd2a* en el mesénquima y *Arid1b* y *Ezr* en el lóbulo anterior, mientras que *Ssr2* se expresa tanto en lóbulo anterior como en mesénquima (Figura 2.5a). En concordancia con lo observado por scRNA-seq, la hibridación *in situ* para *Gldc* demostró una expresión marcadamente específica en el diencéfalo ventral (Figura 2.5c). Cabe recordar que los embriones *knock-out* para *Gldc* presentan un fenotipo de expansión de la placoda hipofisaria (Figura 2.1e). Esto podría sugerir una expansión del centro de señalización diencefálico, en el caso de que se dé una disminución de la expresión de *Gldc*, aunque los mecanismos por los que la ausencia de *Gldc* llevaría a esta expansión aún son poco claros.

Los embriones *knock-outs* para *Sh3pxd2a* presentan un lóbulo intermedio malformado, incluyendo una pequeña extensión del *cleft* y un hueso esfenoide interrumpido

(Figura 2.5d). La hibridación *in situ* confirma niveles de expresión altos en el mesénquima circundante a la hipófisis, como se había observado en el scRNA-seq (Figura 2.5e). Aunque el rol del mesénquima en la formación de la hipófisis no ha sido estudiado en detalle, este patrón de expresión en conjunto con la malformación observada parece sugerir que las interacciones entre los progenitores hipofisarios y el mesénquima son necesarias para la correcta organogénesis de la glándula.

Los embriones *Arid1b*$^{-/-}$ presentan una expansión del lóbulo intermedio hacia el lóbulo posterior (Figura 2.4j) y la hibridación *in situ* para *Arid1b* muestra una marca más intensa alrededor del *cleft* hipofisario (Figura 2.5f). *Setd5* se expresa fuertemente tanto en el diencéfalo ventral como en los lóbulos intermedio y anterior (Figura 2.5h). Los embriones *knock-out* para *Ezr* también presentan una protrusión del lóbulo intermedio hacia el cleft (Figura 2.5i). *Ezr* se expresa más fuertemente en la zona proliferativa para células progenitoras hipofisarias (Figura 2.5j). Los *knock-outs* para *Ssr2* presentan una protrusión del tejido del lóbulo anterior hacia el *cleft* (Figura 2.5k), mientras que la expresión de Ssr2 por hibridación *in situ* no parece restringirse a ningún tejido en particular (Figura 2.5l).

Para *Ezr* y *Ssr2* se decidió, junto a colaboradores, extender el análisis de expresión a nivel proteico, dado que existían anticuerpos comerciales disponibles. La inmunofluorescencia de ratones *wild-type* para EZR mostró una expresión mucho más fuerte del lado apical de las células que rodean al *cleft* a E12.5, E14.5 y E18.5, lo que es característico de células epiteliales polarizadas (Figuras 2.5m-o). Las células que no se encuentran próximas al lumen no presentan expresión polarizada de EZR, en cambio, presentan expresión deslocalizada en todo el citoplasma. En el estadío E18.5 se puede observar una disminución de la expresión de EZR en el lóbulo anterior. En cambio, para *Ssr2* a E12.5 se había observado baja expresión en el scRNA-seq en este estadío, lo que se condice con bajos niveles proteicos de SSR2 observados por inmunofluorescencia a E12.5. A E14.5 se observan niveles más elevados de SSR2 en células individuales, patrón que se repite a E18.5 (Figura 2.5p–r). Es interesante que la expresión proteica parece estar limitada a una región del lóbulo anterior a E18.5, en el parénquima anterior y lejano al nicho de células madres hipofisarias, a pesar de que la expresión a nivel de RNA por hibridación *in situ* no parece estar delimitada a esta región.

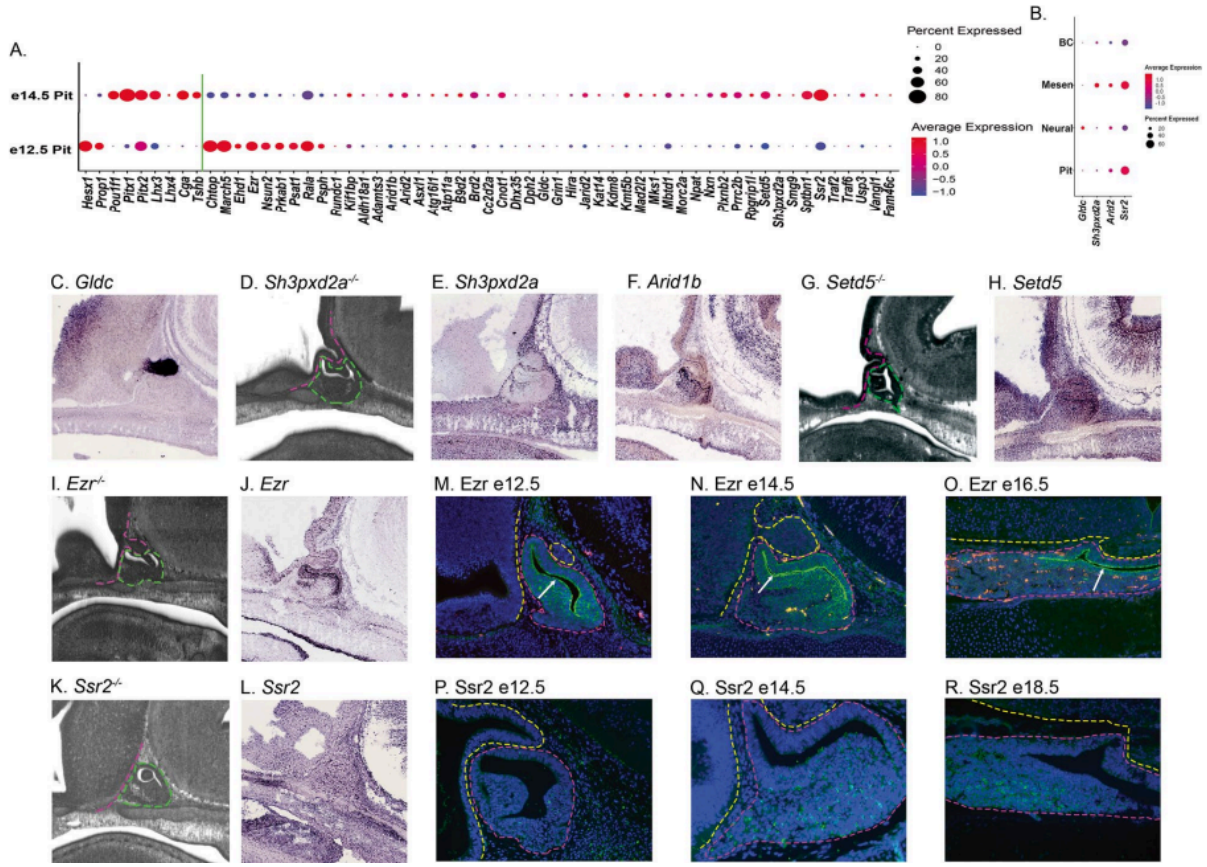

Figura 2.5. Análisis de expresión para genes candidatos. **(A)** *Dot-plot* del scRNA-seq para todos los genes candidatos (a la derecha de la línea vertical verde) de hipófisis diseccionadas a E12.5 y a E14.5. Nótese que *Tent5c* usa el símbolo alternativo *Fam46c* en este análisis. El tamaño del punto representa el porcentaje de células en cada condición que expresa dicho gen, mientras que el color representa el nivel relativo de expresión. Nueve genes (a la izquierda de la línea vertical verde) cuya expresión en la hipófisis es conocida fueron incluidos para una comparación cualitativa. **(B)** *Dot-plots* para expresión en células separadas entre mesénquima (Mesen), células endoteliales (BC), diencéfalo ventral (Neural) y lóbulo pituitario anterior (Pit) a E14.5 para genes candidatos seleccionados. **(C)** Hibridación *in situ* de GenePaint para *Gldc*. **(D)** Imagen de HREM del DMDD para *Sh3pxd2a*$^{-/-}$. **(E)** y **(F)** Hibridación *in situ* de GenePaint para *Sh3pxd2a* y *Arid1b*. **(G)** Imagen de HREM del DMDD para *Setd5*$^{-/-}$. **(H)** Hibridación *in situ* de GenePaint para *Setd5*. **(I)** Imagen de HREM del DMDD para *Ezr*$^{-/-}$. **(J)** Hibridación *in situ* de GenePaint para *Ezr*. **(K)** Imagen de HREM del DMDD para *Ssr2*$^{-/-}$. **(L)** Hibridación *in situ* de GenePaint para *Ssr2*. **(M-O)** Inmunofluorescencia contra *Ezr* a E12.5 **(M)**, E14.5 **(N)** y E18.5 **(O)**. **(P–R)** Inmunofluorescencia contra *Ssr2* a E12.5 **(P)**, E14.5 **(Q)** y E18.5 **(R)**.

En conjunto, la información proporcionada en este apartado permite afirmar que los genes candidatos se expresan en la glándula hipofisaria misma o en sus tejidos circundantes, afianzando la hipótesis de ser genes candidatos a causar HC en humanos.

4. Identificación de variantes en pacientes pediátricos argentinos con HC

El siguiente paso fue realizar una búsqueda de variantes en estos genes en los exomas realizados en el capítulo 1. Se encontraron en total cuatro casos relevantes que se detallarán a continuación, de los cuales dos se considera que han obtenido un diagnóstico definitivo.

Paciente	Gen afectado (Herencia)	Cambio a nivel de cDNA (Proteina)	Clasificación de la/s variante/s
54 (F)	*MKS1* (AR)	c.323G>A (p.Arg108His) c.1436G>A (p.Arg479His)	VUS/VUS
10 (M)	*CC2D2A* (AR)	c.517C>T (p.Arg173*)	LP
55 (F)	*MORC2* (AD)	c.683C>T (p.Thr228Met)	LP
85 (M)	*SETD5* (AD)	c.2404-1G>A (p.?)	P

Tabla 2.3. Se muestran los pacientes afectados, junto a los genes afectados, el modo de herencia de la enfermedad asociada, las variantes encontradas y la clasificación de ACMG de las mismas. AR= autosómica recesiva, AD = autosómica dominante

MKS1

En el caso 54, se encontraron dos variantes en heterocigosis compuestas en *MKS1* (ENST00000393119.7): c.323G>A (p.Arg108His) y c.1436G>A (p.Arg479His). Ambas variantes son consideradas de significado incierto (VUS, criterios PM2 y PM3). La paciente heredó la variante p.Arg108His de su padre y la variante p.Arg479His de su madre (Figura 2.6a). Los análisis estructurales de estas variantes son poco concluyentes, como se puede observar en la figura 2.6b. La arginina 479 está conservada en vertebrados, mientras que la arginina 108 se encuentra conservada sólo en mamíferos (Figura 2.6c). La paciente fue evaluada por primera vez a los 13 meses de edad, presentando -3.5 SD en altura. Fue diagnosticada posteriormente con IGHD, con un pico de 1 ng/dl luego de una prueba de estimulación con arginina. En la última visita la paciente tenía 12 años de edad y aún no había atravesado la pubertad, por lo que no puede descartarse una deficiencia combinada. La resonancia mostraba una APH, EPP y un tallo interrumpido.

MKS1 se asocia normalmente con los síndromes de Meckel y Joubert, siendo Joubert el síndrome con características más leves. Este síndrome normalmente trae aparejado el así llamado "*molar tooth sign*" en las resonancias, pero tal malformación no estaba presente en la paciente. No se observaron otras características típicamente asociadas a estos síndromes, como pueden ser deficiencia intelectual, hipotonía o ataxia. Un examen clínico exhaustivo reveló un paladar blando expandido, pero no se observaron

otras malformaciones clásicas como anomalías craneofaciales, afecciones del hígado, del riñón o esqueléticas.

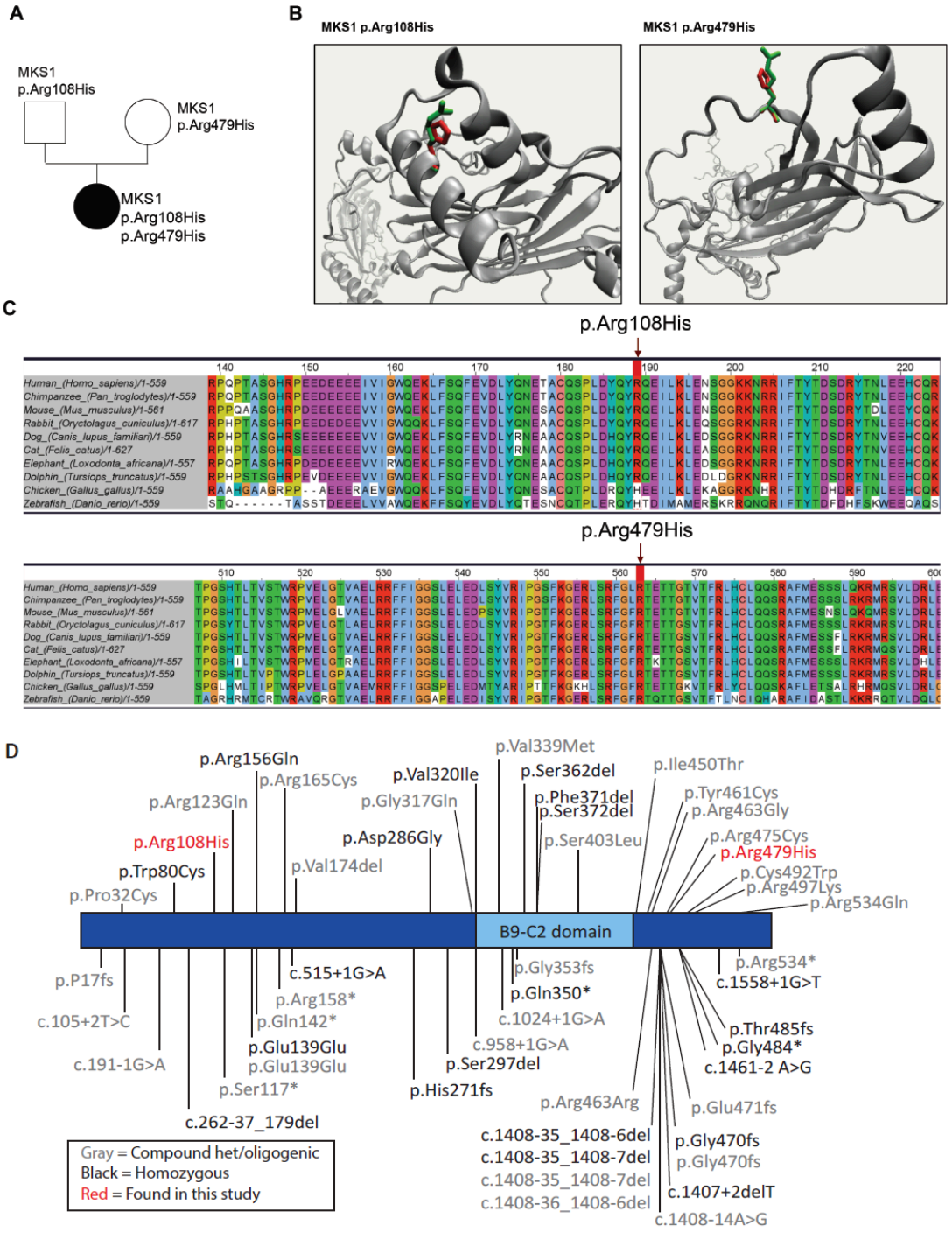

Figura 2.6. (A) Herencia de las variantes en *MKS1* halladas en el paciente 54. **(B)** Análisis estructural de las variantes halladas, la variante p.Arg108His se encuentra en una alfa-hélice, mientras que la variante p.Arg479His se encuentra en un *loop*. **(C)** Análisis de conservación con Clustal Omega de las variantes en *MKS1*. Se observa que ambas posiciones se encuentran altamente conservadas. **(D)** Variantes reportadas hasta el momento en *MKS1* y el modo de herencia descripto para cada una de ellas.

CC2D2A

CC2D2A es parte del complejo de la zona de transición ciliar, involucrado en el ensamblaje de los apéndices sub-distales del centriolo madre (Veleri et al., 2014). Al igual que muchos otros genes ciliares, está involucrado en síndrome de COACH, Joubert y Meckel, con un patrón de herencia AR. Mutaciones en este gen se caracterizan por un gran grado de variabilidad fenotípica, algo que se observa claramente en los ratones *knock-out* (Figura suplementaria 2.1c-e). El paciente 10 presentaba una variante P en *CC2D2A* (ENST00000424120.5: c.517C>T, p.Arg173*), con baja frecuencia en GnomAD (0.00001314). El paciente fue diagnosticado con CPHD, hipoplasia del nervio óptico, agenesia del septum pellucidum y apraxia oculomotora (síntoma común en Joubert, Tusa et al., 1999), lo que llevó a un diagnóstico de SOD. Se han descripto previamente casos de hipopituitarismo en pacientes con variantes en *CC2D2A*, también en heterocigosis (Zwaveling-Soonawala et al., 2017, Brauner et al., 2020). Es posible que variantes intrónicas profundas o en el promotor no hayan sido capturadas por WES y existan en estos casos variantes en *trans* que podrían ser descubiertas con el uso de WGS. Otra posibilidad es que los casos de HC debidos a variantes heterocigotas en este gen presenten penetrancia incompleta. En el caso de los ratones (*knock-outs* homocigotas) las dismorfias hipofisarias son extremadamente variables (figura suplementaria 2.1c-e), lo que se podría tomar como un argumento a favor de la penetrancia incompleta.

MORC2

En la paciente 55 se encontró una variante heterocigota en *MORC2* (ENST00000397641.8): c.683C>T (p.Tr228Met) (rs774960940), que se consideró LP según los criterios de ACMG (PM1, PM2, PP2, PP3). Esta paciente fue evaluada inicialmente al año y medio de vida, debido a hipoglicemia neonatal persistente y epilepsia. Los estudios hormonales demostraron CPHD (GH, TSH y ACTH). Su valor más alto de cortisol a las 8:00 AM fue de 5.3 µg/dL (valor de referencia 8.7–22.4 µg/dL), su T3 total era de 69 ng/dL (valores de referencia 87–178 ng/dL) y su T4 libre era de 0.36 ng/dL (valores de referencia 0.65–2 ng/dL). Luego del tratamiento con hidrocortisona y levotiroxina su pico de respuesta a GH fue de 0.78 ng/mL luego de la prueba de estimulación con arginina y clonidina y comenzó tratamiento con rGH.

Su resonancia mostró anomalías en la materia blanca así como asimetría ventricular, una adenohipófisis hipoplásica y una hipófisis posterior ectópica. A los 12 años presentaba una altura de −0.64 SDS, un peso de −0.62 SDS, estatus prepuberal, retraso severo del desarrollo, hipotonía muscular e hiperlaxitud. Su hipotonía es ahora extremadamente severa, al punto de que se encuentra en silla de ruedas por las dificultades para caminar

que esto le produce. Esto es común en pacientes con variantes en *MORC2* (Albulym et al., 2015), pero es extremadamente raro en pacientes con HC, lo que agrega un nivel de evidencia extra para la causalidad de la variante. La variante tiene una frecuencia baja en GnomAD 4.0 (21 heterocigotas para una frecuencia de 0.00002, sin presencia de homocigotas). Se ha demostrado previamente que algunas variantes en *MORC2* causan neuropatías periféricas de inicio tardío, por lo que los pocos individuos que presentan esta variante puede no haber presentado síntomas aún, o puede que la variante presente penetrancia incompleta. Ambos padres estaban sanos, pero su ADN no estaba disponible para comprobar si la herencia era *de novo*.

El análisis estructural con MutaBind2 mostró que la treonina 228 se ubica en una superficie importante para la formación de homodímeros de MORC2 (Zhang et al., 2020b). Haciendo uso de los cristales de homodímeros disponibles, se pudo comprobar que el cambio de la treonina 228 a metionina probablemente tenga un efecto desestabilizante en el loop en el que se encuentra este residuo. Este cambio lleva a su vez a la pérdida de varias interacciones con el ácido glutámico en la posición 227. Este residuo está conservado en todos los mamíferos (*MORC2* es una novedad evolutiva de estos) y se encuentra en el dominio ATPasa tipo GHKL (Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL) (Figura 2.7c-d). Este residuo es clave para la formación del homodímero, formando dos puentes de hidrógeno con la arginina 437 de la proteína MORC2 interactuante (Figura 2.7b). El analizar in silico de la estabilidad del dímero al mutar este residuo se estimó en −0.149 kcat/mol ΔΔGAfinidad según mCSM-PPI2, lo que indica una baja en el grado de afinidad y por lo tanto una menor estabilidad del homodímero (Rodrigues et al., 2019).

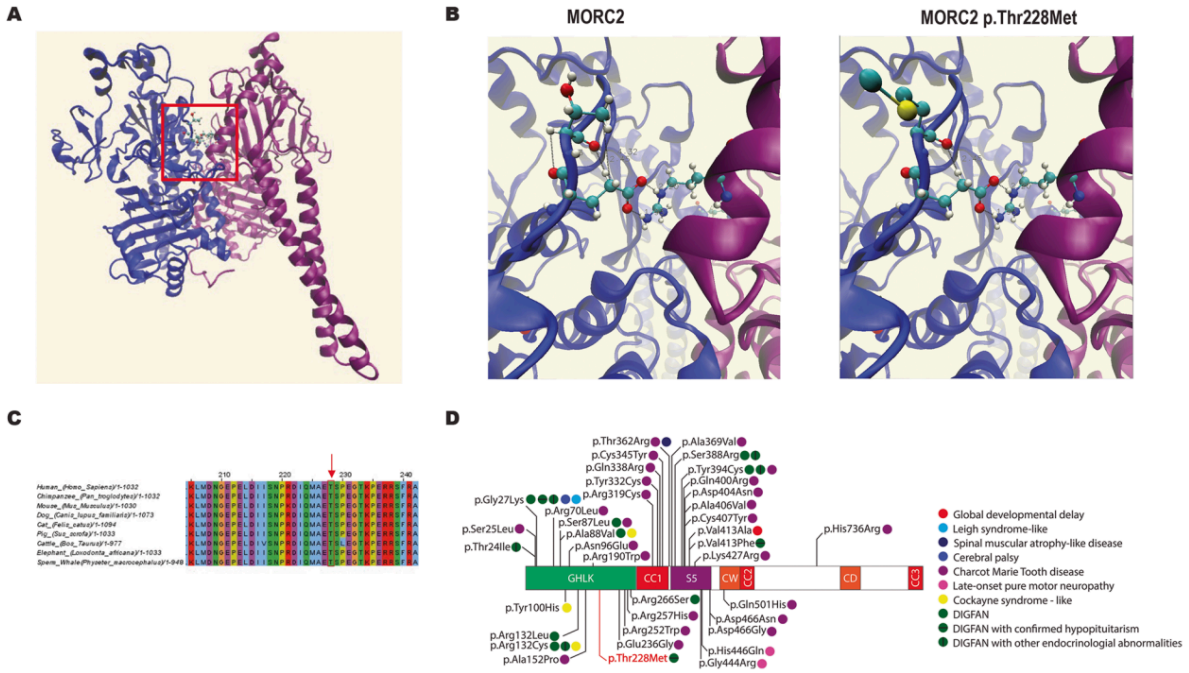

Figura 2.7. Variante heterocigota en MORC2 identificada en la paciente 55. **(A)** Estructura predicha para un homodímero de MORC2, con los monómeros mostrados en azul y violeta. La región indicada por la caja roja marca el dominio de interacción que contiene a la treonina 228. **(B)** Vista detallada de la región marcada, mostrando las interacciones entre la treonina 228 y la glicina 227, así como entre la treonina 228 y la arginina 437 (izquierda) y cómo esas interacciones se ven modificadas en MORC2 p.Thr228Met (derecha). **(C)** Alineamiento proteico de MORC2 en especies de mamíferos seleccionadas. Se indica la posición de la treonina 228, que demuestra un alto nivel de conservación, con una flecha roja. **(D)** Esquema de los dominios de MORC2, mostrando la ubicación de las variantes heterocigotas conocidas asociadas a diversos fenotipos. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024b.

SETD5

En el caso 85, el paciente presentaba polidactilia en el pie derecho, braquicefalia, macrocefalia moderada y una costilla supernumeraria del lado derecho. Además, presentaba características faciales peculiares, incluyendo un paladar alto y angosto, una nariz bulbosa, orejas despegadas y pestañas largas, junto con un retraso global del desarrollo (dislalia y marcha en punta de pie). Su talla era baja y fue diagnosticado con IGHD (7.0 ng/mL luego de pruebas de estimulación), pero no se puede descartar la presencia de CPHD ya que el paciente presentaba criptorquidismo y no ha atravesado la pubertad aún.

En este paciente se identificó una variante patogénica en *SETD5* (ENST00000402198.5: c.2347-1G>A, criterios de ACMG: PVS1, PM2, PP3, PP5). La variante ha sido reportada previamente como LP en ClinVar (RCV000578558) y en dos

publicaciones independientes, pero sin un detalle clínico en ninguno de estos casos (DDD Study 2017, Klee et al., 2020). La variante está ausente de GnomAD v4.0 y está predicha deletérea para el splicing (spliceAI score de pérdida de aceptor = 0.99) (Figura 2.8). La pérdida de este sitio aceptor de splicing canónico en el exón 16 llevaría a la activación de un sitio aceptor críptico, 16 pares de bases río abajo del sitio mutado. Este sitio aceptor alternativo llevaría a un cambio en el marco de lectura y a un codón *stop* prematuro un aminoácido luego del corrimiento del marco (Figura 2.8, opción 1). La otra posibilidad que emerge de la pérdida del sitio de splicing canónico es la exclusión del exón 16, incluyendo el exón 17 a continuación del exón 15. Esta exclusión también llevaría a un corrimiento en el marco de lectura y a un codón stop prematuro dos aminoácidos luego de este corrimiento (Figura 2.8, opción 2) (De Sainte Agathe et al., 2023).

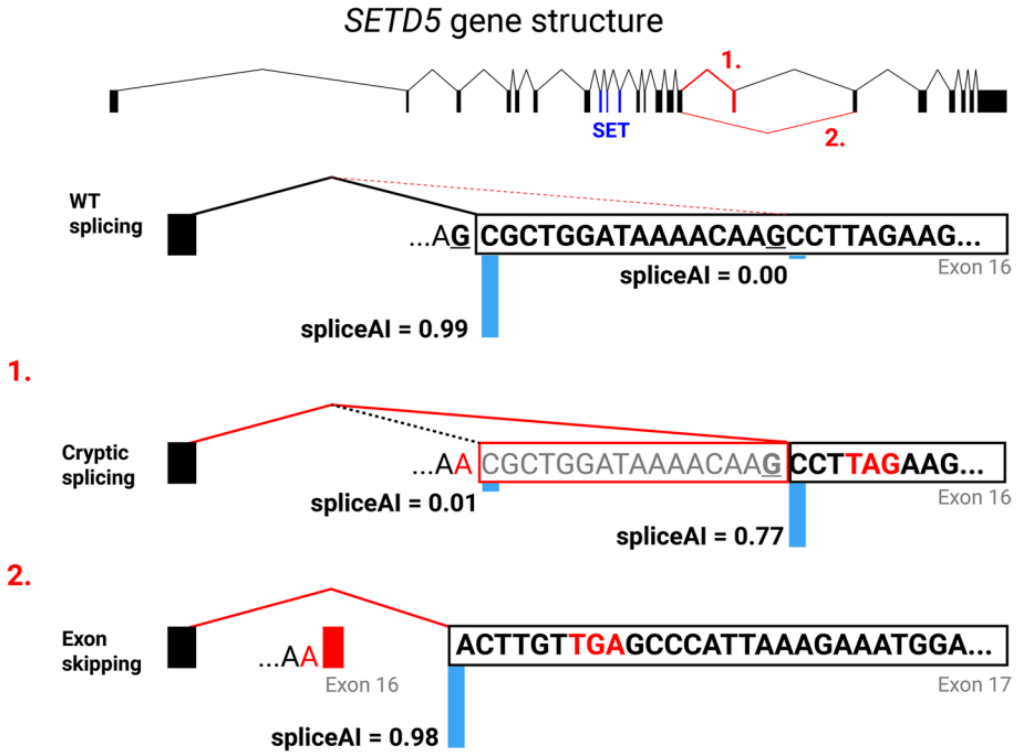

Figura 2.8. Estructura del gen *SETD5* y análisis de splicing para el transcripto mutado. Los exones se muestran en barras negras. Los exones 8 a 10 que forman el dominio SET se muestran en azul. El exón 16, afectado por la mutación, se muestra en rojo. Los eventos de splicing canónicos se muestran con líneas negras sólidas, mientras que los eventos de splicing aberrantes se muestran con líneas rojas. Las líneas punteadas de cada uno de estos colores muestran eventos de splicing poco probables. La base intrónica afectada se muestra en negrita y subrayada en el evento de splicing *wild-type* (WT). El cambio de G a A genera dos eventos de splicing predichos posibles. La primera opción es un evento críptico de splicing donde se activa un aceptor alternativo en el exón 16 (opción 1). La caja marcada en rojo resalta las bases del transcripto que se pierden. La segunda alternativa es la pérdida completa del exón 16 o exon skipping (opción 2). Los *scores* de spliceAI y cómo varían los mismos en presencia de la variante, se muestran en una barra celeste debajo de cada posición relevante, incluyendo el sitio aceptor de splicing críptico. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024b.

CAPÍTULO 2: CONCLUSIONES

En este capítulo se exploró la posibilidad de que la baja tasa diagnóstica en pacientes con hipopituitarismo congénito (HC) se deba, al menos en parte, a la existencia de genes que aún no han sido vinculados con la enfermedad. Con esto en mente, se hipotetizó que el estudio de ratones *knock-out* que demostraran malformaciones hipofisarias podrían dar lugar a genes candidatos a causar HC en humanos.

Se exploró un set de datos público del DMDD (*Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders*) y se encontró que casi un cuarto de los 209 *knock-outs* letales o sub-viables evaluados presentaban malformaciones hipofisarias. De este modo se obtuvieron 51 genes candidatos a causar HC.

A través de experimentos de scRNA-seq se pudo comprobar que todos los genes candidatos estudiados presentaban expresión hipotalámica o hipofisaria. Además, se destacaron algunos de ellos, que presentan patrones de expresión sumamente interesantes. Entre ellos, *Gldc* emerge como un excelente marcador novel de la hipófisis posterior durante el desarrollo. Del mismo modo, *Sh3pxd2a* resultó ser un marcador del mesénquima hipofisario que no ha sido estudiado hasta el momento.

También se cruzaron los datos generados por *whole exome sequencing* (WES) en el capítulo 1 con los 51 genes del presente capítulo para estudiar el posible impacto de los mismos en la etiología genética del HC. Dentro de los 143 pacientes pediátricos estudiados, se encontraron cuatro casos con variantes en estos genes candidatos. Uno de estos casos se correspondía a un paciente con IGHD y dos variantes VUS (en *trans*) en *MKS1*, un componente ciliar, asociado al síndrome de Joubert y al síndrome de Meckel. Otro de estos casos presentaba una variante patogénica en *CC2D2A*, gen asociado a estos mismos síndromes, cuya herencia es autosómica recesiva. Este caso queda a la espera de otros abordajes, como puede ser la secuenciación de genoma completo, para intentar encontrar una variante en trans y llegar a un diagnóstico definitivo.

Además, se considera que dos pacientes llegaron a un diagnóstico certero gracias a este abordaje. Una paciente presentaba una variante LP en *MORC2* un gen que ha sido históricamente asociado a neuropatías motoras. Sin embargo, más recientemente se han reportado múltiples casos con HC, como parte de un nuevo síndrome llamado DIGFAN (*Developmental delay*, *impaired growth*, *dysmorphic facies*, *axonal neuropathy*). Dado que la variante encontrada es sumamente rara y el fenotipo, tanto neurológico como de HC, coincide con la descripción de este nuevo síndrome se considera que este caso ha recibido

un diagnóstico definitivo. Por último, un paciente presentaba una variante P de splicing en *SETD5*. Este paciente presentaba IGHD sindrómico, con un fenotipo coincidente con otros reportes, aunque la baja talla no haya sido adjudicada a IGHD en casos previos.

La identificación de estas variantes, en particular de las clasificadas como LP/P, en genes candidatos, demuestra la utilidad de la caracterización fenotípica de los ratones *knock-out* generados por el IMPC para la mejora del diagnóstico genético de enfermedades poco frecuentes, como es el caso del hipopituitarismo congénito.

CAPÍTULO 3: Transcriptómica de célula única del desarrollo hipofisario en pez cebra (*Danio rerio*) a partir de animales reporteros para *prop1*

INTRODUCCIÓN ESPECÍFICA

Desarrollo hipofisario temprano comparado

El desarrollo hipofisario se establece en etapas tempranas de la evolución de los vertebrados y es común a todos estos. En este apartado se detallarán las diferencias entre mamíferos (*Homo sapiens* y *Mus musculus*), anfibios (*Xenopus laevis*) y peces teleósteos (*Danio rerio*).

En todos los casos, la adenohipófisis se origina a partir de una placoda hipofisaria temprana, ubicada en la línea media, en el surco neural anterior, delante de la región más rostral del cerebro. Esta placoda hipofisaria es *Lhx3*$^{+}$ y esa expresión es seguida de una activación de *Prop1*. En mamíferos la placoda se interioriza mediante la invaginación del ectodermo oral y la subsecuente formación del *Rathke's Pouch* (RP). Si bien este proceso es parecido en anfibios y peces, en estas especies no existe un equivalente al RP. En cambio, la placoda es invaginada de manera acelerada y como un todo, en forma de una densa masa de células.

Tanto en mamíferos como en peces y anfibios, una vez que la hipófisis se ubica por debajo del diencéfalo ventral comienza la diferenciación de la mayoría de los linajes y el estrechamiento del contacto con el ectodermo neural. Este último sufre una evaginación en mamíferos, anfibios y teleósteos (aunque menor en estos dos últimos), que dará lugar a la pars nervosa o hipófisis posterior. De este modo, en mamíferos se forma también un tallo hipofisario que conecta el hipotálamo con la hipófisis. En los teleósteos este tallo puede o no existir dependiendo de la especie (De Jesus et al., 2013, Branco et al., 2025). Específicamente en pez cebra la hipófisis posterior se encuentra dorsal a la hipófisis anterior, en contacto estrecho y directo con la misma, sin la presencia de un tallo hipofisario propiamente dicho (Wiechmann et al., 2003, Chapman et al., 2005).

En anfibios y peces, la diferenciación de los linajes ocurre de manera temprana, incluso antes de la invaginación de la placoda. En Xenopus el proceso de invaginación finaliza entre los estadios 47 o 5 días y medio post fertilización (donde ya se encuentra ventral al hipotálamo) y el 53 o 24 días post fertilización (donde su separación del ectodermo oral es completa). Sin embargo, en los estadíos 39 y 42, donde la invaginación

no ha comenzado, se puede detectar ya expresión de ACTH y de TSH y LHB, respectivamente (Moriceau-Hay et al., 1982). Algo similar ocurre en pez cebra, donde la invaginación comienza alrededor de la hora 28 post fertilización (a partir de ahora hpf) y la expresión de *prl* y *pomc* antecede a esta invaginación por al menos seis horas (Herzog et al., 2003). Se especula que en mamíferos, al tener un desarrollo interno, su homeostasis se encuentra asegurada dentro del vientre materno, mientras que anfibios y teleósteos, deben comenzar a mantener la homeostasis desde incluso antes de la eclosión. Dado que las diversas hormonas hipofisarias juegan un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis, esto podría explicar el desacople que existe entre el proceso de maduración morfológica y el proceso de maduración celular en vertebrados con desarrollo externo.

Como se ha mencionado anteriormente en el capítulo 2, los genes involucrados en el desarrollo hipofisario han sido estudiados mayoritariamente en ratones y en menor medida en pez cebra (*Danio rerio*). En términos generales, la inducción de la placoda sucede de manera similar en mamíferos y peces. Una cascada de factores de transcripción es activada de manera Shh dependiente en particular *Lhx3*, luego *Prop1* y más tarde los factores linaje específicos, como por ejemplo *Pou1f1*. Sin embargo, existen algunas diferencias en cuanto a cómo sucede esta especificación. En mamíferos, los dos primeros genes en expresarse en la región ectodérmica oral donde se especificará la placoda son *Pitx1* y *Pitx2*, mientras que en esta región en pez cebra se expresa *pitx3* (Angotzi et al., 2008). Otro ejemplo son los genes de la familia *Six*: en ratones los genes *Six3* y *Six6*, genes relacionados a la formación de placodas, juegan un rol importante en el desarrollo hipofisario, mientras que en pez cebra es *six1(a/b)* quien cumple esa función, junto a su principal *target* y co-activador, *eya1* (Nica et al., 2006). Este coactivador es necesario para la especificación de todos los linajes hipofisarios con la excepción de lactotropos (Nica et al., 2006), mientras que el gen *ascl1a* se necesita para la especificación de todos los linajes. Este último factor está también presente en las células madre hipofisarias de mamíferos, pero su rol en la diferenciación no ha sido estudiado en detalle (Pogoda et al., 2006, Zhang et al., 2020a).

Hormonas hipofisarias y sus distintas funciones

Uno de los primeros *knock-outs* para hormonas hipofisarias en pez cebra fue el mutante *vizzini*, encontrado como resultado de un *screening* tras mutagénesis al azar, recién en el año 2013 (McMenamin et al., 2013). Este mutante fue identificado por su pequeño tamaño y alta adiposidad, descubriéndose como causa una mutación en *gh1*, demostrando así el rol conservado de esta hormona en el crecimiento de los teleósteos.

La prolactina (*prl*) es la hormona más conservada a lo largo de la evolución y ha adoptado funciones muy diversas (Dobolyi et al., 2020). En pez cebra (y en peces en general) la prolactina funciona como un regulador de la incorporación de iones (en particular de Na^+, K^+ y Cl^-), siendo fundamental para su osmoregulación. Los peces *knock-out* para *prl* sufren un desbalance osmótico y muerte prematura entre días 6 y 16 días post fertilización (dpf) (Shu et al., 2016).

Las hormonas sexuales, la hormona luteinizante (lhb) y la folículo estimulante (fshb), tienen roles similares en teleósteos y mamíferos, aunque la determinación, diferenciación y reproducción sexual en teleósteos es sumamente distinta. La determinación sexual en peces cebra es independiente de la composición cromosómica y depende, en cambio, de factores ambientales como pueden ser la alimentación, la densidad de animales en la misma pecera, la temperatura del agua y otros factores de estrés (Aharon et al., 2021). Las hormonas sexuales, lhb y fshb, no juegan un rol importante en la determinación sexual, pero sí lo hacen en la diferenciación sexual. Los peces cebra *knock-out* para *lhb*, construidos mediante edición genética mediada por TALEN, demuestran problemas de fertilidad en hembras, pero no así en machos (Chu et al., 2014). Algo similar sucede para los *knock-outs* de *fshb*, donde los machos son fértiles y las hembras son subfértiles (Chu et al., 2015).

En el caso de TSH (*tshba*), también se ha generado recientemente un *knock-out* mediante TALEN (Song et al., 2021). Estos peces demostraron bajos niveles de T3 y T4 circulante, indicando un mecanismo conservado de regulación del eje tiroideo. Los peces mostraron además un tamaño levemente menor al esperado y una pigmentación más oscura.

Para el caso de ACTH y α-MSH, se ha generado el *knock-out* global para *pomca*, pero no se han generado aún *knock-outs* específicos para la pro-protein convertasa *pcsk2*, por lo que en estos mutantes es posible distinguir únicamente los efectos combinados de la deficiencia de ambas hormonas. Los *knock-outs* para *pomca* presentan un mayor tamaño, atribuido a una ganancia de masa muscular, sin generar obesidad, probablemente como resultado de la deficiencia de ACTH (Shi et al., 2019, Yang et al., 2023). Además, como consecuencia de la falta de α-MSH se ha observado una menor pigmentación en al menos uno de los *pomca knock-outs* (Yang et al., 2023).

A pesar de los grandes avances que se han realizado en los últimos años en la comprensión de la función y regulación de las hormonas hipofisarias en pez cebra, se ha avanzado en mucho menor medida sobre los factores de transcripción que modulan su expresión. Uno de los pocos trabajos sobre factores de transcripción iniciales del desarrollo hipofisario en peces aborda un *knock-out* para *lhx4* generado por CRISPR-Cas9

(Roisman-Geller et al., 2024). Este *knock-out* presentaba bajos niveles de todas las hormonas evaluadas, así como un menor tamaño y defectos de maduración sexual.

En este caso, resultó interesante investigar el rol de *prop1* en el desarrollo hipofisario en pez cebra, dado que a pesar de ser el jugador central del desarrollo hipofisario, la relevancia de este gen ha sido estudiado únicamente mediante morfolinos (Angotzi et al., 2011). Por lo tanto, *prop1* es un candidato de estudio ideal, que aún necesita de la generación de transgénicos estables (*knock-in* y *knock-out*) mediante tecnologías actuales como CRISPR-Cas9 o TALEN.

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento y generación de líneas transgénicas

Se trabajó en todos los casos con peces cebra de la cepa AB. Las líneas de peces cebra utilizadas para esta tesis fueron crecidas en un ciclo de luz:oscuridad de 14 y 10 horas respectivamente, bajo condiciones de alimentación estandarizadas. Los transgénicos fueron criados bajo los protocolos y lineamientos del comité de ética y experimentos animales de Darmstadt (números de permiso: B2/1218 y B2/2023) y el protocolo N°152, aprobado por la Comisión Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (FCEN-UBA), Argentina.

Generación de una línea reportera para *prop1* mediante inserción al azar

Para la generación de las líneas reporteras mediante el sistema Tol2 (Kawakami 2007), se decidió clonar fragmentos del promotor de *prop1* río arriba de EGFP, en un plásmido pFlipTrap (Trinh et al. 2011), flanqueado por dos elementos Tol2 (Figura 3.1a, b, c y d). Los tres plásmidos se generaron mediante clonado por el método de *in-fusion* utilizando los siguientes *primers*:

Primer	**Secuencia**
prop1 promotor 2 y 6 kb FW	AGAGCAGCAGTGATCTGATTC
tol2 prop1 promotor 2 y 6 kb homology	GAATCAGATCACTGCTGCTCTGGGCCCAATACTCAAGTACAATTTTAATGG
prop1 promotor 2 kb RV	GACTTCAGCTGTGTGAATGTCC
EGFP prop1 promotor 2 kb homology	GACATTCACACAGCTGAAGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
prop1 promotor 6 kb RV	AGTGCGGTTACACCTCTCAC
EGFP prop1 promotor 6 kb homology	CCGCACTGTGATGTCACAACGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT
prop1 promotor Ex1Intr1 FW	GCCACGACTGAACAAGAAGGATG
tol2 prop1 promotor Ex1Intr1 homology	TCCTTCTTGTTCAGTCGTGGCGGGCCCAATACTCAAGTACAATTTTAATGG
prop1 promotor Ex1Intr1 RV	CATCTATATCTGACAGGGGGAAAGTC
EGFP prop1 promotor Ex1Intr1 homology	TCCCCCTGTCAGATATAGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT

Tabla 3.1. *Primers* utilizados para el clonado de los plásmidos Tol2-promotor-EGFP.

Los plásmidos fueron inyectados en una concentración de 100 ng/µL, junto con 150 ng/µL de RNA de transposasa Tol2. Los embriones resultantes fueron evaluados para fluorescencia verde entre las 24 y las 72 hpf.

Microinyecciones de ADN y ARN en embriones de pez cebra

Las inyecciones se realizaron en embriones de pez cebra durante el estadío de una célula, en un microscopio Stemi SV11 (Zeiss) en campo claro, utilizando capilares de vidrio acoplados a un micromanipulador (Marzhauser cat# MM33) y un pico-inyector PICOSPRITZER III (Parker). En todos los casos se inyectó 1 pL de solución, utilizando rojo fenol en la mezcla para visualizar la inyección.

Síntesis de RNA guías

Se sintetizaron gRNAs utilizando *primers* diseñados de la siguiente forma: taatacgactcactataN(X20)gttttagagctagaaatagcaag. La primera parte del *primer* permite la transcripción *in vitro* mediante polimerasa T7. Luego le siguen 20 pares de bases (N) que le confieren especificidad a la guía (las primeras dos bases del *primer* siempre se editan a G para aumentar la eficiencia de transcripción de la polimerasa T7). La parte final del *primer* es complementaria a otro *primer,* el primer constante, con la siguiente secuencia: AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTT GCTATTTCTAGCTCTAAAAC. Este segundo *primer (primer* constante*)* se une por complementariedad al primero (*primer* variable). Para esto se utilizaron 1 uL de primer variable y 1 uL de primer constante, junto con 8 uL de agua miliQ. Esta mezcla se calienta a 95°C durante 5 minutos y se vuelve a enfriar a 4°C. Este dímero de *primers* se completa utilizando una polimerasa T4 (NEB cat#M0203). Para esto se incuba el dímero de *primers* a 12°C durante 20 minutos, junto con 2.5 uL de dNTPs 10mM, 2 uL 10X NEB Buffer r2.1, 0.5 uL polimerasa T4 y 5 uL de agua miliQ. Este templado fue purificado utilizando el kit QIAquick nucleotide removal (QIAGEN cat# 28304). Luego se procedió a la síntesis del gRNA mediante el Ambion MEGAshortscript T7 Kit (Thermo Fisher Scientific cat# AM1354) y dicho RNA fue purificado mediante el kit RNA clean up (Zymo cat#R1013).

Evaluación de RNA guías

La eficiencia de las guías fue evaluada mediante *high resolution melting analysis*. Brevemente, se buscó en cada caso diseñar *primers* alrededor del sitio de corte predicho, que dieran como producto un fragmento de menos de 150 pb. Luego se inyectaron embriones de pez cebra al estadío de una célula con 150 ng/µL de gRNA, junto con 250 ng/µL de proteína Cas9 (Invitrogen cat#A36496), previamente incubados a 37°C durante 10 mins para la formación del complejo. Los embriones se crecieron durante 24 horas y luego

se extrajo ADN con NaOH 50 mM a 95°C por 20 minutos de ocho embriones individuales para cada guía evaluada. El ADN de la región de interés fue amplificado con *primers* específicos. En caso de no haberse producido un corte, el producto de PCR tendrá una curva idéntica a la de un embrión control no inyectado, mientras que si la guía es eficiente se observará una desviación del control.

Generación de la línea reportera mediante inserción sitio dirigida *(bns714)*

El método utilizado para la generación de la línea reportera se basó en el trabajo de Mi et al., 2023. En primer lugar se buscó un RNA guía (gRNA) que fuese capaz de cortar el exón dos de *prop1.* Para esto se diseñaron *primers* (ver síntesis de RNA guías y evaluación de RNA guías) en base al diseño asistido por CRISPOR (https://crispor.gi.ucsc.edu/crispor.py). Se encontró la siguiente guía con alta eficiencia: GGGCGGGATGGTGAAGGGTA. Esta guía está dirigida al exón dos, por lo que el *knock-in* conserva el exón uno y parte de su exón dos. Se buscó entonces insertar en esta posición un fragmento P2A (péptido autoclivable), seguido de GAL4-VP16 (una proteína GAL4 modificada con un activador proveniente del virus *Herpes simplex*). Para esto se usó de base el plásmido pGTag-Gal4-VP16-B-actin (Wierson et al., 2020). Se clonaron 54 pb de la región homóloga del exón dos río arriba del sitio de corte, seguidas de una secuencia P2A, antes del fragmento GAL4-VP16 original. Por otro lado se clonaron también 48 pb de la región homóloga río abajo del sitio de corte, después de la señal de poliadenilación de beta actina putativa del plásmido. Este plásmido fue a su vez usado de base para una amplificación con *primers* modificados con AmC6 en sus extremos 5' (FW: ACGGTATTAGCAACTGGAAACC, RV: AGCTTTCTAGAAGGACCGGG). Este producto de PCR modificado fue inyectado en una concentración de 40 ng/ul en conjunto con 150 ng/µl de gRNA, 250 ng/µl de proteína Cas9 en embriones wt en el estadío de una sola célula. La correcta integración se comprobó en una fracción de los embriones inyectados, extrayendo ADN a las 24 hpf, y en los huevos de la F0 resultante, con *primers* específicos para las inserciones 5' (FW: TGTCCAAATTCACCCAAGAA, RV: TCAAAATCATGTCAAGGTCTTCTC) y 3' (FW: TAGCTAACTGCAAACGGCCT, RV: GTGACCCTAGCAAGCTCCTC).

Síntesis de sondas para hibridación *in situ*

Las sondas fueron sintetizadas utilizando entre 100 y 300 ng de cDNA o DNA linear proveniente de plásmido digerido, en agua miliQ en un volumen de 11 µL. A estos 11 µL se agregan 4µL de buffer de transcripción 5X, 2 µL de DTT 100mM, 2µL de DIG RNA Labeling Mix (cat#11277073910) y 1µL de RNA polimerasa T7. En el caso de usar cDNA como templado, se debe agregar la secuencia gaaatTAATACGACTCACTATAgg en el primer RV

para que la polimerasa pueda sintetizar la hebra antisentido. La reacción se incuba durante 2 horas a 37°C, se agregan 2 µL de DNAse I durante otros 15 minutos para degradar el templado. Finalmente las sondas se purificaron utilizando el kit RNA clean up (Zymo cat#R1013).

Las sondas de *prop1* fueron sintetizadas a partir de un plásmido pGEM-T-Easy-prop1 proveído por el laboratorio de la Dra. Sally Camper, linearizados con la enzima SacII. Las demás sondas fueron sintetizadas desde cDNA con los *primers* que se indican en la tabla 3.2. Las sondas fueron conservadas a -80°C antes de su uso y en buffer Hyb^+ a -20°C luego de su primer uso.

Primer	**Secuencia**
prl FW	ACCACACAGATTCACGCAAG
prl RV	gaaatTAATACGACTCACTATAggACGAGCCCATCTTGTGTACG
notch3 FW	GGGTATTTCGAGACGCACGGC
notch3 RV	gaaatTAATACGACTCACTATAggGAATGTGTTGACACCATCGACGC
tfcp2l1 FW	CGTATGCTTAACGGGAAGCTG
tfcp2l1 RV	gaaatTAATACGACTCACTATAggTTACGATGGAGCCACTGCTG

Tabla 3.2. *Primers* utilizados para las hibridaciones *in situ* fluorescentes.

Hibridación *in situ*

Los embriones fueron fijados en PFA 4% *overnight* a 4°C, en agitación. Luego las muestras fueron deshidratadas con lavados en MeOH 25%, 50% y 75% en PBS por 5 minutos y luego guardadas a -20°C en 100% MeOH por al menos 2 horas. Se repitieron los lavados en sentido inverso para rehidratar y se hicieron 5 lavados en PBS de 5 minutos cada uno. Luego, los embriones se sometieron a una digestión con proteinasa K y se volvieron a fijar en PFA 4% durante 20 minutos, con posteriores lavados en PBS. A continuación, se realizó la pre-hibridación con buffer Hyb^- a 70°C por al menos dos horas. Luego se agregó la sonda en Hyb^+ y se incubó a 70°C *overnight*. Al día siguiente, se hicieron lavados a 70°C: 100% Hyb^- 1 minuto, 75% Hyb^-/25% 2x SSC 15 minutos, 50% Hyb^-/50% 2x SSC 15 minutos, 25% Hyb^-/75% 2x SSC 15 minutos, 2x SSC 15 minutos, 0.2x SSC 30 minutos y 0.2x SSC 30 minutos nuevamente. Los lavados posteriores siguen a temperatura ambiente: 75% 0.2x SSC/25% PBST 10 minutos, 50% 0.2x SSC/50% PBST 10 minutos, 25% 0.2x SSC/75% PBST 10 minutos, PBST 10 minutos. Después de bloquear por al menos 1 hora con buffer de bloqueo se agregó el anticuerpo anti-Dig (Roche cat#11093274910) en una dilución 1:5000 y se incubó en agitación a 4°C *overnight*. Al día

siguiente se hicieron los siguientes lavados: 1x PBS-T 1 minuto, 1x PBS-T 15 minutos (6 veces), buffer de tinción AP 5 minutos (3 veces). Los embriones fueron transferidos a una placa de cultivo p12, se agregó solución de tinción y se monitoreó la reacción cada 15 minutos. La tinción se fijó con PFA 4%. Para las hibridaciones *in situ* fluorescentes se utilizaron anticuerpos POD-conjugados (Roche cat#11207733910) y el kit comercial TSA Plus Fluorescein (Akoya cat#NEL741001KT). Luego se incubó durante 1 hora con el anticuerpo primario (anti-dsRed, hecho en conejo, Takara cat#632496) 1/200 en PBS-Tritón X, 2% BSA, se lavó 1 hora en PBS-Tritón X, 2% BSA y se incubó por 1 hora con el anticuerpo secundario (Alexa Fluor 594, anti conejo, Invitrogen cat#A-11012) 1/500 en PBS-Tritón X, 0.2% BSA. Finalmente se lavó en PBS-Tritón X 5 minutos (3 veces) y se fijaron en PFA 4%.

Soluciones utilizadas durante la hibridación *in situ*:

- Hyb^- (100 mL) = 50 mL formamida + 25 mL 20x SSC + 1 mL 10% tween 20 + 1 mL ácido cítrico 1 M + 21 mL agua miliQ
- Hyb^+ (100 mL) = 98.9 mL Hyb^- + 1 mL tRNA 40 mg/mL + 100 µL heparina 50 mg/mL
- Buffer de bloqueo = 2%v/v suero de oveja y 2 mg/mL BSA en PBS-T
- Buffer de tinción (100 mL) = 10 mL tris-HCl pH 9.5 1M + 5 mL MgCl2 1M + 2 mL NaCL 5M + 1 mL 10% tween 20 + 82 mL agua miliQ
- Solución de tinción (100 mL) = 2 mL NBT/BCIP (11681451001, Roche) + 98 mL buffer de tinción

Inmunofluorescencia

Se procedió del mismo modo que fue descripto en materiales y métodos del capítulo 2, utilizando el anticuerpo primario Anti-EpCAM (Abcam cat#EPR20533-63) hecho en conejo.

Microscopía confocal

Los experimentos de microscopía confocal fueron llevados a cabo en un microscopio Zeiss LSM 880, utilizando un láser de dos fotones. Las fotos fueron tomadas en embriones fijados, montados en agarosa de bajo punto de fusión 1%, con la excepción del *time-lapse* que se muestra en los videos suplementarios 1 y 2, donde los embriones fueron tratados con tricaína 0.016% (Sigma-Aldrich) y montados en agarosa de bajo punto de fusión 1.5% (A1801-LM, Benchmark Scientific) para mantener su posición fija. Para dicho *time-lapse* se tomaron imágenes cada 30 minutos de embriones de 30 hpf durante 18 horas.

scRNA-seq

a. Preparación de las muestras

Con el objetivo de obtener las células adenohipofisarias y secuenciar su transcriptoma se realizaron las cruzas de los animales de la siguiente manera: hembras *TgKI(prop1:*GAL4-VP16^{bns714}*)*; *Tg(UAS:*mScarlet-CAAX^{bns681}*)* se cruzaron en días consecutivos (con una diferencia de 24 horas) con machos *wild-type* (AB), utilizando separadores para controlar el horario de puesta. A las 28 hpf y 52 hpf los embriones se retiraron de la estufa y se pusieron sobre hielo para enlentecer su desarrollo. Además, se utilizó MS-222 como anestesia y PTU 1X para evitar que desarrollen pigmento.

La disección se llevó a cabo de manera manual, utilizando agujas de insulina como agujas de disección, sobre placas de vidrio, para evitar la liberación de microplásticos, bajo una lupa de fluorescencia Nikon SMZ18. La disección para los embriones de 28 hpf consistió únicamente en remover la mayor proporción posible del torso, mientras que la disección de los embriones a las 52 hpf se llevó a cabo separando únicamente la cabeza del torso (Figura 3.4a). Los embriones diseccionados fueron colectados en PBS 1X en hielo y conservados para su disgregación hasta el final de la disección de todos los embriones.

Se realizó una disgregación mecánica y química, basada en el protocolo de Martin et al., 2022. En primer lugar se removió el PBS y se agregó 1 mL de TrypLE (Thermo Fisher cat#12604013). Luego se realizó una incubación durante 30 minutos a 29°C. Durante esta incubación, cada 10 minutos, se fue pipeteando con tips low binding, hasta que la solución luciera homogénea. Luego se centrifugó durante 7 minutos a 4°C a 300 g. El pellet se resuspendió en DMEM (Thermo Fisher cat#21063029) con 2% FBS, previamente enfriado.

b. *Fluorescence activated cell sorting* (FACS)

En primer lugar las células fueron filtradas a través de un *Cell Strainer Snap Cap* (Corning cat#352235) y diluidas en DMEM (Thermo Fisher cat#21063029) con 2% FBS y mantenidas en hielo. Antes de ser sometidas a FACS se les agregó 1ul de DAPI 1 mg/ml de solución. Las células fueron sometidas a FACS, utilizándose como control negativo de sorting los embriones diseccionados de la misma puesta, que resultaron negativos para fluorescencia. Las células fueron pasadas por un equipo “Bigfoot spectral cell sorter” (Thermo Fisher Scientific) y fueron capturadas en un volumen mínimo (20 µL) de PBS + 5% FBS en un eppendorf de 1.5 mL previamente recubierto con PBS + 20% FBS. Las células recolectadas se mantuvieron en hielo hasta el experimento de scRNA-seq.

c. Secuenciación de RNA de célula única (scRNA-seq)

La secuenciación de célula única fue realizada en dos calles separadas en un controlador Chromium con un kit “Chromium Next GEM Single Cell 3' Reagent Kits v3.1” (10x Genomics). La preparación de la librería de scRNA-seq fue realizada con un protocolo estandarizado y la secuenciación se realizó en un equipo NextSeq 2000 (Illumina).

d. Mapeo

Las lecturas crudas fueron alineadas contra el genoma de referencia de *pez cebra* versión GRCZ11. Previo a este alineamiento fueron agregados al genoma la secuencia de ADN correspondientes a las líneas transgénicas *prop1:*GAL4-VP16^{bns714} y UAS:mScarlet-CAAX^{bns681} mediante el paquete de *mkref* dentro de CellRanger (10x Genomics). El alineamiento a este genoma modificado se realizó utilizando CellRanger.

e. Filtrado

El procesamiento de las muestras fue realizado en Python mediante el paquete scanpy (https://github.com/scverse/scanpy) (Wolf et al., 2018). Brevemente ambas muestras (28 hpf y 52 hpf) fueron concatenadas, obteniéndose un total de 5827 células, 1899 correspondientes a 28 hpf y 3927 correspondientes a 52 hpf. Luego se eliminaron células con menos de 100 transcriptos, así como transcriptos que eran detectables en 3 células o menos. Se eliminaron también células con porcentajes transcripcionales mitocondriales mayores a 5%. Luego se utilizó scrublet (https://github.com/swolock/scrublet) para predecir doublets y se filtraron aquellas células con un score >0.2. Luego de este filtrado se obtuvieron 5569 células totales (1785 a 28 hpf y 3784 a 52 hpf).

f. Normalización y reducción de dimensionalidad

La normalización fue llevada a cabo mediante el algoritmo bbknn (https://github.com/Teichlab/bbknn) de correción por batch. La reducción de dimensionalidad se llevó a cabo utilizando los 2500 genes más altamente variables mediante el algoritmo de UMAP.

g. Análisis de expresión diferencial

El análisis de expresión diferencial fue llevado a cabo mediante el paquete scanpy, utilizando la función “rank_genes_groups”. Para cada *cluster* se buscaron los primeros 25 genes estadísticamente diferencialmente expresados y entre estos se eligieron tres para ser representados en forma de *heatmap* (Figura 3.5d). Además, en el *heatmap* se grafican, en las primeras 6 filas, genes altamente expresados en células madre (*clusters* de la izquierda en la figura 3.5c) y células diferenciadas (*clusters* de la derecha en la figura 3.5c).

h. Análisis de enriquecimiento de *sets* de genes

El análisis de enriquecimiento de sets de genes fue llevado a cabo mediante la librería gseapy (https://github.com/zqfang/GSEApy), sobre los genes diferencialmente expresados en los *clusters* correspondientes al *clustering* “leiden_combined”. Estos genes fueron ordenados de mayor a menor de acuerdo a su *score* y los 500 primeros genes fueron a su vez traducidos a genes humanos mediante la libreria danrerlib (https://sdsucomptox.github.io/danrerlib/index.html) para su análisis. Los 343 genes obtenidos de esta operación fueron analizados con la librería “GO_Biological_Process_2017”.

i. Análisis de comunicación célula-célula

El análisis de comunicación célula-células fue realizado mediante el paquete de python LIANA+ (Dimitrov et al., 2024), utilizando la base de datos *“cellchatdb”* con el agregado manual de ligandos y receptores de las familias de *robo*, *bmp* y *fgf* a partir de la base de datos *‘consensus*’ (Jin et al., 2021). El *cluster* de células progenitoras (*Progenitor cells*) fue definido como el conjunto de los *clusters* 0, 5 y 8. El *cluster* de células en diferenciación (*Differentiating cells*) fue definido como los *clusters* 1, 6 y 11. El *cluster* de células productoras de hormonas (*Hormone producing cells*) fue definido como el conjunto de los *clusters* 3, 4_0, 4_1, 7 y 10). Los resultados fueron graficados utilizando el paquete 3dblocks (https://github.com/d3blocks/d3blocks).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Generación de un pez cebra reportero para *prop1*

Con el objetivo de estudiar el mecanismo molecular del desarrollo hipofisario, y dado que *prop1* es el factor de transcripción central en este proceso, se propuso generar un reportero para este gen en pez cebra.

En primera instancia se buscó desarrollar una línea reportera mediante el sistema Tol2, clonando el promotor de *prop1* río arriba de EGFP. Para esto se buscaron regiones regulatorias utilizando datos de ChIP-Seq a 24 hpf y de conservación, disponibles en el UCSC Genome Browser (Zv9/danRer7). Se observaron dos regiones regulatorias con marcas de histonas asociadas a enhancers (H3K4me1), una de ellas alrededor de 8 kb y otra a 6 kb río arriba del promotor de *prop1*. Esta segunda región y el primer intrón, están altamente conservados en peces (Figura 3.1a).

En base a estas observaciones se decidió generar tres plásmidos pCS2-EGFP, donde distintos fragmentos del promotor de *prop1* podrían activar la expresión de EGFP. El primer fragmento elegido fue un fragmento de 2 kb, correspondiente a la región enhancer putativa 8 kb río arriba del promotor (Figura 3.1a y b). El segundo fragmento consistió en una región de 6 kb que se extiende desde esta región enhancer putativa hasta el primer codón de *prop1* (Figura 3.1a y c). También se intentó clonar la extensión completa desde el enhancer putativo hasta el final del intrón 1. Sin embargo, dada la extensión de esta región, no fue posible clonar el fragmento completo. Se decidió entonces clonar en su lugar un promotor mínimo, junto con el primer exón e intrón de *prop1* (Figura 3.1a y c).

Estas tres construcciones fueron inyectadas de manera individual en embriones de pez cebra en el estadío de una célula, junto con mRNA de la transposasa Tol2. Los embriones resultantes fueron evaluados para fluorescencia durante los siguientes tres días.

Ninguno de los tres casos funcionó adecuadamente como reportero de *prop1*. Los peces inyectados con la construcción de 6 kb (Figura 3.1b), no presentaron fluorescencia en la zona esperada en ningún momento del desarrollo. Animales con la construcción de 2 kb (Figura 3.1b), mostraron marca de EGFP en la hipófisis pero únicamente luego de 48 hs y con expresión ectópica en otros tejidos (Figura 3.1e). Finalmente, en los peces con la construcción que incluía al exón 1 e intrón 1 (Figura 3.1d), se observó fluorescencia en la placoda hipofisaria alrededor de las 30 hpf (Figura 3.1f), pero esta fluorescencia no perduraba en el tiempo. Es por esto que se decidió cambiar el abordaje e intentar generar un reportero directamente mediante un *knock-in*.

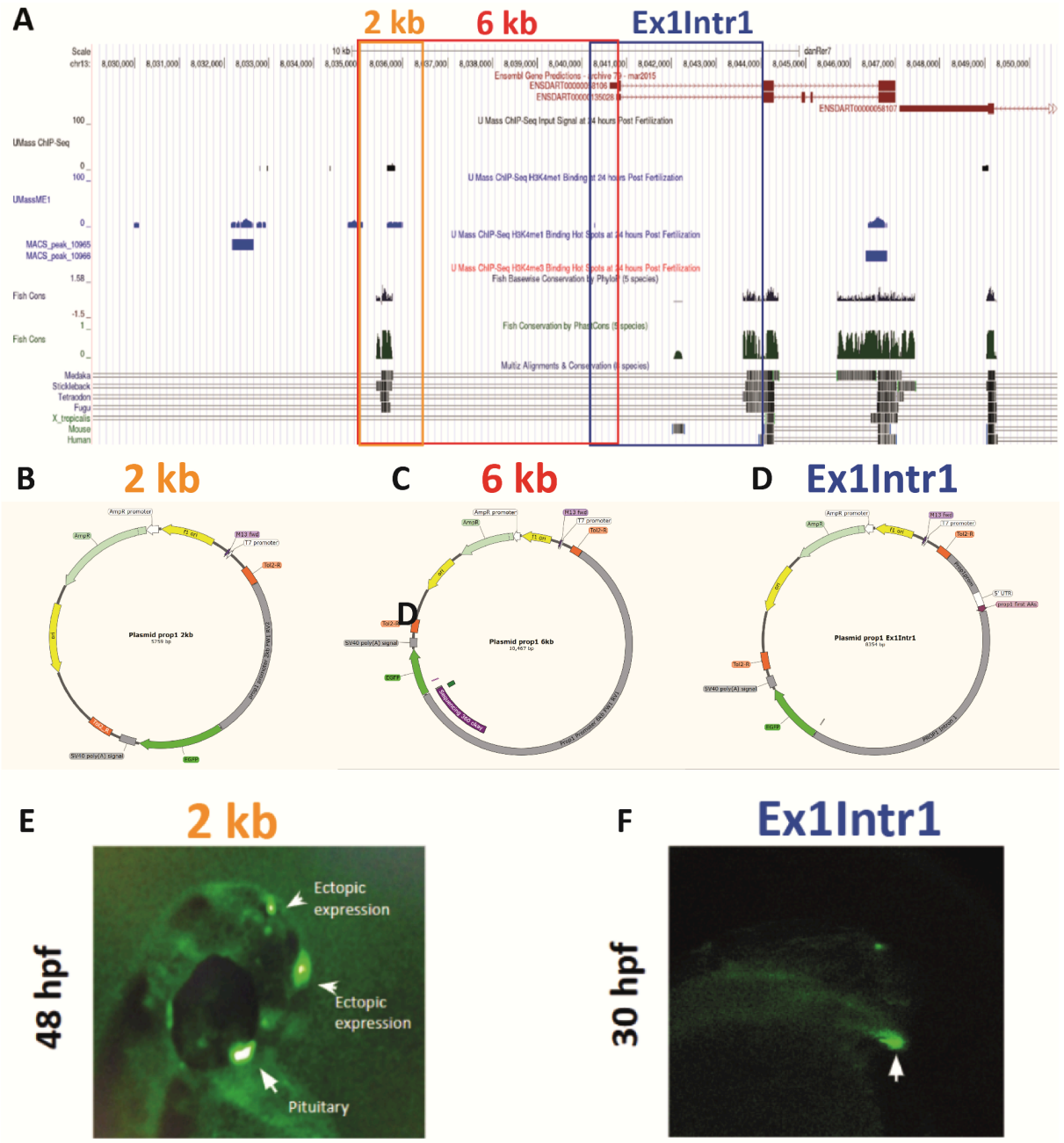

Figura 3.1. (A) Se muestra la región del promotor de *prop1* en el UCSC Genome Browser Home. Se muestra en azul las regiones con marca de H3K4me1, así como la conservación en peces (Fish Cons, verde) y la conservación desdoblada debajo. Se muestran las regiones utilizadas para la construcción de los plásmidos, marcadas en naranja (enhancer putativo, 2 kb), rojo (enhancer putativo extendido hasta codón 1 - 6 kb) y azul (promotor mínimo a final de intrón 1 - Ex1Intr1) (ver plásmidos en **B, C** y **D)**. **(E)** Expresión de EGFP a las 48 hpf, en un embrión inyectado con la construcción 2kb-EGFP. Se indica la hipófisis (*pituitary*) con una flecha blanca y la expresión ectópica (*ectopic expression*) con dos puntas de flecha blancas. **(F)** Expresión de EGFP a las 30 hpf, en un embrión inyectado con la construcción Ex1Intr1-EGFP. La flecha blanca indica la posición de la hipófisis.

Para la generación del *knock-in*, en primer lugar se buscó una guía de RNA (gRNA) dirigida al exón 2 de *prop1* y se clonaron las regiones río arriba y río abajo del sitio de corte en el plásmido pGTag-Gal4-VP16-B-actin (Wierson et al., 2020). Este plásmido fue utilizado de base para una PCR con *primers* AmC6 modificados, que amplificaban la secuencia Gal4-VP16-B-actin junto con las regiones homólogas. La inserción resulta en una proteína de prop1 truncada, seguida de un péptido autoclivable y una versión mejorada de GAL4 (GAL4-VP16) junto con el 3'UTR de □-actina (Figura 3.3a). Una vez generado este alelo, se decidió comprobar que efectivamente la expresión del reportero coincidía con la de *prop1.* Para esto, primero se estudió la expresión de *prop1* mediante hibridación *in situ* durante las primeras horas del desarrollo hipofisario (Figura 3.2b). Se observa un patrón similar en el tiempo (desde 24 a 32 hpf) entre *prop1* y mScarlet, donde la placoda hipofisaria comienza a desarrollarse de manera externa y luego es internalizada (Figura 3.2c). Además, se decidió corroborar el correcto patrón de expresión del reportero mediante una hibridación *in situ* fluorescente contra *prop1*, combinada con una inmunofluorescencia contra mScarlet. Se observa una alta coincidencia entre las marcas de mScarlet y *prop1*, con la excepción de algunas células dorsales a la placoda hipofisaria (Figura 3.2d). Estas células probablemente se corresponden con células de la cresta neural, que sufren una activación transitoria del transgen. De hecho, siguiendo estas células a lo largo del tiempo, se determinó que forman parte de diversas estructuras de la boca, incluyendo por ejemplo parte de los dientes (Figura suplementaria 3.1).

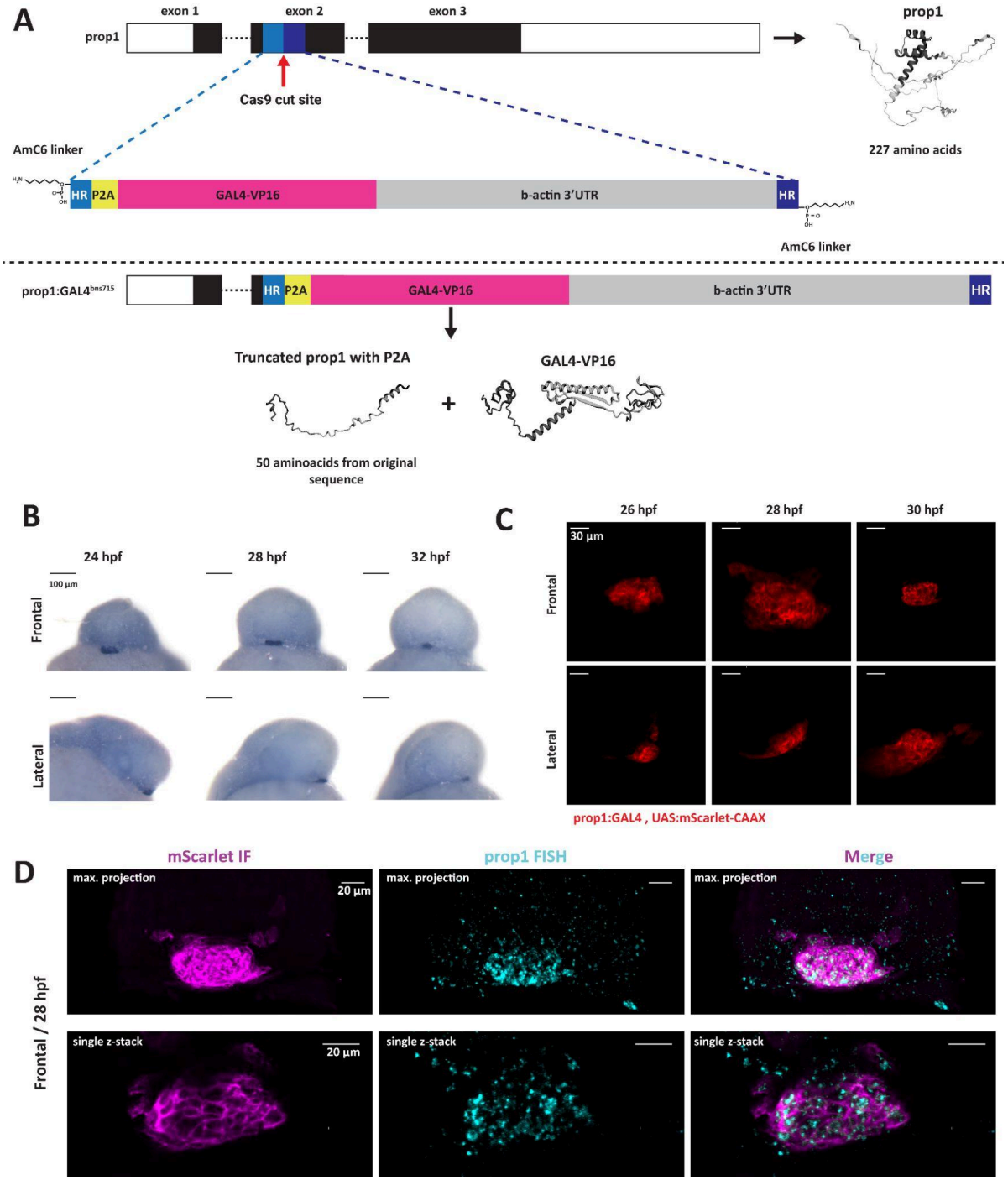

Figura 3.2. Generación y patrón de expresión de la línea *prop1 knock-in* reportera *TgKI(prop1:*GAL4-VP16^{bns714}*)*. (A) Se generó un reportero *knock-in* mediante inserción dirigida de una secuencia P2A-GAL4-VP16 al exón 2 de *prop1*. El DNA donor consistió de un producto de PCR con extremos 5' modificados terminalmente con AmC6. **(B)** Hibridación *in situ* ilustrativa contra *prop1*, mostrando el proceso de invaginación hipofisaria desde las 24 hpf hasta las 32 hpf. **(C)** Expresión temprana de la nueva línea reportera *TgKI(prop1:*GAL4-VP16^{bns714}*)* en combinación con la línea *Tg(UAS:*mScarlet-CAAX^{bns681}*)* examinada por microscopía confocal cada dos horas desde 26 hpf a 30 hpf. **(D)** Expresión de *prop1:*GAL4-VP16^{bns714} (inmunofluorescencia contra mScarlet, violeta) y mRNA de *prop1* (FISH, celeste) examinada a 28 hpf.

Generación de un *prop1 knock-out*

A continuación, con el objetivo de estudiar el rol de *prop1* en el desarrollo del pez cebra se generaron animales *knock-out* para este gen. Para ello, dado que el *knock-in* ha sido dirigido al segundo exón de *prop1*, produciendo una proteína trunca de 50 aminoácidos (Figura 3.2a), se generaron peces homocigotas para este transgen. Es importante notar que hasta el momento el rol de *prop1* sobre el desarrollo hipofisario en peces, ha sido estudiado principalmente mediante morfolinos. Los resultados de estos estudios previos sugerían que *prop1* no tendría un rol clave en el crecimiento de los peces (Angotzi et al., 2011). En la misma línea, un estudio preliminar ha sugerido que una línea *prop1* mutante tendría un tamaño comparable con el *wt* a 20 dpf (Bissegatto et al., 2020).

Sin embargo, el estudio de nuestros peces *knock-out* aporta evidencia de un crecimiento marcadamente deficiente. A 45 dpf los peces mutantes para *prop1* son aproximadamente 50% más chicos que su contraparte *wt* y además demuestran defectos de pigmentación claros, lo que permiten separarlos y criarlos de forma independiente a partir de este estadío (Figura 3.3a). Durante los estadíos siguientes los peces *wt* crecen hasta duplicar su tamaño (casi 15 mm), mientras que los mutantes crecen alrededor de 4 mm. Luego de 90 dpf esta diferencia es aún más marcada (Figura 3.3a). Además, los *prop1*$^{-/-}$ adultos evidencian un peso corporal inferior (Figura 3.3c), defectos de pigmentación (aunque ya no tan evidentes como en estadíos tempranos) y del desarrollo sexual (Figura 3.3d). Estos defectos son indicadores indirectos de defectos hipofisarios, particularmente de defectos en la producción de gh, msh y fhsb/lhb, comprobando de este modo la importancia de *prop1* para el desarrollo de los linajes productores de hormonas adenohipofisarias en pez cebra.

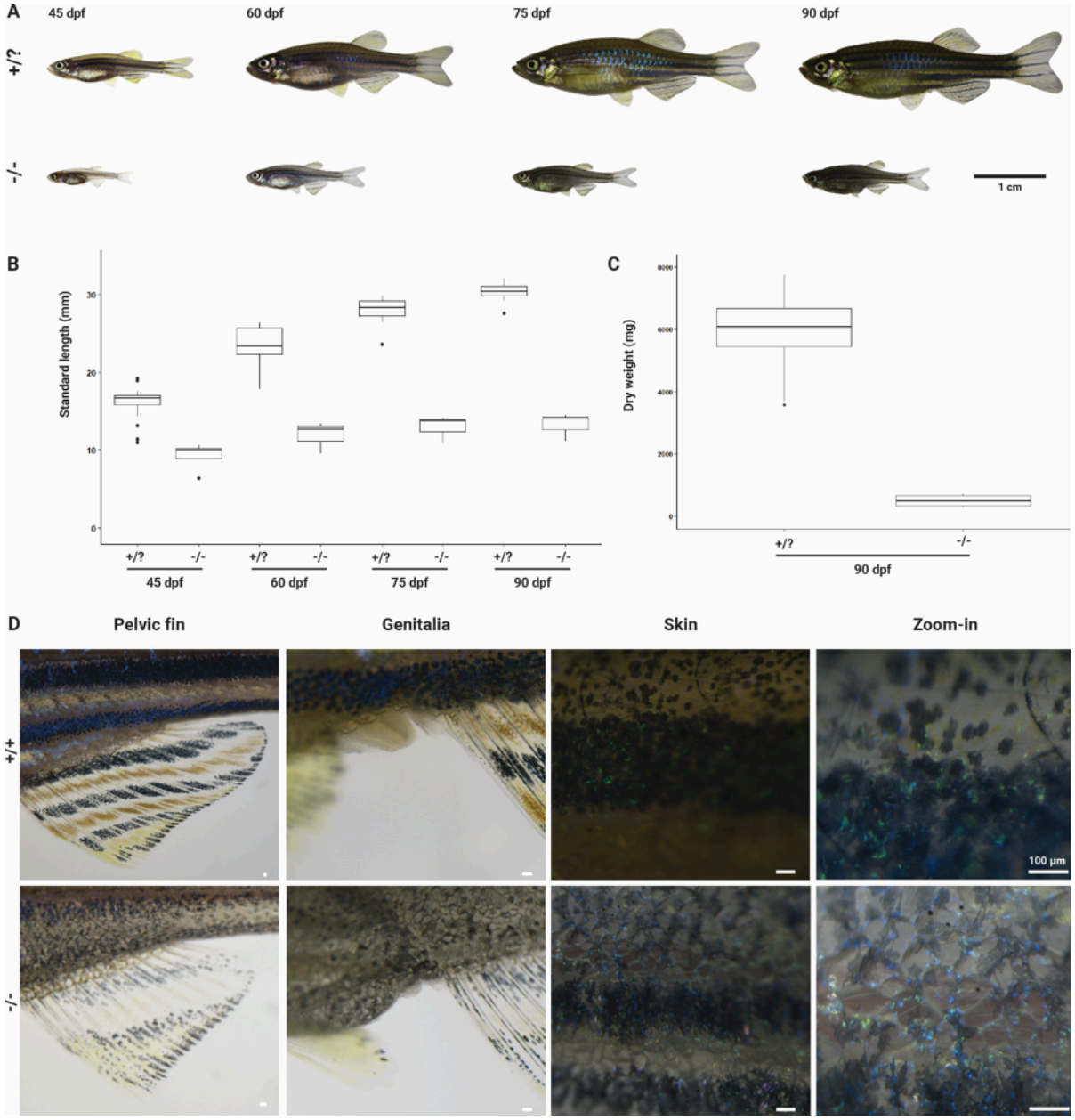

Figura 3.3. (A) Fotos representativas de *prop1 knock-outs* (-/-) comparados con su contrapartes *wild-type* y heterocigotas (+/?). Se evaluó el crecimiento cada 15 días, empezando desde 45 dpf hasta 90 dpf. **(B)** Curva de crecimiento de peces *prop1 knock-out* comparado con sus contrapartes *wild-type* y heterocigotas, medido como largo estándar. **(C)** Comparación del peso de los *prop1 knock-outs* y sus contrapartes *wild-type* y heterocigotas a 90 dpf. **(D)** Fotos representativas de *prop1 knock-outs* mostrando signos de hipopituitarismo (de izquierda a derecha): patrón difuso y escasa pigmentación en la aleta pélvica, pobre desarrollo genital, falta de coloración de la piel y dispersión de los melanóforos comparados con *wild-types*.

Secuenciación de célula única de RNA de la hipófisis anterior del pez cebra

Con el objetivo de estudiar y caracterizar en detalle el desarrollo hipofisario temprano, se decidió realizar ensayos de *single cell RNA sequencing* (scRNA-seq). Hasta el

momento, experimentos a nivel de célula única en hipófisis de pez cebra solo han sido realizados en animales adultos (Fabian et al., 2020, Chen et al., 2023).

Se diseccionaron las cabezas de embriones *prop1:GAL4*^{bns715};*UAS:mScarlet-CAAX*^{bns681} a dos tiempos, 28 hpf y 52 hpf (Figura 3.4a). Las células fueron digeridas y separadas mecánicamente. Esta suspensión celular fue sometida a FACS y las células mScarlet positivas fueron procesadas con la plataforma 10X para generar un set de datos de scRNA-seq (Figura 3.4a-b). En total se obtuvieron 5569 células, 1785 células a 28 hpf y 3784 células a 52 hpf (Figura 3.4b). A partir de los datos crudos (analizados según lo descripto en materiales y métodos) se procedió a hacer un *clustering* mediante el algoritmo de *clustering* de Leiden, con una resolución de 0.2 y los *clusters* fueron anotados manualmente en base a sus genes diferencialmente expresados (Figura suplementaria 3.3). De este modo, se obtuvieron 8 *clusters* en total (Figura 3.4c), pero la expresión de *mScarlet* estaba enriquecida en tres de ellos, definidos como: Pituitary 1, Pituitary 2 y ectodermo oral (Figura 3.4d).

En búsqueda de un marcador común a estos 3 *clusters*, se encontró que *epcam* presentaba un patrón de expresión similar al reportero *mScarlet* (Figura 3.4d-e). Se confirmó que *epcam* se encuentra expresado en la hipófisis en los tiempos de desarrollo evaluados (28 hpf y 52 hpf). En particular se observó que *epcam* es un marcador del ectodermo oral y de la adenohipófisis, pero no del ectodermo neural (Figura 3.4f). Dado que EPCAM ha sido sugerido recientemente como un buen marcador de células tipo hipofisarias en un sistema de células humanas pluripotentes inducidas (Kodani et al., 2022), se buscó determinar si podría estar también conservado como un marcador hipofisario en mamíferos. Para esto se buscaron datos disponibles de expresión de *Epcam* a E14.5, lo que confirmó que su expresión es específica a la hipófisis también en ratones (Figura 3.4g). Además, se confirmó este hallazgo mediante inmunohistoquímica en embriones de ratón desde E11.5 hasta E14.5. Como se observa en la figura 3.4h Epcam es un excelente marcador para el RP y la adenohipófisis en formación. Es interesante que la marca, al igual que en pez cebra, delinea el epitelio oral del que deriva la adenohipófisis (Figura 3.4c y d). Por último, se observó que la expresión de Epcam no se vio afectada en los ratones *Prop1*$^{-/-}$(Figura 3.4h) a pesar de sus defectos morfológicos hipofisarios severos. Esto sugiere que la expresión sostenida de *Epcam* durante el desarrollo es independiente de *Prop1* y es un excelente marcador para estudiar dismorfologías hipofisarias en diferentes especies. Los mecanismos de la expresión de *Epcam* sostenida luego de la invaginación y su posible función durante la misma merecen una investigación más profunda.

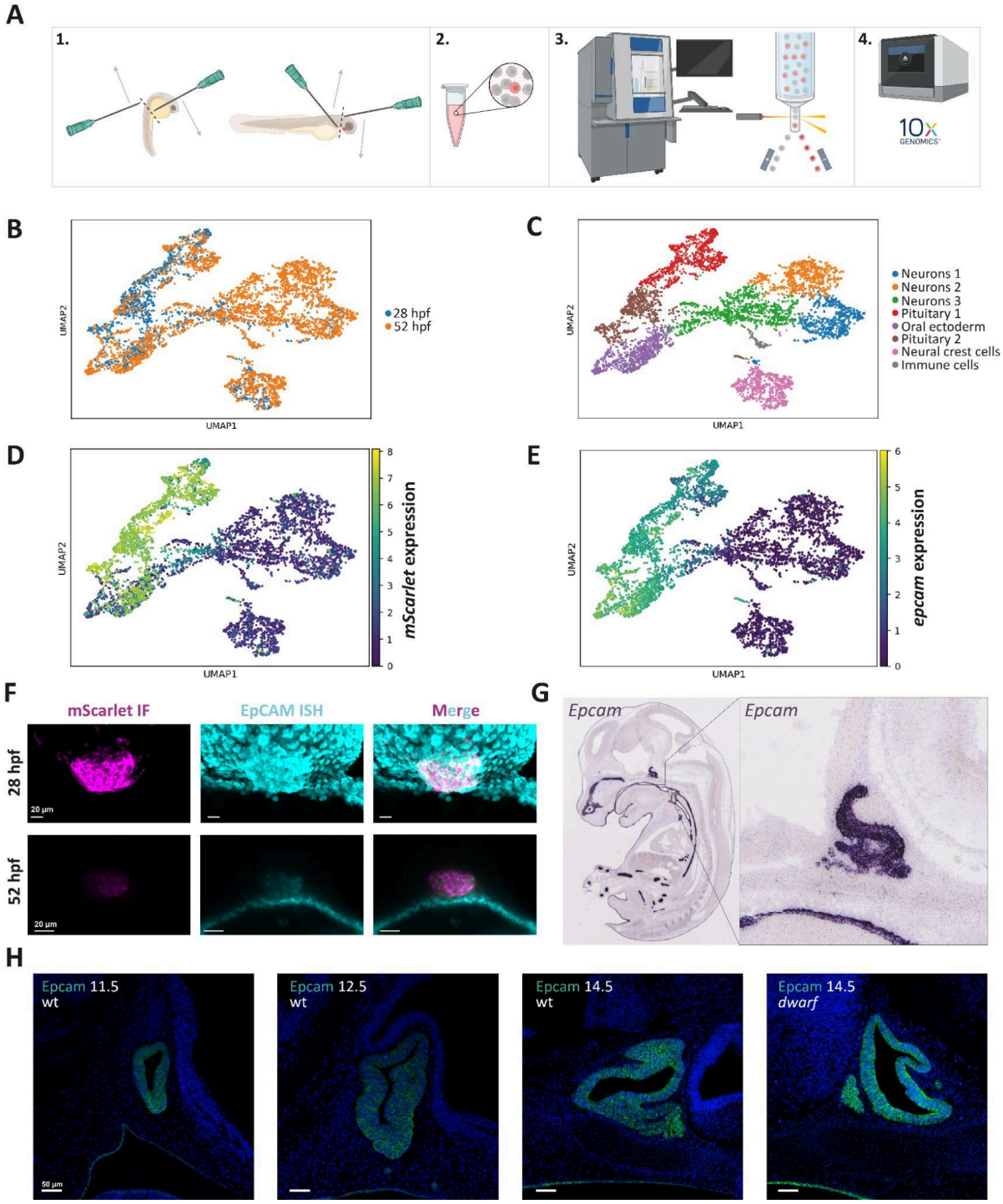

Figura 3.4. (A) Vista esquemática del experimento de scRNA-seq. **(B)** Representación UMAP según etapa embrionaria. **(C)** Representación UMAP según Leiden *clustering*. **(D)** Representación UMAP según nivel de expresión de *mScarlet.* **(E)** Representación UMAP según nivel de expresión de *epcam*. **(F)** Validación de la expresión de *epcam* en la adenohipófisis del pez cebra en estadíos tempranos, 28 y 52 hpf, en embriones *TgKI(prop1:*GAL4-VP16^{bns714}*)*, *Tg(UAS:*mScarlet-CAAX^{bns681}*)*. Se muestra la proyección de máxima intensidad inmunofluorescencia contra mScarlet (violeta) y la hibridación *in situ* contra *epcam* (celeste). **(G)** Hibridación *in situ* contra *Epcam* en un embrión de ratón E14.5, obtenido de la base de datos GenePaint (ST62). **(H)** Inmunofluorescencia contra *Epcam*

en la hipófisis anterior de ratón wt a lo largo del desarrollo (E11.5, E12.5, E14.5) y en un ratón *dwarf* (E14.5).

A continuación, se buscó reagrupar los *clusters* considerando únicamente los *clusters* hipofisarios (*Pituitary* 1 y 2) y el ectodermo oral, que contienen el transcripto del gen reportero (Figura 3.4d). Para esto se procedió a realizar un sub-*clustering* con resolución de Leiden 0.15, obteniéndose 4 nuevos grupos: células del ectodermo oral inducido, células hipofisarias progenitoras, células hipofisarias progenitoras ciclando y células hipofisarias en diferenciación (Figura 3.5a-b). Para obtener información específica y detallada sobre la transición entre células stem, progenitoras y diferenciadas, solo se focalizará, a continuación, en dos de estos *clusters*: *Pituitary progenitors* y *Differentiating Pituitary.* Se aplicó el algoritmo de Leiden con resolución de 0.8 y se obtuvieron los 12 *clusters* finales (Figura 3.5c).

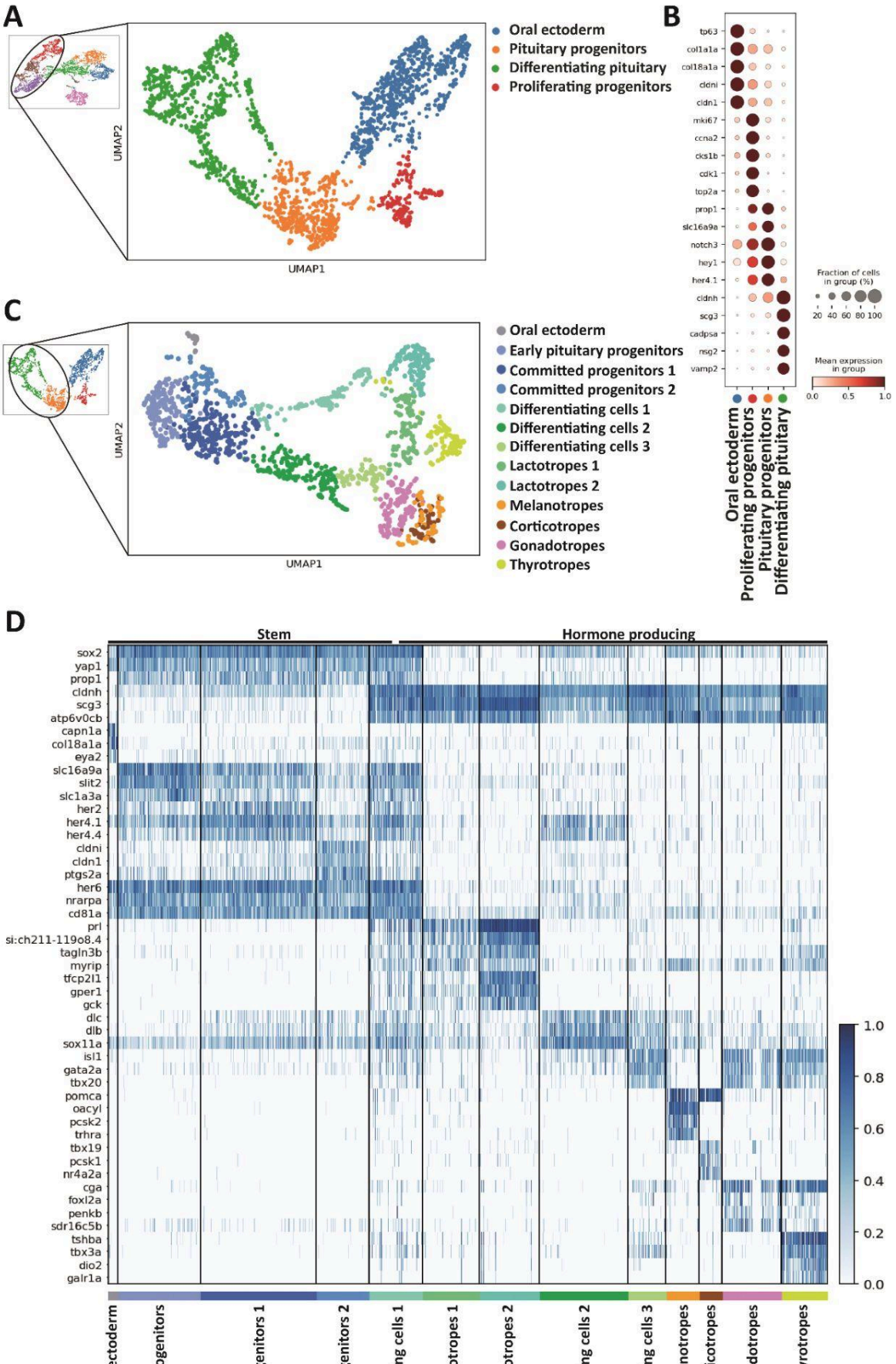
A
UMAP2
UMAP1
Oral ectoderm
Pituitary progenitors
Differentiating pituitary
Proliferating progenitors
B
tp63
col1a1a
col18a1a
cldni
cldn1
mki67
ccna2
cks1b
cdk1
top2a
prop1
slc16a9a
notch3
hey1
her4.1
cldnh
scg3
cadpsa
nsg2
vamp2
Fraction of cells in group (%)
20 40 60 80 100
Mean expression in group
0.0 0.5 1.0
Oral ectoderm
Proliferating progenitors
Pituitary progenitors
Differentiating pituitary
C
UMAP2
UMAP1
Oral ectoderm
Early pituitary progenitors
Committed progenitors 1
Committed progenitors 2
Differentiating cells 1
Differentiating cells 2
Differentiating cells 3
Lactotropes 1
Lactotropes 2
Melanotropes
Corticotropes
Gonadotropes
Thyrotropes
D
Stem
Hormone producing
sox2
yap1
prop1
cldnh
scg3
atp6v0cb
capn1a
col18a1a
eya2
slc16a9a
slit2
slc1a3a
her2
her4.1
her4.4
cldni
cldn1
ptgs2a
her6
nrarpa
cd81a
prl
si:ch211-119o8.4
tagln3b
myrip
tfcp2l1
gper1
gck
dlc
dlb
sox11a
isl1
gata2a
tbx20
pomca
oacyl
pcsk2
trhra
tbx19
pcsk1
nr4a2a
cga
foxl2a
penkb
sdr16c5b
tshba
tbx3a
dio2
galr1a
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Oral ectoderm
Early pituitary progenitors
Committed progenitors 1
Committed progenitors 2
Differentiating cells 1
Lactotropes 1
Lactotropes 2
Differentiating cells 2
Differentiating cells 3
Melanotropes
Corticotropes
Gonadotropes
Thyrotropes

Figura 3.5. (A) Representación UMAP según Leiden *clustering* de las células remanentes luego de excluir los *clusters* negativos para *epcam*. Se muestra un esquema de los clusters seleccionados y a modo de ampliación la nueva representación. **(B)** Dotplot de marcadores seleccionados para cada uno de los *clusters* representados en (A). **(C)** Representación UMAP según Leiden *clustering* de las células hipofisarias luego de excluir los *clusters* de ectodermo oral y progenitores hipofisarios ciclando representados en (A). Se muestra un esquema de los clusters seleccionados y a modo de ampliación la nueva representación. **(D)** *Heatmap* con tres marcadores seleccionados para cada uno de los *clusters* que se muestran en (C). Se muestran además marcadores de células *stem* (filas 1-3) y marcadores de células productoras de hormonas (*hormone producing*, filas 4-6).

Marcadores de progenitores y subtipos celulares hipofisarios

A partir de estos 12 *clusters*, se pudieron identificar marcadores específicos de los diferentes linajes adenohipofisarios, desde células progenitoras y células en vías de diferenciación hasta células maduras. En particular, se encontró que existen factores de transcripción altamente conservados entre mamíferos y pez cebra.

En líneas generales, las células progenitoras o "*stem*" se definieron por sus altos niveles de expresión de *sox2*, *yap1* y *prop1*, mientras que las células maduras presentan altos niveles de *cldnh*, *scg3* y *atp6v0cb*, genes relacionados a la secreción hormonal (Figura 3.5d, primeras filas).

En el *heatmap* se observó que los progenitores tempranos (*early pituitary progenitors*) se distinguen de los progenitores comprometidos a la diferenciación (*committed pituitary progenitors* 1-2) por expresar *slc16a9a*, *slit2* y *slc1a3a*, entre otros factores (Figura 3.5d). Es interesante que los *early pituitary progenitors* expresan *slit2*, dado que su receptor *robo1*, ha sido vinculado a HC en humanos, como se mencionó en el capítulo 1, aunque el mecanismo por el cual variantes en este gen causan enfermedad aún no ha sido dilucidado.

El *cluster* de progenitores comprometidos 1 (*committed pituitary progenitors* 1*)* se caracteriza por expresar varios factores de la familia her, dependientes de notch (*her2*, *her4.1* y *her4.4*) (Figura 3.5d). El *cluster* de progenitores comprometidos 2 tiene la particularidad de no expresar *nkx2.2a* y expresar altos niveles de *cldni*, *cldn1* y *ptgs2a* (Figura 3.5d). Estas células expresan también *s100a10b* así como varios genes de matriz extracelular, por lo que podrían tal vez ser progenitores comprometidos hacia un linaje de células tipo "foliculoestrelladas". Estas células comparten características de células madre y tienen un rol de soporte estructural y modulación de la secreción de las células productoras de hormonas en mamíferos, pero no han sido estudiadas en profundidad en peces (Golan et al., 2016, Royan et al., 2023). También se observaron células con una combinación de

características entre progenitores y células diferenciadas ("*differentiating cells 1*"), que expresan factores tanto de células maduras como células tipo *stem*.

Las células en vías de diferenciación 2 ("*differentiating cells 2*") expresan ligandos de notch (*dla*, *dlb*, *dlc*, *dld*, *jag2b*) y factores de transcripción como por ejemplo *sox11a* (Figura 3.5d). Mientras que las células en diferenciación 3 ("*differentiating cells 3*") expresan factores específicos de los linajes hipofisarios, como *pou1f1*, *isl1*, *gata2a* y *tbx20* (Figura 3.5d). A partir de este punto las células comienzan ya a diferenciarse a los linajes maduros, productores de hormonas.

Los **lactotropos** del pez cebra comparten la expresión inicial de *pou1f1* con los linajes de somatotropos y tirotropos, al igual que sucede en mamíferos. Es interesante que en peces, los lactotropos durante el desarrollo temprano expresan tanto *smtla* como *smtlb* (Figura suplementaria 3.2a-b), aunque los somatolactotropos y los lactotropos constituyen poblaciones claramente distinguibles en peces adultos. Respecto al linaje de los lactotropos se encontraron varios genes marcadores novedosos, *gper1*, *map3k15, si:ch211-119o8.4* (predicho como un receptor de somatostatina, XP_001920980.2). A su vez, se encontró altamente expresado a *tfcp2l1*, un factor de transcripción, cuya expresión correlaciona fuertemente con la expresión de *prl*. En base a resultados preliminares, *tfcp2l1* podría ser necesario para la especificación de este linaje (Figura suplementaria 3.2c-e).

Los **tirotropos** y **gonadotropos** tempranos comparten firmas transcripcionales similares, en línea con lo que se ha observado en mamíferos, con altos niveles de expresión de *isl1* y *gata2a*, así como de *cga* (Figura 3.5d). Además, estos linajes también expresan *tbx20,* una diferencia entre mamíferos y peces cebra. Los tirotropos expresan además los marcadores específicos de su linaje: *galr1a*, *dio2* y *tbx3*. Es interesante destacar que *Tbx3* es también un marcador de tirotropos en ratones, en particular de la subpoblación de tirotropos rostrales (Pontecorvi et al., 2008). Para los gonadotropos tempranos se encontraron varios marcadores específicos, incluyendo *penkb*, *sdr16c5b* y *fox2la*. La relevancia funcional de *fox2la* ha sido previamente demostrada para la maduración de los ovarios en pez cebra (Yang et al., 2017) y mutaciones en el ortólogo humano de *foxl2a* (*FOXL2*), causan falla ovárica prematura (MIM#608996, Harris 2002). Sin embargo, su rol en el desarrollo de los gonadotropos no ha sido estudiado hasta el momento y podría constituir una línea de investigación interesante.

Los **melanotropos y corticotropos** pueden ser reconocidos por su expresión compartida de *pomca*, pero forman subpoblaciones transcripcionalmente distinguibles por la expresión de *pax7a* y *tbx19* en melanotropos y corticotropos, respectivamente. Este patrón de expresión de factores de transcripción ha sido demostrado previamente como

fundamental para la diferenciación correcta de estos linajes en ratones y estos resultados aportan evidencia de la conservación evolutiva de los mismos (Budry et al., 2012). Además, se encontraron varios marcadores conocidos y noveles para estos linajes. El mejor marcador para melanotropos es *oacyl*, lo que ha sido también previamente descripto en ratones (Cheung et al., 2018). Otros marcadores de melanotropos incluyen *pcsk2* y *sema4ba*, mientras que marcadores de corticotropos son *nr4a2a*, *si:ch211-207l14.1* (proteína tipo ring finger 44 sin caracterizar - XP_690894.4) y *scube1*.

En resumen, este scRNA-seq de células hipofisarias en el desarrollo temprano del pez cebra permitió caracterizar a nivel transcripcional poblaciones celulares progenitoras, en vías de diferenciación y productoras de hormonas.

Vías de señalización y comunicación: de células progenitoras a diferenciación

En primera instancia, se realizó un análisis de *Gene Set Enrichment* (GSEA) utilizando los genes presentes en los 12 *clusters* finales caracterizados en la sección anterior (Figura 3.6a). Se encontró, por un lado, términos sobrerrepresentados esperables, como desarrollo de la glándula hipofisaria, regulación positiva de la proliferación celular, o relacionados a transcripción activa. Algo interesante fue que varias de las vías enriquecidas tienen relación con regulación neuronal (*regulation of neurogenesis*, *neuronal stem cell population maintenance*, *negative regulation of neuron differentiation*). Esto sugiere que los mecanismos de regulación de la diferenciación y mantenimiento de la población *stem* en la hipófisis podría tener semejanzas con la diferenciación neuronal. Se encontró también que la vía de Notch se encuentra sobrerrepresentada, lo cual demuestra que esta vía es importante para la diferenciación, como ha sido previamente reportado tanto en peces como ratones, para hipófisis y también en poblaciones neuronales (Raetzman et al., 2004, Imayoshi et al., 2010, Dutta et al., 2008, Sigloch et al., 2023).

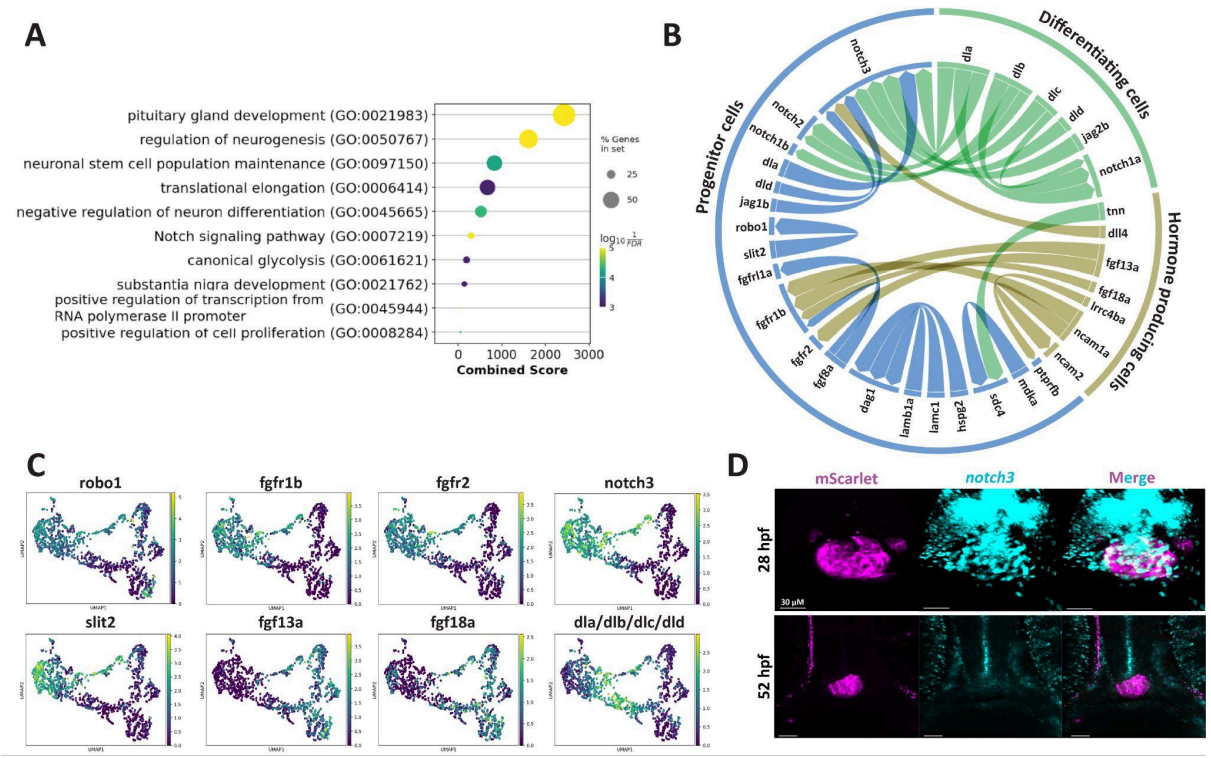

Figura 3.6. (A) Análisis de *Gene Set Enrichment* (GSEA). **(B)** Análisis de interacción célula-célula a partir de los datos de scRNA-seq, diferenciando las interacciones entre células progenitoras (azul), en vías de diferenciación (verde) y productoras de hormonas (marrón claro). Las interacciones se marcan con una flecha, donde el ligando apunta hacia el receptor predicho como interactor. **(C)** Patrones de expresión de receptores y ligandos seleccionados que muestran el patrón de expresión esperado de acuerdo al análisis de comunicación célula-célula. **(D)** FISH para *notch3* (celeste) mostrando co-expresión con el reportero *TgKI(prop1:*GAL4-VP16^{bns714}*)*; *Tg(UAS:*mScarlet-CAAX^{bns681}*)* (violeta).

A continuación, se realizó un análisis de interacciones ligando-receptor, mediante el *framework* Liana. Para esto se procedió a dividir a los 12 *clusters* en tres grandes poblaciones, células progenitoras (*Early progenitors*, *Committed progenitors 1* y *2*), células en diferenciación (*Differentiating cells 1*, *2* y *3*) y células productoras de hormonas (*Lactotropes 1* y *2*, *Thyrotropes*, *Gonadotropes*, *Corticotropes* y *Melanotropes*). Se encontró que las células en diferenciación se comunican principalmente con las células progenitoras y con sí mismas, mediante la vía de Notch. En particular, las células en diferenciación expresan cinco ligandos de Notch (*dla*, *dlb*, *dlc*, *dld* y *jag2b*), que funcionarían como ligandos para los receptores notch3, notch2 y notch1b expresados en los progenitores, así como para el receptor notch1a en sí mismas (Figura 3.6b-c). Esto llevó a plantear la siguiente hipótesis: la especificación temprana de los progenitores depende en gran medida de un cambio en la vía de Notch, pasando de un estado activo en el progenitor (activado en trans por células en vías de diferenciación), con una activación a un estado de actividad de Notch más baja a medida que la diferenciacion avanza, donde una alta expresión de

ligandos de Notch podría actuar cis-reprimiendo (Sprinzak et al., 2010). Anteriormente se demostró el rol fundamental de la vía de Notch para el correcto desarrollo de la hipófisis y la correcta diferenciación y especificación de los linajes hipofisarios en el pez cebra (Dutta et al., 2008).

Además de la vía de Notch, surgen otras vías de interés del análisis de interacciones ligando-receptor. Interesantemente, se observa una interacción entre *robo1* y *slit2* dentro de los progenitores (Figura 3.6b). La expresión de *slit2* parece estar concentrada en los progenitores tempranos, mientras que la de *robo1* se extiende a todos los progenitores (Figura 3.6c), sugiriendo un rol en el mantenimiento del estado *stem* de estas células. Aunque actualmente no se conoce el mecanismo, las variantes en *ROBO1* en humanos han sido asociadas principalmente al síndrome de interrupción del tallo (ver Capítulo 1) y se ha postulado que la función de *ROBO1* podría estar mediada por *Hes1,* al menos en ratones (el ortólogo de *Hes1* en ratones es *her6* en pez cebra), (Bashamboo et al., 2017, Raetzman et al., 2007, Borrell et al., 2012). Dada la expresión de tanto *robo1* como *slit2* en células madre tempranas, esto sugiere que un posible efecto de las mutaciones en *ROBO1* sea la salida prematura del estado *stem*. Se hipotetiza que, de darse un patrón de expresión similar en humanos, el síndrome de interrupción del tallo en humanos podría darse no por un efecto directo sobre la atracción o repulsión de neuronas hipotalámicas, sino por una acción indirecta, en la que los factores secretados por las células *stem* se pierden de forma prematura, y la falta de esta señal lleva a un pobre o nulo desarrollo del tallo.

Del análisis ligando-receptor emerge otro resultado interesante en los componentes de la vía de señalización de Fgfs. Se puede observar que las células progenitoras expresan múltiples receptores de fgf (*fgfr1b*, *fgfr2* y *fgfrl1a*), así como el ligando *fgf8a*. A su vez, las células productoras de hormonas también expresan fgfs (*fgf13a* y *fgf18a*), pero no expresan sus receptores (Figura 3.6c). Además, se sabe que el hipotálamo expresa también *fgf3* y *fgf10*, siendo ambos importantes para el desarrollo hipofisario en pez cebra (Herzog et al., 2004). Esto sugiere que los progenitores dependen de múltiples fuentes de fgfs para mantener su estado *stem* o regular su salida del mismo.

Es interesante que las células maduras, pero no las que están en vías de diferenciación, expresan fgfs distintivos. De este modo, la división asimétrica de una célula progenitora en dos células, una progenitora y una comprometida hacia diferenciación, podría estar mediada por la vía de Notch de manera directa, mientras que el ritmo al que ocurre esta diferenciación podría estar mediado por fgfs. La expresión de fgfs en las células maduras podría actuar entonces como un compás, marcando el ritmo de división necesario para obtener suficientes células productoras de hormonas, pero al mismo tiempo no perder

el pool de células *stem*. En un primer momento, donde todas las células se comportan como células stem, el ritmo de división sería sumamente rápido, mientras que a medida que se producen células maduras aumenta también la concentración de fgfs. Esto funciona como un *feedback-loop* negativo, reforzando el estado *stem*, enlenteciendo el ritmo de diferenciación, hasta llegar a un equilibrio en el que quedará un nicho de células *stem* sin capacidad de dividirse.

La expresión de *fgfr1b* es también de particular interés, dado que, en humanos, mutaciones en FGFR1 pueden dar lugar a HC, pero el mecanismo por el cual variantes en este gen causan enfermedad aún no ha sido dilucidado. Siguiendo el razonamiento anterior, y de manera similar a lo planteado para la vía de Robo, es posible que la ausencia de uno de los receptores de fgf en el nicho de células *stem* lleve a una diferenciación anticipada de las células madre, depletando el nicho antes de obtener una cantidad suficiente de células productoras de hormonas.

El análisis de interacción ligando-receptor revela además un rico entramado de interacciones entre proteoglicanos, proteínas de membrana y de matriz extracelular, entre ellos perlecán (*hspg2*), distroglicano 1 (*dag1*), sindecano (*sdc4*), midkina a (mdka) y lamininas (*lamb1a* y *lamc1*). Es interesante que ha sido descripto un caso de HC en un paciente con mutaciones heterocigotas compuestas en *LAMB2*, pero hasta ahora no se ha descripto un rol para este gen en el desarrollo hipofisario, aunque los ratones *knock-outs* presentan un parénquima anormal de la hipófisis anterior (Tahoun et al., 2019). Varios de estos genes juegan un rol importante en la regulación de factores secretados. El mejor ejemplo de esto es perlecán, que puede actuar como modulador de la vía de Fgf, uniendo fgfs en circulación y facilitando la activación de la vía (Yang et al., 2005). Se especula que podría también jugar un rol similar en la vía de Shh (Girós et al., 2007).

Hacia un modelo unificado de la diferenciación hipofisaria

Por último, se decidió intentar recopilar toda la información recabada mediante este experimento de scRNA-seq junto con información bibliográfica en un modelo de la diferenciación temprana de la hipófisis anterior en pez cebra. Para esto, se recurrió a los datos de expresión diferencial así como al análisis de interacción, buscando genes diferencialmente expresados en los distintos estadíos encontrados. Estos análisis se resumen en la figura 3.7 en cinco estadíos: progenitores tempranos y comprometidos, células en vías de diferenciación tempranas y tardías, y células productoras de hormonas.

Los **progenitores tempranos** presentan altos niveles de actividad de varias vías en paralelo. La vía de Notch se encuentra activa, sin expresión prácticamente de ligandos

propios, probablemente siendo sostenida por los ligandos expresados en células vecinas comprometidas y en vías de diferenciación. Esta vía probablemente actúa reprimiendo genes de diferenciación como *ascl1a*, mediante la expresión de *hey1* y genes de la familia *her* (Flasse et al., 2013). Además, se expresan en este estadío también genes *her* represores de la diferenciación independientes de Notch, como son *her6* y *her9*, que probablemente mantengan un nivel basal de represión sobre *ascl1a* y otros genes de diferenciación.

La vía de Fgf se encuentra también muy activa en los progenitores tempranos. Estos expresan los receptores *fgfr1b*, *fgfr2* y *fgfrl1a*, y la expresión de *fgf8a* como ligando. Además, esta vía está activada por factores exógenos, como fgf3 y fgf10 hipotalámicos y fgf13a y fgf18a producido por células productoras de hormonas. Esta vía probablemente funciones como se describió anteriormente, promoviendo el estado *stem*, manteniendo activa la expresión de *sox2* (Millimaki et al., 2009). Es posible que esta vía juegue un rol dual, dado que se sabe que la expresión de *fgf3* hipotalámico es necesaria para la activación de *ascl1a* (Pogoda et al., 2006). Sin embargo, fgf3 es también necesario para la activación de factores río arriba de *prop1*, como *pitx3* y *lhx3*, por lo que tal vez su rol en la activación de *ascl1a* y por lo tanto en la salida del estado *stem* hacia diferenciación sea indirecto (Herzog et al., 2004).

La vía de Shh también se encuentra sumamente activa, dado que la placoda hipofisaria recibe grandes cantidades de shh del hipotálamo en desarrollo, lo que activa a *gli2a* y su target *nkx2.2a*. Además, parece existir un feedback loop negativo, por el cual *gli2a* lleva también a la regulación positiva de los inhibidores de la vía *hhip* y *ptch1*. Se sabe que la sobreactivación de esta vía puede dar lugar a placodas hipofisarias ectópicas y *gli2a* actúa sobre genes target como *lhx3* y *lhx4* para llevar a la activación de *prop1* (Herzog et al., 2003). Otro factor de transcripción que está sumamente activo durante todo el desarrollo es *eya1*. Se sabe que eya1 interactúa con sox2 (Wong et al., 2019), por lo que es probable que este complejo juegue un rol en mantener el estado *stem*.

La vía más novedosa de estos resultados es el la vía de Robo. Las células progenitoras tempranas son las únicas que expresan el ligando *slit2*, mientras que *slit3* se expresa también en progenitores comprometidos. Esto parece sugerir una mayor relevancia de la señalización vía Robo1 en el nicho de progenitores tempranos, pero, como se discutió anteriormente, sus efectores río abajo no están claros. En la glándula mamaria se ha sugerido que la vía Slit2/Robo1 podría modificar la localización de □-catenina, llevando a una localización citoplasmática en lugar de nuclear (Macias et al., 2011). Esto podría ir de la

mano del rol de □-catenina como modulador de la actividad de Prop1 y Hesx1 (Olson et al., 2006). Así mismo, esta regulación podría también jugar un rol en la vía canónica de Wnt.

La vía de Wnt es la última vía relevante encontrada en los progenitores tempranos. En este caso no se conoce exactamente cuál es el ligando responsable de la activación de esta vía, aunque se asume que su origen debe ser hipotalámico. En todos los progenitores se expresan el receptor *fzd8a*, su target downstream canónico *dvl2*, y a su vez también los targets canónicos de *dvl2*, *tcf7l2*, *tcf7l1a* y *tcf7l1b*. Se conocen casos de HC causados por variantes en *TCF7L1* (ver anexo capítulo 1), así como los efectos de la pérdida de *Tcf7l1 y Tcf7l2* en ratones, en los que se expande la señalización hipotalámica y se da una inducción exacerbada del ectodermo oral (ver capítulo 2). Esta expansión se daría por una falta de represión de factores hipotalámicos, de manera independiente de □-catenina (Brinkmeier et al., 2007 y Gaston-Massuet et al., 2016). Sin embargo, la expresión de esta familia de factores en la hipófisis misma, y las consecuencias de su falta de expresión únicamente en este tejido no han sido exploradas, dado que los *knock-outs* estudiados eran totales o involucraban también al hipotálamo (utilizando ratones *Hesx1:Cre*).

En las **células progenitoras comprometidas** algunas de estas vías comienzan a verse *down* reguladas, entre ellas las vías de Shh, Robo y Fgf, con la pérdida de la expresión de *hhip*, *slit2* y *fgf8a,* respectivamente. Además, se da una activación exacerbada de la vía de Notch, probablemente inducida por el contacto con otros progenitores comprometidos, que comienzan a expresar *dla* y con ligandos de células en vías de diferenciación. Esta activación lleva a la expresión simultánea de varios reguladores negativos de la familia de *her*. Estos genes se agrupan en dos *clusters*, uno en el cromosoma 11 (*her2*, *her15.1* y her15.2) y otro en el cromosoma 23 (*her12, her4.1*, *her4.2*, *her4.3* y *her4.4*, Estos reguladores probablemente funcionen de forma sinérgica con *her6*, *her9* y *hey1*, para reprimir la expresión de *ascl1a* y otros genes de diferenciación. Es probable que en algún momento esta represión se vea contrarrestada por una activación mediante factores externos (como fgf3), o por una autorregulación de los factores *her* Notch-dependientes, llevando a una regulación negativa de la vía de Notch y una salida hacia la diferenciación. Este mecanismo es sumamente similar al que se ha propuesto recientemente para la diferenciación del tálamo en pez cebra (Sigloch et al., 2023), y mecanismos similares han sido descriptos para otros genes de la familia *her* en la somitogénesis (Wahi et al., 2016).

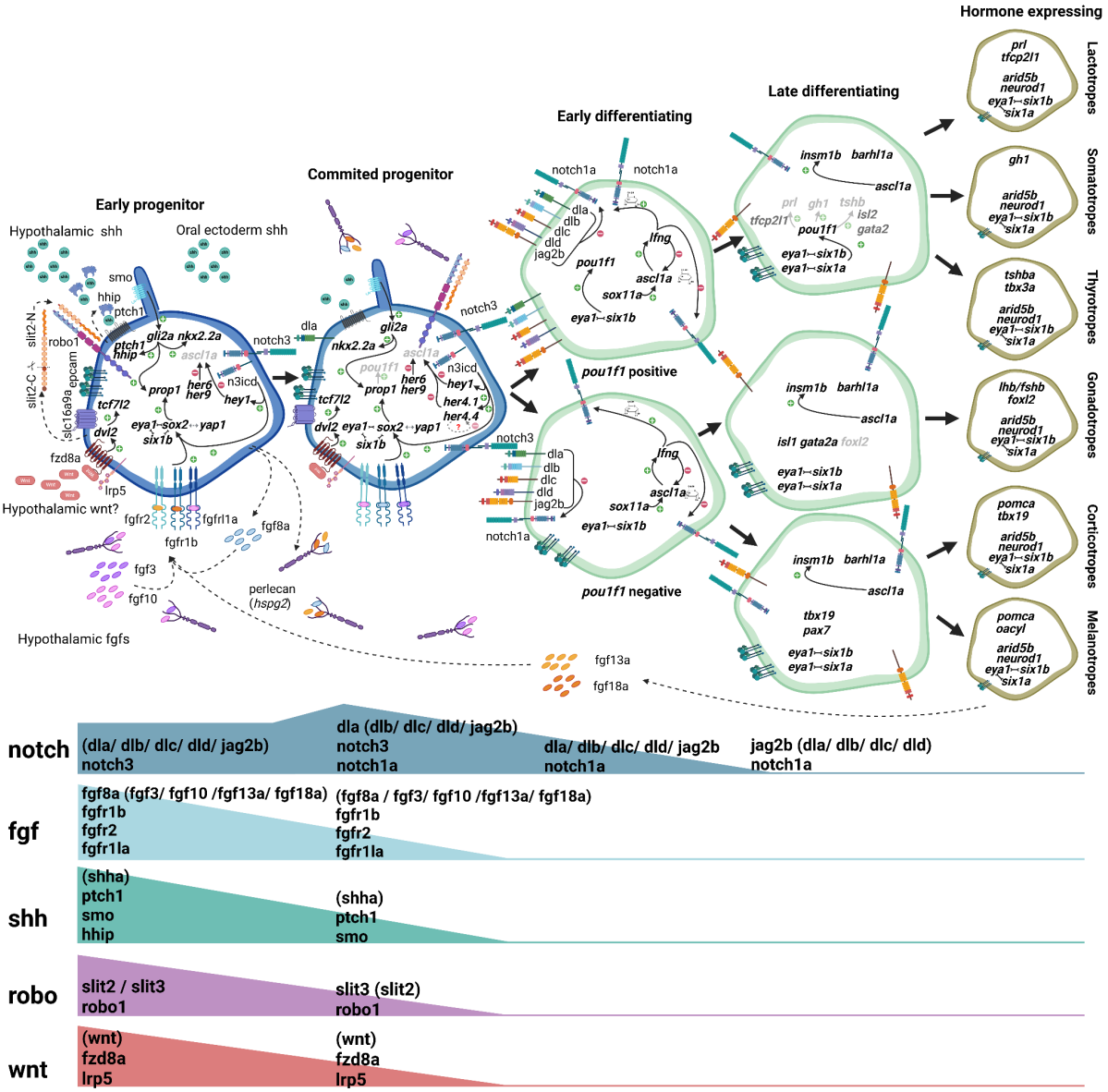

Figura 3.7. El esquema muestra células representativas de los estadíos de progenitores tempranos, progenitores comprometidos, células en diferenciación temprana, células en diferenciación tardía y que expresan hormonas. Se muestran los principales receptores y ligandos, así como los genes diferencialmente expresados más relevantes y las relaciones entre todos estos, para cada uno de estos estadíos. Se muestra también la actividad presumida de las vías de señalización más relevantes para el proceso de diferenciación hipofisaria en cada uno de estos estadíos.

En las **células progenitoras tempranas** ocurre un gran *switch* transcripcional, en el que prácticamente todas las vías, a excepción de la vía de Notch comienzan a apagarse, disminuyendo la expresión de la mayoría de los receptores (*robo1*, *fgfr1b*, *fgfr2*, *fgfrl1a*, *fzd8a*, *smo*). A su vez, la vía de Notch sufre una transición muy marcada: comienzan a expresarse muchos de sus ligandos (*dla*, *dlb*, *dlc*, *dld*, *jag2b*) y se da un cambio de expresión de sus receptores, donde se apaga la expresión de *notch3* y comienza a expresarse *notch1a*. A partir de este estadío aumenta la expresión de *sox11b*, ya expresado

en progenitores, y comienzan a expresarse *sox11a, sox4b* y *ascl1a*. En otros contextos *sox11a* y *sox11b* regulan positivamente a *ascl1a* (Guo et al., 2010), por lo que se asume que estos factores funcionan río arriba de *ascl1a.* Es interesante que los *knock-out* para *sox11a* presentan signos de síndrome de Coffin-Siris, recientemente asociado a HC (ver Capítulo 1). Uno de estos signos es un menor tamaño, posiblemente por deficiencia de GH, aunque no se ha estudiado la hipófisis en estos animales. A su vez, los *knock-outs* para *sox4b* presentan defectos en los linajes dependientes de *gata2a* (tirotropos y gonadotropos, Quiroz et al., 2012). Por último, los peces *knock-out* para *ascl1a* no logran activar la diferenciación de ningún linaje (Pogoda et al., 2006). Todo esto sugiere un efecto sinérgico entre estos factores *sox* y *ascl1a* para la diferenciación hipofisaria. Además, *ascl1a* activa a *lfng* (*lunatic fringe*), un modulador de la vía de Notch, que confiere afinidad preferencial para ligandos del tipo *delta* por sobre *jagged* (Yang et al., 2004), lo que probablemente ayuda a conferir sincronicidad al sistema (Okubo et al., 2012).

En células que ya han avanzado en la diferenciación comienzan a expresarse genes tempranos de cada linaje, como *pou1f1*, *isl1*, *gata2a*, y *pax7a*, mientras que la vía de Notch termina de apagarse, dejando de expresarse tanto receptores como ligandos. Se da también un cambio en la regulación de *eya1*. El factor de transcripción *eya1* se expresa durante todo el proceso de diferenciación y además de interactuar con *sox2* en células progenitoras, interactúa y colabora con los factores de transcripción tipo *six*. Se ha comprobado, mediante el estudio de peces cebra *knock-out*, que *eya1* es necesario para la diferenciación de los linajes hipofisarios, pero no para su supervivencia (Nica et al., 2006). En este set de datos se encontró que si bien *six1b* se expresa durante todo el desarrollo, *six1a* se activa únicamente durante estadíos tardíos de la diferenciación. Esto sugiere que el complejo eya1-six1a podría ser el responsable de mantener la expresión de *pou1f1* que en los progenitores *pou1f1*$^{+}$ logra iniciarse pero no logra sostenerse en el tiempo (Nica et al., 2006). Además, en este estadío tardío comienza a expresarse *barhl1a* y el target de *ascl1a, insm1b* (Jacob et al., 2009), cuyos roles no han sido aún estudiado en hipófisis.

Por último, **las células productoras de hormonas** ya no responden a ninguna de las vías canónicas presentes en las células *stem*, aunque sí expresan ligandos de la vía de fgf (*fgf13a* y *fgf18a*), como se explicó anteriormente. También expresan otros factores de transcripción característicos. Entre ellos se encuentra *arid5b*, cuyo ortólogo en humanos ha sido vinculado por primera vez a HC en el marco de esta tesis (ver capítulo 1). Además, comienza a expresarse también *neurod1*, un marcador de diferenciación terminal en neuronas, cuya expresión es usualmente reprimida por *sox2, y activada por nkx2.2a* (Anderson et al., 2009, Amador-Arjona et al., 2015).

CAPÍTULO 3: CONCLUSIONES

En este capítulo se logró generar un reportero para *prop1* en el pez cebra. En primer lugar, el abordaje mediante clonado del promotor putativo demostró que la regulación de la expresión de *prop1* es compleja y probablemente dependa de un elemento regulador dentro de su primer intrón. Esto motivó a generar un reportero mediante *knock-in*, conservando este intrón intacto, dirigiendo la inserción al exón 2 mediante Cas9. Se optó también por un reportero indirecto, insertando un elemento GAL4, para conferirle una mayor flexibilidad del sistema, así como una señal de fluorescencia amplificada y sostenida en el tiempo. Este *knock-in* presentó una expresión hipofisaria altamente específica.

También se utilizó al *knock-in* generado como *knock-out*, dado que la inserción interrumpe a la proteína prop1 antes del homeodominio. Se observó que, a diferencia de estudios previos con morfolinos, los *prop1 knock-out* presentan un fenotipo *dwarf*, del mismo modo que sucede en ratones. Además, los *knock-out* presentaron otros síntomas asociados a hipopituitarismo, como defectos de pigmentación y un desarrollo sexual alterado.

Se decidió utilizar el reportero para llevar a cabo el primer experimento de scRNA-seq de la hipófisis del pez cebra durante el desarrollo. Este scRNA-seq permitió comprobar que la arquitectura del desarrollo temprano hipofisario está altamente conservado entre vertebrados. Por ejemplo, el análisis de este set de datos permitió determinar que *epcam* es un excelente marcador para distinguir la hipófisis del tejido neural circundante en pez cebra. A su vez, se comprobó que *Epcam* es un marcador conservado también en ratones, y que su expresión es independiente de *Prop1*, lo que lo vuelve un excelente marcador para estudiar el límite de la hipófisis anterior en ratones con dismorfologías hipofisarias.

Se pudo también comprobar que los progenitores tempranos hipofisarios dependen de una multiplicidad de vías (Notch, Shh, Wnt, Fgf y Robo). Estas vías modulan la salida de un estado *stem (prop1^{+})* hacia un estado diferenciado *(prop1^{-})*. Durante esta diferenciación los receptores de estas vías se apagan, mientras que en paralelo se encienden ligandos de la vía de Notch. Esta salida viene acoplada a la desrepresión de *ascl1a*, probablemente mediada por *sox11a*, y la subsecuente activación de factores de transcripción linaje específicos como *pou1f1*, *pax7a*, *isl1* y *gata2a*.

Además, se pudo comprobar que en células maduras, productoras de hormonas, existe también una gran coincidencia de marcadores específicos para los linajes entre pez cebra y mamíferos, con la excepción de los somatotropos, que no fueron capturados en

suficiente cantidad para hacer un análisis exhaustivo. En el caso de corticotropos y melanotropos, estos pueden ser distinguidos por la expresión de *tbx19* y *oacyl*, al igual que en mamíferos. En el caso de gonadotropos y tirotropos, ambos comparten los marcadores *isl1* y *gata2a*, pero los primeros expresan *foxl2*, mientras que los segundos expresan *tbx3a*, de manera similar a lo que sucede con los tirotropos del *rostral tip* en ratones. Los lactotropos, en cambio, no comparten marcadores con mamíferos, pero sí presentan un marcador novel, el factor de transcripción *tfcp2l1*. Este factor se correlaciona fuertemente con los niveles de expresión de *prl*, y podría ser necesario para la diferenciación de este linaje. Dado que el linaje de los lactotropos es el que evolutivamente más cambios ha sufrido en cuanto a su función, no es sorprendente que en este linaje se encuentren también las mayores diferencias en sus marcadores.

El set de datos de scRNA-seq obtenido permitió, además, construir un modelo de diferenciación hipofisaria en el pez cebra, que involucra las vías de Notch, Fgf, Shh, Robo y Wnt. En este modelo se incluyeron la mayoría de los genes conocidos del desarrollo hipofisario en mamíferos, lo que demuestra el alto grado de conservación que presenta el desarrollo hipofisario en vertebrados. Además, se destaca la expresión en estadíos clave de genes que han sido recientemente involucrados en HC en modelos murinos y en pacientes pediátricos.

En conclusión, en este capítulo se describe el primer reportero *knock-in* para *prop1* en pez cebra, que funciona además como *knock-out*. Este reportero abre las puertas a estudios más detallados del desarrollo temprano hipofisario en este modelo, ejemplificado en esta tesis con el primer scRNA-seq del desarrollo temprano hipofisario en teleósteos.

CONCLUSIÓN GENERAL

En el marco de esta tesis doctoral se logró estudiar el desarrollo temprano de la hipófisis en dos modelos animales, ratón (*Mus musculus*) y pez cebra (*Danio rerio*). Además, se estudió el origen genético del hipopituitarismo congénito en humanos, específicamente en una cohorte de pacientes pediátricos argentinos.

El estudio sobre la cohorte de pacientes pediátricos argentinos mediante la secuenciación de exoma completo demostró que esta técnica permite mejorar la tasa de diagnóstico respecto a trabajos previos, que se limitaban a paneles de genes. Además, esto permitió estimar la prevalencia de variantes patogénicas de splicing y CNVs. Ambos tipos de variantes resultaron fundamentales para elevar la tasa de diagnóstico genético definitivo.

La búsqueda de ratones *knock-out* con hipófisis dismórficas en la base de datos del DMDD permitió encontrar 51 genes candidatos. Para estos, se comprobó su expresión en regiones importantes para el desarrollo hipofisario, como el hipotálamo, la neurohipófisis, el mesénquima adyacente y la adenohipófisis misma. A su vez, se buscaron variantes en estos genes candidatos en nuestra cohorte de pacientes argentinos. Se encontraron variantes de interés para cuatro de estos genes candidatos, siendo dos de estas variantes, en los genes *SETD5* y *MORC2*, consideradas patogénicas y por lo tanto diagnósticas. Esto permite concluir que la búsqueda de genes causantes de dismorfologías en ratones es un buen modo de encontrar genes causantes de hipopituitarismo congénito.

También se exploró el desarrollo hipofisario en el pez cebra, generando un *knock-in* reportero para *prop1*. Aprovechando este reportero se generó un set de datos de scRNA-seq durante el desarrollo temprano del pez cebra (28 y 52 horas post fertilización). Esto permitió demostrar que la arquitectura transcripcional del desarrollo hipofisario temprano se encuentra altamente conservado en teleósteos. Una prueba de esto es el marcador hipofisario *epcam*, que permite distinguir la hipófisis anterior del tejido neuronal circundante tanto en pez cebra como en ratones. Así mismo, se aprovechó que el *knock-in* genera una versión truncada de prop1 para estudiar el desarrollo del pez cebra *knock-out* para *prop1*. Este *knock-out* presentaba varios signos de deficiencias hipofisarias, incluyendo un menor crecimiento, de manera similar a lo que ha sido demostrado previamente en ratones. Esto confirma que el pez cebra es un excelente modelo para estudiar el desarrollo hipofisario. El reportero para *prop1* generado en el marco de esta tesis permitirá que este estudio sea más sencillo y eficiente.

Para concluir, esta tesis aporta nuevos conocimientos sobre el desarrollo de la hipófisis anterior, del origen genético de sus dismorfologías y del hipopituitarismo congénito.

Bibliografía

Aarskog, D., Eiken, H. G., Bjerknes, R., & Myking, O. L. (1997). Pituitary dwarfism in the R271W Pit-1 gene mutation. European Journal of Pediatrics, 156(11), 829–834. https://doi.org/10.1007/s004310050722

Abidi, K., Jellouli, M., Rabeh, R. B., Hammi, Y., & Gargah, T. (2015). Williams-Beuren syndrome associated with single kidney and nephrocalcinosis: a case report. Pan African Medical Journal, 22. https://doi.org/10.11604/pamj.2015.22.276.7929

Abu-Libdeh, B., Mor-Shaked, H., Atawna, A. A., Gillis, D., Halstuk, O., Shaul-Lotan, N., Slae, M., Sultan, M., Meiner, V., Elpeleg, O., & Harel, T. (2021). Homozygous variant in MADD, encoding a Rab guanine nucleotide exchange factor, results in pleiotropic effects and a multisystemic disorder. European Journal of Human Genetics, 29(6), 977–987. https://doi.org/10.1038/s41431-021-00844-7

Adachi, M., Tajima, T., Muroya, K., & Asakura, Y. (2013). Classic Bartter syndrome complicated with profound growth hormone deficiency: a case report. Journal of Medical Case Reports, 7(1). https://doi.org/10.1186/1752-1947-7-283

Adly, N., Alhashem, A., Ammari, A., & Alkuraya, F. S. (2013). Ciliary GenesTBC1D32/C6orf170andSCLT1are Mutated in Patients with OFD Type IX. Human Mutation, 35(1), 36–40. https://doi.org/10.1002/humu.22477

Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen‐2. Current Protocols in Human Genetics, 76(1). https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76

Aharon, D., & Marlow, F. L. (2021). Sexual determination in zebrafish. Cellular and Molecular Life Sciences, 79(1). https://doi.org/10.1007/s00018-021-04066-4

Ahn, E., DeKelver, R. C., Lo, M., Nguyen, T. A., Matsuura, S., Boyapati, A., Pandit, S., Fu, X., & Zhang, D. (2011). SON controls Cell-Cycle progression by coordinated regulation of RNA splicing. Molecular Cell, 42(2), 185–198. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.03.014

Akiyama, R., Kawakami, H., Wong, J., Oishi, I., Nishinakamura, R., & Kawakami, Y. (2015). Sall4-Gli3 system in early limb progenitors is essential for the development of limb skeletal elements. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(16), 5075–5080. https://doi.org/10.1073/pnas.1421949112

AlAbdi, L., Desbois, M., Rusnac, D., Sulaiman, R. A., Rosenfeld, J. A., Lalani, S., Murdock, D. R., Burrage, L. C., Au, P. Y. B., Towner, S., Wilson, W. G., Wong, L., Brunet, T., Strobl-Wildemann, G., Burton, J. E., Hoganson, G., McWalter, K., Begtrup, A., Zarate, Y. A., . . . Alkuraya, F. S. (2022). Loss-of-function variants in MYCBP2 cause neurobehavioural phenotypes and corpus callosum defects. Brain, 146(4), 1373–1387. https://doi.org/10.1093/brain/awac364

Alatzoglou, K. S., & Dattani, M. T. (2011). Phenotype-Genotype correlations in congenital isolated Growth Hormone deficiency (IGHD). The Indian Journal of Pediatrics, 79(1), 99–106. https://doi.org/10.1007/s12098-011-0614-7

Alba, M., & Salvatori, R. (2004). A Mouse with Targeted Ablation of the Growth Hormone-Releasing Hormone Gene: A New Model of Isolated Growth Hormone Deficiency. Endocrinology, 145(9), 4134–4143. https://doi.org/10.1210/en.2004-0119

Albulym, O. M., Kennerson, M. L., Harms, M. B., Drew, A. P., Siddell, A. H., Auer‐Grumbach, M., Pestronk, A., Connolly, A., Baloh, R. H., Zuchner, S., Reddel, S. W., & Nicholson, G. A. (2015).

MORC2 mutations cause axonal Charcot–Marie–Tooth disease with pyramidal signs. Annals of Neurology, 79(3), 419–427. https://doi.org/10.1002/ana.24575

Alesi, V., Loddo, S., Orlando, V., Genovese, S., Di Tommaso, S., Liambo, M. T., Pompili, D., Ferretti, D., Calacci, C., Catino, G., Falasca, R., Dentici, M. L., Novelli, A., Digilio, M. C., & Dallapiccola, B. (2020). Atypical 7q11.23 deletions excluding ELN gene result in Williams–Beuren syndrome craniofacial features and neurocognitive profile. American Journal of Medical Genetics Part A, 185(1), 242–249. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61937

Alfadhel, M., Umair, M., Almuzzaini, B., Asiri, A., Tuwaijri, A. A., Alhamoudi, K., Alyafee, Y., & Al-Owain, M. (2021). Identification of the *TTC26* Splice Variant in a Novel Complex Ciliopathy Syndrome with Biliary, Renal, Neurological, and Skeletal Manifestations. Molecular Syndromology, 12(3), 133–140. https://doi.org/10.1159/000513829

Al-Jawahiri, R., Foroutan, A., Kerkhof, J., McConkey, H., Levy, M., Haghshenas, S., Rooney, K., Turner, J., Shears, D., Holder, M., Lefroy, H., Castle, B., Reis, L. M., Semina, E. V., Nickerson, D., Bamshad, M., Leal, S., Lachlan, K., Chandler, K., . . . McNeill, A. (2022). SOX11 variants cause a neurodevelopmental disorder with infrequent ocular malformations and hypogonadotropic hypogonadism and with distinct DNA methylation profile. Genetics in Medicine, 24(6), 1261–1273. https://doi.org/10.1016/j.gim.2022.02.013

Alkhouri, N., Kaplan, B., Kay, M., Shealy, A., Crowe, C., Bauhuber, S., & Zenker, M. (2008). Johanson-Blizzard syndrome with mild phenotypic features confirmed by UBR1 gene testing. World Journal of Gastroenterology, 14(44), 6863. https://doi.org/10.3748/wjg.14.6863

Almasoudi, S. H., & Schlosser, G. (2021). Eya1 protein distribution during embryonic development of *Xenopus laevis*. Gene Expression Patterns, 42, 119213. https://doi.org/10.1016/j.gep.2021.119213

Alsemari, A., Al-Younes, B., Goljan, E., Jaroudi, D., BinHumaid, F., Meyer, B. F., Arold, S. T., & Monies, D. (2017). Recessive VARS2 mutation underlies a novel syndrome with epilepsy, mental retardation, short stature, growth hormone deficiency, and hypogonadism. Human Genomics, 11(1). https://doi.org/10.1186/s40246-017-0124-4

Amador-Arjona, A., Cimadamore, F., Huang, C., Wright, R., Lewis, S., Gage, F. H., & Terskikh, A. V. (2015). SOX2 primes the epigenetic landscape in neural precursors enabling proper gene activation during hippocampal neurogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 112(15). https://doi.org/10.1073/pnas.1421480112

Amlie‐Wolf, L., Bardakjian, T., Kopinsky, S. M., Reis, L. M., Semina, E. V., & Schneider, A. (2021). Review of 37 patients with SOX2 pathogenic variants collected by the Anophthalmia/Microphthalmia Clinical Registry and DNA research study. American Journal of Medical Genetics Part A, 188(1), 187–198. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.62518

Anderson, K. R., Torres, C. A., Solomon, K., Becker, T. C., Newgard, C. B., Wright, C. V., Hagman, J., & Sussel, L. (2009). Cooperative transcriptional regulation of the essential pancreatic islet gene NeuroD1 (Beta2) by NKX2.2 and neurogenin 3. Journal of Biological Chemistry, 284(45), 31236–31248. https://doi.org/10.1074/jbc.m109.048694

Angotzi, A. R., Ersland, K. M., Mungpakdee, S., Stefansson, S., & Chourrout, D. (2008). Independent and dynamic reallocation of pitx gene expression during vertebrate evolution, with emphasis on fish pituitary development. Gene, 417(1–2), 19–26. https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.03.013

Angotzi, A. R., Mungpakdee, S., Stefansson, S., Male, R., & Chourrout, D. (2011). Involvement of Prop1 homeobox gene in the early development of fish pituitary gland. General and Comparative Endocrinology, 171(3), 332–340. https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.02.026

Aouchiche, K., Romanet, P., Barlier, A., Brue, T., Pertuit, M., Reynaud, R., & Saveanu, A. (2024). CSNK2B mutation: a rare cause of IGHD. Clinical Endocrinology. https://doi.org/10.1111/cen.15174

Arai, H., Noguchi, A., Shina, K., Otaka, S., Takahashi, I., Kosaki, K., & Takahashi, T. (2023). A child with branchio-oto-renal spectrum disorder carrying an SIX1 variant. Pediatrics International, 65(1). https://doi.org/10.1111/ped.15638

Araújo, C., Baptista, C., & Paiva, I. (2023). An orthodenticle homeobox 2 (OTX2) mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and retinitis pigmentosa. Cureus. https://doi.org/10.7759/cureus.50819

Arefzadeh, A., Khalighinejad, P., Ataeinia, B., & Parvar, P. (2018). Brachydactyly mental retardation syndrome with growth hormone deficiency. Endocrinology Diabetes and Metabolism Case Reports, 2018. https://doi.org/10.1530/edm-18-0068

Argente, J., Flores, R., Gutiérrez-Arumí, A., Verma, B., Martos-Moreno, G. Á., Cuscó, I., Oghabian, A., Chowen, J. A., Frilander, M. J., & Pérez-Jurado, L. A. (2014). Defective minor spliceosome mRNA processing results in isolated familial growth hormone deficiency. EMBO Molecular Medicine, 6(3), 299–306. https://doi.org/10.1002/emmm.201303573

Arnhold, I. J. P., França, M. M., Carvalho, L. R., Mendonca, B. B., & Jorge, A. a. L. (2015). Role of GLI2 in hypopituitarism phenotype. Journal of Molecular Endocrinology, 54(3), R141–R150. https://doi.org/10.1530/jme-15-0009

Arrabal, L., Muñoz-Pujol, G., Martínez, I. M., Gort, L., García-Villoria, J., Roldán, S., Tort, F., & Ribes, A. (2023). Functional Evidence of CCDC186 as a New Disease-Associated Gene with Endocrine and Central Nervous System Alterations. International Journal of Molecular Sciences, 24(15), 12319. https://doi.org/10.3390/ijms241512319

Ascoli, P., & Cavagnini, F. (2006). Hypopituitarism. Pituitary, 9(4), 335–342. https://doi.org/10.1007/s11102-006-0416-5

Ashkenazi-Hoffnung, L., Lebenthal, Y., Wyatt, A. W., Ragge, N. K., Dateki, S., Fukami, M., Ogata, T., Phillip, M., & Gat-Yablonski, G. (2010). A novel loss-of-function mutation in OTX2 in a patient with anophthalmia and isolated growth hormone deficiency. Human Genetics, 127(6), 721–729. https://doi.org/10.1007/s00439-010-0820-9

Aydın, B. K., Baş, F., Tamay, Z., Kılıç, G., Süleyman, A., Bundak, R., Saka, N., Özkaya, E., Güler, N., & Darendeliler, F. (2013). Netherton Syndrome Associated with Growth Hormone Deficiency. Pediatric Dermatology, 31(1), 90–94. https://doi.org/10.1111/pde.12220

Babadi, M., Fu, J. M., Lee, S. K., Smirnov, A. N., Gauthier, L. D., Walker, M., Benjamin, D. I., Zhao, X., Karczewski, K. J., Wong, I., Collins, R. L., Sanchis-Juan, A., Brand, H., Banks, E., & Talkowski, M. E. (2023). GATK-gCNV enables the discovery of rare copy number variants from exome sequencing data. Nature Genetics, 55(9), 1589–1597. https://doi.org/10.1038/s41588-023-01449-0

Bando, H., Brinkmeier, M. L., Castinetti, F., Fang, Q., Lee, M., Saveanu, A., Albarel, F., Dupuis, C., Brue, T., & Camper, S. A. (2022). Heterozygous variants in SIX3 and POU1F1 cause pituitary hormone deficiency in mouse and man. Human Molecular Genetics, 32(3), 367–385. https://doi.org/10.1093/hmg/ddac192

Barberi, S., Bozzola, E., Berardinelli, A., Meazza, C., & Bozzola, M. (2004). Long-Term growth hormone therapy in mitochondrial cytopathy. Hormone Research in Paediatrics, 62(2), 103–106. https://doi.org/10.1159/000080451

Bartholdi, D., Asadollahi, R., Oneda, B., Schmitt-Mechelke, T., Tonella, P., Baumer, A., & Rauch, A. (2013). Further delineation of genotype–phenotype correlation in homozygous 2p21 deletion syndromes: First description of patients without cystinuria. American Journal of Medical Genetics Part A, 161(8), 1853–1859. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.35994

Bashamboo, A., Bignon-Topalovic, J., Rouba, H., McElreavey, K., & Brauner, R. (2015). A nonsense mutation in the hedgehog receptor CDON associated with pituitary stalk interruption syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 101(1), 12–15. https://doi.org/10.1210/jc.2015-2995

Bashamboo, A., Bignon-Topalovic, J., Moussi, N., McElreavey, K., & Brauner, R. (2017). Mutations in the human ROBO1 gene in pituitary stalk interruption syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 102(7), 2401–2406. https://doi.org/10.1210/jc.2016-1095

Battini, R., Bertelloni, S., Astrea, G., Casarano, M., Travaglini, L., Baroncelli, G., Pasquariello, R., Bertini, E., & Cioni, G. (2015). Longitudinal follow up of a boy affected by Pol III-related leukodystrophy: a detailed phenotype description. BMC Medical Genetics, 16(1). https://doi.org/10.1186/s12881-015-0203-0

Bauer, C. K., Schneeberger, P. E., Kortüm, F., Altmüller, J., Santos-Simarro, F., Baker, L., Keller-Ramey, J., White, S. M., Campeau, P. M., Gripp, K. W., & Kutsche, K. (2019). Gain-of-Function mutations in KCNN3 encoding the Small-Conductance Ca2+-Activated K+ channel SK3 cause Zimmermann-Laband Syndrome. The American Journal of Human Genetics, 104(6), 1139–1157. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.04.012

Bennett, J. T., Tan, T. Y., Alcantara, D., Tétrault, M., Timms, A. E., Jensen, D., Collins, S., Nowaczyk, M. J., Lindhurst, M. J., Christensen, K. M., Braddock, S. R., Brandling-Bennett, H., Hennekam, R. C., Chung, B., Lehman, A., Su, J., Ng, S., Amor, D. J., Majewski, J., . . . McDonell, L. M. (2016). Mosaic activating mutations in FGFR1 cause encephalocraniocutaneous lipomatosis. The American Journal of Human Genetics, 98(3), 579–587. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.006

Bian, Y., Hahn, H., & Uhmann, A. (2023). The hidden hedgehog of the pituitary: hedgehog signaling in development, adulthood and disease of the hypothalamic-pituitary axis. Frontiers in Endocrinology, 14. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1219018

Binder, G., Neuer, K., Ranke, M. B., & Wittekindt, N. E. (2005). PTPN11 Mutations Are Associated with Mild Growth Hormone Resistance in Individuals with Noonan Syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 90(9), 5377–5381. https://doi.org/10.1210/jc.2005-0995

Birrcll, G., Lampe, A., Richmond, S., Bruce, S., Gecz, J., Lower, K., Wright, M., & Chectham, T. (2003). Borjeson-Forssman-Lehmann Syndrome and multiple pituitary hormone deficiency. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 16(9). https://doi.org/10.1515/jpem.2003.16.9.1295

Bissegatto, D. D., Fernandes, B. H. V., Da Silva, C. C., Chen, W., De Souza Junqueira, M., & Carvalho, L. R. S. (2020). MON-712 Restoration of Growth and Fertility in Zebrafish (Danio Rerio) Model with PROP1 Knockout Generated by CRISPR/Cas9 Genomic Editing. Journal of the Endocrine Society, 4 (Supplement 1). https://doi.org/10.1210/jendso/bvaa046.1138

Bloor, S., Giri, D., Didi, M., & Senniappan, S. (2017). Novel Splicing Mutation in B3GAT3 Associated with Short Stature, GH Deficiency, Hypoglycaemia, Developmental Delay, and Multiple Congenital Anomalies. Case Reports in Genetics, 2017, 1–5. https://doi.org/10.1155/2017/3941483

Brachet, C., Kozhemyakina, E. A., Boros, E., Heinrichs, C., Balikova, I., Soblet, J., Smits, G., Vilain, C., & Mathers, P. H. (2019). Truncating RAX mutations: anophthalmia, hypopituitarism, diabetes insipidus, and cleft palate in mice and men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 104(7), 2925–2930. https://doi.org/10.1210/jc.2018-02316

Brambilla, I., Poddighe, D., Mantelli, S. S., Guarracino, C., & Marseglia, G. L. (2018). Bartter syndrome and growth hormone deficiency: Three siblings with a novel CLCNKB mutation. Pediatrics International, 61(2), 193–197. https://doi.org/10.1111/ped.13726

Branco, G. S., Cassel, M., Chehade, C., De Paiva Camargo, M., De Melo Dias, G. C., Borella, M. I., & De Jesus, L. W. O. (2025). Ontogeny of adenohypophyseal cells, pituitary gland development, and structure in adults of Astyanax lacustris (Teleostei, Characiformes): an emerging Neotropical model fish species. Fish Physiology and Biochemistry, 51(1). https://doi.org/10.1007/s10695-024-01448-w

Breitfeld, J., Martens, S., Klammt, J., Schlicke, M., Pfäffle, R., Krause, K., Weidle, K., Schleinitz, D., Stumvoll, M., Führer, D., Kovacs, P., & Tönjes, A. (2013). Genetic analyses of bone morphogenetic protein 2, 4 and 7 in congenital combined pituitary hormone deficiency. BMC Endocrine Disorders, 13(1). https://doi.org/10.1186/1472-6823-13-56

Brent, G. A. (2012). Mechanisms of thyroid hormone action. Journal of Clinical Investigation, 122(9), 3035–3043. https://doi.org/10.1172/jci60047

Bogdanović, R., Draaken, M., Toromanović, A., Đorđević, M., Stajić, N., & Ludwig, M. (2010). A novel CLCN5 mutation in a boy with Bartter-like syndrome and partial growth hormone deficiency. Pediatric Nephrology, 25(11), 2363–2368. https://doi.org/10.1007/s00467-010-1615-x

Bonfig, W., Salem, N. J., Heiliger, K., Hempel, M., Lederer, G., Bornkamm, M., Wieland, K., Lohse, P., Burdach, S., & Oexle, K. (2012). Recurrent hypoglycemia due to growth hormone deficiency in an infant with Turner syndrome. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 25(9–10). https://doi.org/10.1515/jpem-2012-0103

Boniel, S., Szymańska, K., Śmigiel, R., & Szczałuba, K. (2021). Kabuki Syndrome—Clinical Review with Molecular Aspects. Genes, 12(4), 468. https://doi.org/10.3390/genes12040468

Borrell, V., Cárdenas, A., Ciceri, G., Galcerán, J., Flames, N., Pla, R., Nóbrega-Pereira, S., García-Frigola, C., Peregrín, S., Zhao, Z., Ma, L., Tessier-Lavigne, M., & Marín, O. (2012). Slit/Robo signaling modulates the proliferation of central nervous system progenitors. Neuron, 76(2), 338–352. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.003

Bowden, S. A. (2023). Current screening strategies for the diagnosis of adrenal insufficiency in children. Pediatric Health Medicine and Therapeutics, Volume 14, 117–130. https://doi.org/10.2147/phmt.s334576

Boztug, K., Rosenberg, P. S., Dorda, M., Banka, S., Moulton, T., Curtin, J., Rezaei, N., Corns, J., Innis, J. W., Avci, Z., Tran, H. C., Pellier, I., Pierani, P., Fruge, R., Parvaneh, N., Mamishi, S., Mody, R., Darbyshire, P., Motwani, J., . . . Klein, C. (2011). Extended spectrum of human Glucose-6-Phosphatase catalytic subunit 3 deficiency: novel genotypes and phenotypic variability in severe congenital neutropenia. The Journal of Pediatrics, 160(4), 679-683.e2. https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2011.09.019

Brancati, F., Camerota, L., Colao, E., Vega-Warner, V., Zhao, X., Zhang, R., Bottillo, I., Castori, M., Caglioti, A., Sangiuolo, F., Novelli, G., Perrotti, N., & Otto, E. A. (2018). Biallelic variants in the ciliary gene TMEM67 cause RHYNS syndrome. European Journal of Human Genetics, 26(9), 1266–1271. https://doi.org/10.1038/s41431-018-0183-6

Bräuer, A. U., Savaskan, N. E., Kühn, H., Prehn, S., Ninnemann, O., & Nitsch, R. (2003). A new phospholipid phosphatase, PRG-1, is involved in axon growth and regenerative sprouting. Nature Neuroscience, 6(6), 572–578. https://doi.org/10.1038/nn1052

Brauner, R., Bignon-Topalovic, J., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2020). Pituitary stalk interruption syndrome is characterized by genetic heterogeneity. PLoS ONE, 15(12), e0242358. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242358

Brauner, R., Bignon-Topalovic, J., Bashamboo, A., & McElreavey, K. (2023). Exome sequencing in 16 patients with pituitary stalk interruption syndrome: A monocentric study. PLoS ONE, 18(12), e0292664. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292664

Brinkman, J. E., Tariq, M. A., Leavitt, L., & Sharma, S. (2023). Physiology, growth hormone. StatPearls - NCBI Bookshelf. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482141/

Brinkmeier, M. L., Potok, M. A., Davis, S. W., & Camper, S. A. (2007). TCF4 deficiency expands ventral diencephalon signaling and increases induction of pituitary progenitors. Developmental Biology, 311(2), 396–407. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.08.046

Brisset, S., Slamova, Z., Dusatkova, P., Briand-Suleau, A., Milcent, K., Metay, C., Simandlova, M., Sumnik, Z., Tosca, L., Goossens, M., Labrune, P., Zemankova, E., Lebl, J., Tachdjian, G., & Sedlacek, Z. (2014). Anophthalmia, hearing loss, abnormal pituitary development and response to growth hormone therapy in three children with microdeletions of 14q22q23. Molecular Cytogenetics, 7(1). https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-17

Brue, T., Quentien, M., Khetchoumian, K., Bensa, M., Capo-Chichi, J., Delemer, B., Balsalobre, A., Nassif, C., Papadimitriou, D. T., Pagnier, A., Hasselmann, C., Patry, L., Schwartzentruber, J., Souchon, P., Takayasu, S., Enjalbert, A., Van Vliet, G., Majewski, J., Drouin, J., & Samuels, M. E. (2014). Mutations in NFKB2and potential genetic heterogeneity in patients with DAVID syndrome, having variable endocrine and immune deficiencies. BMC Medical Genetics, 15(1). https://doi.org/10.1186/s12881-014-0139-9

Budny, B., Zemojtel, T., Kaluzna, M., Gut, P., Niedziela, M., Obara-Moszynska, M., Rabska-Pietrzak, B., Karmelita-Katulska, K., Stajgis, M., Ambroziak, U., Bednarczuk, T., Wrotkowska, E., Bukowska-Olech, E., Jamsheer, A., Ruchala, M., & Ziemnicka, K. (2020). SEMA3A and IGSF10 are novel contributors to combined pituitary hormone deficiency (CPHD). Frontiers in Endocrinology, 11. https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00368 (a)

Budny, B., Karmelita-Katulska, K., Stajgis, M., Żemojtel, T., Ruchała, M., & Ziemnicka, K. (2020). Copy number variants contributing to combined pituitary hormone deficiency. International Journal of Molecular Sciences, 21(16), 5757. https://doi.org/10.3390/ijms21165757 (b)

Budry, L., Balsalobre, A., Gauthier, Y., Khetchoumian, K., L'Honoré, A., Vallette, S., Brue, T., Figarella-Branger, D., Meij, B., & Drouin, J. (2012). The selector gene Pax7 dictates alternate pituitary cell fates through its pioneer action on chromatin remodeling. Genes & Development, 26(20), 2299–2310. https://doi.org/10.1101/gad.200436.112

Buenrostro-Aguilar, R., Bosch-Canto, V., Isaac-Otero, G., Leal-Leal, C., Uribe-Ortiz, L., Diezi, M., Mercier, T., Galley, M., Decosterd, L., Munier, F., & Beck-Popovic, M. (2016). SIOP 2016 Scientific Programme+Index. Pediatric Blood & Cancer, 63(S3). https://doi.org/10.1002/pbc.26233

Bukvic, N., Chetta, M., Bagnulo, R., Leotta, V., Pantaleo, A., Palumbo, O., Palumbo, P., Oro, M., Rivieccio, M., Laforgia, N., De Rinaldis, M., Rosati, A., Kerkhof, J., Sadikovic, B., & Resta, N. (2023). What Have We Learned from Patients Who Have Arboleda-Tham Syndrome Due to a De Novo KAT6A Pathogenic Variant with Impaired Histone Acetyltransferase Function? A Precise Clinical Description May Be Critical for Genetic Testing Approach and Final Diagnosis. Genes, 14(1), 165. https://doi.org/10.3390/genes14010165

Cacheiro, P., Muñoz-Fuentes, V., Murray, S. A., Dickinson, M. E., Bucan, M., Nutter, L. M. J., Peterson, K. A., Haselimashhadi, H., Flenniken, A. M., Morgan, H., Westerberg, H., Konopka, T., Hsu, C., Christiansen, A., Lanza, D. G., Beaudet, A. L., Heaney, J. D., Fuchs, H., Gailus-Durner, V., . . . Kane, C. (2020). Human and mouse essentiality screens as a resource for disease gene discovery. Nature Communications, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-14284-2

Callier, P., Faivre, L., Marle, N., Thauvin-Robinet, C., Mosca, A., Masurel-Paulet, A., Borgnon, J., Falcon-Eicher, S., Danino, A., Malka, G., Merrer, M. L., Huet, F., & Mugneret, F. (2007). Untreated growth hormone deficiency with extremely short stature, bone dysplasia, cleft lip–palate and severe mental retardation in a 26-year-old man with a de novo unbalanced translocation t(1;12)(q24;q24). European Journal of Medical Genetics, 50(6), 455–464. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2007.06.004

Cao, D., Ma, X., Cai, J., Luan, J., Liu, A., Yang, R., Cao, Y., Zhu, X., Zhang, H., Chen, Y., Shi, Y., Shi, G., Zou, D., Cao, X., Grusby, M. J., Xie, Z., & Zhang, W. J. (2016). ZBTB20 is required for anterior pituitary development and lactotrope specification. Nature Communications, 7(1). https://doi.org/10.1038/ncomms11121

Carlston, C. M., Bleyl, S. B., Andrews, A., Meyers, L., Brown, S., Bayrak-Toydemir, P., Bale, J. F., & Botto, L. D. (2019). Expanding the genetic and clinical spectrum of the NONO-associated X-linked intellectual disability syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A, 179(5), 792–796. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61091

Carreno, G., Apps, J. R., Lodge, E. J., Panousopoulos, L., Haston, S., Gonzalez-Meljem, J. M., Hahn, H., Andoniadou, C. L., & Martinez-Barbera, J. P. (2017). Hypothalamic sonic hedgehog is required for cell specification and proliferation of LHX3/LHX4 pituitary embryonic precursors. Development, 144(18), 3289–3302. https://doi.org/10.1242/dev.153387

Carvalho, L. R., Woods, K. S., Mendonca, B. B., Marcal, N., Zamparini, A. L., Stifani, S., Brickman, J. M., Arnhold, I. J., & Dattani, M. T. (2003). A homozygous mutation in HESX1 is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. Journal of Clinical Investigation, 112(8), 1192–1201. https://doi.org/10.1172/jci18589

Castets, S., Roucher-Boulez, F., Saveanu, A., Mallet-Motak, D., Chabre, O., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Girardin, C., Morel, Y., Villanueva, C., Brue, T., Reynaud, R., & Nicolino, M. (2020). Hypopituitarism in Patients with Blepharophimosis and *FOXL2* Mutations. Hormone Research in Paediatrics, 93(1), 30–39. https://doi.org/10.1159/000507249

Çelik, N., Cinaz, P., Bideci, A., Yüce, Ö., Emeksiz, H. C., Döğer, E., & Çamurdan, O. (2014). Cardio-Facio-Cutaneous Syndrome with Precocious Puberty, Growth Hormone Deficiency and Hyperprolactinemia. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology, 6(1), 55–58. https://doi.org/10.4274/jcrpe.1151

Celik, M. Y., Yazici, H., Erdem, F., Yanbolu, A. Y., Aykut, A., Durmaz, A., Zeybek, S., Canda, E., Ucar, S. K., & Coker, M. (2023). Unique clinical presentations and follow-up outcomes from experience with congenital disorders of glycosylation: PMM2-PGM1-DPAGT1-MPI-POMT2-B3GALNT2-DPM1-SRD5A3-CDG. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 0(0). https://doi.org/10.1515/jpem-2022-0641

Chapman, S. C., Sawitzke, A. L., Campbell, D. S., & Schoenwolf, G. C. (2005). A three-dimensional atlas of pituitary gland development in the zebrafish. The Journal of Comparative Neurology, 487(4), 428–440. https://doi.org/10.1002/cne.20568

Chehadeh-Djebbar, S. E., Callier, P., Masurel-Paulet, A., Bensignor, C., Méjean, N., Payet, M., Ragon, C., Durand, C., Marle, N., Mosca-Boidron, A., Huet, F., Mugneret, F., Faivre, L., & Thauvin-Robinet, C.

(2011b). 17q21.31 microdeletion in a patient with pituitary stalk interruption syndrome. European Journal of Medical Genetics, 54(3), 369–373. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.03.001

Chen, Q., Leshkowitz, D., Li, H., Van Impel, A., Schulte-Merker, S., Amit, I., Rizzoti, K., & Levkowitz, G. (2023). Neural plate progenitors give rise to both anterior and posterior pituitary cells. Developmental Cell, 58(23), 2652-2665.e6. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.08.018

Cheng, X., Tang, F., Hu, X., Li, H., Li, M., Fu, Y., Yan, L., Li, Z., Gou, P., Su, N., Gong, C., He, W., Xiang, R., Bu, D., & Shen, Y. (2019). Two Chinese Xia‐Gibbs syndrome patients with partial growth hormone deficiency. Molecular Genetics and Genomic Medicine, 7(4). https://doi.org/10.1002/mgg3.596

Cheng, Y., Xu, C., Yang, J., Zhou, X., & Chen, N. (2022). Identification of a novel MAP3K1 variant in a family with 46, XY DSD and partial growth hormone deficiency. Molecular Medicine Reports, 26(5). https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12854

Cheung, L. Y. M., George, A. S., McGee, S. R., Daly, A. Z., Brinkmeier, M. L., Ellsworth, B. S., & Camper, S. A. (2018). Single-Cell RNA sequencing reveals novel markers of male pituitary stem cells and Hormone-Producing cell types. Endocrinology, 159(12), 3910–3924. https://doi.org/10.1210/en.2018-00750

Chevrier, V., Bruel, A., Van Dam, T. J. P., Franco, B., Lo Scalzo, M., Lembo, F., Audebert, S., Baudelet, E., Isnardon, D., Bole, A., Borg, J., Kuentz, P., Thevenon, J., Burglen, L., Faivre, L., Rivière, J., Huynen, M. A., Birnbaum, D., Rosnet, O., & Thauvin-Robinet, C. (2015). OFIP/KIAA0753 forms a complex with OFD1 and FOR20 at pericentriolar satellites and centrosomes and is mutated in one individual with oral-facial-digital syndrome. Human Molecular Genetics, 25(3), 497–513. https://doi.org/10.1093/hmg/ddv488

Chinn, I. K., Xie, Z., Chan, E. C., Nagata, B. M., Koval, A., Chen, W., Zhang, F., Ganesan, S., Hong, D. N., Suzuki, M., Nardone, G., Moore, I. N., Katanaev, V. L., Balazs, A. E., Liu, C., Lupski, J. R., Orange, J. S., & Druey, K. M. (2021). Short stature and combined immunodeficiency associated with mutations in RGS10. Science Signaling, 14(693). https://doi.org/10.1126/scisignal.abc1940

Choi, J., Yang, A., Song, A., Lim, M., Kim, J., Jang, J., Park, K., Cho, S., & Jin, D. (2018). Oculodentodigital Dysplasia with a Novel Mutation in GJA1 Diagnosed by Targeted Gene Panel Sequencing: A Case Report and Literature Review. PubMed, 48(6), 776–781. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30610049

Chu, L., Li, J., Liu, Y., Hu, W., & Cheng, C. H. K. (2014). Targeted gene disruption in zebrafish reveals noncanonical functions of LH signaling in reproduction. Molecular Endocrinology, 28(11), 1785–1795. https://doi.org/10.1210/me.2014-1061

Chu, L., Li, J., Liu, Y., & Cheng, C. H. K. (2015). Gonadotropin signaling in zebrafish ovary and testis development: Insights from gene knockout study. Molecular Endocrinology, 29(12), 1743–1758. https://doi.org/10.1210/me.2015-1126

Ciuba, K., Hawkes, W., Tojkander, S., Kogan, K., Engel, U., Iskratsch, T., & Lappalainen, P. (2018). Calponin-3 is critical for coordinated contractility of actin stress fibers. Scientific Reports, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41598-018-35948-6

Cody, J. D., Heard, P., & Hale, D. (2010). Identification of Two Novel Chromosome Regions Associated with Isolated Growth Hormone Deficiency. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 23(11). https://doi.org/10.1515/jpem.2010.181

Cody, J. D., Hasi, M., Soileau, B., Heard, P., Carter, E., Sebold, C., O'Donnell, L., Perry, B., Stratton, R. F., & Hale, D. E. (2013). Establishing a reference group for distal 18q-: clinical description and molecular basis. Human Genetics, 133(2), 199–209. https://doi.org/10.1007/s00439-013-1364-6

Cogan, J. D., Ramel, B., Lehto, M., Phillips, J., Prince, M., Blizzard, R. M., De Ravel, T. J., Brammert, M., & Groop, L. (1995). A recurring dominant negative mutation causes autosomal dominant growth hormone deficiency--a clinical research center study. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 80(12), 3591–3595. https://doi.org/10.1210/jcem.80.12.8530604

Cohen, M., Harrington, J., Narang, I., & Hamilton, J. (2014). Growth hormone secretion decreases with age in paediatric Prader-Willi syndrome. Clinical Endocrinology, 83(2), 212–215. https://doi.org/10.1111/cen.12694

Cohen, E., Maghnie, M., Collot, N., Leger, J., Dastot, F., Polak, M., Rose, S., Touraine, P., Duquesnoy, P., Tauber, M., Copin, B., Bertrand, A., Brioude, F., Larizza, D., Edouard, T., Briceño, L. G., Netchine, I., Oliver-Petit, I., Sobrier, M., . . . Legendre, M. (2016). Contribution of LHX4 mutations to pituitary deficits in a cohort of 417 unrelated patients. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 102(1), 290–301. https://doi.org/10.1210/jc.2016-3158

Correa, F. A., Jorge, A. A., Nakaguma, M., Canton, A. P., Costa, S. S., Funari, M. F., Lerario, A. M., Franca, M. M., Carvalho, L. R., Krepischi, A. C., Arnhold, I. J., Rosenberg, C., & Mendonca, B. B. (2017). Pathogenic copy number variants in patients with congenital hypopituitarism associated with complex phenotypes. Clinical Endocrinology, 88(3), 425–431. https://doi.org/10.1111/cen.13535

Correa, F. A., Nakaguma, M., Madeira, J. L. O., Nishi, M. Y., Abrão, M. G., Jorge, A. a. L., Carvalho, L. R., Arnhold, I. J. P., & Mendonça, B. B. (2019). Combined pituitary hormone deficiency caused by PROP1 mutations: update 20 years post-discovery. Archives of Endocrinology and Metabolism, 63(2), 167–174. https://doi.org/10.20945/2359-3997000000139

Correa-Silva, S. R., Kunii, I., Mitne-Neto, M., Moreira, C. M., Dias-da-Silva, M. R., & Abucham, J. (2022). Copy number variation in pituitary stalk interruption syndrome: A large case series of sporadic non-syndromic patients and literature review. Journal of Neuroendocrinology, 35(1). https://doi.org/10.1111/jne.13221

Costa, C., Coutinho, E., Santos-Silva, R., Castro-Correia, C., Lemos, M. C., & Fontoura, M. (2020). Neonatal presentation of growth hormone deficiency in CHARGE syndrome: the benefit of early treatment on long-term growth. Archives of Endocrinology and Metabolism. https://doi.org/10.20945/2359-3997000000231

Craig, M., Geng, B., Wigby, K., Phillips, S. A., Bakhoum, C., Naheedy, J., & Cernelc-Kohan, M. (2022). Activated phosphoinositide 3-kinase δ syndrome associated with nephromegaly, growth hormone deficiency, bronchiectasis: a case report. Allergy Asthma and Clinical Immunology, 18(1). https://doi.org/10.1186/s13223-022-00655-5

Crinò, A., Di Giorgio, G., Schiaffini, R., Fierabracci, A., Spera, S., Maggioni, A., & Gattinara, G. C. (2008). Central precocious puberty and growth hormone deficiency in a boy with Prader-Willi syndrome. European Journal of Pediatrics, 167(12), 1455–1458. https://doi.org/10.1007/s00431-008-0679-0

Dacou-Voutetakis, C., Feltquate, D. M., Drakopoulou, M., Kourides, I. A., & Dracopoli, N. C. (1990). Familial hypothyroidism caused by a nonsense mutation in the thyroid-stimulating hormone beta-subunit gene. PubMed, 46(5), 988–993. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1971148

Dai, C., Wang, L., Li, Y., Zheng, Z., Qian, J., Wang, C., Liu, Z., & Shan, X. (2019). Lowe syndrome with extremely short stature: growth hormone deficiency may be the pathogeny. Growth Factors, 37(3–4), 170–177. https://doi.org/10.1080/08977194.2019.1669589

Danti, L., Lundin, K., Nedeczey-Ruzsák, P., Tuuri, T., & Tapanainen, J. S. (2025). FOXL2 drives the differentiation of supporting gonadal cells in early ovarian development. Reproductive Biology and Endocrinology, 23(1). https://doi.org/10.1186/s12958-025-01377-0

Dateki, S., Watanabe, S., Mishima, H., Shirakawa, T., Morikawa, M., Kinoshita, E., Yoshiura, K., & Moriuchi, H. (2019). A homozygous splice site ROBO1 mutation in a patient with a novel syndrome with combined pituitary hormone deficiency. Journal of Human Genetics, 64(4), 341–346. https://doi.org/10.1038/s10038-019-0566-8

Dattani, M. T., Martinez-Barbera, J., Thomas, P. Q., Brickman, J. M., Gupta, R., Mårtensson, I., Toresson, H., Fox, M., Wales, J. K. H., Hindmarsh, P. C., Krauss, S., Beddington, R. S. P., & Robinson, I. C. a. F. (1998). Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. Nature Genetics, 19(2), 125–133. https://doi.org/10.1038/477

David, O., Eskin‐Schwartz, M., Ling, G., Dolgin, V., Kristal, E., Benkowitz, E., Osyntsov, L., Gradstein, L., Birk, O. S., Loewenthal, N., & Yerushalmi, B. (2020). Pituitary stalk interruption syndrome broadens the clinical spectrum of the TTC26 ciliopathy. Clinical Genetics, 98(3), 303–307. https://doi.org/10.1111/cge.13805

Davis, S. W., & Camper, S. A. (2007). Noggin regulates Bmp4 activity during pituitary induction. Developmental Biology, 305(1), 145–160. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.02.001

Davis, S. W., Keisler, J. L., Pérez-Millán, M. I., Schade, V., & Camper, S. A. (2016). All Hormone-Producing cell types of the pituitary intermediate and anterior lobes derive from PROP1-Expressing progenitors. Endocrinology, 157(4), 1385–1396. https://doi.org/10.1210/en.2015-1862

Davis, S., Ware, M. A., Zeiger, J., Deardorff, M. A., Grand, K., Grimberg, A., Hsu, S., Kelsey, M., Majidi, S., Matthew, R. P., Napier, M., Nokoff, N., Prasad, C., Riggs, A. C., McKinnon, M. L., & Mirzaa, G. (2019). Growth hormone deficiency in megalencephaly‐capillary malformation syndrome: An association with activating mutations in PIK3CA. American Journal of Medical Genetics Part A, 182(1), 162–168. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61403

DDD Study (2017). Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. Nature, 542(7642), 433–438. https://doi.org/10.1038/nature21062

Del Blanco, D. G., De Graaff, L. C. G., Posthouwer, D., Visser, T. J., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2011). Isolated GH deficiency: mutation screening and copy number analysis of HMGA2 and CDK6 genes. European Journal of Endocrinology, 165(4), 537–544. https://doi.org/10.1530/eje-11-0478

Del Blanco, D. G., De Graaff, L. C. G., Visser, T. J., & Hokken‐Koelega, A. C. S. (2012). Single‐nucleotide variants in two Hedgehog genes, SHH and HHIP, as genetic cause of combined pituitary hormone deficiency. Clinical Endocrinology, 78(3), 415–423. https://doi.org/10.1111/cen.12000 (a)

Del Blanco, D. G., Romero, C. J., Diaczok, D., De Graaff, L. C. G., Radovick, S., & Hokken-Koelega, A. C. S. (2012). A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. European Journal of Endocrinology, 167(3), 441–452. https://doi.org/10.1530/eje-12-0333 (b)

De Castro, V. F., Mattos, D., De Carvalho, F. M., Cavalcanti, D. P., Duenas-Roque, M. M., Llerena, J., Jr, Cosentino, V. R., Honjo, R. S., Leite, J. C. L., Sanseverino, M. T., De Souza, M. P. A., Bernardi, P., Bolognese, A. M., Da Silva, L. C. S., Barbero, P., Correia, P. S., Bueno, L. S. M., Savastano, C. P., & Orioli, I. M. (2021). New SHH and Known SIX3 Variants in a Series of Latin American Patients with Holoprosencephaly. Molecular Syndromology, 12(4), 219–233. https://doi.org/10.1159/000515044

De Fátima Borges, M., Teixeira, F. C. C., Feltrin, A. K., Ribeiro, K. A., Nascentes, G. a. N., Resende, E. a. M. R., Ferreira, B. P., Silva, A. P., & Palhares, H. M. C. (2016). Clonidine-stimulated growth hormone concentrations (cut-off values) measured by immunochemiluminescent assay (ICMA) in children and adolescents with short stature. Clinics, 71(4), 226–231. https://doi.org/10.6061/clinics/2016(04)09

De Jesus, L. W. O., Chehade, C., Costa, F. G., & Borella, M. I. (2013). Pituitary gland morphogenesis and ontogeny of adenohypophyseal cells of Salminus brasiliensis (Teleostei, Characiformes). Fish Physiology and Biochemistry. https://doi.org/10.1007/s10695-013-9895-2

De Sainte Agathe, J., Filser, M., Isidor, B., Besnard, T., Gueguen, P., Perrin, A., Van Goethem, C., Verebi, C., Masingue, M., Rendu, J., Cossée, M., Bergougnoux, A., Frobert, L., Buratti, J., Lejeune, É., Guern, É. L., Pasquier, F., Clot, F., Kalatzis, V., . . . Baux, D. (2023). SpliceAI-visual: a free online tool to improve SpliceAI splicing variant interpretation. Human Genomics, 17(1). https://doi.org/10.1186/s40246-023-00451-1

Descartes, M., Hain, J. Z., Conklin, M., Franklin, J., Mikhail, F. M., Lachman, R. S., Nolet, S., & Messiaen, L. M. (2008). Molecular characterization of a patient with an interstitial 1q deletion [del(1)(q24.1q25.3)] and distinctive skeletal abnormalities. American Journal of Medical Genetics Part A, 146A(22), 2937–2943. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32550

Devillard, F., Guinchat, V., Moreno-De-Luca, D., Tabet, A., Gruchy, N., Guillem, P., Morel, M. N., Leporrier, N., Leboyer, M., Jouk, P., Lespinasse, J., & Betancur, C. (2010). Paracentric inversion of chromosome 2 associated with cryptic duplication of 2q14 and deletion of 2q37 in a patient with autism. American Journal of Medical Genetics Part A, 152A(9), 2346–2354. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33601

Dimitrov, D., Schäfer, P. S. L., Farr, E., Rodriguez-Mier, P., Lobentanzer, S., Badia-I-Mompel, P., Dugourd, A., Tanevski, J., Flores, R. O. R., & Saez-Rodriguez, J. (2024). LIANA+ provides an all-in-one framework for cell–cell communication inference. Nature Cell Biology, 26(9), 1613–1622. https://doi.org/10.1038/s41556-024-01469-w

Divyasri, N., Javid, J., Kunnuru, S., & Anne, B. (2024). Focal dermal hypoplasia (Goltz syndrome) with concurrent growth hormone deficiency and response to therapy. BMJ Case Reports, 17(11), e260377. https://doi.org/10.1136/bcr-2024-260377

Dobolyi, A., Oláh, S., Keller, D., Kumari, R., Fazekas, E. A., Csikós, V., Renner, É., & Cservenák, M. (2020). Secretion and function of pituitary prolactin in evolutionary perspective. Frontiers in Neuroscience, 14. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00621

Dodé, C., Levilliers, J., Dupont, J., De Paepe, A., Dû, N. L., Soussi-Yanicostas, N., Coimbra, R. S., Delmaghani, S., Compain-Nouaille, S., Baverel, F., Pêcheux, C., Tessier, D. L., Cruaud, C., Delpech, M., Speleman, F., Vermeulen, S., Amalfitano, A., Bachelot, Y., Bouchard, P., . . . Hardelin, J. (2003). Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. Nature Genetics, 33(4), 463–465. https://doi.org/10.1038/ng1122

Dolek-Cetinkaya, D., Demirpence, M., Gorgel, A., Salgur, F., & Bahceci, M. (2013). A rare association of monosomy 18P syndrome and polyglandular autoimmune syndrome type IIIA. Balkan Journal of Medical Genetics, 16(1), 81–83. https://doi.org/10.2478/bjmg-2013-0023

Dostal, A., Nemeckova, J., & Gaillyova, R. (2009). The 18q deletion syndrome and analysis of the critical region for orofacial cleft at 18q22.3. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 37(5), 272–275. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2008.12.002

Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., Neuhauss, S. C., Malicki, J., Stemple, D. L., Stainier, D. Y., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J., & Boggs, C. (1996). A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. Zurich Open Repository and Archive (University of Zurich), 123, 37–46. https://doi.org/10.1242/dev.123.1.37

Duclaux-Loras, R., Bourgeois, P., Lavrut, P., Charbit-Henrion, F., Bonniaud-Blot, P., Maudinas, R., Bournez, M., Faure, M., Cerf-Bensussan, N., Lachaux, A., Peretti, N., & Fabre, A. (2021). A novel mutation of PCSK1 responsible for PC1/3 deficiency in two siblings. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 45(6), 101640. https://doi.org/10.1016/j.clinre.2021.101640

Durmaz, C. D., Altıner, Ş., Taşdelen, E., Karabulut, H. G., & Ruhi, H. I. (2020). Extending phenotypic spectrum of 17Q22 microdeletion: growth hormone deficiency. Fetal and Pediatric Pathology, 40(5), 486–492. https://doi.org/10.1080/15513815.2019.1710789

Dutta, S., Dietrich, J., Westerfield, M., & Varga, Z. M. (2008). Notch signaling regulates endocrine cell specification in the zebrafish anterior pituitary. Developmental Biology, 319(2), 248–257. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.04.019

Ellsworth, B. S., Egashira, N., Haller, J. L., Butts, D. L., Cocquet, J., Clay, C. M., Osamura, R. Y., & Camper, S. A. (2006). FOXL2 in the Pituitary: Molecular, Genetic, and Developmental analysis. Molecular Endocrinology, 20(11), 2796–2805. https://doi.org/10.1210/me.2005-0303

El-Nahry, Y. H., Bardinet, V., Bührer, C., & Henrich, W. (2024). Novel homozygous mutation in the human RAX homeobox gene in a patient with bilateral anophthalmia and severe endocrine dysfunction – a case report and literature review. Case Reports in Perinatal Medicine, 13(1). https://doi.org/10.1515/crpm-2024-0018

Ertl, D., De Nanclares, G. P., Jüppner, H., Hanna, P., Pagnano, A., Pereda, A., Rothenbuhler, A., Del Sindaco, G., Ruiz-Cuevas, P., Audrain, C., Escribano, A., Berkenou, J., Gleiss, A., Mantovani, G., & Linglart, A. (2023). Recombinant growth hormone improves growth and adult height in patients with maternal inactivating GNAS mutations. European Journal of Endocrinology, 189(1), 123–131. https://doi.org/10.1093/ejendo/lvad085

Esposito, V., Lettiero, T., Fecarotta, S., Sebastio, G., Parenti, G., & Salerno, M. (2006). Growth hormone deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance. European Journal of Pediatrics, 165(11), 763–766. https://doi.org/10.1007/s00431-006-0170-8

Fabian, P., Tseng, K., Smeeton, J., Lancman, J. J., Dong, P. D. S., Cerny, R., & Crump, J. G. (2020). Lineage analysis reveals an endodermal contribution to the vertebrate pituitary. Science, 370(6515), 463–467. https://doi.org/10.1126/science.aba4767

Faienza, M. F., Meliota, G., Mentino, D., Ficarella, R., Gentile, M., Vairo, U., & D'amato, G. (2024). Cardiac phenotype and gene mutations in RASopathies. Genes, 15(8), 1015. https://doi.org/10.3390/genes15081015

Falcon-Rodriguez, T., Solano, N., & Diaz, A. (2024). 6369 Weiss-Kruszka Syndrome and growth hormone deficiency, adrenal insufficiency, and morbid obesity. Journal of the Endocrine Society, 8(Supplement_1). https://doi.org/10.1210/jendso/bvae163.1532

Fan, J., Zhou, J., Lin, D., Guo, Y., Li, S., Zhang, S., Liang, L., & Yan, L. (2020). Partial trisomy 9p and 14q microduplication in a patient with growth retardation: a case report and review of the literature.

Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 33(3), 431–436. https://doi.org/10.1515/jpem-2019-0246

Fang, Q., George, A. S., Brinkmeier, M. L., Mortensen, A. H., Gergics, P., Cheung, L. Y. M., Daly, A. Z., Ajmal, A., Millán, M. I. P., Ozel, A. B., Kitzman, J. O., Mills, R. E., Li, J. Z., & Camper, S. A. (2016). Genetics of Combined Pituitary Hormone Deficiency: Roadmap into the Genome Era. Endocrine Reviews, 37(6), 636–675. https://doi.org/10.1210/er.2016-1101

Fang, X., Zhang, Y., Cai, J., Lu, T., Hu, J., Yuan, F., & Chen, P. (2020). Identification of novel candidate pathogenic genes in pituitary stalk interruption syndrome by whole-exome sequencing. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 24(20), 11703–11717. https://doi.org/10.1111/jcmm.15781

Fazel, A., Kashef, S., Aleyasin, S., Harsini, S., Karamizadeh, Z., Zoghi, S., Flores, S., Boztug, K., & Rezaei, N. (2016). Novel AICDA mutation in a case of autosomal recessive hyper-IgM syndrome, growth hormone deficiency and autoimmunity. Allergologia Et Immunopathologia, 45(1), 82–86. https://doi.org/10.1016/j.aller.2016.08.005

Ferreira, N. G. B. P., Madeira, J. L. O., Gergics, P., Kertsz, R., Marques, J. M., Trigueiro, N. S. S., Benedetti, A. F. F., Azevedo, B. V., Fernandes, B. H. V., Bissegatto, D. D., Biscotto, I. P., Fang, Q., Ma, Q., Ozel, A. B., Li, J., Camper, S. A., Jorge, A. a. L., Mendonça, B. B., Arnhold, I. J. P., & Carvalho, L. R. (2023). Homozygous CDH2 variant may be associated with hypopituitarism without neurological disorders. Endocrine Connections, 12(8). https://doi.org/10.1530/ec-22-0473

Filges, I., Bischof-Renner, A., Röthlisberger, B., Potthoff, C., Glanzmann, R., Günthard, J., Schneider, J., Huber, A. R., Zumsteg, U., Miny, P., & Szinnai, G. (2012). Panhypopituitarism presenting as Life-Threatening heart failure caused by an inherited microdeletion in 1Q25 including LHX4. PEDIATRICS, 129(2), e529–e534. https://doi.org/10.1542/peds.2010-3849

Flanagan, N., Healy, E., Ray, A., Philips, S., Todd, C., Jackson, I. J., Birch-Machin, M. A., & Rees, J. L. (2000). Pleiotropic effects of the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene on human pigmentation. Human Molecular Genetics, 9(17), 2531–2537. https://doi.org/10.1093/hmg/9.17.2531

Flasse, L. C., Stern, D. G., Pirson, J. L., Manfroid, I., Peers, B., & Voz, M. L. (2013). The bHLH transcription factor Ascl1a is essential for the specification of the intestinal secretory cells and mediates Notch signaling in the zebrafish intestine. Developmental Biology, 376(2), 187–197. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2013.01.011

Flyvbjerg, A., Dørup, I., Everts, M. E., & Ørskov, H. (1991). Evidence that potassium deficiency induces growth retardation through reduced circulating levels of growth hormone and insulin-like growth factor I. Metabolism, 40(8), 769–775. https://doi.org/10.1016/0026-0495(91)90001-d

Foryś-Dworniczak, E., Zajdel-Cwynar, O., Kalina-Faska, B., Małecka-Tendera, E., & Matusik, P. (2019). Trichorhinophalangeal syndrome as a diagnostic and therapeutic challenge for paediatric endocrinologists. Pediatric Endocrinology Diabetes and Metabolism, 25(1), 41–47. https://doi.org/10.5114/pedm.2019.84708

Forzano, F., Napoli, F., Uliana, V., Malacarne, M., Viaggi, C., Bloise, R., Coviello, D., Di Maria, E., Olivieri, I., Di Iorgi, N., & Faravelli, F. (2012). 19q13 microdeletion syndrome: Further refining the critical region. European Journal of Medical Genetics, 55(6–7), 429–432. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2012.03.002

França, M. M., Jorge, A. a. L., Alatzoglou, K. S., Carvalho, L. R. S., Mendonca, B. B., Audi, L., Carrascosa, A., Dattani, M. T., & Arnhold, I. J. P. (2011). Absence of GH-Releasing Hormone (GHRH) Mutations in Selected Patients with Isolated GH Deficiency. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 96(9), E1457–E1460. https://doi.org/10.1210/jc.2011-0170

Franciskovich, R., Soler-Alfonso, C., Neira-Fresneda, J., Lupski, J. R., McCann-Crosby, B., & Potocki, L. (2020). Short stature and growth hormone deficiency in a subset of patients with Potocki–Lupski syndrome: Expanding the phenotype of PTLS. American Journal of Medical Genetics Part A, 182(9), 2077–2084. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61741

Gage, P. J., & Camper, S. A. (1997). Pituitary homeobox 2, a novel member of the bicoid-related family of homeobox genes, is a potential regulator of anterior structure formation. Human Molecular Genetics, 6(3), 457–464. https://doi.org/10.1093/hmg/6.3.457

Galazzi, E., Duminuco, P., Moro, M., Guizzardi, F., Marazzi, N., Sartorio, A., Avignone, S., Bonomi, M., Persani, L., & Bonati, M. T. (2018). Hypogonadotropic hypogonadism and pituitary hypoplasia as recurrent features in Ulnar-Mammary syndrome. Endocrine Connections, 7(12), 1432–1441. https://doi.org/10.1530/ec-18-0486

Gao, Y., Du, Q., Liu, L., & Liao, Z. (2021). Serum inhibin B for differentiating between congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty: a systematic review and meta-analysis. Endocrine, 72(3), 633–643. https://doi.org/10.1007/s12020-020-02582-0

García, M., De Buitrago, J. G., Jiménez-Rosés, M., Pardo, L., Hinkle, P. M., & Moreno, J. C. (2017). Central hypothyroidism due to a TRHR mutation causing impaired ligand affinity and transactivation of GQ. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 102(7), 2433–2442. https://doi.org/10.1210/jc.2016-3977 (a)

García, M., Barrio, R., García-Lavandeira, M., Garcia-Rendueles, A. R., Escudero, A., Díaz-Rodríguez, E., Del Blanco, D. G., Fernández, A., De Rijke, Y. B., Vallespín, E., Nevado, J., Lapunzina, P., Matre, V., Hinkle, P. M., Hokken-Koelega, A. C. S., De Miguel, M. P., Cameselle-Teijeiro, J. M., Nistal, M., Alvarez, C. V., & Moreno, J. C. (2017b). The syndrome of central hypothyroidism and macroorchidism: IGSF1 controls TRHR and FSHB expression by differential modulation of pituitary TGFβ and Activin pathways. Scientific Reports, 7(1). https://doi.org/10.1038/srep42937 (b)

Gaston-Massuet, C., McCabe, M. J., Scagliotti, V., Young, R. M., Carreno, G., Gregory, L. C., Jayakody, S. A., Pozzi, S., Gualtieri, A., Basu, B., Koniordou, M., Wu, C., Bancalari, R. E., Rahikkala, E., Veijola, R., Lopponen, T., Graziola, F., Turton, J., Signore, M., . . . Martinez-Barbera, J. P. (2016). Transcription factor 7-like 1 is involved in hypothalamo–pituitary axis development in mice and humans. Proceedings of the National Academy of Sciences, 113(5). https://doi.org/10.1073/pnas.1503346113

Gergics, P., Smith, C., Bando, H., Jorge, A. A., Rockstroh-Lippold, D., Vishnopolska, S. A., Castinetti, F., Maksutova, M., Carvalho, L. R. S., Hoppmann, J., Mayer, J. M., Albarel, F., Braslavsky, D., Keselman, A., Bergadá, I., Martí, M. A., Saveanu, A., Barlier, A., Jamra, R. A., . . . Camper, S. A. (2021). High-throughput splicing assays identify missense and silent splice-disruptive POU1F1 variants underlying pituitary hormone deficiency. The American Journal of Human Genetics, 108(8), 1526–1539. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.06.013

Geyer, S. H., Mohun, T. J., & Weninger, W. J. (2009). Visualizing Vertebrate Embryos with Episcopic 3D Imaging Techniques. The Scientific World JOURNAL, 9, 1423–1437. https://doi.org/10.1100/tsw.2009.154

Giordano, M., Gertosio, C., Pagani, S., Meazza, C., Fusco, I., Bozzola, E., & Bozzola, M. (2015). A 5.8 Mb interstitial deletion on chromosome Xq21.1 in a boy with intellectual disability, cleft palate, hearing impairment and combined growth hormone deficiency. BMC Medical Genetics, 16(1). https://doi.org/10.1186/s12881-015-0220-z

Giordano, M., Muratore, V., Babu, D., Meazza, C., & Bozzola, M. (2016). A 18p11.23-p11.31 microduplication in a boy with psychomotor delay, cerebellar vermis hypoplasia, chorioretinal coloboma, deafness and GH deficiency. Molecular Cytogenetics, 9(1). https://doi.org/10.1186/s13039-016-0298-9

Gippert, S., Wagner, M., Brunet, T., Berruti, R., Brugger, M., Schwaibold, E. M. C., Haack, T. B., Hoffmann, G. F., Bettendorf, M., & Choukair, D. (2023). Exome sequencing (ES) of a pediatric cohort with chronic endocrine diseases: a single-center study (within the framework of the TRANSLATE-NAMSE project). Endocrine, 85(1), 444–453. https://doi.org/10.1007/s12020-023-03581-7

Girós, A., Morante, J., Gil-Sanz, C., Fairén, A., & Costell, M. (2007). Perlecan controls neurogenesis in the developing telencephalon. BMC Developmental Biology, 7(1). https://doi.org/10.1186/1471-213x-7-29

Glynn, P. (2005). Neuropathy target esterase and phospholipid deacylation. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids, 1736(2), 87–93. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2005.08.002

Golan, M., Hollander-Cohen, L., & Levavi-Sivan, B. (2016). Stellate cell networks in the Teleost pituitary. Scientific Reports, 6(1). https://doi.org/10.1038/srep24426

Goldsmith, S., Lovell-Badge, R., & Rizzoti, K. (2016). SOX2 is sequentially required for progenitor proliferation and lineage specification in the developing pituitary. Development. https://doi.org/10.1242/dev.137984

Gonsalves, R., Aleck, K., Newbern, D., Shaibi, G., Kapadia, C., & Oatman, O. (2020). Severe early onset obesity and hypopituitarism in a child with a novel SIM1 gene mutation. Endocrinology Diabetes and Metabolism Case Reports, 2020. https://doi.org/10.1530/edm-20-0042

Goto, M., Mabe, H., Nishimura, G., & Katsumata, N. (2010). Progressive osseous heteroplasia caused by a novel nonsense mutation in the GNAS1 gene. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 23(3). https://doi.org/10.1515/jpem.2010.23.3.303

Grattan, D. R. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. Journal of Endocrinology, 226(2), T101–T122. https://doi.org/10.1530/joe-15-0213

Gregoric, N., Groselj, U., Bratina, N., Debeljak, M., Tansek, M. Z., Omladic, J. S., Kovac, J., Battelino, T., Kotnik, P., & Stefanija, M. A. (2021). Two cases with an early presented proopiomelanocortin Deficiency—A Long-Term Follow-Up and Systematic Literature review. Frontiers in Endocrinology, 12. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.689387

Gregory, L., Gaston‐Massuet, C., Andoniadou, C., Carreno, G., Webb, E., Kelberman, D., McCabe, M., Panagiotakopoulos, L., Saldanha, J., Spoudeas, H., Torpiano, J., Rossi, M., Raine, J., Canham, N., Martinez‐Barbera, J., & Dattani, M. (2014). The role of the sonic hedgehog signalling pathway in patients with midline defects and congenital hypopituitarism. Clinical Endocrinology, 82(5), 728–738. https://doi.org/10.1111/cen.12637

Gregory, L. C., Shah, P., Sanner, J. R. F., Arancibia, M., Hurst, J., Jones, W. D., Spoudeas, H., Stabej, P. L. Q., Williams, H. J., Ocaka, L. A., Loureiro, C., Martinez-Aguayo, A., & Dattani, M. T. (2019). Mutations in MAGEL2 and L1CAM are associated with congenital hypopituitarism and arthrogryposis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 104(12), 5737–5750. https://doi.org/10.1210/jc.2019-00631

Gregory, L. C., Cionna, C., Cerbone, M., & Dattani, M. T. (2023). Identification of genetic variants and phenotypic characterization of a large cohort of patients with congenital hypopituitarism and related disorders. Genetics in Medicine, 25(9), 100881. https://doi.org/10.1016/j.gim.2023.100881

Griffero, M., Benedetti, A. F. F., Pérez, M., Carvalho, L., Jorge, A., Latronico, A. C., Mendonca, B., Arnhold, I., & Mericq, V. (2022). Novel OTX2 loss of function variant associated with congenital hypopituitarism without eye abnormalities. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 35(6), 831–835. https://doi.org/10.1515/jpem-2021-0719

Grigori, P., Panayiotou, E., Sismani, C., Koumbaris, G., Ioannides, M., Costalos, C., Kosmaidou-Aravidou, Z., Kousoulidou, L., & Patsalis, P. C. (2011). 21 Mb deletion in chromosome band 13q22.2q32.1 associated with mild/moderate psychomotor retardation, growth hormone insufficiency, short neck, micrognathia, hypotonia, dysplastic ears and other dysmorphic features. European Journal of Medical Genetics, 54(3), 365–368. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2011.02.006

Gualtieri, A., Kyprianou, N., Gregory, L. C., Vignola, M. L., Nicholson, J. G., Tan, R., Inoue, S., Scagliotti, V., Casado, P., Blackburn, J., Abollo-Jimenez, F., Marinelli, E., Besser, R. E. J., Högler, W., Temple, I. K., Davies, J. H., Gagunashvili, A., Robinson, I. C., Camper, S. A., . . . Gaston-Massuet, C. (2021). Activating mutations in BRAF disrupt the hypothalamo-pituitary axis leading to hypopituitarism in mice and humans. Nature Communications, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-21712-4

Guo, Q., Wang, C., Wu, Z., Qin, Y., Han, B., Wang, A., Wang, B., Dou, J., Wu, X., & Mu, Y. (2017). Multi‐genic pattern found in rare type of hypopituitarism: a whole‐exome sequencing study of Han Chinese with pituitary stalk interruption syndrome. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 21(12), 3626–3632. https://doi.org/10.1111/jcmm.13272

Guo, Y., Ma, L., Cristofanilli, M., Hart, R., Hao, A., & Schachner, M. (2010). Transcription factor Sox11b is involved in spinal cord regeneration in adult zebrafish. Neuroscience, 172, 329–341. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.026

Guo, D., Regalado, E. S., Pinard, A., Chen, J., Lee, K., Rigelsky, C., Zilberberg, L., Hostetler, E. M., Aldred, M., Wallace, S. E., Prakash, S. K., Leal, S. M., Bamshad, M. J., Nickerson, D. A., Natowicz, M., Rifkin, D. B., & Milewicz, D. M. (2018). LTBP3 pathogenic variants predispose individuals to thoracic aortic aneurysms and dissections. The American Journal of Human Genetics, 102(4), 706–712. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.03.002

Gutiérrez, M., Scaglia, P., Keselman, A., Martucci, L., Karabatas, L., Domené, S., Martin, A., Pennisi, P., Blanco, M., Sanguineti, N., Bezrodnik, L., Di Giovanni, D., Caldirola, M. S., Azcoiti, M. E., Gaillard, M. I., Denson, L. A., Zhang, K., Husami, A., Jones, N. Y., . . . Domené, H. (2018). Partial growth hormone insensitivity and dysregulatory immune disease associated with de novo germline activating STAT3 mutations. Molecular and Cellular Endocrinology, 473, 166–177. https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.016

Guzzetti, C., Ibba, A., Pilia, S., Beltrami, N., Di Iorgi, N., Rollo, A., Fratangeli, N., Radetti, G., Zucchini, S., Maghnie, M., Cappa, M., & Loche, S. (2016). Cut-off limits of the peak GH response to stimulation tests for the diagnosis of GH deficiency in children and adolescents: study in patients with organic GHD. European Journal of Endocrinology, 175(1), 41–47. https://doi.org/10.1530/eje-16-0105

Gyuricsko, E. (2020). The “slightly” abnormal thyroid test: What is the pediatrician to do? Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care, 50(3), 100770. https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2020.100770

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. A., Odenthal, J., Van Eeden, F. J. M., Jiang, Y., Heisenberg, C., Kelsh, R. N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., & Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and

essential functions in the development of the zebrafish, Danio rerio. Development, 123(1), 1–36. https://doi.org/10.1242/dev.123.1.1

Halloun, R., Habib, C., Ekhilevitch, N., Weiss, R., Tiosano, D., & Cohen, M. (2021). Expanding the spectrum of endocrinopathies identified in Schaaf-Yang syndrome - A case report and review of the literature. European Journal of Medical Genetics, 64(8), 104252. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2021.104252

Hamdan, F. F., Daoud, H., Rochefort, D., Piton, A., Gauthier, J., Langlois, M., Foomani, G., Dobrzeniecka, S., Krebs, M., Joober, R., Lafrenière, R. G., Lacaille, J., Mottron, L., Drapeau, P., Beauchamp, M. H., Phillips, M. S., Fombonne, E., Rouleau, G. A., & Michaud, J. L. (2010). De Novo Mutations in FOXP1 in Cases with Intellectual Disability, Autism, and Language Impairment. The American Journal of Human Genetics, 87(5), 671–678. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.017

Hamid, R., Patterson, J., & Brandt, S. (2008). Genomic structure, alternative splicing and expression of TG-interacting factor, in human myeloid leukemia blasts and cell lines. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, 1779(5), 347–355. https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2008.04.003

Han, Y., Leaman, D. W., Watling, D., Rogers, N. C., Groner, B., Kerr, I. M., Wood, W. I., & Stark, G. R. (1996). Participation of JAK and STAT proteins in growth hormone-induced signaling. Journal of Biological Chemistry, 271(10), 5947–5952. https://doi.org/10.1074/jbc.271.10.5947

Harris, S. (2002). Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. Molecular Human Reproduction, 8(8), 729–733. https://doi.org/10.1093/molehr/8.8.729

Hata, K., Takashima, R., Amano, K., Ono, K., Nakanishi, M., Yoshida, M., Wakabayashi, M., Matsuda, A., Maeda, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., Whitson, R. H., Nishimura, R., & Yoneda, T. (2013). Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9-regulated genes. Nature Communications, 4(1). https://doi.org/10.1038/ncomms3850

He, D., Li, Y., Yang, W., Chen, S., Sun, H., Li, P., Zhang, M., & Ban, B. (2021). Molecular diagnosis for growth hormone deficiency in Chinese children and adolescents and evaluation of impact of rare genetic variants on treatment efficacy of growth hormone. Clinica Chimica Acta, 524, 1–10. https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.11.021

Heinen, C. A., Losekoot, M., Sun, Y., Watson, P. J., Fairall, L., Joustra, S. D., Zwaveling-Soonawala, N., Oostdijk, W., Van Den Akker, E. L. T., Alders, M., Santen, G. W. E., Van Rijn, R. R., Dreschler, W. A., Surovtseva, O. V., Biermasz, N. R., Hennekam, R. C., Wit, J. M., Schwabe, J. W. R., Boelen, A., . . . Van Trotsenburg, A. S. P. (2016). Mutations in TBL1X are associated with central hypothyroidism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 101(12), 4564–4573. https://doi.org/10.1210/jc.2016-2531

Heinen, C. A., De Vries, E. M., Alders, M., Bikker, H., Zwaveling-Soonawala, N., Van Den Akker, E. L. T., Bakker, B., Hoorweg-Nijman, G., Roelfsema, F., Hennekam, R. C., Boelen, A., Van Trotsenburg, A. S. P., & Fliers, E. (2018). Mutations in IRS4 are associated with central hypothyroidism. Journal of Medical Genetics, 55(10), 693–700. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-105113

Helbig, K. L., Lauerer, R. J., Bahr, J. C., Souza, I. A., Myers, C. T., Uysal, B., Schwarz, N., Gandini, M. A., Huang, S., Keren, B., Mignot, C., Afenjar, A., De Villemeur, T. B., Héron, D., Nava, C., Valence, S., Buratti, J., Fagerberg, C. R., Soerensen, K. P., . . . Wiener, J. (2018). De Novo Pathogenic Variants in CACNA1E Cause Developmental and Epileptic Encephalopathy with Contractures, Macrocephaly, and Dyskinesias. The American Journal of Human Genetics, 103(5), 666–678. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.09.006

Hempel, A., Pagnamenta, A. T., Blyth, M., Mansour, S., McConnell, V., Kou, I., Ikegawa, S., Tsurusaki, Y., Matsumoto, N., Lo-Castro, A., Plessis, G., Albrecht, B., Battaglia, A., Taylor, J. C., Howard, M. F., Keays, D., Sohal, A. S., Kühl, S. J., Kini, U., & McNeill, A. (2015). Deletions and de novo mutations of *SOX11* are associated with a neurodevelopmental disorder with features of Coffin–Siris syndrome. Journal of Medical Genetics, 53(3), 152–162. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103393

Hergott-Faure, L., Borot, S., Kleinclauss, C., Abitbol, M., & Penfornis, A. (2012). Pituitary function and glucose tolerance in a family with a PAX6 mutation. Annales D Endocrinologie, 73(6), 510–514. https://doi.org/10.1016/j.ando.2012.10.001

Herzog, W., Zeng, X., Lele, Z., Sonntag, C., Ting, J., Chang, C., & Hammerschmidt, M. (2003). Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. Developmental Biology, 254(1), 36–49. https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00124-0

Herzog, W., Sonntag, C., Von Der Hardt, S., Roehl, H. H., Varga, Z. M., & Hammerschmidt, M. (2004). Fgf3 signaling from the ventral diencephalon is required for early specification and subsequent survival of the zebrafish adenohypophysis. Development, 131(15), 3681–3692. https://doi.org/10.1242/dev.01235

Hibino, H., Pironkova, R., Onwumere, O., Vologodskaia, M., Hudspeth, A., & Lesage, F. (2002). RIM binding proteins (RBPs) couple RAB3-Interacting molecules (RIMs) to Voltage-Gated CA2+ channels. Neuron, 34(3), 411–423. https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00667-0

Hietamäki, J., Gregory, L. C., Ayoub, S., Iivonen, A., Vaaralahti, K., Liu, X., Brandstack, N., Buckton, A. J., Laine, T., Känsäkoski, J., Hero, M., Miettinen, P. J., Varjosalo, M., Wakeling, E., Dattani, M. T., & Raivio, T. (2020). Loss-of-Function variants in TBC1D32 underlie syndromic hypopituitarism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 105(6), 1748–1758. https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa078

Higa, M., Zaha, A., Takushi, A., Morishima, N., Majikina, T., Touma, T., Shimabukuro, M., Masuzaki, H., Honda, M., & Hasegawa, T. (2021). Novel STAR gene variant in a patient with classic lipoid congenital adrenal hyperplasia and combined pituitary hormone deficiency. Human Genome Variation, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41439-021-00138-w

Horn, D., Kapeller, J., Rivera-Brugués, N., Moog, U., Lorenz-Depiereux, B., Eck, S., Hempel, M., Wagenstaller, J., Gawthrope, A., Monaco, A. P., Bonin, M., Riess, O., Wohlleber, E., Illig, T., Bezzina, C. R., Franke, A., Spranger, S., Villavicencio-Lorini, P., Seifert, W., . . . Strom, T. M. (2010). Identification of FOXP1 deletions in three unrelated patients with mental retardation and significant speech and language deficits. Human Mutation, 31(11), E1851–E1860. https://doi.org/10.1002/humu.21362

Hsu, S. C., Bartz, S., Pyle, L., Fete, M., Davis, S., Ohman‐Hanson, R., Fete, T. J., & Motil, K. J. (2019). Growth failure in focal dermal hypoplasia. American Journal of Medical Genetics Part A, 179(4), 628–633. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61051

Hu, F., & Sun, L. (2019). Recognizable type of pituitary, heart, kidney and skeletal dysplasia mostly caused by SEMA3A mutation: A case report. World Journal of Clinical Cases, 7(20), 3310–3315. https://doi.org/10.12998/wjcc.v7.i20.3310

Huang, K., Dai, Y., Zhang, J., Zhang, L., Wu, W., Dong, G., Ullah, R., Fei, Y., & Fu, J. (2019). Gitelman syndrome combined with growth hormone deficiency. Medicine, 98(40), e17244. https://doi.org/10.1097/md.0000000000017244

Huang, L., Yang, Z., Kirschke, C. P., Prouteau, C., Copin, M., Bonneau, D., Pellier, I., Coutant, R., Miot, C., & Ziegler, A. (2023). Identification of novel compound heterozygous variants in the SLC30A7

(ZNT7) gene in two French brothers with stunted growth, testicular hypoplasia and bone marrow failure. Human Molecular Genetics, 32(12), 2016–2031. https://doi.org/10.1093/hmg/ddad033

Huh, R., Cho S.Y., Kim J., Ki C.S., Jin D.K. (2015) Letter to the Editor: A Novel Mutation in the CREBBP Gene of a Korean Girl with Rubinstein-Taybi syndrome Annals of Clinical and Laboratory Science, Summer 45(4):458-61. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26275701/

Humbert, J., Salian, S., Makrythanasis, P., Lemire, G., Rousseau, J., Ehresmann, S., Garcia, T., Alasiri, R., Bottani, A., Hanquinet, S., Beaver, E., Heeley, J., Smith, A. C., Berger, S. I., Antonarakis, S. E., Yang, X., Côté, J., & Campeau, P. M. (2020). De Novo KAT5 Variants Cause a Syndrome with Recognizable Facial Dysmorphisms, Cerebellar Atrophy, Sleep Disturbance, and Epilepsy. The American Journal of Human Genetics, 107(3), 564–574. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2020.08.002

Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. Journal of Molecular Graphics, 14(1), 33–38. https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5

Ikeda, H., Suzuki, J., Sasano, N., & Niizuma, H. (1988). The development and morphogenesis of the human pituitary gland. Anatomy and Embryology, 178(4), 327–336. https://doi.org/10.1007/bf00698663

Ilias, C., Evgenia, B., Aikaterini, P., Asimina, G., Constantina, S., Maria, L., George, M., Paraskevi, K., Christos, T., Zissis, M., & Nikolaos, N. (2015). Netherton Syndrome in a Neonate with Possible Growth Hormone Deficiency and Transient Hyperaldosteronism. Case Reports in Pediatrics, 2015, 1–4. https://doi.org/10.1155/2015/818961

Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., & Kageyama, R. (2010). Essential roles of notch signaling in maintenance of neural stem cells in developing and adult brains. Journal of Neuroscience, 30(9), 3489–3498. https://doi.org/10.1523/jneurosci.4987-09.2010

Iwafuchi-Doi, M., Matsuda, K., Murakami, K., Niwa, H., Tesar, P. J., Aruga, J., Matsuo, I., & Kondoh, H. (2012). Transcriptional regulatory networks in epiblast cells and during anterior neural plate development as modeled in epiblast stem cells. Development, 139(21), 3926–3937. https://doi.org/10.1242/dev.085936

Jabbour, S., & Harissi-Dagher, M. (2016). Recessive mutation in a Nuclear-Encoded mitochondrial TRNA synthetase associated with infantile cataract, congenital neurotrophic keratitis, and orbital myopathy. Cornea, 35(6), 894–896. https://doi.org/10.1097/ico.0000000000000847

Jackowski, T., Petriczko, E., Horodnicka-Jozwa, A., Biczysko-Mokosa, A., Szalecki, M., & Walczak, M. (2019). Growth hormone treatment in a patient with deletion of the long arm of chromosome 18: An 8-year observation. PubMed, 40(4), 169–174. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32087092

Jacob, J., Storm, R., Castro, D. S., Milton, C., Pla, P., Guillemot, F., Birchmeier, C., & Briscoe, J. (2009). Insm1 (IA-1) is an essential component of the regulatory network that specifies monoaminergic neuronal phenotypes in the vertebrate hindbrain. Development, 136(14), 2477–2485. https://doi.org/10.1242/dev.034546

Jaganathan, K., Panagiotopoulou, S. K., McRae, J. F., Darbandi, S. F., Knowles, D., Li, Y. I., Kosmicki, J. A., Arbelaez, J., Cui, W., Schwartz, G. B., Chow, E. D., Kanterakis, E., Gao, H., Kia, A., Batzoglou, S., Sanders, S. J., & Farh, K. K. (2019). Predicting Splicing from Primary Sequence with Deep Learning. Cell, 176(3), 535-548.e24. https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.015

Jagtap, V. S., Acharya, S. V., Sarathi, V., Lila, A. R., Budyal, S. R., Kasaliwal, R., Sankhe, S. S., Bandgar, T. R., Menon, P. S., & Shah, N. S. (2011). Ectopic posterior pituitary and stalk abnormality predicts severity and coexisting hormone deficiencies in patients with congenital growth hormone deficiency. Pituitary, 15(2), 243–250. https://doi.org/10.1007/s11102-011-0321-4

Jamsheer, A., Olech, E. M., Kozłowski, K., Niedziela, M., Sowińska-Seidler, A., Obara-Moszyńska, M., Latos-Bieleńska, A., Karczewski, M., & Zemojtel, T. (2016). Exome sequencing reveals two novel compound heterozygous XYLT1 mutations in a Polish patient with Desbuquois dysplasia type 2 and growth hormone deficiency. Journal of Human Genetics, 61(7), 577–583. https://doi.org/10.1038/jhg.2016.30

Jee, Y. H., Gangat, M., Yeliosof, O., Temnycky, A. G., Vanapruks, S., Whalen, P., Gourgari, E., Bleach, C., Yu, C. H., Marshall, I., Yanovski, J. A., Link, K., Ten, S., Baron, J., & Radovick, S. (2021). Evidence that the etiology of congenital hypopituitarism has a major genetic component but is infrequently monogenic. Frontiers in Genetics, 12. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.697549

Jin, W., Chang, M., & Sun, S. (2012). Peli: a family of signal-responsive E3 ubiquitin ligases mediating TLR signaling and T-cell tolerance. Cellular and Molecular Immunology, 9(2), 113–122. https://doi.org/10.1038/cmi.2011.60

Jin, S., Guerrero-Juarez, C. F., Zhang, L., Chang, I., Ramos, R., Kuan, C., Myung, P., Plikus, M. V., & Nie, Q. (2021). Inference and analysis of cell-cell communication using CellChat. Nature Communications, 12(1). https://doi.org/10.1038/s41467-021-21246-9

Jones, B., Su, H., Bhat, A., Lei, H., Bajko, J., Hevi, S., Baltus, G. A., Kadam, S., Zhai, H., Valdez, R., Gonzalo, S., Zhang, Y., Li, E., & Chen, T. (2008). The Histone H3K79 methyltransferase DOT1L is essential for mammalian development and heterochromatin structure. PLoS Genetics, 4(9), e1000190. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000190

Joustra, S. D., Van Trotsenburg, A. S. P., Sun, Y., Losekoot, M., Bernard, D. J., Biermasz, N. R., Oostdijk, W., & Wit, J. M. (2013). IGSF1 deficiency syndrome. Rare Diseases, 1(1), e24883. https://doi.org/10.4161/rdis.24883 (a)

Joustra, S. D., Schoenmakers, N., Persani, L., Campi, I., Bonomi, M., Radetti, G., Beck-Peccoz, P., Zhu, H., Davis, T. M. E., Sun, Y., Corssmit, E. P., Appelman-Dijkstra, N. M., Heinen, C. A., Pereira, A. M., Varewijck, A. J., Janssen, J. a. M. J. L., Endert, E., Hennekam, R. C., Lombardi, M. P., . . . Van Trotsenburg, A. S. P. (2013). The IGSF1 Deficiency Syndrome: Characteristics of male and female patients. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 98(12), 4942–4952. https://doi.org/10.1210/jc.2013-2743 (b)

Junghans, D., & Herzog, S. (2017). Cnn3 regulates neural tube morphogenesis and neuronal stem cell properties. FEBS Journal, 285(2), 325–338. https://doi.org/10.1111/febs.14338

Kalina, M., Kalina‐Faska, B., Paprocka, J., Jamroz, E., Pyrkosz, A., Marszał, E., & Małecka‐Tendera, E. (2010). Do children with Adams‐Oliver syndrome require endocrine follow‐up? New information on the phenotype and management. Clinical Genetics, 78(3), 227–235. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2010.01470.x

Kang, S., Graham, J. M., Olney, A. H., & Biesecker, L. G. (1997). GLI3 frameshift mutations cause autosomal dominant Pallister-Hall syndrome. Nature Genetics, 15(3), 266–268. https://doi.org/10.1038/ng0397-266

Kapali, J., Kabat, B. E., Schmidt, K. L., Stallings, C. E., Tippy, M., Jung, D. O., Edwards, B. S., Nantie, L. B., Raeztman, L. T., Navratil, A. M., & Ellsworth, B. S. (2016). Foxo1 is required for normal somatotrope differentiation. Endocrinology, 157(11), 4351–4363. https://doi.org/10.1210/en.2016-1372

Karaca, E., Buyukkaya, R., Pehlivan, D., Charng, W., Yaykasli, K. O., Bayram, Y., Gambin, T., Withers, M., Atik, M. M., Arslanoglu, I., Bolu, S., Erdin, S., Buyukkaya, A., Yaykasli, E., Jhangiani, S. N., Muzny, D. M., Gibbs, R. A., & Lupski, J. R. (2014). Whole-Exome Sequencing Identifies

Homozygous GPR161 Mutation in a Family with Pituitary Stalk Interruption Syndrome. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 100(1), E140–E147. https://doi.org/10.1210/jc.2014-1984

Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., Solomonson, M., Watts, N. A., Rhodes, D., Singer-Berk, M., England, E. M., Seaby, E. G., Kosmicki, J. A., . . . MacArthur, D. G. (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. Nature, 581(7809), 434–443. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2308-7

Kaulfers, A. M. D., Lim, W. Y., & Bhowmick, S. K. (2020). Unusual endocrinopathies in 18Q deletion syndrome: pseudoparathyroidism and Hyper-/Hypo-Thyroidism. AACE Clinical Case Reports. https://doi.org/10.1016/j.aace.2020.12.012

Kawakami, K. (2007). Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. Genome Biology, 8(Suppl 1), S7. https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s7

Kawame, H., Hannibal, M. C., Hudgins, L., & Pagon, R. A. (1999). Phenotypic spectrum and management issues in Kabuki syndrome. The Journal of Pediatrics, 134(4), 480–485. https://doi.org/10.1016/s0022-3476(99)70207-6

Kelberman, D. (2006). Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. Journal of Clinical Investigation. https://doi.org/10.1172/jci28658

Kelberman, D., Rizzoti, K., Lovell-Badge, R., Robinson, I. C. a. F., & Dattani, M. T. (2009). Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. Endocrine Reviews, 30(7), 790–829. https://doi.org/10.1210/er.2009-0008

Kera, J., Watal, P., & Ali, S. A. (2021). Anophthalmia, global developmental delay, and severe dysphagia in a young girl with 14Q22Q23 microdeletion syndrome. Cureus. https://doi.org/10.7759/cureus.16395

Kevelam, S. H., Van Harssel, J. J., Van Der Zwaag, B., Smeets, H. J., Paulussen, A. D., & Lichtenbelt, K. D. (2011). A patient with a mild holoprosencephaly spectrum phenotype and heterotaxy and a 1.3 Mb deletion encompassing GLI2. American Journal of Medical Genetics Part A, 158A(1), 166–173. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34350

Khan, N. A., Govindaraj, P., Meena, A. K., & Thangaraj, K. (2015). Mitochondrial disorders: Challenges in diagnosis & treatment. The Indian Journal of Medical Research, 141(1), 13. https://doi.org/10.4103/0971-5916.154489

Kidd T., Bland K. S., Goodman C. S. (1999). Slit Is the Midline Repellent for the Robo Receptor in Drosophila. Cell, 96 (6), 785-794. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80589-9.

Kim, Y., Osborn, D. P., Lee, J., Araki, M., Araki, K., Mohun, T., Känsäkoski, J., Brandstack, N., Kim, H., Miralles, F., Kim, C., Brown, N. A., Kim, H., Martinez‐Barbera, J. P., Ataliotis, P., Raivio, T., Layman, L. C., & Kim, S. (2017). WDR11‐mediated Hedgehog signalling defects underlie a new ciliopathy related to Kallmann syndrome. EMBO Reports, 19(2), 269–289. https://doi.org/10.15252/embr.201744632

Kim, M. R., Yoo, E., Rhie, S., Seo, G. H., & Jung, M. K. (2022). Growth hormone deficiency in a boy with Wiedemann-Steiner syndrome: a case report and review. Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 28(Suppl 1), S25–S28. https://doi.org/10.6065/apem.2244052.026

Kinjo, K., Nagasaki, K., Muroya, K., Suzuki, E., Ishiwata, K., Nakabayashi, K., Hattori, A., Nagao, K., Nozawa, R., Obuse, C., Miyado, K., Ogata, T., Fukami, M., & Miyado, M. (2020). Rare variant of the

epigenetic regulator SMCHD1 in a patient with pituitary hormone deficiency. Scientific Reports, 10(1). https://doi.org/10.1038/s41598-020-67715-x

Kioussi, C., O'Connell, S., St-Onge, L., Treier, M., Gleiberman, A. S., Gruss, P., & Rosenfeld, M. G. (1999). Pax6 is essential for establishing ventral-dorsal cell boundaries in pituitary gland development. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96(25), 14378–14382. https://doi.org/10.1073/pnas.96.25.14378

Kiratikanon, S., Chattipakorn, S. C., Chattipakorn, N., & Kumfu, S. (2022). The regulatory effects of PTPN6 on inflammatory process: Reports from mice to men. Archives of Biochemistry and Biophysics, 721, 109189. https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109189

Kitamura, T., Ishihara, Y., Kusakabe, T., Tsuiki, M., Nanba, K., Hiroshima-Hamanaka, K., Nomura, T., Satoh-Asahara, N., Yasoda, A., & Tagami, T. (2023). A case of osteogenesis imperfecta caused by a *COL1A1* variant, coexisting with pituitary stalk interruption syndrome. Endocrine Journal, 70(8), 839–846. https://doi.org/10.1507/endocrj.ej22-0564

Klammt, J., Neumann, D., Gevers, E. F., Andrew, S. F., Schwartz, I. D., Rockstroh, D., Colombo, R., Sanchez, M. A., Vokurkova, D., Kowalczyk, J., Metherell, L. A., Rosenfeld, R. G., Pfäffle, R., Dattani, M. T., Dauber, A., & Hwa, V. (2018). Dominant-negative *STAT5B* mutations cause growth hormone insensitivity with short stature and mild immune dysregulation. Nature Communications, 9(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-04521-0

Klee, E. W., Cousin, M. A., Vairo, F. P. E., Morales-Rosado, J. A., Macke, E. L., Jenkinson, W. G., Ferrer, A., Schultz-Rogers, L. E., Olson, R. J., Oliver, G. R., Sigafoos, A. N., Schwab, T. L., Zimmermann, M. T., Urrutia, R. A., Kaiwar, C., Gupta, A., Blackburn, P. R., Boczek, N. J., Prochnow, C. A., . . . Lazaridis, K. N. (2020). Impact of integrated translational research on clinical exome sequencing. Genetics in Medicine, 23(3), 498–507. https://doi.org/10.1038/s41436-020-01005-9

Kloth, K., Renner, S., Burmester, G., Steinemann, D., Pabst, B., Lorenz, B., Simon, R., Kolbe, V., Hempel, M., & Rosenberger, G. (2019). 16p13.11 microdeletion uncovers loss-of-function of a MYH11 missense variant in a patient with megacystis-microcolon-intestinal-hypoperistalsis syndrome. Clinical Genetics, 96(1), 85–90. https://doi.org/10.1111/cge.13557

Kmoch, S., Majewski, J., Ramamurthy, V., Cao, S., Fahiminiya, S., Ren, H., MacDonald, I. M., Lopez, I., Sun, V., Keser, V., Khan, A., Stránecký, V., Hartmannová, H., Přistoupilová, A., Hodaňová, K., Piherová, L., Kuchař, L., Baxová, A., Chen, R., . . . Koenekoop, R. K. (2015). Mutations in PNPLA6 are linked to photoreceptor degeneration and various forms of childhood blindness. Nature Communications, 6(1). https://doi.org/10.1038/ncomms6614

Kodani, Y., Kawata, M., Suga, H., Kasai, T., Ozone, C., Sakakibara, M., Kuwahara, A., Taga, S., Arima, H., Kameyama, T., Saito, K., Nakashima, A., & Nagasaki, H. (2022). EPCAM is a surface marker for enriching anterior pituitary cells from human Hypothalamic-Pituitary organoids. Frontiers in Endocrinology, 13. https://doi.org/10.3389/fendo.2022.941166

Kodytková, A., Amaratunga, S. A., Zemková, D., Maratová, K., Dušátková, P., Plachý, L., Průhová, Š., Koloušková, S., & Lebl, J. (2023). SALL4 phenotype in four generations of one family: an interplay of the upper limb, kidneys, and the pituitary. Hormone Research in Paediatrics, 97(2), 203–210. https://doi.org/10.1159/000531996

Koljonen, L., Salonen, P., Rusanen, S., Mäyränpää, M. K., Pekkinen, M., & Mäkitie, O. (2024). A de novo *PRPF8* Pathogenic Variant in Transient Severe Hypophosphatemia with Delayed Puberty and Growth Failure. Hormone Research in Paediatrics, 1–11. https://doi.org/10.1159/000540249

Krude, H., Schütz, B., Biebermann, H., Von Moers, A., Schnabel, D., Neitzel, H., Tönnies, H., Weise, D., Lafferty, A., Schwarz, S., DeFelice, M., Von Deimling, A., Van Landeghem, F., DiLauro, R., & Grüters, A. (2002). Choreoathetosis, hypothyroidism, and pulmonary alterations due to human NKX2-1 haploinsufficiency. Journal of Clinical Investigation, 109(4), 475–480. https://doi.org/10.1172/jci14341

Kwon, J. J., Hajian, B., Bian, Y., Young, L. C., Amor, A. J., Fuller, J. R., Fraley, C. V., Sykes, A. M., So, J., Pan, J., Baker, L., Lee, S. J., Wheeler, D. B., Mayhew, D. L., Persky, N. S., Yang, X., Root, D. E., Barsotti, A. M., Stamford, A. W., . . . Aguirre, A. J. (2022). Structure–function analysis of the SHOC2–MRAS–PP1C holophosphatase complex. Nature, 609(7926), 408–415. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04928-2

Lam, F., & Morris, C. (2016). Nine year old boy with chromosome 1q23.3-q25.1 deletion. American Journal of Medical Genetics Part A, 170(11), 3013–3017. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37843

Lam, C., Fong, N., Chan, T. Y., Lau, K., Ling, T., Mak, D. W., Cheng, X., & Law, C. (2020). Centrosome-associated CDC25B is a novel disease-causing gene for a syndrome with cataracts, dilated cardiomyopathy, and multiple endocrinopathies. Clinica Chimica Acta, 504, 81–87. https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.017

Latres, E., Amini, A. R., Amini, A. A., Griffiths, J., Martin, F. J., Wei, Y., Lin, H. C., Yancopoulos, G. D., & Glass, D. J. (2004). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) inversely regulates atrophy-induced genes via the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian target of rapamycin (PI3K/AKT/MTOR) pathway. Journal of Biological Chemistry, 280(4), 2737–2744. https://doi.org/10.1074/jbc.m407517200

Laumonnier, F., Ronce, N., Hamel, B. C., Thomas, P., Lespinasse, J., Raynaud, M., Paringaux, C., Van Bokhoven, H., Kalscheuer, V., Fryns, J., Chelly, J., Moraine, C., & Briault, S. (2002). Transcription Factor SOX3 Is Involved in X-Linked Mental Retardation with Growth Hormone Deficiency. The American Journal of Human Genetics, 71(6), 1450–1455. https://doi.org/10.1086/344661

Lawrence, C., Hong-McAtee, I., Hall, B., Hartsfield, J., Rutherford, A., Bonilla, T., & Bay, C. (2013). Endocrine abnormalities in townes–brocks syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A, 161(9), 2266–2273. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36104

Le, L. T. H. L., Park, S., Lee, J. H., Kim, Y. K., & Lee, M. J. (2024). N-recognins UBR1 and UBR2 as central ER stress sensors in mammals. Molecules and Cells, 47(1), 100001. https://doi.org/10.1016/j.mocell.2023.12.001

Lee, C. S., Sund, N. J., Behr, R., Herrera, P. L., & Kaestner, K. H. (2004). Foxa2 is required for the differentiation of pancreatic α-cells. Developmental Biology, 278(2), 484–495. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2004.10.012

Lee, P. A., & Houk, C. P. (2006). Gonadotropin-Releasing hormone analog therapy for central precocious puberty and other childhood disorders affecting growth and puberty. Treatments in Endocrinology, 5(5), 287–296. https://doi.org/10.2165/00024677-200605050-00003

Leka-Emiri, S., Petrou, V., Manolakos, E., Thomaidis, L., Fotinou, A., Vlachopapadopoulou, E., & Michalacos, S. (2018). 17p13.1 Microduplication syndrome in a child, familial short stature, and growth hormone deficiency: A case report and review of the literature. Molecular Syndromology, 9(6), 300–305. https://doi.org/10.1159/000494681

Levy-Shraga, Y., Gothelf, D., Pinchevski-Kadir, S., Katz, U., & Modan-Moses, D. (2017). Endocrine manifestations in children with Williams–Beuren syndrome. Acta Paediatrica, 107(4), 678–684. https://doi.org/10.1111/apa.14198

https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324

Li, G., Li, N., Li, J., Ding, Y., Yu, T., Wang, X., & Wang, J. (2017). De Novo Mutation of *KAT6B* Gene causing atypical Say–Barber–Biesecker–Young–Simpson Syndrome or genitopatellar Syndrome. Fetal and Pediatric Pathology, 36(2), 130–138. https://doi.org/10.1080/15513815.2017.1281364

Li, X., Cheng, Q., Li, N., Chang, G., Ding, Y., Li, J., Shen, Y., Wang, J., & Wang, X. (2018). SOPH Syndrome with Growth Hormone Deficiency, Normal Bone Age, and Novel Compound Heterozygous Mutations in NBAS. Fetal and Pediatric Pathology, 37(6), 404–410. https://doi.org/10.1080/15513815.2018.1509406

Li, H., He, J., & Leong, I. (2021). A rare case of 46, XX (SRY positive) testicular disorder of sex development with growth hormone deficiency. Medicine, 100(6), e24641. https://doi.org/10.1097/md.0000000000024641

Li, K., Xiong, Z., Zhou, M., Ou, Y., Li, W., Wu, G., Che, M., Gong, H., Wang, X., Peng, J., Zheng, X., Li, J., Feng, Z., & Peng, J. (2023). A procedure in mice to obtain intact pituitary-infundibulum-hypothalamus preparations: a method to evaluate the reconstruction of hypothalamo-hypophyseal system. Pituitary, 26(2), 197–208. https://doi.org/10.1007/s11102-023-01299-3 (a)

Li, H., Zhang, Q., Wan, R., Zhou, L., Xu, X., Xu, C., Yu, Y., Xu, Y., Xiang, Y., & Tang, S. (2023). PLPPR4 haploinsufficiency causes neurodevelopmental disorders by disrupting synaptic plasticity via mTOR signalling. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 27(21), 3286–3295. https://doi.org/10.1111/jcmm.17899 (b)

Lin, J., Yan, Y., Hsieh, W., Peng, P., Su, C., & Tarn, W. (2012). RBM4 promotes pancreas cell differentiation and insulin expression. Molecular and Cellular Biology, 33(2), 319–327. https://doi.org/10.1128/mcb.01266-12

Lin, Y., Wang, D., Chen, W., Lin, X., Lin, M., & Wang, N. (2014). Growth hormone deficiency in a Dopa-Responsive Dystonia patient with a novel mutation of guanosine triphosphate cyclohydrolase 1 gene. Journal of Child Neurology, 30(6), 796–799. https://doi.org/10.1177/0883073814538498

Lin, S., Yang, J., Xie, T., Li, J., Ma, J., Wu, S., Wang, N., & Wang, Y. (2023). Aicardi-Goutières syndrome type 7 in a Chinese child: A case report. World Journal of Clinical Cases, 11(11), 2452–2456. https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i11.2452

Linden, H., Williams, R., King, J., Blair, E., & Kini, U. (2009). Ulnar mammary syndrome and TBX3: Expanding the phenotype. American Journal of Medical Genetics Part A, 149A(12), 2809–2812. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33096

Liu, Z., & Chen, X. (2019). A Novel Missense Mutation in Human Receptor Roundabout-1 (*ROBO1*) Gene Associated with Pituitary Stalk Interruption Syndrome. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology, 12(2), 212–217. https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2019.2018.0309

Liu, Z., Zhao, W., Cao, C., Wang, Y., Xiao, L., Wang, X., Jin, C., & Xiao, J. (2023). Pituitary stalk interruption syndrome and liver cirrhosis associated with diabetes and an inactivating KCNJ11 gene mutation: a case report and literature review. Frontiers in Endocrinology, 14. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1297146

Lodge, E. J., Xekouki, P., Silva, T. S., Kochi, C., Longui, C. A., Faucz, F. R., Santambrogio, A., Mills, J. L., Pankratz, N., Lane, J., Sosnowska, D., Hodgson, T., Patist, A. L., Francis-West, P., Helmbacher, F., Stratakis, C. A., & Andoniadou, C. L. (2020). Requirement of FAT and DCHS protocadherins during hypothalamic-pituitary development. JCI Insight, 5(23). https://doi.org/10.1172/jci.insight.134310

Lonero, A., Delvecchio, M., Primignani, P., Caputo, R., Bargiacchi, S., Penco, S., Mauri, L., Andreucci, E., Faienza, M. F., & Cavallo, L. (2016). A novel OTX2 gene frameshift mutation in a child with

microphthalmia, ectopic pituitary and growth hormone deficiency. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 29(5). https://doi.org/10.1515/jpem-2015-0425

Lopez, M., Nica, G., Motte, P., Martial, J. A., Hammerschmidt, M., & Muller, M. (2005). Expression of the somatolactin β gene during zebrafish embryonic development. Gene Expression Patterns, 6(2), 156–161. https://doi.org/10.1016/j.modgep.2005.06.010

López-Bendito, G., Flames, N., Ma, L., Fouquet, C., Di Meglio, T., Chedotal, A., Tessier-Lavigne, M., & Marín, O. (2007). Robo1 and Robo2 cooperate to control the guidance of major axonal tracts in the mammalian forebrain. Journal of Neuroscience, 27(13), 3395–3407. https://doi.org/10.1523/jneurosci.4605-06.2007

Lozano, R., Gbekie, C., Siper, P. M., Srivastava, S., Saland, J. M., Sethuram, S., Tang, L., Drapeau, E., Frank, Y., Buxbaum, J. D., & Kolevzon, A. (2021). FOXP1 syndrome: a review of the literature and practice parameters for medical assessment and monitoring. Journal of Neurodevelopmental Disorders, 13(1). https://doi.org/10.1186/s11689-021-09358-1

Lucas-Herald, A. K., Kinning, E., Iida, A., Wang, Z., Miyake, N., Ikegawa, S., McNeilly, J., & Ahmed, S. F. (2015). A case of functional growth hormone deficiency and early growth retardation in a child with IFT172 mutations. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 100(4), 1221–1224. https://doi.org/10.1210/jc.2014-3852

Macchiaroli, A., Kelberman, D., Auriemma, R. S., Drury, S., Islam, L., Giangiobbe, S., Ironi, G., Lench, N., Sowden, J. C., Colao, A., Pivonello, R., Cavallo, L., Gasperi, M., & Faienza, M. F. (2013). A novel heterozygous SOX2 mutation causing congenital bilateral anophthalmia, hypogonadotropic hypogonadism and growth hormone deficiency. Gene, 534(2), 282–285. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.043

Macias, H., Moran, A., Samara, Y., Moreno, M., Compton, J. E., Harburg, G., Strickland, P., & Hinck, L. (2011). SLIT/ROBO1 signaling suppresses mammary branching morphogenesis by limiting basal cell number. Developmental Cell, 20(6), 827–840. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.012

MacPherson, L., Tamblyn, L., Rajendra, S., Bralha, F., McPherson, J. P., & Matthews, J. (2012). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. Nucleic Acids Research, 41(3), 1604–1621. https://doi.org/10.1093/nar/gks1337

Magoulas, P. L., & El-Hattab, A. W. (2012). Chromosome 15q24 microdeletion syndrome. Orphanet Journal of Rare Diseases, 7(1), 2. https://doi.org/10.1186/1750-1172-7-2

Makova, K., & Norton, H. (2005). Worldwide polymorphism at the MC1R locus and normal pigmentation variation in humans. Peptides, 26(10), 1901–1908. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.12.032

Marafi, D., Mitani, T., Isikay, S., Hertecant, J., Almannai, M., Manickam, K., Jamra, R. A., El-Hattab, A. W., Rajah, J., Fatih, J. M., Du, H., Karaca, E., Bayram, Y., Punetha, J., Rosenfeld, J. A., Jhangiani, S. N., Boerwinkle, E., Akdemir, Z. C., Erdin, S., . . . Lupski, J. R. (2020). Biallelic GRM7 variants cause epilepsy, microcephaly, and cerebral atrophy. Annals of Clinical and Translational Neurology, 7(5), 610–627. https://doi.org/10.1002/acn3.51003

Margarit, E., Morales, C., Rodríguez-Revenga, L., Monné, R., Badenas, C., Soler, A., Clusellas, N., Mademont, I., & Sánchez, A. (2012b). Familial 4.8 MB deletion on 18q23 associated with growth hormone insufficiency and phenotypic variability. American Journal of Medical Genetics Part A, 158A(3), 611–616. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.34221

Martinelli, S., Krumbach, O. H., Pantaleoni, F., Coppola, S., Amin, E., Pannone, L., Nouri, K., Farina, L., Dvorsky, R., Lepri, F., Buchholzer, M., Konopatzki, R., Walsh, L., Payne, K., Pierpont, M. E., Vergano, S. S., Langley, K. G., Larsen, D., Farwell, K. D., Mirzaa, G. M. (2018b). Functional dysregulation of CDC42 causes diverse developmental phenotypes. The American Journal of Human Genetics, 102(2), 309–320. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.12.015

Marino, B., Digilio, M. C., Toscano, A., Giannotti, A., & Dallapiccola, B. (1999). Congenital heart diseases in children with Noonan syndrome: An expanded cardiac spectrum with high prevalence of atrioventricular canal. The Journal of Pediatrics, 135(6), 703–706. https://doi.org/10.1016/s0022-3476(99)70088-0

Marsh, A. P. L., Heron, D., Edwards, T. J., Quartier, A., Galea, C., Nava, C., Rastetter, A., Moutard, M., Anderson, V., Bitoun, P., Bunt, J., Faudet, A., Garel, C., Gillies, G., Gobius, I., Guegan, J., Heide, S., Keren, B., Lesne, F., . . . Depienne, C. (2017). Mutations in DCC cause isolated agenesis of the corpus callosum with incomplete penetrance. Nature Genetics, 49(4), 511–514. https://doi.org/10.1038/ng.3794

Martin, A., Babbitt, A., Pickens, A. G., Pickett, B. E., Hill, J. T., & Suli, A. (2022). Single-Cell RNA sequencing characterizes the molecular heterogeneity of the larval zebrafish optic tectum. Frontiers in Molecular Neuroscience, 15. https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.818007

Martinez-Mayer, J., Vishnopolska, S., Perticarari, C., Garcia, L. I., Hackbartt, M., Martinez, M., Zaiat, J., Jacome-Alvarado, A., Braslavsky, D., Keselman, A., Bergadá, I., Marino, R., Ramírez, P., Garrido, N. P., Ciaccio, M., Di Palma, M. I., Belgorosky, A., Forclaz, M. V., Benzrihen, G., . . . Perez-Millan, M. I. (2024). Exome sequencing has a high diagnostic rate in sporadic congenital hypopituitarism and reveals novel candidate genes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 109(12), 3196–3210. https://doi.org/10.1210/clinem/dgae320 (a)

Martinez-Mayer, J., Brinkmeier, M. L., O'Connell, S. P., Ukagwu, A., Marti, M. A., Miras, M., Forclaz, M. V., Benzrihen, M. G., Cheung, L. Y. M., Camper, S. A., Ellsworth, B. S., Raetzman, L. T., Pérez-Millán, M. I., & Davis, S. W. (2024). Knockout mice with pituitary malformations help identify human cases of hypopituitarism. Genome Medicine, 16(1). https://doi.org/10.1186/s13073-024-01347-y (b)

Marzuillo, P., Grandone, A., Coppola, R., Cozzolino, D., Festa, A., Messa, F., Luongo, C., Del Giudice, E. M., & Perrone, L. (2013). Novel cAMP binding protein-BP (CREBBP) mutation in a girl with Rubinstein-Taybi syndrome, GH deficiency, Arnold Chiari malformation and pituitary hypoplasia. BMC Medical Genetics, 14(1). https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-28

Matalliotakis, M., Koliarakis, I., Matalliotaki, C., Trivli, A., & Hatzidaki, E. (2019). Clinical manifestations, evaluation and management of hyperprolactinemia in adolescent and young girls: a brief review. PubMed, 90(1), 149–157. https://doi.org/10.23750/abm.v90i1.8142

Matsumoto, R., Suga, H., Aoi, T., Bando, H., Fukuoka, H., Iguchi, G., Narumi, S., Hasegawa, T., Muguruma, K., Ogawa, W., & Takahashi, Y. (2019). Congenital pituitary hypoplasia model demonstrates hypothalamic OTX2 regulation of pituitary progenitor cells. Journal of Clinical Investigation, 130(2), 641–654. https://doi.org/10.1172/jci127378

Matsuzaki, M., Izumi, T., Shishikura, K., Suzuki, H., & Hirayama, Y. (2002). Hypothalamic Growth Hormone Deficiency and Supplementary GH Therapy in Two Patients with Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes. Neuropediatrics, 33(5), 271–273. https://doi.org/10.1055/s-2002-36742

Mazen, I., El-Ruby, M., & El-Bassyouni, H. T. (2010). Variable associations of Klinefelter syndrome in children. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 23(10). https://doi.org/10.1515/jpem.2010.158

Mazzanti, L., Cacciari, E., Cicognani, A., Bergamaschi, R., Scarano, E., & Forabosco, A. (2003). Noonan-like syndrome with loose anagen hair: A new syndrome? American Journal of Medical Genetics Part A, 118A(3), 279–286. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.10923

Mazzanti, L., Tamburrino, F., Scarano, E., Perri, A., Vestrucci, B., Guidetti, M., Rossi, C., & Tartaglia, M. (2013). GH Therapy and first final height data in Noonan-like syndrome with loose anagen hair (Mazzanti syndrome). American Journal of Medical Genetics Part A, 161(11), 2756–2761. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36255

McCabe, M. J., Gaston-Massuet, C., Tziaferi, V., Gregory, L. C., Alatzoglou, K. S., Signore, M., Puelles, E., Gerrelli, D., Farooqi, I. S., Raza, J., Walker, J., Kavanaugh, S. I., Tsai, P., Pitteloud, N., Martinez-Barbera, J., & Dattani, M. T. (2011). Novel *FGF8* Mutations Associated with Recessive Holoprosencephaly, Craniofacial Defects, and Hypothalamo-Pituitary Dysfunction. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 96(10), E1709–E1718. https://doi.org/10.1210/jc.2011-0454

McCabe, M. J., & Dattani, M. T. (2014). Genetic aspects of hypothalamic and pituitary gland development. Handbook of Clinical Neurology, 3–15. https://doi.org/10.1016/b978-0-444-59602-4.00001-0

McCabe, M. J., Hu, Y., Gregory, L. C., Gaston-Massuet, C., Alatzoglou, K. S., Saldanha, J. W., Gualtieri, A., Thankamony, A., Hughes, I., Townshend, S., Martinez-Barbera, J., Bouloux, P., & Dattani, M. T. (2015). Novel application of luciferase assay for the in vitro functional assessment of KAL1 variants in three females with septo-optic dysplasia (SOD). Molecular and Cellular Endocrinology, 417, 63–72. https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.09.010

McInerney-Leo, A. M., Goff, C. L., Leo, P. J., Kenna, T. J., Keith, P., Harris, J. E., Steer, R., Bole-Feysot, C., Nitschke, P., Kielty, C., Brown, M. A., Zankl, A., Duncan, E. L., & Cormier-Daire, V. (2016). Mutations in *LTBP3* cause acromicric dysplasia and geleophysic dysplasia. Journal of Medical Genetics, 53(7), 457–464. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103647

McKenna, A., Hanna, M., Banks, E., Sivachenko, A., Cibulskis, K., Kernytsky, A., Garimella, K., Altshuler, D., Gabriel, S., Daly, M., & DePristo, M. A. (2010). The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 20(9), 1297–1303. https://doi.org/10.1101/gr.107524.110

McMenamin, S. K., Minchin, J. E., Gordon, T. N., Rawls, J. F., & Parichy, D. M. (2013). Dwarfism and Increased Adiposity in the gh1 Mutant Zebrafish vizzini. Endocrinology, 154(4), 1476–1487. https://doi.org/10.1210/en.2012-1734

Meazza, C., Lausch, E., Pagani, S., Bozzola, E., Calcaterra, V., Superti-Furga, A., Silengo, M., & Bozzola, M. (2013). 3-M syndrome associated with growth hormone deficiency: 18 year follow-up of a patient. The Italian Journal of Pediatrics/Italian Journal of Pediatrics, 39(1). https://doi.org/10.1186/1824-7288-39-21

Medlej, R., Wasson, J., Baz, P., Azar, S., Salti, I., Loiselet, J., Permutt, A., & Halaby, G. (2004). Diabetes mellitus and optic atrophy: A study of Wolfram syndrome in the Lebanese population. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 89(4), 1656–1661. https://doi.org/10.1210/jc.2002-030015

Medrano, C., Vega, A., Navarrete, R., Ecay, M. J., Calvo, R., Pascual, S. I., Ruiz-Pons, M., Toledo, L., García-Jiménez, I., Arroyo, I., Campo, A., Couce, M. L., Domingo-Jiménez, M. R., García-Silva, M.

T., González-Gutiérrez-Solana, L., Hierro, L., Martín-Hernández, E., Martínez-Pardo, M., Roldán, S., . . . Pérez-Cerdá, C. (2019). Clinical and molecular diagnosis of non-phosphomannomutase 2 N-linked congenital disorders of glycosylation in Spain. Clinical Genetics, 95(5), 615–626. https://doi.org/10.1111/cge.13508

Meyer-Marcotty, P., Weisschuh, N., Dressler, P., Hartmann, J., & Stellzig-Eisenhauer, A. (2008). Morphology of the sella turcica in Axenfeld–Rieger syndrome with PITX2 mutation. Journal of Oral Pathology and Medicine, 37(8), 504–510. https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2008.00650.x

Mi, J., & Andersson, O. (2023). Efficient knock-in method enabling lineage tracing in zebrafish. Life Science Alliance, 6(5), e202301944. https://doi.org/10.26508/lsa.202301944

Milenkovic, T., Guc-Scekic, M., Zdravkovic, D., Topic, V., Liehr, T., Joksic, G., Radivojevic, D., & Lakic, N. (2011). Molecular Analysis of Ring Y Chromosome in a 10-Year-Old Boy with Mixed Gonadal Dysgenesis and Growth Hormone Deficiency. Balkan Journal of Medical Genetics, 14(2). https://doi.org/10.2478/v10034-011-0049-5

Millar, D. S., Lewis, M. D., Horan, M., Newsway, V., Easter, T. E., Gregory, J. W., Fryklund, L., Norin, M., Crowne, E. C., Davies, S. J., Edwards, P., Kirk, J., Waldron, K., Smith, P. J., Phillips, J. A., Scanlon, M. F., Krawczak, M., Cooper, D. N., & Procter, A. M. (2003). Novel mutations of the growth hormone 1 (GH1) gene disclosed by modulation of the clinical selection criteria for individuals with short stature. Human Mutation, 21(4), 424–440. https://doi.org/10.1002/humu.10168

Miller, B. S., & Freeze, H. H. (2003). New disorders in carbohydrate metabolism: congenital disorders of glycosylation and their impact on the endocrine system. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 4(1), 103–113. https://doi.org/10.1023/a:1021883605280

Millimaki, B. B., Sweet, E. M., & Riley, B. B. (2009). Sox2 is required for maintenance and regeneration, but not initial development, of hair cells in the zebrafish inner ear. Developmental Biology, 338(2), 262–269. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.011

Min, S. R., Cho, H. S., Hong, J., Cheong, H. I., & Ahn, S. Y. (2013). Gitelman syndrome combined with complete growth hormone deficiency. Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 18(1), 36. https://doi.org/10.6065/apem.2013.18.1.36

Ming, J. E., Kaupas, M. E., Roessler, E., Brunner, H. G., Golabi, M., Tekin, M., Stratton, R. F., Sujansky, E., Bale, S. J., & Muenke, M. (2002). Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. Human Genetics, 110(4), 297–301. https://doi.org/10.1007/s00439-002-0695-5

Misgar, R. A., Chhabra, A., Qadir, A., Arora, S., Wani, A. I., Bashir, M. I., & Masoodi, S. R. (2024). Pituitary stalk interruption syndrome due to novel ROBO1 mutation presenting as combined pituitary hormone deficiency and central diabetes insipidus. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 37(5), 477–481. https://doi.org/10.1515/jpem-2023-0541

Moalla, M., Kacem, F. H., Al-Mutery, A. F., Mahfood, M., Mejdoub-Rekik, N., Abid, M., Mnif-Feki, M., & Kacem, H. H. (2019). Nonstop mutation in the Kisspeptin 1 receptor (KISS1R) gene causes normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 36(6), 1273–1280. https://doi.org/10.1007/s10815-019-01468-z

Mohun, T., Adams, D. J., Baldock, R., Bhattacharya, S., Copp, A. J., Hemberger, M., Houart, C., Hurles, M. E., Robertson, E., Smith, J. C., Weaver, T., & Weninger, W. (2013). Deciphering the Mechanisms of Developmental Disorders (DMDD): a new programme for phenotyping embryonic lethal mice. Disease Models & Mechanisms. https://doi.org/10.1242/dmm.011957

Moon, J., Lee, S., & Ko, C. W. (2018). A de novo KMT2D mutation in a girl with Kabuki syndrome associated with endocrine symptoms: a case report. BMC Medical Genetics, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12881-018-0606-9

Moosa, S., Haagerup, A., Gregersen, P. A., Petersen, K. K., Altmüller, J., Thiele, H., Nürnberg, P., Cho, T., Kim, O., Nishimura, G., Wollnik, B., & Vogel, I. (2017). Confirmation of CAGSSS syndrome as a distinct entity in a Danish patient with a novel homozygous mutation in IARS2. American Journal of Medical Genetics Part A, 173(4), 1102–1108. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38116

Moriceau-Hay, D., Doerr-Schott, J., & Dubois, M. (1982). Immunohistochemical demonstration of TSR-, LH- and ACTH-cells in the hypophysis of tadpoles of Xenopus laevis D. Cell and Tissue Research, 225(1), 57–64. https://doi.org/10.1007/bf00216218

Morlot, C., Thielens, N. M., Ravelli, R. B. G., Hemrika, W., Romijn, R. A., Gros, P., Cusack, S., & McCarthy, A. A. (2007). Structural insights into the Slit-Robo complex. Proceedings of the National Academy of Sciences, 104(38), 14923–14928. https://doi.org/10.1073/pnas.0705310104

Morris, C. A., Mervis, C. B., Paciorkowski, A. P., Abdul‐Rahman, O., Dugan, S. L., Rope, A. F., Bader, P., Hendon, L. G., Velleman, S. L., Klein‐Tasman, B. P., & Osborne, L. R. (2015). 7q11.23 Duplication syndrome: Physical characteristics and natural history. American Journal of Medical Genetics Part A, 167(12), 2916–2935. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37340

Mouden, C., De Tayrac, M., Dubourg, C., Rose, S., Carré, W., Hamdi-Rozé, H., Babron, M., Akloul, L., Héron-Longe, B., Odent, S., Dupé, V., Giet, R., & David, V. (2015). Homozygous STIL mutation causes holoprosencephaly and microcephaly in two siblings. PLoS ONE, 10(2), e0117418. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117418

Mouskou, S., Leka-Emiri, S., Korona, A., Mastroyanni, S., Manolakos, E., Papoulidis, I., Sekouris, N., Katerelos, A., Katsarou-Pectasides, E., & Voudris, K. (2022). Growth Hormone Deficiency due to p.(Gln467Argfs*64) Mutation in the *ARID1B* Gene in a Girl with Coffin-Siris Syndrome. Molecular Syndromology, 13(5), 425–432. https://doi.org/10.1159/000522532

Muriello, M., Kim, A. Y., Schatz, K. S., Beck, N., Gunay‐Aygun, M., & Hoover‐Fong, J. E. (2019). Growth hormone deficiency, aortic dilation, and neurocognitive issues in Feingold syndrome 2. American Journal of Medical Genetics Part A, 179(3), 410–416. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.61037

Nakaguma, M., Correa, F. A., Santana, L. S., Benedetti, A. F. F., Perez, R. V., Huayllas, M. K. P., Miras, M. B., Funari, M. F. A., Lerario, A. M., Mendonca, B. B., Carvalho, L. R. S., Jorge, A. a. L., & Arnhold, I. J. P. (2019). Genetic diagnosis of congenital hypopituitarism by a target gene panel: novel pathogenic variants in GLI2, OTX2 and GHRHR. Endocrine Connections, 8(5), 590–595. https://doi.org/10.1530/ec-19-0085

Nakaguma, M., Ferreira, N. G. B. P., Benedetti, A. F. F., Madi, M. C., Silva, J. M., Li, J. Z., Ma, Q., Ozel, A. B., Fang, Q., De Moraes Narcizo, A., Cardoso, L. C., Montenegro, L. R., De Assis Funari, M. F., Nishi, M. Y., Arnhold, I. J. P., De Lima Jorge, A. A., De Mendonca, B. B., Camper, S. A., & Carvalho, L. R. (2021). Allelic variants in established hypopituitarism genes expand our knowledge of the phenotypic spectrum. Genes, 12(8), 1128. https://doi.org/10.3390/genes12081128

Ng, P. C. (2003). SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. Nucleic Acids Research, 31(13), 3812–3814. https://doi.org/10.1093/nar/gkg509

Nica, G., Herzog, W., Sonntag, C., Nowak, M., Schwarz, H., Zapata, A. G., & Hammerschmidt, M. (2006). Eya1 is required for lineage-specific differentiation, but not for cell survival in the zebrafish adenohypophysis. Developmental Biology, 292(1), 189–204. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.12.036

Niceta, M., Dentici, M. L., Ciolfi, A., Marini, R., Barresi, S., Lepri, F. R., Novelli, A., Bertini, E., Cappa, M., Digilio, M. C., Dallapiccola, B., & Tartaglia, M. (2020). Co-occurrence of mutations in KIF7 and KIAA0556 in Joubert syndrome with ocular coloboma, pituitary malformation and growth hormone deficiency: a case report and literature review. BMC Pediatrics, 20(1). https://doi.org/10.1186/s12887-020-2019-0

Nil, Z., Deshwar, A. R., Huang, Y., Barish, S., Zhang, X., Choufani, S., Stabej, P. L. Q., Hayes, I., Yap, P., Haldeman-Englert, C., Wilson, C., Prescott, T., Tveten, K., Vøllo, A., Haynes, D., Wheeler, P. G., Zon, J., Cytrynbaum, C., Jobling, R., . . . Bellen, H. J. (2023). Rare de novo gain-of-function missense variants in DOT1L are associated with developmental delay and congenital anomalies. The American Journal of Human Genetics, 110(11), 1919–1937. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2023.09.009

Noguchi, T., Nakamura, K., Satoda, Y., Katoh, Y., & Nakayama, K. (2021). CCRK/CDK20 regulates ciliary retrograde protein trafficking via interacting with BROMI/TBC1D32. PLoS ONE, 16(10), e0258497. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0258497

Norlin, S., Nordström, U., & Edlund, T. (2000). Fibroblast growth factor signaling is required for the proliferation and patterning of progenitor cells in the developing anterior pituitary. Mechanisms of Development, 96(2), 175–182. https://doi.org/10.1016/s0925-4773(00)00393-2

Nso-Roca, A. P., Marco, F. C., Ricote, J. M., & Ruiz, M. J. (2014). Endocrinological anomalies in a patient with 12q14 microdeletion syndrome. Completing phenotype of this exceptional short stature condition. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 27(5–6). https://doi.org/10.1515/jpem-2013-0239

Nüsslein-Volhard, C. (2012). The zebrafish issue of Development. Development, 139(22), 4099–4103. https://doi.org/10.1242/dev.085217

Obata, Y., Takayama, K., Nishikubo, H., Tobimatsu, A., Matsuda, I., Uehara, Y., Maruo, Y., Sho, H., Kosugi, M., & Yasuda, T. (2023). Combined pituitary hormone deficiency harboring CHD7 gene missense mutation without CHARGE syndrome: a case report. BMC Endocrine Disorders, 23(1). https://doi.org/10.1186/s12902-023-01373-8

Ogasawara, K., Nogami, H., Tsuda, M. C., Gustafsson, J., Korach, K. S., Ogawa, S., Harigaya, T., & Hisano, S. (2008). Hormonal regulation of prolactin cell development in the fetal pituitary gland of the mouse. Endocrinology, 150(2), 1061–1068. https://doi.org/10.1210/en.2008-1151

Okubo, Y., Sugawara, T., Abe-Koduka, N., Kanno, J., Kimura, A., & Saga, Y. (2012). Lfng regulates the synchronized oscillation of the mouse segmentation clock via trans-repression of Notch signalling. Nature Communications, 3(1). https://doi.org/10.1038/ncomms2133

Olson, L. E., Tollkuhn, J., Scafoglio, C., Krones, A., Zhang, J., Ohgi, K. A., Wu, W., Taketo, M. M., Kemler, R., Grosschedl, R., Rose, D., Li, X., & Rosenfeld, M. G. (2006). HomeoDomain-Mediated B-Catenin-Dependent switching Events dictate Cell-Lineage determination. Cell, 125(3), 593–605. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.046

Öncül, Ü., Kose, E., & Eminoğlu, F. T. (2021). ALG1-CDG: A Patient with a Mild Phenotype and Literature Review. Molecular Syndromology, 13(1), 69–74. https://doi.org/10.1159/000517797

Ospina, N. S., Nofal, A. A., Bancos, I., Javed, A., Benkhadra, K., Kapoor, E., Lteif, A. N., Natt, N., & Murad, M. H. (2015). ACTH Stimulation Tests for the Diagnosis of Adrenal Insufficiency: Systematic Review and Meta-Analysis. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 101(2), 427–434. https://doi.org/10.1210/jc.2015-1700

Ozon, Z. A., Alikasifoglu, A., Kandemir, N., Aydin, B., Gonc, E. N., Karaosmanoglu, B., Celik, N. B., Eroglu-Ertugrul, N. G., Taskiran, E. Z., Haliloglu, G., Oguz, K. K., Kiper, P. O., Yalnizoglu, D., Utine, G.

E., & Alikasifoglu, M. (2020). Novel insights into diabetes mellitus due to DNAJC3 - defect: Evolution of neurological and endocrine phenotype in the pediatric age group. Pediatric Diabetes, 21(7), 1176–1182. https://doi.org/10.1111/pedi.13098

Öztürk, N., Karamık, G., Mutlu, H., Bayer, Ö. Y., Mıhçı, E., Çetin, G. O., & Nur, B. (2023). Expanding the clinical and molecular features of trichorhinophalangeal syndrome with a novel variant. The Turkish Journal of Pediatrics, 65(1), 81–95. https://doi.org/10.24953/turkjped.2022.793

Pan, X., Eathiraj, S., Munson, M., & Lambright, D. G. (2006). TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. Nature, 442(7100), 303–306. https://doi.org/10.1038/nature04847

Pandey, A. V. (2012). Bioinformatics tools and databases for the study of human growth hormone. Endocrine Development, 71–85. https://doi.org/10.1159/000341755

Pantel, J., Legendre, M., Nivot, S., Morisset, S., Vie-Luton, M., Bouc, Y. L., Epelbaum, J., & Amselem, S. (2009). Recessive isolated growth hormone deficiency and mutations in the ghrelin receptor. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 94(11), 4334–4341. https://doi.org/10.1210/jc.2009-1327

Papingi, D., Bierhals, T., Volk, A. E., Kutsche, M., Paul, K., & Herget, T. (2023). A novel TTC26 variant in a patient with hexadactyly, pituitary stalk interruption, hepatopathy, nephropathy, and bilateral lip‐palate cleft: A case report and expansion of the phenotype. American Journal of Medical Genetics Part A, 194(5). https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63515

Parker, G. E., West, B. E., Witzmann, F. A., & Rhodes, S. J. (2004). Serine/threonine/tyrosine phosphorylation of the LHX3 LIM-homeodomain transcription factor. Journal of Cellular Biochemistry, 94(1), 67–80. https://doi.org/10.1002/jcb.20287

Parsons, S. J. H., Wright, N. B., Burkitt‐Wright, E., Skae, M. S., & Murray, P. G. (2017). A heterozygous microdeletion of 20p12.2-3 encompassingPROKR2andBMP2in a patient with congenital hypopituitarism and growth hormone deficiency. American Journal of Medical Genetics Part A, 173(8), 2261–2267. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38306

Peall, K. J., Lumsden, D., Kneen, R., Madhu, R., Peake, D., Gibbon, F., Lewis, H., Hedderly, T., Meyer, E., Robb, S. A., Lynch, B., King, M. D., Lin, J., Morris, H. R., Jungbluth, H., & Kurian, M. A. (2013). Benign hereditary chorea related to NKX2.1: expansion of the genotypic and phenotypic spectrum. Developmental Medicine & Child Neurology, 56(7), 642–648. https://doi.org/10.1111/dmcn.12323

Pérez, B., Medrano, C., Ecay, M. J., Ruiz‐Sala, P., Martínez‐Pardo, M., Ugarte, M., & Pérez‐Cerdá, C. (2012). A novel congenital disorder of glycosylation type without central nervous system involvement caused by mutations in the phosphoglucomutase 1 gene. Journal of Inherited Metabolic Disease, 36(3), 535–542. https://doi.org/10.1007/s10545-012-9525-7

Pfaeffle, R. W., Hunter, C. S., Savage, J. J., Duran-Prado, M., Mullen, R. D., Neeb, Z. P., Eiholzer, U., Hesse, V., Haddad, N. G., Stobbe, H. M., Blum, W. F., Weigel, J. F. W., & Rhodes, S. J. (2007). Three Novel Missense Mutations within the LHX4 Gene Are Associated with Variable Pituitary Hormone Deficiencies. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 93(3), 1062–1071. https://doi.org/10.1210/jc.2007-1525 (a)

Pfaeffle, R. W., Savage, J. J., Hunter, C. S., Palme, C., Ahlmann, M., Kumar, P., Bellone, J., Schoenau, E., Korsch, E., BräMswig, J. H., Stobbe, H. M., Blum, W. F., & Rhodes, S. J. (2007). Four Novel Mutations of the LHX3 Gene Cause Combined Pituitary Hormone Deficiencies with or without

Limited Neck Rotation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 92(5), 1909–1919. https://doi.org/10.1210/jc.2006-2177 (b)

Pierce, M., & Madison, L. (2016). Evaluation and initial management of hypopituitarism. Pediatrics in Review, 37(9), 370–376. https://doi.org/10.1542/pir.2015-0081

Pivnick, E. K., Velagaleti, G. V., Wilroy, R. S., Smith, M. E., Rose, S. R., Tipton, R. E., & Tharapel, A. T. (1996). Jacobsen syndrome: report of a patient with severe eye anomalies, growth hormone deficiency, and hypothyroidism associated with deletion 11 (q23q25) and review of 52 cases. Journal of Medical Genetics, 33(9), 772–778. https://doi.org/10.1136/jmg.33.9.772

Plachy, L., Dusatkova, P., Maratova, K., Amaratunga, S. A., Zemkova, D., Neuman, V., Kolouskova, S., Obermannova, B., Snajderova, M., Sumnik, Z., Lebl, J., & Pruhova, S. (2024). Etiology of combined pituitary hormone deficiency: GNAO1 as a novel candidate gene. Endocrine Connections, 13(10). https://doi.org/10.1530/ec-24-0217

Pogoda, H., Von Der Hardt, S., Herzog, W., Kramer, C., Schwarz, H., & Hammerschmidt, M. (2006). The proneural gene *ascl1a* is required for endocrine differentiation and cell survival in the zebrafish adenohypophysis. Development, 133(6), 1079–1089. https://doi.org/10.1242/dev.02296

Pontecorvi, M., Goding, C. R., Richardson, W. D., & Kessaris, N. (2008). Expression of Tbx2 and Tbx3 in the developing hypothalamic–pituitary axis. Gene Expression Patterns, 8(6), 411–417. https://doi.org/10.1016/j.gep.2008.04.006

Poot, M. (2018). HNRNPU: Key to Neurodevelopmental Disorders such as Intellectual Delay, Epilepsy, and Autism. Molecular Syndromology, 9(6), 275–278. https://doi.org/10.1159/000495204

Potic, A., Brais, B., Choquet, K., Schiffmann, R., & Bernard, G. (2012). 4H syndrome with Late-Onset growth hormone deficiency caused by POLR3A mutations. Archives of Neurology, 69(7). https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.1963

Proskorovski-Ohayon, R., Kadir, R., Michalowski, A., Flusser, H., Perez, Y., Hershkovitz, E., Sivan, S., & Birk, O. S. (2017). *PAX7* mutation in a syndrome of failure to thrive, hypotonia, and global neurodevelopmental delay. Human Mutation, 38(12), 1671–1683. https://doi.org/10.1002/humu.23310

Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. Bioinformatics, 26(6), 841–842. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033

Quiroz, Y., Lopez, M., Mavropoulos, A., Motte, P., Martial, J. A., Hammerschmidt, M., & Muller, M. (2012). The HMG-Box Transcription Factor Sox4b Is Required for Pituitary Expression of gata2a and Specification of Thyrotrope and Gonadotrope Cells in Zebrafish. Molecular Endocrinology, 26(6), 1014–1027. https://doi.org/10.1210/me.2011-1319

Raetzman, L., Ross, S., Cook, S., Dunwoodie, S., Camper, S., & Thomas, P. (2003). Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. Developmental Biology, 265(2), 329–340. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2003.09.033

Raetzman, L. T., Cai, J. X., & Camper, S. A. (2006). Hes1 is required for pituitary growth and melanotrope specification. Developmental Biology, 304(2), 455–466. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.11.010

Raivio, T., Avbelj, M., McCabe, M. J., Romero, C. J., Dwyer, A. A., Tommiska, J., Sykiotis, G. P., Gregory, L. C., Diaczok, D., Tziaferi, V., Elting, M. W., Padidela, R., Plummer, L., Martin, C., Feng, B., Zhang, C., Zhou, Q., Chen, H., Mohammadi, M., . . . Pitteloud, N. (2012). Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and Septo-Optic dysplasia. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 97(4), E694–E699. https://doi.org/10.1210/jc.2011-2938

Régal, L., Aydin, H. I., Dieltjens, A., Van Esch, H., Francois, I., Okur, I., Zeybek, C., Meulemans, S., Van Mol, C., Van Bruwaene, L., Then, S., Jaeken, J., & Creemers, J. (2012). Two novel deletions in hypotonia–cystinuria syndrome. Molecular Genetics and Metabolism, 107(3), 614–616. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.06.011

Renard, E., Bonnet, C., Di Patrizio, M., Schmitt, E., Madkaud, A. C., Chabot, C., Kuchenbuch, M., & Lambert, L. (2024). Megalencephaly secondary to a novel germline missense variant p.Asp322Tyr in AKT3 associated with growth hormone deficiency and central hypothyroidism: A case report. American Journal of Medical Genetics Part A, 194(7). https://doi.org/10.1002/ajmg.a.63585

Reynaud, R., Albarel, F., Saveanu, A., Kaffel, N., Castinetti, F., Lecomte, P., Brauner, R., Simonin, G., Gaudart, J., Carmona, E., Enjalbert, A., Barlier, A., & Brue, T. (2011). Pituitary stalk interruption syndrome in 83 patients: novel HESX1 mutation and severe hormonal prognosis in malformative forms. European Journal of Endocrinology, 164(4), 457–465. https://doi.org/10.1530/eje-10-0892

Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W. W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., Voelkerding, K., & Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine, 17(5), 405–424. https://doi.org/10.1038/gim.2015.30

Richieri-Costa, A., & Ribeiro, L. A. (2006). Holoprosencephaly-like phenotype: Clinical and genetic perspectives. American Journal of Medical Genetics Part A, 140A(23), 2587–2593. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.31378

Rizzolio, F., Bione, S., Sala, C., Tribioli, C., Ciccone, R., Zuffardi, O., Di Iorgi, N., Maghnie, M., & Toniolo, D. (2008). Highly conserved Non-Coding sequences and the 18Q critical region for short stature: a common mechanism of disease? PLoS ONE, 3(1), e1460. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001460

Roberts, C., Sutherland, H. F., Farmer, H., Kimber, W., Halford, S., Carey, A., Brickman, J. M., Wynshaw-Boris, A., & Scambler, P. J. (2002). Targeted mutagenesis of the HirA gene results in gastrulation defects and patterning abnormalities of mesoendodermal derivatives prior to early embryonic lethality. Molecular and Cellular Biology, 22(7), 2318–2328. https://doi.org/10.1128/mcb.22.7.2318-2328.2002

Rodrigues, C. H. M., Myung, Y., Pires, D. E. V., & Ascher, D. B. (2019). mCSM-PPI2: predicting the effects of mutations on protein–protein interactions. Nucleic Acids Research, 47(W1), W338–W344. https://doi.org/10.1093/nar/gkz383

Roisman-Geller, N., Pisanty, O., Weinberger, A., Gajbhiye, D. S., Golan, M., & Gothilf, Y. (2024). Combined pituitary hormone deficiency in LHX4-Knockout Zebrafish. International Journal of Molecular Sciences, 25(13), 7332. https://doi.org/10.3390/ijms25137332

Rolle, M. L., Massa, F., Siggers, P., Turchi, L., Loubat, A., Koo, B., Clevers, H., Greenfield, A., Schedl, A., Chaboissier, M., & Chassot, A. (2021). Arrest of WNT/β-catenin signaling enables the transition from pluripotent to differentiated germ cells in mouse ovaries. Proceedings of the National Academy of Sciences, 118(30). https://doi.org/10.1073/pnas.2023376118

Romano, S., Maffei, P., Bettini, V., Milan, G., Favaretto, F., Gardiman, M., Marshall, J. D., Greggio, N. A., Pozzan, G. B., Collin, G. B., Naggert, J. K., Bronson, R., & Vettor, R. (2013). Alström syndrome is associated with short stature and reduced GH reserve. Clinical Endocrinology, 79(4), 529–536. https://doi.org/10.1111/cen.12180

Royan, M. R., Hodne, K., Nourizadeh-Lillabadi, R., Weltzien, F., Henkel, C. V., & Fontaine, R. (2023). Photoperiod regulates gonadotrope cell division in medaka via melatonin, Tsh and folliculostellate cells. bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory). https://doi.org/10.1101/2023.06.09.544159

Sanchez-Valle, A., Wang, X., Potocki, L., Xia, Z., Kang, S. L., Carlin, M. E., Michel, D., Williams, P., Cabrera-Meza, G., Brundage, E. K., Eifert, A. L., Stankiewicz, P., Cheung, S. W., & Lalani, S. R. (2010). HERV-mediated genomic rearrangement of EYA1 in an individual with branchio-oto-renal syndrome. American Journal of Medical Genetics Part A, 152A(11), 2854–2860. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.33686

Sandestig, A., Green, A., Aronsson, J., Ellnebo, K., & Stefanova, M. (2019). A Novel DLG3 Mutation Expanding the Phenotype of X-Linked Intellectual Disability Caused by DLG3 Nonsense Variants. Molecular Syndromology, 10(5), 281–285. https://doi.org/10.1159/000502601

Sandhu, B. K., & Brueton, M. J. (1989). Concurrent pancreatic and growth hormone insufficiency in Johanson-Blizzard syndrome. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 9(4), 535–538. https://doi.org/10.1097/00005176-198911000-00026

Sbrogna, J. L., Barresi, M. J., & Karlstrom, R. O. (2003). Multiple roles for Hedgehog signaling in zebrafish pituitary development. Developmental Biology, 254(1), 19–35. https://doi.org/10.1016/s0012-1606(02)00027-1

Scaglia, P. A., Martínez, A. S., Feigerlová, E., Bezrodnik, L., Gaillard, M. I., Di Giovanni, D., Ballerini, M. G., Jasper, H. G., Heinrich, J. J., Fang, P., Domené, H. M., Rosenfeld, R. G., & Hwa, V. (2012). A Novel Missense Mutation in the SH2 Domain of the *STAT5B* Gene Results in a Transcriptionally Inactive STAT5b Associated with Severe IGF-I Deficiency, Immune Dysfunction, and Lack of Pulmonary Disease. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 97(5), E830–E839. https://doi.org/10.1210/jc.2011-2554

Scala, M., Accogli, A., Allegri, A. M. E., Tassano, E., Severino, M., Morana, G., Maghnie, M., & Capra, V. (2018). Familial ROBO1 deletion associated with ectopic posterior pituitary, duplication of the pituitary stalk and anterior pituitary hypoplasia. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 32(1), 95–99. https://doi.org/10.1515/jpem-2018-0272

Schänzer, A., Achleitner, M. T., Trümbach, D., Hubert, L., Munnich, A., Ahlemeyer, B., AlAbdulrahim, M. M., Greif, P. A., Vosberg, S., Hummer, B., Feichtinger, R. G., Mayr, J. A., Wortmann, S. B., Aichner, H., Rudnik-Schöneborn, S., Ruiz, A., Gabau, E., Sánchez, J. P., Ellard, S., . . . Weber, A. (2021). Mutations in HID1 cause syndromic infantile encephalopathy and hypopituitarism. Annals of Neurology, 90(1), 143–158. https://doi.org/10.1002/ana.26127

Schimke, L. F., Rieber, N., Rylaarsdam, S., Cabral-Marques, O., Hubbard, N., Puel, A., Kallmann, L., Sombke, S. A., Notheis, G., Schwarz, H., Kammer, B., Hökfelt, T., Repp, R., Picard, C., Casanova, J., Belohradsky, B. H., Albert, M. H., Ochs, H. D., Renner, E. D., & Torgerson, T. R. (2013). A Novel Gain-of-Function IKBA Mutation Underlies Ectodermal Dysplasia with Immunodeficiency and Polyendocrinopathy. Journal of Clinical Immunology, 33(6), 1088–1099. https://doi.org/10.1007/s10875-013-9906-1

Schmahl, J., Raymond, C. S., & Soriano, P. (2006). PDGF signaling specificity is mediated through multiple immediate early genes. Nature Genetics, 39(1), 52–60. https://doi.org/10.1038/ng1922

Schulz, Y., Wehner, P., Opitz, L., Salinas-Riester, G., Bongers, E. M. H. F., Van Ravenswaaij-Arts, C. M. A., Wincent, J., Schoumans, J., Kohlhase, J., Borchers, A., & Pauli, S. (2014). CHD7, the gene mutated in CHARGE syndrome, regulates genes involved in neural crest cell guidance. Human Genetics, 133(8), 997–1009. https://doi.org/10.1007/s00439-014-1444-2

Schwarz, J. M., Cooper, D. N., Schuelke, M., & Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. Nature Methods, 11(4), 361–362. https://doi.org/10.1038/nmeth.2890

Seaby, E. G., Rehm, H. L., & O'Donnell-Luria, A. (2021). Strategies to uplift Novel Mendelian Gene Discovery for improved Clinical Outcomes. Frontiers in Genetics, 12. https://doi.org/10.3389/fgene.2021.674295

Seo, G. H., & Yoo, H. (2018). Growth hormone therapy in patients with Noonan syndrome. Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism, 23(4), 176–181. https://doi.org/10.6065/apem.2018.23.4.176

Shalata, A., Lauhasurayotin, S., Leibovitz, Z., Li, H., Hebert, D., Dhanraj, S., Hadid, Y., Mahroum, M., Bajar, J., Egenburg, S., Arad, A., Shohat, M., Haddad, S., Bakry, H., Moshiri, H., Scherer, S. W., Tzur, S., & Dror, Y. (2018). Biallelic mutations in EXOC3L2 cause a novel syndrome that affects the brain, kidney and blood. Journal of Medical Genetics, 56(5), 340–346. https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105421

Sheehan, M. T. (2016). Biochemical Testing of the Thyroid: TSH is the Best and, Oftentimes, Only Test Needed – A Review for Primary Care. Clinical Medicine & Research, 14(2), 83–92. https://doi.org/10.3121/cmr.2016.1309

Sherry, S. T. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. Nucleic Acids Research, 29(1), 308–311. https://doi.org/10.1093/nar/29.1.308

Shi, C., Lu, Y., Zhai, G., Huang, J., Shang, G., Lou, Q., Li, D., Jin, X., He, J., Du, Z., Gui, J., & Yin, Z. (2019). Hyperandrogenism in POMCa-deficient zebrafish enhances somatic growth without increasing adiposity. Journal of Molecular Cell Biology, 12(4), 291–304. https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz053

Shu, Y., Lou, Q., Dai, Z., Dai, X., He, J., Hu, W., & Yin, Z. (2016). The basal function of teleost prolactin as a key regulator on ion uptake identified with zebrafish knockout models. Scientific Reports, 6(1). https://doi.org/10.1038/srep18597

Shupnik, M. A., Weck, J., & Hinkle, P. M. (1996). Thyrotropin (TSH)-releasing hormone stimulates TSH beta promoter activity by two distinct mechanisms involving calcium influx through L type Ca2+ channels and protein kinase C. Molecular Endocrinology, 10(1), 90–99. https://doi.org/10.1210/mend.10.1.8838148

Sigloch, C., Spitz, D., & Driever, W. (2023). A network of Notch-dependent and -independent her genes controls neural stem and progenitor cells in the zebrafish thalamic proliferation zone. Development, 150(7). https://doi.org/10.1242/dev.201301

Silva, S., Miyake, N., Tapia, C., & Matsumoto, N. (2018). The second point mutation in PREPL: a case report and literature review. Journal of Human Genetics, 63(5), 677–681. https://doi.org/10.1038/s10038-018-0426-y

Silva, T. S., Faucz, F. R., Hernández-Ramírez, L. C., Pankratz, N., Lane, J., Kay, D. M., Lyra, A., Kochi, C., Stratakis, C. A., Longui, C. A., & Mills, J. L. (2022). Whole exome sequencing in patients with ectopic posterior pituitary. Journal of the Endocrine Society, 6(10). https://doi.org/10.1210/jendso/bvac116

Simm, F., Griesbeck, A., Choukair, D., Weiß, B., Paramasivam, N., Klammt, J., Schlesner, M., Wiemann, S., Martinez, C., Hoffmann, G. F., Pfäffle, R. W., Bettendorf, M., & Rappold, G. A. (2017). Identification of SLC20A1 and SLC15A4 among other genes as potential risk factors for combined pituitary hormone deficiency. Genetics in Medicine, 20(7), 728–736. https://doi.org/10.1038/gim.2017.165

Simms, R. J., Sayer, J. A., Quinton, R., Walker, M., Ellard, S., & Goodship, T. H. J. (2010). Monogenic diabetes, renal dysplasia and hypopituitarism: a patient with a HNF1A mutation. QJM, 104(10), 881–883. https://doi.org/10.1093/qjmed/hcq195

Skarnes, W. C., Rosen, B., West, A. P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A. O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., Jackson, D., Severin, J., Biggs, P., Fu, J., Nefedov, M., De Jong, P. J., Stewart, A. F., & Bradley, A. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. Nature, 474(7351), 337–342. https://doi.org/10.1038/nature10163

Smith, J. D., Hing, A. V., Clarke, C. M., Johnson, N. M., Perez, F. A., Park, S. S., Horst, J. A., Mecham, B., Maves, L., Nickerson, D. A., & Cunningham, M. L. (2014). Exome Sequencing Identifies a Recurrent De Novo ZSWIM6 Mutation Associated with Acromelic Frontonasal Dysostosis. The American Journal of Human Genetics, 95(2), 235–240. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.07.008

Sohn, Y. B., Ki, C., Park, S. W., Cho, S., Ko, A., Kwon, M., Kim, J., Park, H., Kim, O., & Jin, D. (2013). Clinical, biochemical, and genetic analysis of two Korean patients with Trichorhinophalangeal syndrome type I and growth hormone deficiency. International Journal of Pediatric Endocrinology, 2013(S1). https://doi.org/10.1186/1687-9856-2013-s1-p59

Solnica-Krezel, L., Schier, A. F., & Driever, W. (1994). Efficient recovery of ENU-induced mutations from the zebrafish germline. Genetics, 136(4), 1401–1420. https://doi.org/10.1093/genetics/136.4.1401

Solomon, N. M. (2004). Array comparative genomic hybridisation analysis of boys with X linked hypopituitarism identifies a 3.9 Mb duplicated critical region at Xq27 containing SOX3. Journal of Medical Genetics, 41(9), 669–678. https://doi.org/10.1136/jmg.2003.016949

Song, J., Lu, Y., Cheng, X., Shi, C., Lou, Q., Jin, X., He, J., Zhai, G., & Yin, Z. (2021). Functions of the Thyroid-Stimulating hormone on key developmental features revealed in a series of zebrafish dyshormonogenesis models. Cells, 10(8), 1984. https://doi.org/10.3390/cells10081984

Sornson, M. W., Wu, W., Dasen, J. S., Flynn, S. E., Norman, D. J., O'Connell, S. M., Gukovsky, I., Carrière, C., Ryan, A. K., Miller, A. P., Zuo, L., Gleiberman, A. S., Andersen, B., Beamer, W. G., & Rosenfeld, M. G. (1996). Pituitary lineage determination by the Prophet of Pit-1 homeodomain factor defective in Ames dwarfism. Nature, 384(6607), 327–333. https://doi.org/10.1038/384327a0

Spaziani, M., Tarantino, C., Tahani, N., Gianfrilli, D., Sbardella, E., Lenzi, A., & Radicioni, A. F. (2020). Hypothalamo-Pituitary axis and puberty. Molecular and Cellular Endocrinology, 520, 111094. https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111094

Spiegel, R., Shalev, S. A., Adawi, A., Sprecher, E., & Tenenbaum-Rakover, Y. (2010). ANE syndrome caused by mutated RBM28 gene: a novel etiology of combined pituitary hormone deficiency. European Journal of Endocrinology, 162(6), 1021–1025. https://doi.org/10.1530/eje-10-0077

Spitzweck, B., Brankatschk, M., & Dickson, B. J. (2010). Distinct protein domains and expression patterns confer divergent axon guidance functions for drosophila robo receptors. Cell, 140(3), 409–420. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.002

Sprinzak, D., Lakhanpal, A., LeBon, L., Santat, L. A., Fontes, M. E., Anderson, G. A., Garcia-Ojalvo, J., & Elowitz, M. B. (2010). Cis-interactions between Notch and Delta generate mutually exclusive signalling states. Nature, 465(7294), 86–90. https://doi.org/10.1038/nature08959

Stagi, S., Lapi, E., Pantaleo, M., Carella, M., Petracca, A., De Crescenzo, A., Zelante, L., Riccio, A., & De Martino, M. (2015). A new case of de novo 6q24.2-q25.2 deletion on paternal chromosome 6 with growth hormone deficiency: a twelve-year follow-up and literature review. BMC Medical Genetics, 16(1). https://doi.org/10.1186/s12881-015-0212-z

Stanik, J., Skopkova, M., Stanikova, D., Brennerova, K., Barak, L., Ticha, L., Hornova, J., Klimes, I., & Gasperikova, D. (2018). Neonatal hypoglycemia, Early-Onset diabetes and hypopituitarism due to the mutation in EIF2S3 gene causing MEHMO syndrome. Physiological Research, 331–337. https://doi.org/10.33549/physiolres.933689

Stephen, J., Vilboux, T., Mian, L., Kuptanon, C., Sinclair, C. M., Yildirimli, D., Maynard, D. M., Bryant, J., Fischer, R., Vemulapalli, M., Mullikin, J. C., Huizing, M., Gahl, W. A., Malicdan, M. C. V., & Gunay-Aygun, M. (2017). Mutations in KIAA0753 cause Joubert syndrome associated with growth hormone deficiency. Human Genetics, 136(4), 399–408. https://doi.org/10.1007/s00439-017-1765-z

Steyn, F. J., Tolle, V., Chen, C., & Epelbaum, J. (2016). Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion. Comprehensive Physiology, 687–735. https://doi.org/10.1002/cphy.c150002

Stewart, D. M., Tian, L., Notarangelo, L. D., & Nelson, D. L. (2005). Update on X-linked hypogammaglobulinemia with isolated growth hormone deficiency. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 5(6), 510–512. https://doi.org/10.1097/01.all.0000191235.35879.29

Stewart, D. M., Tian, L., Notarangelo, L. D., & Nelson, D. L. (2008). X-linked hypogammaglobulinemia and isolated growth hormone deficiency: an update. Immunologic Research, 40(3), 262–270. https://doi.org/10.1007/s12026-007-0028-9

Sukarova-Angelovska, E., Kocova, M., Ilieva, G., Angelkova, N., & Kochova, E. (2016). Rare case of Killian-Pallister syndrome associated with idiopathic short stature detected with fluorescent in situ hybridization on buccal smear. Molecular Cytogenetics, 9(1). https://doi.org/10.1186/s13039-016-0239-7

Sun, Q., Zheng, Y., Zhang, X., & Mu, Y. (2015). Role of Gonadotropin-releasing Hormone Stimulation Test in Diagnosing Gonadotropin Deficiency in Both Males and Females with Delayed Puberty. Chinese Medical Journal, 128(18), 2439–2443. https://doi.org/10.4103/0366-6999.164926

Szczawińska-Popłonyk, A., Popłonyk, N., Niedziela, M., Sowińska-Seidler, A., Sztromwasser, P., Jamsheer, A., & Obara-Moszyńska, M. (2022). Case report: The cardio-facio-cutaneous syndrome due to a novel germline mutation in MAP2K1: A multifaceted disease with immunodeficiency and short stature. Frontiers in Pediatrics, 10. https://doi.org/10.3389/fped.2022.990111

Szekeres‐bartho, J., Kilaŕ, F., Falkay, G., Csernus, V., Török, A., & Pacsa, A. (1985). The mechanism of the inhibitory effect of progesterone on lymphocyte cytotoxicity: i. Progesterone‐Treated lymphocytes release a substance inhibiting cytotoxicity and prostaglandin synthesis. American Journal of Reproductive Immunology, 9(1), 15–18. https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.1985.tb00334.x

Tahoun, M., Chandler, J. C., Ashton, E., Haston, S., Hannan, A., Kim, J. S., D'Arco, F., Bockenhauer, D., Anderson, G., Lin, M., Marzouk, S., Saied, M. H., Miner, J. H., Dattani, M. T., & Waters, A. M. (2019). Mutations in LAMB2 are associated with albuminuria and optic nerve hypoplasia with hypopituitarism. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 105(3), 595–599. https://doi.org/10.1210/clinem/dgz216

Tajima, T., Ishizu, K., & Nakamura, A. (2013). Molecular and Clinical Findings in Patients with *LHX4* and *OTX2* Mutations. Clinical Pediatric Endocrinology, 22(2), 15–23. https://doi.org/10.1297/cpe.22.15

Takagi, M., Nagasaki, K., Fujiwara, I., Ishii, T., Amano, N., Asakura, Y., Muroya, K., Hasegawa, Y., Adachi, M., & Hasegawa, T. (2014). Heterozygous defects in PAX6 gene and congenital hypopituitarism. European Journal of Endocrinology, 172(1), 37–45. https://doi.org/10.1530/eje-14-0255 (a)

Takagi, M., Narumi, S., Hamada, R., Hasegawa, Y., & Hasegawa, T. (2014). A novel KAL1 mutation is associated with combined pituitary hormone deficiency. Human Genome Variation, 1(1). https://doi.org/10.1038/hgv.2014.11 (b)

Takezawa, Y., Fujie, H., Kikuchi, A., Niihori, T., Funayama, R., Shirota, M., Nakayama, K., Aoki, Y., Sasaki, M., & Kure, S. (2018). Novel IARS2 mutations in Japanese siblings with CAGSSS, Leigh, and West syndrome. Brain and Development, 40(10), 934–938. https://doi.org/10.1016/j.braindev.2018.06.010

Tasdemir, S., Sahin, I., Cayır, A., Doneray, H., Solomon, B. D., Muenke, M., Yuce, I., & Tatar, A. (2014). Holoprosencephaly: ZIC2 mutation in a case with panhypopituitarism. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism, 27(7–8). https://doi.org/10.1515/jpem-2013-0449

Tatsi, C., Sertedaki, A., Voutetakis, A., Valavani, E., Magiakou, M., Kanaka-Gantenbein, C., Chrousos, G. P., & Dacou-Voutetakis, C. (2013). Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in Holoprosencephaly-Related genes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 98(4), E779–E784. https://doi.org/10.1210/jc.2012-3982

Thomas, P. Q. (2001). Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. Human Molecular Genetics, 10(1), 39–45. https://doi.org/10.1093/hmg/10.1.39

Tiong, K., Cotterill, A., & Falhammar, H. (2010). Adult case of partial trisomy 9q. BMC Medical Genetics, 11(1). https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-26

Tobias, E. S., Lucas-Herald, A. K., Sagar, D., Montezano, A. C., Rios, F. J., De Lucca Camargo, L., Hamilton, G., Gazdagh, G., Diver, L. A., Williams, N., Herzyk, P., Touyz, R. M., Greenfield, A., McGowan, R., & Ahmed, S. F. (2024). SEC31A may be associated with pituitary hormone deficiency and gonadal dysgenesis. Endocrine, 84(2), 345–349. https://doi.org/10.1007/s12020-024-03701-x

Tommiska, J., Känsäkoski, J., Skibsbye, L., Vaaralahti, K., Liu, X., Lodge, E. J., Tang, C., Yuan, L., Fagerholm, R., Kanters, J. K., Lahermo, P., Kaunisto, M., Keski-Filppula, R., Vuoristo, S., Pulli, K., Ebeling, T., Valanne, L., Sankila, E., Kivirikko, S., . . . Raivio, T. (2017). Two missense mutations in KCNQ1 cause pituitary hormone deficiency and maternally inherited gingival fibromatosis. Nature Communications, 8(1). https://doi.org/10.1038/s41467-017-01429-z

Tornese, G., Marzuillo, P., Pellegrin, M. C., Germani, C., Faleschini, E., Zennaro, F., Grandone, A., Del Giudice, E. M., Perrone, L., & Ventura, A. (2015). A case of Rubinstein-Taybi syndrome associated with growth hormone deficiency in childhood. Clinical Endocrinology, 83(3), 437–439. https://doi.org/10.1111/cen.12748

Tovar, J. L., Zuluaga, N. A., Torres, A. C. F., Correa-Jimenez, O., & Sierra, J. M. (2022). Endocrine Abnormalities and Growth Characterization in Colombian Pediatric Patients with 22q11 Deletion Syndrome. Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology, 15(1), 16–24. https://doi.org/10.4274/jcrpe.galenos.2022.2022-4-12

Treier, M., O'Connell, S., Gleiberman, A., Price, J., Szeto, D. P., Burgess, R., Chuang, P., McMahon, A. P., & Rosenfeld, M. G. (2001). Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. Development, 128(3), 377–386. https://doi.org/10.1242/dev.128.3.377

Triantafyllou, P., Economou, M., Vlachaki, E., Aggelaki, M., Athanassiou-Mataxa, M., Michelakaki, E., & Zafeiriou, D. I. (2014). Multiple endocrine disorders associated with adrenomyeloneuropathy and a novel mutation of the ABCD1 gene. Pediatric Neurology, 50(6), 622–624. https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2014.01.027

Trimouille, A., Lasseaux, E., Barat, P., Deiller, C., Drunat, S., Rooryck, C., Arveiler, B., & Lacombe, D. (2017). Further delineation of the phenotype caused by biallelic variants in the WDR4 gene. Clinical Genetics, 93(2), 374–377. https://doi.org/10.1111/cge.13074

Trinh, L. A., Hochgreb, T., Graham, M., Wu, D., Ruf-Zamojski, F., Jayasena, C. S., Saxena, A., Hawk, R., Gonzalez-Serricchio, A., Dixson, A., Chow, E., Gonzales, C., Leung, H., Solomon, I., Bronner-Fraser, M., Megason, S. G., & Fraser, S. E. (2011). A versatile gene trap to visualize and interrogate the function of the vertebrate proteome. Genes & Development, 25(21), 2306–2320. https://doi.org/10.1101/gad.174037.111

Tsai, Y., Shen, C., D, D., Tsai, C., & Tarn, W. (2023). Activation of TrkB signaling mitigates cerebellar anomalies caused by Rbm4-Bdnf deficiency. Communications Biology, 6(1). https://doi.org/10.1038/s42003-023-05294-z

Tuiskula, A., Rahikkala, E., Kero, A., Haanpää, M. K., & Avela, K. (2023). Jansen de Vries syndrome: Report of four new patients and review of the literature. European Journal of Medical Genetics, 66(8), 104807. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2023.104807

Tusa, R. J., & Hove, M. T. (1999). Ocular and oculomotor signs in Joubert Syndrome. Journal of Child Neurology, 14(10), 621–627. https://doi.org/10.1177/088307389901401001

Twigg, S., Ousager, L., Miller, K., Zhou, Y., Elalaoui, S., Sefiani, A., Bak, G., Hove, H., Hansen, L., Fagerberg, C., Tajir, M., & Wilkie, A. (2015). Acromelic frontonasal dysostosis and ZSWIM6 mutation: phenotypic spectrum and mosaicism. Clinical Genetics, 90(3), 270–275. https://doi.org/10.1111/cge.12721

Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigyarto, C. A., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., . . . Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. Science, 347(6220). https://doi.org/10.1126/science.1260419

Van Der Laan, L., Kleinendorst, L., Van Hagen, J. M., Waisfisz, Q., & Van Haelst, M. M. (2024b). Phenotypic spectrum in Weiss-Kruszka syndrome caused by ZNF462 variants: Three new patients and literature review. European Journal of Medical Genetics, 71, 104964. https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2024.104964

Van Esch, H., Poirier, K., De Zegher, F., Holvoet, M., Bienvenu, T., Chelly, J., Devriendt, K., & Fryns, J. (2004). ARX mutation in a boy with transsphenoidal encephalocele and hypopituitarism. Clinical Genetics, 65(6), 503–505. https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2004.00256.x

Van Tijn, D. A., De Vijlder, J. J. M., Verbeeten, B., Verkerk, P. H., & Vulsma, T. (2005). Neonatal detection of congenital hypothyroidism of central origin. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 90(6), 3350–3359. https://doi.org/10.1210/jc.2004-2444

Veleri, S., Manjunath, S. H., Fariss, R. N., May-Simera, H., Brooks, M., Foskett, T. A., Gao, C., Longo, T. A., Liu, P., Nagashima, K., Rachel, R. A., Li, T., Dong, L., & Swaroop, A. (2014). Ciliopathy-associated gene Cc2d2a promotes assembly of subdistal appendages on the mother centriole during cilia biogenesis. Nature Communications, 5(1). https://doi.org/10.1038/ncomms5207

Verheijen, J., Tahata, S., Kozicz, T., Witters, P., & Morava, E. (2019b). Therapeutic approaches in Congenital Disorders of Glycosylation (CDG) involving N-linked glycosylation: an update. Genetics in Medicine, 22(2), 268–279. https://doi.org/10.1038/s41436-019-0647-2

Verpula, M., Danda, V. S. R., Paidipally, S. R., & Konda, C. (2020). Bloom's syndrome with growth hormone deficiency: a rare association. BMJ Case Reports, 13(10), e235238. https://doi.org/10.1136/bcr-2020-235238

Vetro, A., Pagani, S., Silengo, M., Severino, M., Bozzola, E., Meazza, C., Zuffardi, O., & Bozzola, M. (2014). Severe growth hormone deficiency and pituitary malformation in a patient with chromosome 2p25 duplication and 2q37 deletion. Molecular Cytogenetics, 7(1). https://doi.org/10.1186/1755-8166-7-41

Vilboux, T., Malicdan, M. C. V., Roney, J. C., Cullinane, A. R., Stephen, J., Yildirimli, D., Bryant, J., Fischer, R., Vemulapalli, M., Mullikin, J. C., Steinbach, P. J., Gahl, W. A., & Gunay-Aygun, M. (2017). CELSR2, encoding a planar cell polarity protein, is a putative gene in Joubert syndrome with cortical heterotopia, microphthalmia, and growth hormone deficiency. American Journal of Medical Genetics Part A, 173(3), 661–666. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38005

Visel, A. (2003). GenePaint.org: an atlas of gene expression patterns in the mouse embryo. Nucleic Acids Research, 32(90001), 552D – 556. https://doi.org/10.1093/nar/gkh029

Vishnopolska, S. A., Mercogliano, M. F., Camilletti, M. A., Mortensen, A. H., Braslavsky, D., Keselman, A., Bergadá, I., Olivieri, F., Miranda, L., Marino, R., Ramírez, P., Garrido, N. P., Mejia, H. P., Ciaccio, M., Di Palma, M. I., Belgorosky, A., Martí, M. A., Kitzman, J. O., Camper, S. A., & Pérez-Millán, M. I. (2021). Comprehensive identification of pathogenic gene variants in patients with neuroendocrine disorders. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 106(7), 1956–1976. https://doi.org/10.1210/clinem/dgab177

Vona, B., Maroofian, R., Bellacchio, E., Najafi, M., Thompson, K., Alahmad, A., He, L., Ahangari, N., Rad, A., Shahrokhzadeh, S., Bahena, P., Mittag, F., Traub, F., Movaffagh, J., Amiri, N., Doosti, M., Boostani, R., Shirzadeh, E., Haaf, T., . . . Karimiani, E. G. (2018). Expanding the clinical phenotype of IARS2-related mitochondrial disease. BMC Medical Genetics, 19(1). https://doi.org/10.1186/s12881-018-0709-3

Voutsadaki, K., Matalliotakis, M., & Ladomenou, F. (2022). Hypogonadism in adolescent girls: treatment and long-term effects. PubMed, 93(5), e2022317. https://doi.org/10.23750/abm.v93i5.13719

Wahi, K., Bochter, M. S., & Cole, S. E. (2014). The many roles of Notch signaling during vertebrate somitogenesis. Seminars in Cell and Developmental Biology, 49, 68–75. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.11.010

Wang, H., Gauthier, B. R., Hagenfeldt-Johansson, K. A., Iezzi, M., & Wollheim, C. B. (2002). FOxa2 (HNF3B) controls multiple genes implicated in Metabolism-Secretion coupling of glucose-induced insulin release. Journal of Biological Chemistry, 277(20), 17564–17570. https://doi.org/10.1074/jbc.m111037200

Wang, K., Li, M., & Hakonarson, H. (2010). ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Research, 38(16), e164. https://doi.org/10.1093/nar/gkq603 (a)

Wang, Y., Martin, J. F., & Bai, C. B. (2010). Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. Developmental Biology, 348(2), 199–209. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.09.024 (b)

Wang, X., Zhang, D., Xu, Z., Ma, M., Wang, W., Li, L., Han, X., Huo, Y., Yu, X., & Sun, J. (2014). Understanding cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptors. Journal of Neurochemistry, 131(6), 699–711. https://doi.org/10.1111/jnc.12955

Wang, C., Wei, Q., Guo, L., Liu, H., & Guo, Q. (2019). Normal height and novel mutations in growth hormone deficiency adults with pituitary stalk interruption syndrome. PubMed, 40(7–8), 299–304. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32304364 (a)

Wang, D., Zhang, M., Guan, H., & Wang, X. (2019). Osteogenesis imperfecta due to combined heterozygous mutations in both COL1A1 and COL1A2, coexisting with pituitary stalk interruption syndrome. Frontiers in Endocrinology, 10. https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00193 (b)

Wang, C., Guo, L., Guo, Q., & Mu, Y. (2020). NBPF9 Gene May Be Involved in Congenital Hypopituitarism: A Whole-Genome Study of a Boy with Pituitary Stalk Interruption Syndrome and His Family. International Journal of Endocrinology, 2020, 1–9. https://doi.org/10.1155/2020/5401738

Wang, Q., Cheng, S., Fu, Y., & Yuan, H. (2022). Case report: A de novo RASopathy-causing SHOC2 variant in a Chinese girl with noonan syndrome-like with loose anagen hair. Frontiers in Genetics, 13. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1040124

Webb, E. A., AlMutair, A., Kelberman, D., Bacchelli, C., Chanudet, E., Lescai, F., Andoniadou, C. L., Banyan, A., Alsawaid, A., Alrifai, M. T., Alahmesh, M. A., Balwi, M., Mousavy-Gharavy, S. N., Lukovic, B., Burke, D., McCabe, M. J., Kasia, T., Kleta, R., Stupka, E., . . . Dattani, M. T. (2013). ARNT2 mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies. Brain, 136(10), 3096–3105. https://doi.org/10.1093/brain/awt218

Webb, B., & Sali, A. (2016). Comparative protein structure modeling using MODELLER. Current Protocols in Bioinformatics, 54(1). https://doi.org/10.1002/cpbi.3

Wee, E., Herriges, J., Dileepan, K., Tsai, S. L., Alaimo, J. T., & Paprocki, E. (2023). Hyperinsulinemic hypoglycemia and growth hormone deficiency secondary to 20P11 deletion. Case Reports in Endocrinology, 2023, 1–5. https://doi.org/10.1155/2023/8658540

Weinzimer, S. A. (2001). Endocrine aspects of the 22q11.2 deletion syndrome. Genetics in Medicine, 3(1), 19–22. https://doi.org/10.1097/00125817-200101000-00005

Wen, M., Hsiao, H., Chao, M., & Tsai, F. (2010). Growth Hormone Deficiency in a Case of Crouzon Syndrome with Hydrocephalus. International Journal of Pediatric Endocrinology, 2010, 1–4. https://doi.org/10.1155/2010/876514

Wen, L., Fu, L., Guo, X., Chen, Y., & Shi, Y. (2014). Histone methyltransferase Dot1L plays a role in postembryonic development in *Xenopus tropicalis*. The FASEB Journal, 29(2), 385–393. https://doi.org/10.1096/fj.14-252171

Wheway, G., Schmidts, M., Mans, D. A., Szymanska, K., Nguyen, T. T., Racher, H., Phelps, I. G., Toedt, G., Kennedy, J., Wunderlich, K. A., Sorusch, N., Abdelhamed, Z. A., Natarajan, S., Herridge, W., Van Reeuwijk, J., Horn, N., Boldt, K., Parry, D. A., Letteboer, S. J. F., . . . Johnson, C. A. (2015). An siRNA-based functional genomics screen for the identification of regulators of ciliogenesis and ciliopathy genes. Nature Cell Biology, 17(8), 1074–1087. https://doi.org/10.1038/ncb3201

Wiechmann, A. F., Vrieze, M. J., & Wirsig-Wiechmann, C. R. (2003). Differential distribution of melatonin receptors in the pituitary gland of *Xenopus laevis*. Anatomy and Embryology, 206(4), 291–299. https://doi.org/10.1007/s00429-002-0295-0

Wierson, W. A., Welker, J. M., Almeida, M. P., Mann, C. M., Webster, D. A., Torrie, M. E., Weiss, T. J., Kambakam, S., Vollbrecht, M. K., Lan, M., McKeighan, K. C., Levey, J., Ming, Z., Wehmeier, A., Mikelson, C. S., Haltom, J. A., Kwan, K. M., Chien, C., Balciunas, D., . . . Essner, J. (2020). Efficient targeted integration directed by short homology in zebrafish and mammalian cells. eLife, 9. https://doi.org/10.7554/elife.53968

Wilson, R., Geyer, S. H., Reissig, L., Rose, J., Szumska, D., Hardman, E., Prin, F., McGuire, C., Ramirez-Solis, R., White, J., Galli, A., Tudor, C., Tuck, E., Mazzeo, C. I., Smith, J. C., Robertson, E., Adams, D. J., Mohun, T., & Weninger, W. J. (2017). Highly variable penetrance of abnormal

phenotypes in embryonic lethal knockout mice. Wellcome Open Research, 1, 1. https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.9899.2

Wolf, M., Saunier, S., O'Toole, J., Wanner, N., Groshong, T., Attanasio, M., Salomon, R., Stallmach, T., Sayer, J., Waldherr, R., Griebel, M., Oh, J., Neuhaus, T., Josefiak, U., Antignac, C., Otto, E., & Hildebrandt, F. (2007). Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. Kidney International, 72(12), 1520–1526. https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002630

Wolf, F. A., Angerer, P., & Theis, F. J. (2018). SCANPY: large-scale single-cell gene expression data analysis. Genome Biology, 19(1). https://doi.org/10.1186/s13059-017-1382-0

Wong, E. Y., Ahmed, M., & Xu, P. (2012). EYA1–SIX1 complex in neurosensory cell fate induction in the mammalian inner ear. Hearing Research, 297, 13–19. https://doi.org/10.1016/j.heares.2012.09.009

Woody, A. L., Hsieh, D. T., McIver, H. K., Thomas, L. P., & Rohena, L. (2015). Infantile onset Vanishing White Matter disease associated with a novelEIF2B5variant, remarkably long life span, severe epilepsy, and hypopituitarism. American Journal of Medical Genetics Part A, 167(4), 826–830. https://doi.org/10.1002/ajmg.a.36961

Wu, R., Tang, W., Qiu, K., Li, X., Tang, D., Meng, Z., & He, Z. (2021). Identification of novel CSNK2A1 variants and the genotype–phenotype relationship in patients with Okur–Chung neurodevelopmental syndrome: a case report and systematic literature review. Journal of International Medical Research, 49(5). https://doi.org/10.1177/03000605211017063

Wu, H., Wang, C., Yu, S., Ye, X., Jiang, Y., He, P., & Shan, X. (2023). Downregulation of ACAN is Associated with the Growth hormone pathway and Induces short stature. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 37(2). https://doi.org/10.1002/jcla.24830

Xue, Y., Zhao, Y., Wu, B., Shu, J., Yan, D., Li, D., Yu, X., & Cai, C. (2023). A novel variant in ALG1 gene associated with congenital disorder of glycosylation: A case report and short literature review. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 11(8). https://doi.org/10.1002/mgg3.2197

Yan, C., Wu, F., Sun, F., Fang, Y., Zhang, R., Zhang, C., Zhang, C., Wang, Z., Yang, R., Yang, L., Dong, M., Zhang, Q., Ye, X., Song, H., & Zhao, S. (2023). The *isl2a* transcription factor regulates pituitary development in zebrafish. Frontiers in Endocrinology, 14. https://doi.org/10.3389/fendo.2023.920548

Yang, L., Nichols, J. T., Yao, C., Manilay, J. O., Robey, E. A., & Weinmaster, G. (2004). Fringe glycosyltransferases differentially modulate notch1 proteolysis induced by Delta1 and jagged1. Molecular Biology of the Cell, 16(2), 927–942. https://doi.org/10.1091/mbc.e04-07-0614

Yang, W., Gomes, R., Alicknavitch, M., Farach-Carson, M., & Carson, D. (2005). Perlecan Domain I promotes fibroblast growth factor 2 delivery in collagen I fibril scaffolds. Tissue Engineering, 11(1–2), 76–89. https://doi.org/10.1089/ten.2005.11.76

Yang, Y., Wang, Y., Li, Z., Zhou, L., & Gui, J. (2017). Sequential, divergent, and cooperative requirements ofFOXL2AandFOXL2Bin ovary development and maintenance of zebrafish. Genetics, 205(4), 1551–1572. https://doi.org/10.1534/genetics.116.199133

Yang, L., & Yang, F. (2020). A de novo heterozygous variant in the SON gene is associated with Zhu-Tokita-Takenouchi-Kim syndrome. Molecular Genetics and Genomic Medicine, 8(11). https://doi.org/10.1002/mgg3.149 (a)

Yang, Q., Hua, R., Qian, J., Yi, S., Shen, F., Zhang, Q., Li, M., Yi, S., Luo, J., & Fan, X. (2020). PREPL deficiency: A homozygous splice site PREPL mutation in a patient with congenital myasthenic syndrome and absence of ovaries and hypoplasia of uterus. Frontiers in Genetics, 11. https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00198 (b)

Yang, Z., Wong, J., Wang, L., Sun, F., & Yue, G. H. (2023). *pomc* knockout increases growth in zebrafish. Aquaculture, 574, 739707. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739707

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics, 13(1). https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134

Yıldırım, Ş., Topaloğlu, N., Tekin, M., & Sılan, F. (2017). A case with short stature, growth hormone deficiency and 46, XX, XQ27-qter deletion. PubMed, 55(10), 661–663. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29228534

Yu, H., Yu, M., Li, C., Zhan, Y., Xu, W., Li, Y., Li, W., Wang, Z., Ge, C., & Yang, X. (2009). Specific Expression and Regulation of Hepassocin in the Liver and Down-regulation of the Correlation of HNF1α with Decreased Levels of Hepassocin in Human Hepatocellular Carcinoma. Journal of Biological Chemistry, 284(20), 13335–13347. https://doi.org/10.1074/jbc.m806393200

Yu, C., Xie, B., Zhao, Z., Zhao, S., Liu, L., Cheng, X., Li, X., Cao, B., Shao, J., Chen, J., Zhao, H., Yan, Z., Su, C., Niu, Y., Song, Y., Wei, L., Wang, Y., Ren, X., Fan, L., . . . Wu, N. (2021). Whole Exome sequencing uncovered the genetic architecture of growth hormone deficiency patients. Frontiers in Endocrinology, 12. https://doi.org/10.3389/fendo.2021.711991

Zeevaert, R., De Zegher, F., Sturiale, L., Garozzo, D., Smet, M., Moens, M., Matthijs, G., & Jaeken, J. (2012). Bone Dysplasia as a Key Feature in Three Patients with a Novel Congenital Disorder of Glycosylation (CDG) Type II Due to a Deep Intronic Splice Mutation in TMEM165. JIMD Reports, 145–152. https://doi.org/10.1007/8904_2012_172

Zhang, H., Wang, Y., Han, L., Gu, X., & Shi, D. (2010). A Large Deletion of *PROP1* Gene in Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency from Two Unrelated Chinese Pedigrees. Hormone Research in Paediatrics, 74(2), 98–105. https://doi.org/10.1159/000313375

Zhang, S., Cui, Y., Ma, X., Yong, J., Yan, L., Yang, M., Ren, J., Tang, F., Wen, L., & Qiao, J. (2020). Single-cell transcriptomics identifies divergent developmental lineage trajectories during human pituitary development. Nature Communications, 11(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-19012-4 (a)

Zhang, N., Chen, Y., Lu, H., Zhao, F., Alvarez, R. V., Goncearenco, A., Panchenko, A. R., & Li, M. (2020). MutABiND2: Predicting the impacts of single and multiple mutations on Protein-Protein interactions. iScience, 23(3), 100939. https://doi.org/10.1016/j.isci.2020.100939 (b)

Zhao, X., Li, Z., Wang, L., Lan, Z., Lin, F., Zhang, W., & Su, Z. (2021). A Chinese family with Noonan syndrome caused by a heterozygous variant in LZTR1: a case report and literature review. BMC Endocrine Disorders, 21(1). https://doi.org/10.1186/s12902-020-00666-6

Zhou, Y., Liu, J., Wu, S., Li, W., & Zheng, Y. (2022). Case report: A heterozygous mutation in ZNF462 leads to growth hormone deficiency. Frontiers in Genetics, 13. https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1015021

Zhu, X., Zhang, J., Tollkuhn, J., Ohsawa, R., Bresnick, E. H., Guillemot, F., Kageyama, R., & Rosenfeld, M. G. (2006). Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. Genes & Development, 20(19), 2739–2753. https://doi.org/10.1101/gad.1444706

Zhu, X., Petrovski, S., Xie, P., Ruzzo, E. K., Lu, Y., McSweeney, K. M., Ben-Zeev, B., Nissenkorn, A., Anikster, Y., Oz-Levi, D., Dhindsa, R. S., Hitomi, Y., Schoch, K., Spillmann, R. C., Heimer, G., Marek-Yagel, D., Tzadok, M., Han, Y., Worley, G., . . . Goldstein, D. B. (2015). Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. Genetics in Medicine, 17(10), 774–781. https://doi.org/10.1038/gim.2014.191

Zielonka, M., Makhseed, N., Blau, N., Bettendorf, M., Hoffmann, G. F., & Opladen, T. (2015). Dopamine-Responsive Growth-Hormone deficiency and central hypothyroidism in sepiapterin reductase deficiency. JIMD Reports, 109–113. https://doi.org/10.1007/8904_2015_450

Zwaveling-Soonawala, N., Alders, M., Jongejan, A., Kovačič, L., Duijkers, F. A., Maas, S. M., Fliers, E., Van Trotsenburg, A. S. P., & Hennekam, R. C. (2017). Clues for polygenic inheritance of pituitary stalk interruption syndrome from exome sequencing in 20 patients. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 103(2), 415–428. https://doi.org/10.1210/jc.2017-01660

Anexo - Capítulo 1

A continuación se hace una breve descripción de los casos del capítulo 1 que no fueron descriptos en dicho capítulo.

CACNA1E

En el paciente 9 se encontró una mutación en la subunidad alpha-1e del canal de Ca^{2+} voltaje dependiente (*CACNA1E*). Este gen es altamente intolerante a la pérdida de función (pLI = 1, LOEUF = 0.221) y ha sido previamente asociado en encefalopatías en humanos (MIM#618285) (Helbig et al., 2018). El paciente presenta la variante LP c.2410_2411delAC, p.Thr804fs (ENST00000367573.7) y tiene CPHD (incluyendo deficiencia de arginina vasopresina), junto con un fenotipo SOD, con APH, PP ausente, hipoplasia del cuerpo calloso, hipoplasia bilateral del nervio óptico, nistagmus y ceguera bilateral. Además, presenta retraso del neurodesarrollo y polimicrogiria bilateral. Su sistema renal también se veía comprometido, presentando hiperbilirrubinemia neonatal y doble sistema pielocalicial en el riñón izquierdo. Dado que ningún caso descripto previamente para este gen presentaba disfunciones endócrinas, oculares o renales, es difícil atribuir todos los fenotipos encontrados en este paciente a la mutación en *CACNA1E.*

CNN3

CNN3 es un componente crítico de las fibras de estrés, compuestas de actina y miosina no muscular tipo II (Ciuba et al., 2018). Se ha comprobado que este gen es esencial para el desarrollo en ratones (Junghans et al., 2017) y es además altamente intolerante a la pérdida de función en humanos (pLI = 1, LOEUF = 0.431). Los ratones *knock-out* exhiben malformaciones cerebrales graves, presuntamente por exceso de señalización Wnt, y la hipófisis en estos ratones parece estar ausente (originalmente no descripto, visible en la figura 1h de (Junghans et al., 2017). El paciente 23 con CPHD (GH, TSH, ACTH, LH, FSH) y PSIS (APH, EPP y tallo ausente), presentaba también labio leporino junto con una nariz con punta bífida sutil. Su resonancia no mostró anormalidades extra-hipofisarias y su desarrollo neurológico era normal, lo que hace la asociación fenotipo genotipo cuestionable, aunque intrigante, dado que el paciente presentaba una variante LP sin frecuencia poblacional (ENST00000370206.9, c.447_448delAA, p.Arg150fs).

LAMB2

El paciente 50 presentaba CPHD y la MRI mostró APH, PP ausente, agenesia del cuerpo calloso y septum pellucidum, además de hipoplasia bilateral del nervio óptico. El paciente también tuvo hipoglucemia neonatal e ictericia, además de retraso del neurodesarrollo. Este paciente tiene una variante LP heterocigota en *LAMB2*

(ENST00000305544.9: c.77-1G>A), que causaría un defecto de splicing según spliceAI (spliceAI acceptor loss = 0.79) y los aceptores alternativos llevarían a frameshifts. Sin embargo, no se encontraron otras variantes relevantes y dada la herencia AR y la falta de fenotipos hepáticos sugieren que podría haber otro gen involucrado en este caso (síndrome de Pierson (MIM#609049, ver el estudio de *LAMB2* en la sección siguiente).

CPLANE1

Un hallazgo similar se dió en el caso 27. Este paciente tiene un incisivo central maxilar único, junto con baja talla y CPHD. El paciente presentaba una variante de splicing P en *CPLANE1*, un gen causante de síndrome de Joubert (MIM#614615) y síndrome orofaciodigital (MIM#277170). La variante (ENST00000651892.2: c.834+1G>T) es predicha por spliceAI como de donor loss (score = 0.92) y ha sido reportada previamente en ClinVar como LP (RCV002862331). De manera similar al caso de *CC2D2A*, es posible que una segunda variante en regiones no codificantes pueda ser detectada en *trans* mediante WGS.

DOT1L

DOT1L es la única H3K79 lisina-transferasa humana y es esencial para la estructura normal de la heterocromatina y el desarrollo. En ratones *knock-out* se observó letalidad embrionaria y un retraso en su crecimiento (Jones et al., 2008), mientras que en el *knock-out* para Xenopus tropicalis se observó letalidad antes de la metamorfosis (Wen et al., 2014). Más recientemente variantes de ganancia de función en humanos han sido asociadas a retraso global del desarrollo en humanos y la mayoría de estos pacientes sufrían baja talla (Nil et al., 2023). En la cohorte estudiada el paciente 28 presentaba CPHD, APH, EPP, tallo ausente e hiposmia con una variante presuntamente de pérdida de función en DOT1L (ENST00000398665.8: c.4154delG, p.Arg1385fs). Dado que *DOT1L* tiene un pLI = 1, pero no hay reportes previos de variantes con pérdida de función, no es claro si este hallazgo tiene alguna relación con los casos previamente reportados de retraso global del desarrollo o si es parte de un espectro fenotípico que aún no ha sido descripto.

FOXP1

FOXP1 fue inicialmente asociado a un desorden intelectual con dificultades para el lenguaje (OMIM: #605515) (Horn et al., 2010, Hamdan et al., 2010). Sin embargo, ha sido demostrado que el síndrome de *FOXP1* presentaba un fenotipo variable (Lozano et al., 2021). *FOXP1* es también altamente intolerante a la pérdida de función (pLI = 1) y, aunque algunos pacientes presentan baja talla, no se han reportado vínculos con HC. Sin embargo, se ha sugerido que se deberían considerar las anormalidades hipofisarias, dadas las

alteraciones del sistema nervioso central presentes en algunos pacientes (Lozano et al., 2021).

El paciente sufría de CPHD y portaba variante P en *FOXP1* (c.259G>T, p.Glu87*; ENST00000318779.7). La variante no tiene frecuencia en GnomAD y cae en un transcripto no canónico, que se sabe que produce una isoforma corta (NP_001012523.1, Q9H334-5). Su resonancia mostró una AP hipoplástica y una PP ectópica. Además, presentaba astigmatismo y sufría convulsiones. Errores refractivos visuales han sido reportados en alrededor del 50% de los pacientes con síndrome de *FOXP1* y convulsiones en alrededor del 12% (Lozano et al., 2021). Sorprendentemente no presentaba deficiencia intelectual ni dificultades en el lenguaje.

LTBP3

LTBP3 codifica para la proteína de unión al factor de crecimiento transformante beta (TGF-β) latente. Esta proteína juega un rol dual, como componente estructural de la matriz extracelular y como un secuestrador de TGF-β. Mutaciones en este gen han sido asociadas a displasia acromícrica y displasia geleofísica, de manera AD (McInerney-Leo et al., 2016), así como a anomalías dentales y baja talla de modo AR (Guo et al., 2018). En la paciente 53 se encontró una variante frameshift LP en *LTBP3* (ENST00000301873.10: c.3104dupT, p.Asp1036fs).La paciente presentaba un fenotipo altamente sindrómico: CPHD con APH, hepatomegalia y cutis verticis gyrata. Su resonancia mostró paquigiria, hemisferios asimétricos y heterotopía de la materia gris. A pesar de esto su inteligencia era normal. Su baja talla era severa (-3.72 SDS) y presentaba edad ósea retrasada e hipotonía. Además, presentaba escoliosis, hiperlordosis, un bermellón del labio superior en forma de U, y anormalidades en las manos que fueron inicialmente atribuidas a posibles bandas amnióticas. Dado el hallazgo genético se cree que estas malformaciones son en realidad el resultado de una braquidactilia severa. Este sería el primer caso de displasia geleofísica con involucramiento hipofisario (McInerney-Leo et al., 2016).

POU5F1

La paciente 63 presentaba CPHD (GH, FSH, LH) con APH y EPP. Sus pies y manos eran pequeñas y su voz era aflautada. También contaba con una pequeña anomalía del desarrollo venoso paraventricular en la región frontal derecha. Se encontró una variante (ENST00000259915.13: c.194dupC, p.Pro66fs) en *POU5F1* (también conocido como *OCT4*), gen altamente intolerante a la pérdida de función (pLI=1). Sin embargo, esta variante cuenta con una baja frecuencia poblacional (0.0000007 en GnomAD) y este gen no cuenta con asociaciones a enfermedad en OMIM. Su rol más conocido es en el mantenimiento de las células madre y en la regulación de la vía de WNT, por lo que podría

participar del mantenimiento de las células madre hipofisarias, interviniendo en la vía de *PROP1*/*Beta-Catenina* (Le Rolle 2021).

RIMBP2

Uno de los casos familiares (pacientes 70a y 70b) consiste en un caso de gemelos monocigóticos con deficiencia aislada de TSH (ICeCH, por *isolated central congenital hypothyroidism*). Ambos presentaron ductus arteriosus persistente y plagiocefalia posterior. Los pacientes no compartían ninguna variante en genes conocidos que causen ICeCH (*IGSF1*, *IRS4*, *TBL1X*, *TRHR* y *TSHB*). Sin embargo, presentan una variante rara de splicing en *RIMBP2* (ENST00000643940.1: c.504+1G>A), que se encuentra en la población general en una frecuencia menor a 1/1.000.000 y es predicha como patogénica por spliceAI (donor loss = 0.92). *RIMBP2* codifica para una proteína de binding (BP) de moléculas interactuantes con RAB3 (RIMs) y ha sido estudiada sobre todo en el contexto de oído interno. En este contexto se demostró que RIMBPs interactúan con canales de Ca^{2+} voltaje dependientes (Hibino et al., 2002). *RIMBP2* es además uno de los pocos genes que se expresa de forma elevada y diferencial en la hipófisis (Uhlén et al., 2015). Interesantemente, se ha sugerido que la estimulación de TRH sobre el promotor de TSH ocurre mediante la activación de un canal de Ca^{2+} voltaje dependiente de tipo L (Shupnik et al., 1996). Este caso provee un gen candidato interesante para el ICeCH, junto con un posible mecanismo de enfermedad, donde una proteína RIMBP2 defectuosa impide la activación correcta de los canales Ca^{2+} voltaje dependiente de tipo L y por lo tanto lleva a una reducción en la producción de TSH.

Gen	Prueba de herencia de novo, en trans o familiar	Múltiples pacientes no relacionados	Estudios funcionales	Expresión génica	Interacciones y vías de señalización	Total
PROP1	+	+	+	+	+	5
POU1F1	+	+	+	+	+	5
LHX3	+	+	+	+	+	5
LHX4	+	+	+	+	+	5
SHH	+	+	+	+	+	5
SOX2	+	+	+	+	+	5
SOX3	+	+	+	+	+	5
GLI2	+	+	+	+	+	5
GLI3	+	+	+	+	+	5
OTX2	+	+	+	+	+	5
HESX1	+	+	+	+	+	5
GH1	+	+	+	+	+	5
GHR	+	+	+	+	+	5
GHRHR	+	+	+	+	+	5
CHD7	+	+	-	+	+	5
FGF8	-	+	+	+	+	4
PAX6	-	+	+	+	+	4
ROBO1	+	+	-	+	+	4
BMP4	+	-	+	+	+	4
WDR11	-	+	+	+	+	4
SOX11	+	+	-	+	+	4
TCF7L1	-	+	+	+	+	4
MADD	+	+	+	-	+	4
MAGEL2	+	+	+	+	-	4

Gen	Prueba de herencia de novo, en trans o familiar	Múltiples pacientes no relacionados	Estudios funcionales	Expresión génica	Interacciones y vías de señalización	Total
HID1	+	+	+	+	-	4
PNPLA6	+	+	+	+	-	4
PTPN11	+	+	-	-	+	3
FOXL2	-	+	-	+	+	3
NFKB2	+	+	+	-	-	3
GHSR	-	+	-	+	+	3
EYA1		+	-	+	+	3
RAX		+	-	+	+	3
PAX7		+	-	+	+	3
LZTR1	+	+	-	-	+	3
SHOC2	+	+	-	-	+	3
KISS1R	+	+	-	-	+	3
BTK	+	+	-	+	-	3
RGS10	+	-	+	+	-	3
GHRH	-	-	+	+	+	3
MAP2K1	+	+	-	-	+	3
CSNKA1	+	+	-	-	+	3
CSNKB2	+	+	-	-	+	3
ALMS1	+	+	-	-	+	3
RNPC3	+	+	-	+	-	3
RBM28	+	+	-	+	-	3
POLR3A	+	+	-	+	-	3
TTC26	+	+	-	-	+	3
LAMB2	+	-	+	+	-	3
COL1A1	+	+	-	+	-	3
L1CAM	+	-	-	+	-	2

Gen	Prueba de herencia de novo, en trans o familiar	Múltiples pacientes no relacionados	Estudios funcionales	Expresión génica	Interacciones y vías de señalización	Total
POLR3B	+	-	-	-	+	2
KIAA0753	+	-	-	-	+	2
ATK3	+	+	-	-	-	2
DNAJC3	+	+	-	-	-	2
PROKR2	-	+	-	-	+	2
CDON	-	+	-	-	+	2
PITX2	-	-	-	+	+	2
SIX1	-	-	-	+	+	2
SIX3	-	-	-	+	+	2
PTCH1	-	-	-	+	+	2
CREBBP	+	+	-	-	-	2
ACP5	+	+	-	-	-	2
PIK3CA	+	+	-	-	-	2
ROBO2	+	-	-	-	+	2
ALG1	+	+	-	-	-	2
TMEM165	+	+	-	-	-	2
KAT6B	+	-	-	-	+	2
TBX3	-	-	-	+	+	2
SALL1	+	-	-	-	+	2
SALL4	+	-	-	-	+	2
KANSL1	+	+	-	-	-	2
SON	+	+	-	-	-	2
ZNF462	+	+	-	-	-	2
ANOS1	-	+	-	-	+	2
SEMA3A	-	+	-	-	+	2
ZSWIM6	+	+	-	-	-	2

Gen	Prueba de herencia de novo, en trans o familiar	Múltiples pacientes no relacionados	Estudios funcionales	Expresión génica	Interacciones y vías de señalización	Total
TGIF1	-	+	-	-	+	2
ARNT2	+	-	-	+	-	2
KAT5	+	-	-	-	+	2
KAT6A	+	-	-	-	+	2
NR0B1 (DAX1)	+	+	-	-	-	2
NBAS	+	+	-	-	-	2
SPINK5	+	+	-	-	-	2
GNAS	-	+	-	-	+	2
G6CP3	+	+	-	-	-	2
GRM7	+	+	-	-	-	2
SLC12A3	+	+	-	-	-	2
CLCNKB	+	+	-	-	-	2
CLCN5	+	+	-	-	-	2
WDR4	+	+	-	-	-	2
EIF2S3	+	+	-	-	-	2
IFT172	+	-	-	-	+	2
KATNIP	+	-	-	-	+	2
TMEM67	+	-	-	-	+	2
PIBF1	+	-	-	-	+	2
CELSR2	+	-	-	-	+	2
UBR1	+	+	-	-	-	2
CC2D2A	-	+	-	-	+	2
DNMT1	+	-	-	-	-	1
GJA1	+	-	-	-	-	1
XYLT1	+	-	-	-	-	1

Gen	Prueba de herencia de novo, en trans o familiar	Múltiples pacientes no relacionados	Estudios funcionales	Expresión génica	Interacciones y vías de señalización	Total
DPM1	+	-	-	-	-	1
PMM2	+	-	-	-	-	1
NONO	+	-	-	-	-	1
EIF2B5	+	-	-	-	-	1
VARS1	+	-	-	-	-	1
BRCC3	-	+	-	-	-	1
SLC7A7	-	+	-	-	-	1
PGM1	+	-	-	-	-	1
HNRNPU	+	-	-	-	-	1
PRPF8	+	-	-	-	-	1
MYCBP2	+	-	-	-	-	1
EXOC3L2	+	-	-	-	-	1
SEC31A	+	-	-	-	-	1
FGFR2	-	-	-	-	+	1
GNAO1	-	-	-	-	+	1
ABCD1	+	-	-	-	-	1
DLG3	+	-	-	-	-	1
CDC25B	+	-	-	-	-	1
CCDC186	+	-	-	-	-	1
CCDC88C	+	-	-	-	-	1
MAP3K1	-	-	-	-	+	1
PPP1CB	-	-	-	-	+	1
TRPS1	-	+	-	-	-	1
AHDC1	-	+	-	-	-	1
ARID1B	-	-	-	-	+	1

Gen	Prueba de herencia de novo, en trans o familiar	Múltiples pacientes no relacionados	Estudios funcionales	Expresión génica	Interacciones y vías de señalización	Total
PROK2	-	-	-	-	+	1
ARX	+	-	-	-	-	1
AICDA	+	-	-	-	-	1
NFKBIA	-	-	+	-	-	1
PIK3CA	+	-	-	-	-	1
HNF1A	+	-	-	-	-	1

Tabla suplementaria 1.1. Genes que han sido reportados como causantes de HC, clasificados según cinco criterios. **(1)** La existencia de prueba del modo de herencia, ya sea por un caso *de novo* o con herencia en trans comprobada o la existencia de un caso familiar extenso. **(2)** Que el gen se haya reportado en múltiples pacientes no relacionados. **(3)** Que se hayan realizado estudios funcionales, ya sea a nivel genético (es decir animales transgénicos) o a nivel de la variante (es decir estudios moleculares). **(4)** Que el gen se encuentre expresado en la hipófisis o el hipotálamo en animales modelo o en humanos. **(5)** Que el gen pertenezca a una vía de señalización conocida o interacción a nivel proteico con proteínas causantes de HC. Los genes que fueron excluidos de este listado por falta de evidencia en estas cinco categorías pueden ser encontrados al final del anexo correspondiente a este capítulo.

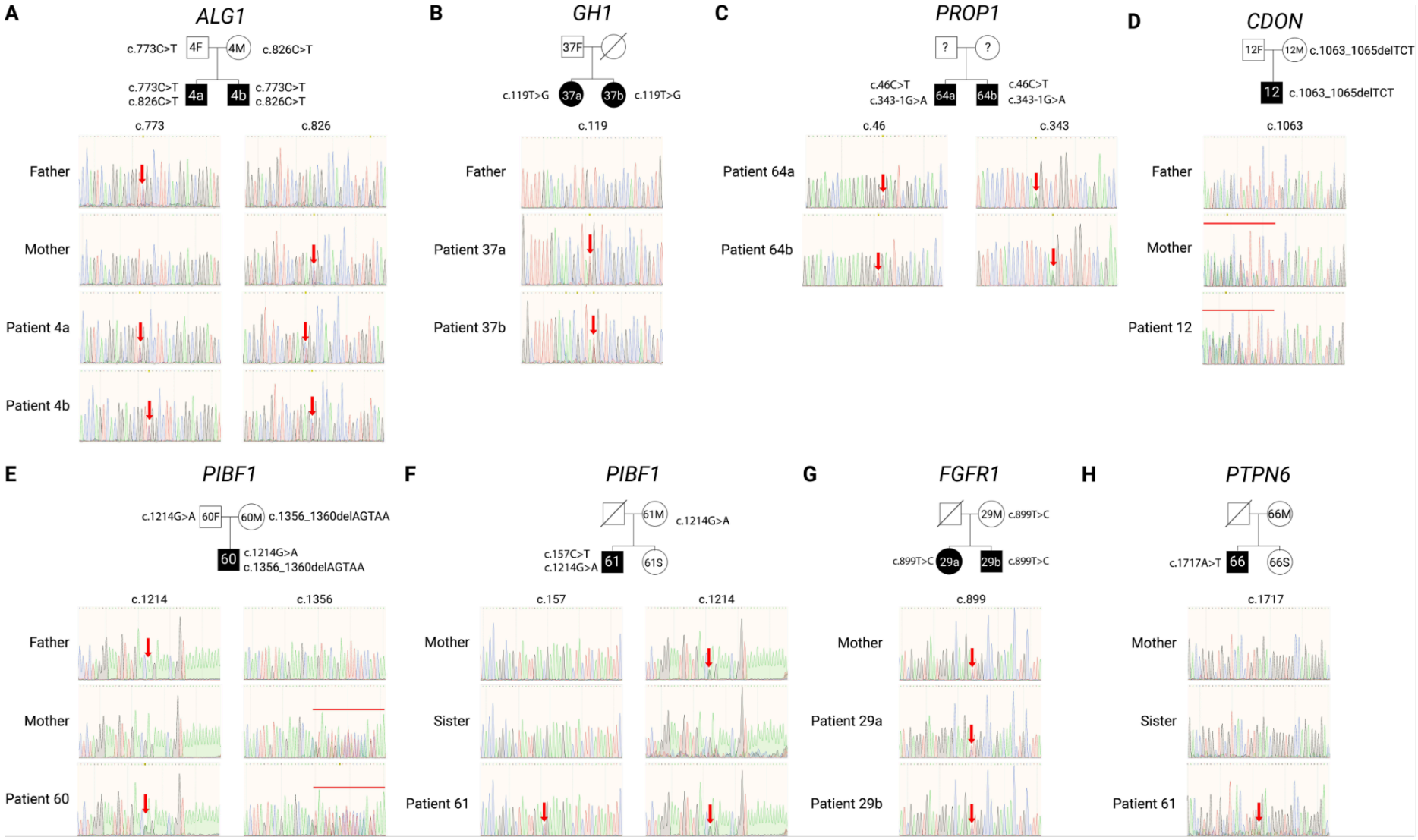

Figura suplementaria 1.1. Resultados de secuenciación directa de familias seleccionadas.

A continuación se hace una breve descripción de la función y relevancia de cada gen que se ha considerado como un posible causante de hipopituitarismo congénito, basado en la tabla suplementaria 1.1.

PTCH1

PTCH1 es uno de los receptores de SHH que se expresa en la hipófisis durante el desarrollo. Su sobreactivación lleva a una hiperplasia hipofisaria, por lo que se podría especular que una pérdida de función podría llevar a una hipoplasia hipofisaria (Carreno et al., 2017). De hecho, variantes en *PTCH1* han sido asociadas a HPE (MIM#610828) (Ming et al., 2002). Más recientemente se han reportado variantes en *PTCH1* en pacientes con hipopituitarismo, pero la consecuencia de dichas variantes no ha sido analizada en profundidad (Brauner et al., 2020, Fang et al., 2020).

GLI3

GLI3 al igual que GLI2 es un efector de la vía de SHH. Si bien es también un actor importante para el desarrollo hipofisario, no es una causa común de hipopituitarismo. En contadas ocasiones se han reportado casos altamente sindrómicos, que presentan síndrome de Pallister-Hall. Este síndrome suele presentar una gran cantidad de malformaciones craneofaciales, polidactilia postaxial u oligodactilia, malformaciones ventriculares o aórticas, holoprosencefalia y panhipopituitarismo. Todos los casos se presentan de manera AD por variantes de pérdida de función (Kang et al., 1997).

CDON

CDON funciona como un co-receptor para SHH junto con PTCH1. Variantes en CDON, al igual que en PTCH1, pueden generar HPE (MIM#614226) de manera AD. Sin embargo, existen reportes de pacientes con hipopituitarismo, particularmente con síndrome de interrupción del tallo (PSIS por *pituitary stalk interruption syndrome*). Estos casos presentaban variantes patogénicas tanto de manera heterocigota como homocigota, por lo que el modo de herencia para este fenotipo, así como su causalidad, aún no es claro (Bashamboo et al., 2015).

BMP4

BMP4 es uno de los morfógenos más importantes para la formación del RP y la correcta expansión y diferenciación del mismo. Variantes en *BMP4* causan microftalmia sindrómica (MIM#607932) así como labio leporino y paladar hendido (MIM#600625). Las variantes en *BMP4* son raras y al día de hoy existe un solo reporte de un caso con hipopituitarismo y una mutación LP/P en *BMP4*, aunque otros reportes han considerado variantes VUS en este mismo gen (Brauner et al., 2020, Breitfeld et al., 2013).

EYA1

EYA1 es un factor de transcripción de la familia "*eyes absent*" inicialmente descubiertos en *Drosophila melanogaster*. Es interesante que *EYA1* es un gen clave para el desarrollo hipofisario en pez cebra (Nica et al., 2006) y también se expresa fuertemente en la placoda hipofisaria en Xenopus laevis (Almasoudi et al., 2021). Sin embargo, su rol en mamíferos no ha sido estudiado en profundidad, aunque se ha descrito una interacción proteica con *SIX1*. En humanos variantes en *EYA1* causan los síndromes branquio-ótico o branquio-oto-renal de manera AD. Estos pacientes pueden presentar baja talla, posiblemente por deficiencia de GH, lo que sugiere que el rol de *EYA1* podría estar conservado en el desarrollo hipofisario en mamíferos (Sanchez-Valle et al., 2010)

RAX

RAX es un factor de transcripción, estudiado principalmente por su rol en el desarrollo de la retina. Variantes en RAX producen microftalmia y anoftalmia sindrómica (MIM#611038) de manera AR. Se sabe que *Rax/rx3* (ortólogos en ratón y zebrafish) juegan un rol importante en el desarrollo hipotalámico, particularmente sobre la expresión de *Shh*, afectando el desarrollo hipofisario. Es interesante entonces que existan reportes donde la anoftalmia en estos pacientes viene acompañada de deficiencias hipofisarias (Brachet et al., 2019, El Nahry et al., 2024).

PAX6

PAX6 es un factor de transcripción del tipo *"paired box"* clave para el desarrollo del sistema visual como también del sistema nervioso, del páncreas y de la hipófisis. Variantes patogénicas en este gen están asociadas a diferentes enfermedades oculares, como pueden ser aniridia, hipoplasia de la fóvea, hipoplasia o coloboma del nervio óptico y disgenesia del segmento anterior, en todos los casos de herencia AD.

Durante el desarrollo hipofisario *Pax6* es necesario para el establecimiento del eje dorsal-ventral (Kioussi et al., 1999). Existen reportes aislados de pacientes con variantes en *PAX6* que presentan, además de malformaciones oculares, deficiencias hipofisarias (Hergott-Faure et al., 2012, Takagi et al., 2014a), similar a lo que sucede con *PITX2* y *OTX2*.

PAX7

PAX7, a diferencia de PAX6, ha sido delineado como un factor linaje específico dentro del desarrollo hipofisario. Sin embargo, dado que también se trata de un gen maestro para el desarrollo de otros órganos, no es sorprendente que variantes en *PAX7* tengan como consecuencia un síndrome. En particular este síndrome AR se asocia a baja talla, hipotonía, retraso del neurodesarrollo y escoliosis. En un paciente la baja talla ha sido

atribuida a deficiencia de hormona de crecimiento (Proskorovski-Ohayon et al., 2017). Es interesante que los pacientes no parecen presentar deficiencia de α-MSH.

GHR

Así como existe la deficiencia de GH, la baja talla puede ser también causada por mutaciones en el receptor de GH (*GHR*), de manera AD (MIM#604271) o AR (MIM#262500). En estos casos la respuesta a la prueba de estimulación de GH debería ser normal y por lo tanto no habría solapamiento clínico con IGHD. Sin embargo, dado que no siempre es posible acceder a pruebas de GH, que estos pacientes presentan baja IGF1 y baja talla, y que la prueba de GH no es siempre suficiente para diferenciar entre IGHD y una GH baja por motivos idiopáticos, es importante explorar variantes en este gen si no existen otras variantes diagnósticas en casos de IGHD.

GHRH

En teoría la deficiencia de GH podría ser causada por una deficiencia de la hormona liberadora de GH (GHRH) a nivel hipotalámico. Una falta de estímulo hipotalámico resultaría en una disminución de los niveles de GH liberados y por lo tanto en IGHD. Esto ha sido comprobado *in vivo* utilizando ratones *knock-out* para GHRH (Alba et al., 2004). Sin embargo, hasta el momento no existen reportes de mutaciones en GHRH en pacientes con IGHD (França et al., 2011).

GHRHR

Mutaciones en el receptor para GHRH (GHRHR), en contraste con su ligando, son una causa común de IGHD, denominada IGHD tipo IV (MIM#618157). La herencia es siempre AR y se debe a mutaciones de pérdida función, independientemente del tipo de variante.

GHSR

GHSR es el receptor de grelina, un secretagogo de GH, que se produce en el estómago y entra a circulación sanguínea. El mecanismo exacto por el cual la activación de GHSR por grelina lleva a la liberación de GH a nivel hipofisario aún no ha sido completamente dilucidado. El modo de herencia para la deficiencia de GH causada por variantes en GHSR (MIM#615925) ha sido reportado tanto como AD como AR (Pantel et al., 2009).

TSHB

Las deficiencias aisladas del eje tiroideo son raras y generalmente se deben a disfunciones de la glándula tiroidea. En estos casos la disfunción viene dada por una

disfunción periférica y no por una desregulación central. La falta de funcionamiento de la glándula tiroides misma puede deberse a variantes en varios genes conocidos (*TSHR*, *PAX8*, *STRTS*, *GNAS*, *FOXE1*, *GLIS3*, *SLC5A5*, *TPO*, *SLC26A4*, *TG*, *IYD*, *DUOX2*, *DUOXA2*, *THRA*, *NKX2.5*, *UBR1*, *NKX2.1)*, involucrados en la morfogénesis de la glándula, la producción de T3 y T4, etc. Los casos de hipotiroidismo aislado central (i.e. de origen hipotalámico o hipofisario) son mucho menos frecuentes, teniendo una frecuencia menor a 1/12000 nacidos vivos (Van Tijn et al., 2005). Una de las causas más frecuentes de hipotiroidismo aislado central son las variantes de pérdida de función en *TSHB (*Dacou-Voutetakis et al., 1990), con herencia AR (MIM#275100).

TRHR

Otra causa de hipotiroidismo central aislado a nivel hipofisario son las variantes en *TRHR*. En este caso la hipófisis no es capaz de responder al estímulo hipotalámico de TRH, lo que termina llevando a una liberación insuficiente de TSH y por lo tanto a hipotiroidismo. Su modo de herencia es AR (MIM#618573) y todas las variantes descriptas hasta la fecha presentan una disrupción severa de la señalización mediada por TRH (García et al., 2017a).

IGSF1

IGSF1 es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y es una proteína transmembrana altamente expresada en la hipófisis (García et al., 2017b). Recientemente se han descripto casos de hipotiroidismo central aislado por mutaciones en *IGSF1*, con herencia XLR (Joustra et al., 2013a). En este caso, si bien la deficiencia es aislada, suele venir acompañada de macroorquidismo (un aumento del tamaño testicular). Esto se debe a que *IGSF1* regula la expresión de *TRHR* a nivel hipofisario, pero también regula la expresión de *FSHB* a nivel gonadal (Garcia et al., 2017b). Sin embargo, la macroorquidia no siempre está presente en estos pacientes y hay incluso casos reportados de CPHD, en combinación con deficiencia de GH (Joustra et al., 2013b).

TBL1X

TBL1X es una subunidad del complejo de silenciamiento NCoR mediado por receptores nucleares retinoides y tiroideos (SMRT), con expresión tanto hipofisaria como hipotalámica. Recientemente se ha descubierto que variantes en este gen pueden dar lugar a hipotiroidismo central aislado leve. Interesantemente, al igual que *IGSF1*, *TBL1X* también se ubica en el cromosoma X y su modo de herencia es ligado al X dominante (Heinen et al., 2016).

IRS4

El último de una serie de genes en ser descubiertos como causantes de hipotiroidismo central aislado es *IRS4*. IRS4 es un miembro de la familia de sustratos del receptor de insulina (IRS). Aunque poco se sabe de su función, se sabe que presenta expresión tanto hipofisaria como hipotalámica. Es sorprendente que este gen también se encuentra en el cromosoma X y su herencia es XLR (Heinen et al., 2018).

NKX2.1

Dentro de los genes causantes de hipotiroidismo central se encuentra también *NKX2.1*. NKX2.1 es un factor de transcripción importante para el desarrollo de varios órganos, incluyendo el cerebro, la glándula tiroides y los pulmones. Se ha demostrado ya hace más de dos décadas que variantes en este gen pueden causar un síndrome que afecta a estos tres órganos (MIM#610978) (Krude et al., 2002). Los síntomas neurológicos son variables pero suelen incluir movimientos involuntarios. Del mismo modo, a nivel respiratorio puede o no haber dificultades respiratorias o infecciones a repetición. Es interesante que si bien las variantes en *NKX2.1* han sido históricamente asociadas únicamente con hipotiroidismo central aislado, recientemente se han descripto pacientes con CPHD (Peall et al., 2013).

POMC

La deficiencia de POMC (ver eje hipotálamo-hipofisario-cutáneo) es extremadamente rara, con menos de 30 casos descriptos en la literatura (Gregoric et al., 2021). La enfermedad se caracteriza por mutaciones de pérdida de función en *POMC* y tiene un modo de herencia AR. Los pacientes en cuestión presentan pelo rojizo como consecuencia de la falta de α-MSH, además de insuficiencia adrenal por falta de ACTH y obesidad debido al rol de POMC en la reducción del apetito y del incremento de la tasa metabólica basal.

PCSK1

La enzima PCSK1 (también llamada PC1/3 por proproteína convertasa 1/3) es la responsable del primer clivaje de POMC. Sin embargo, también está involucrada en el procesamiento de otros péptidos, como por ejemplo pro-insulina. El fenotipo de los pacientes es complejo y variable, pero suele incluir deficiencia de GH, deficiencia adrenal, deficiencia de vasopresina y obesidad, con herencia AR (Duclaux-Loras et al., 2021)

TBX19

TBX19 es un factor de transcripción de clase *T-box*, importante para el desarrollo de los corticotropos (ver “Genética y señalización del desarrollo hipofisario”). En consecuencia, variantes en *TBX19* causan deficiencia de ACTH congénita aislada (MIM#201400), lo que puede a su vez llevar a insuficiencia adrenal. Su modo de herencia es AR.

Genes relacionados a hipogonadismo hipogonadotrófico y desarrollo sexual

FGF8

FGF8 es uno de los morfógenos más importantes para el desarrollo hipofisario, expresado de manera dorsal, en el hipotálamo. Como sucede con *BMP4*, su correcta expresión es fundamental para la correcta formación y desarrollo del RP. Aunque variantes en *FGF8* han sido históricamente asociadas a hipogonadismo hipogonadotrófico AD (MIM#612702) existen múltiples reportes que vinculan variantes en este gen a fenotipos del espectro HPE-SOD-HC (McCabe et al., 2011, Zwaveling-Soonawala et al., 2017, Raivio et al., 2012, Gregory et al., 2023). Sin embargo, una única variante sinónima ha sido ensayada funcionalmente, lo que hace necesario reevaluar el rol de este gen en la etiología del HC.

ANOS1

ANOS1 codifica para anosmina-1, una proteína de matriz extracelular involucrada en la migración de neuronas GnRH+. Variantes en *ANOS1* han sido usualmente vinculadas a hipogonadismo hipogonadotrófico con o sin anosmia (falta de olfato) XLR (MIM#308700). Existen unos pocos reportes de variantes VUS en pacientes con SOD y CPHD, pero más evidencia es necesaria para entender el rol de ANOS1 en el desarrollo hipofisario (Takagi et al., 2014b, McCabe et al., 2015).

KISS1R

KISS1R es el receptor para KISS1 y está vinculado a hipogonadismo hipogonadotrófico con o sin anosmia AR (MIM#614837). En este caso existen dos reportes de pacientes con hipopituitarismo, incluyendo siempre el eje gonadal, con variantes LP/P en KISS1R (Moalla et al., 2019, Brauner et al., 2020).

PROKR2 y PROK2

PROKR2 es el receptor de PROK2, ambos asociados a hipogonadismo hipogonadotrófico con o sin anosmia AD. Si bien existen numerosos reportes de variantes en PROKR2 en pacientes con IGHD, CPHD, PSIS e incluso PCHD, una revisión sistemática generada en el marco de esta tesis, determinó que la mayoría de los casos reportados con estos fenotipos son casos de variantes VUS o incluso benignas (Martinez-Mayer et al.,

2023), por lo que su rol en HC es controversial. En el caso de PROK2, existe un único reporte que asocia variantes en este gen con CPHD, por lo que se lo considera, cuando mucho, una causa infrecuente de HC (Zwaveling-Soonawala et al., 2017).

SEMA3A

SEMA3A codifica para una semaforina de membrana, importante para el desarrollo axonal e inicialmente vinculada a hipogonadismo hipogonadismo hipogonadotrófico AD (MIM#614897). Más recientemente se han descrito unos pocos casos de pacientes con HC con variantes LP/P en SEMA3A (Hu et al., 2019, Budny et al., 2020a). Los fenotipos de estos pacientes eran altamente variantes, desde casos sindrómicos graves hasta CPHD.

WDR11

WDR11 es una proteína de la familia *WD repeat*, posiblemente relacionada al tráfico vesicular. Variantes en *WDR11* han sido asociadas a hipogonadismo hipogonadotrófico AD (MIM#614858) y a retraso global del desarrollo AR (MIM#620237). Existen varios reportes que asocian también variantes en *WDR11* a CPHD (Kim et al., 2017, Brauner et al., 2020). Estudios en ratones sugieren que las afecciones del eje hipotalámico-hipofisario en estos pacientes puede deberse a un rol de WDR11 en la vía de SHH, ayudando a procesar la señalización mediada por GLI3, por lo que podría considerarse también como un espectro de ciliopatías (Kim et al., 2017).

SOX11

SOX11 es un factor de transcripción del tipo SOXC, asociado a retraso global del desarrollo con hipogonadismo hipogonadotrófico AD (MIM#615866), similares a casos de Coffin-Siris (Al-Jawahiri et al., 2022, Hempel et al., 2015). Sin embargo, más recientemente se han reportado también casos sin retraso global del desarrollo y con HC (Brauner et al., 2020). Dada la influencia de *SOX2* y *SOX3* en el desarrollo hipofisario, SOX11 es considerado un gen candidato interesante.

TBX3

TBX3 codifica para un factor de transcripción tipo *t-box* y está asociado a síndrome ulnar-mamario. Este síndrome se caracteriza por hipoplasia variable de las extremidades superiores, así como malformaciones variables de manos y dedos, además de hipoplasia mamaria. Únicamente un caso de hipopituitarismo ha sido confirmado en humanos, a pesar de que *Tbx3* haya sido descripto como un factor de transcripción importante para tirotropos en ratones (Linden et al., 2009). Sin embargo, la asociación con hipogonadismo hipogonadotrófico se considera más robusta (Galazzi et al., 2018).

MAP3K1

Variantes en el gen que codifica para la MAP-quinasa-quinasa-quinasa 1 (*MAP3K1)* causan disgenesia gonadal 46 XY, que provoca el desarrollo de genitales externos e internos femeninos en personas con cariotipo 46 XY. Recientemente se ha reportado un caso con IGHD, además de genitales atípicos (Cheng et al., 2022).

Factores de transcripción y epigenética

ARID1B

ARID1B es un factor de transcripción de la familia ARID, asociado a síndrome de Coffin-Siris tipo 1 (MIM#135900). La baja talla es un síntoma común en pacientes con este síndrome, pero los perfiles endocrinológicos de los mismos no han sido explorados en profundidad. Recientemente un reporte ha vinculado la baja talla de un paciente con Coffin-Siris a una deficiencia aislada de GH (Mouskou et al., 2022).

TGIF1

TGIF1 es un factor de transcripción tipo *homeobox* que lleva su nombre por responder a TGF-□. Variantes en *TGIF1* causan HPE (MIM#142946), aunque también existen unos pocos reportes de variantes en TGIF1 causantes de HC, de acuerdo con la teoría de que el HC puede presentarse en la parte leve del espectro de esta enfermedad (Nakaguma et al., 2021, Tatsi et al., 2013).

TCF7L1

TCF7L1 codifica para un factor de transcripción que funciona principalmente como represor en la vía de señalización WNT/□-catenina. Se ha demostrado que su rol en el desarrollo hipofisario es clave, reprimiendo la expresión de FGFs para la correcta formación del RP. En humanos se han reportado dos variantes en familias independientes con problemas hipofisarios, aunque su herencia, asumida *de novo,* no fue confirmada (Gaston-Massuet et al., 2016).

ARNT2

ARNT2 es un factor de transcripción tipo *basic helix-loop-helix*. Variantes en este gen han sido propuestas como causantes de un síndrome AR que causa HC, junto con microcefalia, anomalías visuales y renales (Webb et al., 2013). Hasta el momento una única familia ha sido descripta.

ARX

ARX es un factor de transcripción del tipo homeobox, asociado a diversas enfermedades neurológicas XL y XLR. En un paciente se ha registrado un encefalocele transesfenoidal que causaba HC de origen hipotalámico (Van Esch et al., 2004).

KMT2A

KMT2A es una metiltransferasa lisina específica, asociada al síndrome de Wiedemann-Steiner (MIM#605130), a veces confundido con el síndrome de Kabuki. Este síndrome puede afectar múltiples órganos. Las características faciales incluyen una distancia corta entre el párpado superior e inferior o fisuras palpebrales estrechas, ptosis, hipertelorismo, pestañas largas, cejas pobladas, nariz ancha con puente nasal deprimido, paladar alto y anomalías dentales/orales. Además, los pacientes suelen presentar retraso global del desarrollo o autismo e hipertricosis, particularmente en el codo. La baja talla es también común en estos pacientes y se cree que, al menos en algunos casos, esta baja talla está dada por una deficiencia de GH (Gippert et al., 2023, Kim et al., 2022).

KMT2D

KMT2D es una metiltransferasa lisina específica, asociada al síndrome de Kabuki tipo 1 (MIM#147920) de manera AD. El síndrome de Kabuki es un síndrome que involucra varios órganos, pero se reconoce principalmente por las características faciales. Son muy característicos los ojos, que suelen presentar ptosis, hipertelorismo, fisura palpebral larga, ectropión, acompañado de cejas arqueadas. También son muy características las orejas, de implantación baja y por lo general con pocos pliegues, además de defectos del oído interno que pueden llevar a sordera. También pueden presentar baja talla, paladar hendido, problemas cardíacos, respiratorios y gastrointestinales, malformaciones esqueléticas como escoliosis y retraso global del desarrollo. Además, los pacientes suelen presentar hipotiroidismo (Kawame et al., 1999), pero recientemente los síntomas endócrinos asociados se han expandido a otros ejes hipofisarios. Se han reportado pacientes con deficiencia de GH (Moon et al., 2018) así como con CPHD (Gippert et al., 2023).

KDM6A

KDM6A es una demetilasa específica de lisinas, también asociada al síndrome de Kabuki, en este caso tipo 2 (MIM#300867), con herencia XLD. Los pacientes con Kabuki tipo 2 también presentan baja talla, pero la deficiencia de GH no ha sido estudiada en profundidad en estos pacientes. Esto se explica principalmente porque la gran mayoría (alrededor del 75% de los casos) de Kabuki son tipo 1 y hay pocos reportes de Kabuki tipo 2

(Boniel et al., 2021). Por lo tanto KDM6A se considera un gen candidato para IGHD/CPHD por asociación.

KAT5

KAT5 es una acetiltransferasa específica de lisinas de histonas que ha sido recientemente reportada como causante de un síndrome neurológico que incluye epilepsia y perturbaciones del sueño (MIM#619103). De los tres casos reportados inicialmente, dos presentaban baja talla, de los cuales uno sufría de IGHD (Humbert et al., 2020). Dada la asociación de los casos de Kabuki con HC es interesante que también las acetiltransferasas que realizan el proceso inverso a *KMT2A*, *KMT2D* y *KDM6A* se asocien a HC.

KAT6A

KAT6A es una acetiltransferasa de histonas responsable de causar el síndrome de Arboleda-Tham (MIM#616268). Aunque la baja talla es un síntoma común en estos pacientes sus perfiles endocrinológicos no han sido estudiados en profundidad (Bukvic et al., 2023). Recientemente un estudio de genes candidatos ha asociado una variante de novo en *KAT6A* en un caso de PSIS (Zwaveling-Soonawala et al., 2017).

KAT6B

Variantes en el gen de la acetiltransferasa *KAT6B* causan los síndromes de SBBYSS (MIM## 603736) y síndrome genitopatelar (MIM#606170). A diferencia de *KAT6A*, la baja talla no parece ser un síntoma común de variantes en *KAT6B*. Sin embargo, recientemente se ha reportado un caso atípico de un paciente con IGHD no sindrómico y una variante patogénica *de novo* en *KAT6B* (Li et al., 2017).

DNMT1

DNMT1 codifica para una DNA metiltransferasa, encargado de metilar islas CpG específicas. Mutaciones en este gen causan dos enfermedades neuronales, por un lado una neuropatía sensitiva hereditaria (MIM#614116) y por otro ataxia cerebelosa, sordera y narcolepsia (MIM#604121), ambas AD, y que probablemente formen parte de un mismo espectro fenotípico. Recientemente se ha reportado un paciente con ataxia cerebelosa y CPHD atípico (TSH, ACTH, FSH, LH) con una variante LP en este gen (Brauner et al., 2020).

KANSL1

KANSL1 es la subunidad 1 del complejo NSL de regulación de KAT8. Mutaciones de novo en KANSL1 causan el síndrome de Koolen-De Vries (MIM#610443). En este síndrome

alrededor de un tercio de los pacientes presentan baja talla. En algunos de estos casos se ha sugerido que la baja talla puede deberse a IGH (Chehadeh-Djebbar et al., 2011).

PHF6

PHF6 codifica para un factor de transcripción con un dominio tipo *plant homeodomain (PHD)-like finger*, considerados "lectores" de modificaciones post traduccionales de histonas. Variantes en este gen provocan síndrome de Borjeson-Forssman-Lehmann XLR (MIM#301900). Estos pacientes presentan un fenotipo de baja talla, obesidad, hipogonadismo, hipotonía, retraso global del desarrollo, además de anomalías craneofaciales, en manos y dígitos. A pesar de esta sintomatología altamente sugerente de defectos hipofisarios, hasta el momento se ha registrado un solo caso familiar con HC (Birrcll et al., 2003).

FOXA2

FOXA2 es un factor de transcripción del tipo *forkhead box*, que juega un rol central en la diferenciación pancreática y en el control de la secreción de insulina (Lee et al., 2004, Wang et al., 2002). A pesar de que sus funciones han sido estudiadas en detalle sobre todo para hígado y páncreas, hay evidencia de que *FOXA2* también es importante para el desarrollo hipofisario, sobre todo de casos clínicos. En los últimos diez años se han descrito varios casos que suelen presentar afecciones pancreáticas (por lo general hiperinsulinismo, en combinación con hipopituitarismo con un modo de herencia siempre AD (Vishnopolska et al., 2021).

FOXL2

Otro factor de transcripción de la familia *forkhead box* que ha sido implicado en HC es FOXL2. *FOXL2* ha sido vinculado a falla ovárica prematura (MIM#608996) y al síndrome de blefarofimosis-ptosis-epicanto inverso (MIM#110100). Además, FOXL2 juega un rol importante en el desarrollo de los gonadotropos en ratones. En humanos se ha demostrado recientemente que casos con anormalidades palpebrales e hipopituitarismo (tanto IGHD como CPHD) pueden ser explicados por mutaciones en FOXL2 (Castets et al., 2020).

SALL1

SALL1 es un factor de transcripción tipo *SPALT-like* responsable del síndrome Townes-Brock (MIM#107480). Se lo considera un síndrome similar al branquio-oto-renal (ver *SIX1* y *EYA1*), donde las características principales son ano imperforado, orejas animales y malformaciones en los pulgares. Además, pueden presentar problemas en los riñones y corazón. En contadas ocasiones se han reportado pacientes con este síndrome y problemas hipofisarios (Lawrence et al., 2013).

SALL4

El factor de transcripción *SALL4* causa síndrome IVIC (MIM#147750) y síndrome del rayo radial de Duane (MIM#607323). Estos síndromes afectan las extremidades superiores, los ojos, el corazón y los riñones en distinta medida. Durante el desarrollo de las extremidades superiores SALL4 juega un rol importante, interactuando con GLI3 para garantizar su correcto desarrollo (Akiyama et al., 2015). Dado el rol en la vía de *SHH* de *SALL4*, no es entonces extraño pensar en posibles afecciones hipofisarias. Hasta la fecha una sola familia ha sido descripta con afecciones hipofisarias (Kodytková et al., 2023).

AHDC1

AHDC1 codifica para una proteína de función desconocida, probablemente con capacidad de unión al ADN por presentar *AT-hooks*. Este gen es responsable del síndrome de Xia-Gibbs. Este síndrome causa problemas neurológicos y en muchos de los casos baja talla, posiblemente por deficiencias hipofisarias (Cheng et al., 2019).

TRPS1

TRPS1 es un represor transcripcional que reprime genes activados por factores de la familia GATA. Variantes en TRPS1 causan síndrome tricorrinofalángico tipo 1/3 (MIM#190350/190351). Este síndrome suele presentar baja talla como consecuencia de una displasia esquelética por lo que generalmente el estatus hormonal de estos pacientes no es analizado. Sin embargo, existen reportes de pacientes con variantes en *TRPS1* e IGHD (Sohn et al., 2013).

CREBBP

CREBBP es una proteína que une a CREB, un factor de transcripción, y funciona como su co-activador. Variantes en *CREBBP* son responsables de causar el síndrome de Rubinstein-Taybi de forma AD. Este síndrome se caracteriza por baja talla, dedos anchos, fisuras palpebrales inclinadas hacia abajo, hipertelorismo ocular, pestañas largas, cejas arqueadas, nariz prominente, orejas de implantación baja y mal plegadas. Además, presentan paladar alto, maxilar hipoplásico, con una expresión que muestra muecas o al menos una sonrisa inusual. El hallazgo de cúspide talón en los incisivos es una particularidad casi única de estos pacientes. Existen únicamente tres casos reportados con deficiencia de GH, lo que podría explicar la baja talla en algunos pacientes con este síndrome (Tornese et al., 2015, Marzuillo et al., 2013, Huh et al., 2015).

HNF1A

HNF1A es un factor de transcripción asociado al desarrollo del hígado y del páncreas. Un único caso de HC ha sido descripto con una variante en *HNF1A*. *HNF1A* suele estar relacionado a diabetes monogénica, pero en este caso el paciente presentaba además displasia renal e hipopituitarismo (Simms et al., 2010). Es interesante que se ha demostrado que HNF1A y CREBBP interactúan a nivel proteico (Yu et al., 2009), aunque clínicamente causan cuadros sumamente distintos.

ZNF462

Mutaciones en el factor de transcripción tipo zinc finger *ZNF462* generan el síndrome de Weiss-Kruszka (MIM#618619). Este síndrome es extremadamente raro, suele afectar el sistema nervioso central, los rasgos craneofaciales y suele presentarse con baja talla (Van der Laan et al., 2024) y en al menos dos pacientes se atribuye esta baja talla a IGHD (Zhou et al., 2022, Falcon-Rodriguez et al., 2024).

ZSWIM6

Variantes en *ZSWIM6* causan un síndrome intelectual y craniofacial grave, llamado displasia frontonasal acromélica AD (MIM#603671). En particular una variante *de novo* (p.Arg1163Trp) ha sido asociada con múltiples casos, de los cusles algunos presentaban malformaciones hipofisarias e hipopituitarismo (Smith et al., 2014, Twigg et al., 2015).

RASopatías

PTPN11

PTPN11 codifica para una tirosina quinasa tipo *Shp2*, sin dominio transmembrana. Esta quinasa también es parte de la vía de señalización de las MAPKs y variantes en este gen también tienen como resultado RASopatías. En este caso las variantes pueden dar lugar a dos síndromes, síndrome de LEOPARD (MIM#151100) y síndrome de Noonan (MIM#163950). Variantes en PTPN11 son la causa más común de síndrome de Noonan (Faienza et al., 2024), un desorden en el que es habitual que los pacientes presenten baja talla. Esta baja talla ha sido sugerida como una consecuencia de resistencia a GH (Binder et al., 2005). Sin embargo, más recientemente, esta baja talla ha sido atribuida a una deficiencia de GH propiamente dicha y alrededor de un 70% de los pacientes tratados con rGH alcanzaron una altura adulta normal (Seo et al., 2018), lo que sugiere que el hipopituitarismo podría ser un elemento común en RASopatías.

LZTR1

LZTR1 es un regulador transcripcional tipo *leucine zipper*, de función aún poco clara. Recientemente se han descripto casos de síndrome de Noonan, tanto AD (MIM#616564) como AR (MIM#605275) causados por variantes en *LZTR1*. En varios pacientes con esta variante de síndrome de Noonan se ha también descripto baja talla con IGHD (Zhao et al., 2021, He et al., 2021).

MAP2K1

Otra causa de CFC son las mutaciones en *MAP2K1* (también conocido como *MEK1*), un efector río abajo de BRAF. Los casos de CFC por mutaciones en MAP2K1 son menos comunes que aquellos causados por BRAF, pero de todos modos existen dos reportes de caso con IGHD (uno de ellos con la rara combinación de IGHD y pubertad precoz) (Çelik et al., 2014, Szczawińska-Popłonyk et al., 2022).

SHOC2

SHOC2 es una proteína de andamiaje, formando parte del complejo de activación de proteínas RAF, por desfosforilación mediada por RAS (Kwon et al., 2022). Variantes en *SHOC2* causan el llamado “síndrome similar a Noonan con cabello anágeno suelto tipo 1” (MIM#607721). Este síndrome presenta características similares al Noonan, incluyendo la baja talla, pero además presentan poco pelo, que puede arrancarse fácilmente sin dolor. Existen varios reportes de pacientes con este síndrome, baja talla e IGHD, y existen incluso reportes de pacientes con CPHD (Mazzanti et al., 2013, Wang et al., 2022).

Transporte intracelular

MADD

MADD codifica para un factor intercambiador de guanina, que activa RAB3 y RAB27A/B, lo que lo convierte en un regulador clave de las uniones neuromusculares y los gránulos secretorios endócrinos. Variantes en este gen están asociadas a el síndrome DEEAH (MIM#619004, AR). Este síndrome consiste en retraso del **d**esarrollo con anormalidades **e**ndócrinas, **e**xócrinas, **a**utonómicas y **h**ematológicas. Dentro de las anormalidades endócrinas puede encontrarse el hipopituitarismo (Abu-Libdeh et al., 2021).

DNAJC3

DNAJC3 es una co-chaperona de la familia *heat shock protein* (HSP). Esta chaperona juega un rol en el procesamiento de proteínas del retículo endoplasmático. Variantes en *DNAJC3* han sido recientemente asociadas a diabetes mellitus sindrómica, con ataxia, sordera y neuropatías (MIM#616192). Recientemente el espectro de defectos

endócrinos presente en estos pacientes se ha ampliado para incluir también hipopituitarismo congénito (Ozon et al., 2020)

PORCN

PORCN codifica para una O-aciltransferasa denominada *porcupine*. Esta enzima está involucrada en el procesamiento de la familia de proteínas WNT en el retículo endoplasmático. Variantes en este gen generan hipoplasia dérmica focal (MIM#305600, XLR). Esta enfermedad afecta principalmente la piel y es una enfermedad que afecta al ectodermo. Dado el origen ectodérmico de la hipófisis, tanto anterior como posterior, no es extraño que se hayan reportado casos de hipoplasia dérmica focal con IGHD (Divyasri et al., 2024, Hsu et al., 2019).

CCDC88C

CCDC88C codifica para la proteína DAPLE, que tiene la capacidad de unirse a DVL1 y actuar como regulador negativo de la vía de WNT, promoviendo la degradación de □-catenina. Variantes en este gen causan hidrocefalia AR (MIM#236600). Existe un solo reporte que vincula variantes en heterocigosis compuesta en un caso de PSIS (Zwaveling-Soonawala et al., 2017).

CCDC186

CCDC186 está involucrado en la vía secretoria, en particular de vesículas de núcleo denso, particulares de neuronas y células endócrinas. Recientemente se ha descripto un síndrome de retraso global del desarrollo en el que algunos de los pacientes presentan además alteraciones endócrinas debido a variantes bi-alélicas en *CCDC186*. Uno de estos pacientes presentaba además IGHD confirmada (Arrabal et al., 2023).

NBAS

NBAS codifica para una subunidad del complejo NRZ de *tethering*, asociado al transporte retrógrado del aparato de Golgi al retículo endoplasmático. Variantes en este gen causan un síndrome con baja talla, atrofia del nervio óptico y anomalía de Pelger–Huët (MIM#614800, AR). Aunque en la descripción inicial del síndrome se excluyó la IGHD como causa de la baja talla, reportes posteriores han encontrado variantes de interés en *NBAS* en pacientes con HC (Li et al., 2018, Brauner et al., 2020).

SEC31A

SEC31A codifica para un componente del complejo COPII, necesario para el transporte anterógrado entre el retículo endoplasmático y el Golgi. Recientemente se describió una familia con tres hermanos afectados por la misma mutación *de novo* en

SEC31A, que presentaban diversos síntomas, que incluían CPHD y disgenesia gonadal (Tobias et al., 2024).

EXOC3L2

EXOC3L2 es una subunidad del complejo exocisto, responsable de dirigir las vesículas exocíticas a las membranas celulares. Variantes en este gen pueden causar un síndrome de malformación cerebral y renal, que puede afectar la hipófisis (Shalata et al., 2018).

HID1

HID1 es parte de la maquinaria de tráfico de vesículas en la red del trans Golgi. Recientemente mutaciones bi-alélicas en este gen han sido asociadas a una encefalopatía infantil con hipopituitarismo completamente penetrante (Schänzer et al., 2021).

OCRL

OCRL es una inositol polifosfato-5-fosfatasa que se localiza en la red del trans Golgi. Variantes en este gen pueden causar una encefalopatía con cataratas congénitas y disfunción renal (síndrome de Lowe, MIM#309000, XLR), así como enfermedad de Dent aislada (MIM#300555). Recientemente se ha reportado un caso de síndrome de Lowe acompañado de baja talla severa, causada por IGHD (Dai et al., 2019).

Relacionados a vías de degradación

SPINK5

SPINK5 codifica para un inhibidor de serin-proteasas tipo Kazal. Mutaciones en este gen son responsables del síndrome de Netherton (MIM#256500), un síndrome que afecta principalmente la piel, el pelo y el sistema inmune. La baja talla está presente en casi todos los casos, dados problemas para la alimentación generalizados, incluyendo alergias e inflamación. Sin embargo, existen reportes en la literatura de este síndrome acompañado por IGHD, que respondieron al tratamiento con rGH (Ilias et al., 2015, Aydin et al., 2013).

MYCBP2

MYCBP2 codifica para una proteína que se considera como una probable ligasa de ubiquitina, altamente conservada y sensible a la pérdida de función en humanos. Variantes bi-alélicas en este gen producen un síndrome que incluye malformaciones en el cuerpo calloso y fenotipos neurocomportamentales. Es interesante, dada la estrecha relación entre el cuerpo calloso y la hipófisis, que uno de estos pacientes presentaba HC (AlAbdi et al., 2022).

UBR1

UBR1 es una ligasa de ubiquitina E3 N-recognina 1, que funciona como sensor de estrés del retículo endoplasmático (Le et al., 2024). Pacientes con dos copias defectuosas de *UBR1* presentan el síndrome de Johanson-Blizzard, un síndrome complejo que afecta diversos órganos. Se caracteriza por retraso global del desarrollo, baja talla, problemas pancreáticos, sordera, aplasia del cuero cabelludo, anormalidades del pelo y dentarias. Hasta el momento existen dos reportes de caso donde pacientes con este síndrome además presentaban HC, lo que podría explicar su baja talla (Sandhu et al., 1989, Alkhouri et al., 2008)

Transportadores

SLC12A3

SLC12A3 codifica para un transportador de sodio y cloro renal, importante para la homeostasis electrolítica. Variantes patogénicas en este gen causa síndrome de Gitelman AR (MIM#263800), caracterizado por bajos niveles de potasio, magnesio y calcio en sangre. Existen al menos dos reportes de caso que vinculan al síndrome de Gitelman con IGHD, aunque los vínculos de estos fenotipos, de haberlos, no son claros (Huang et al., 2019, Min et al., 2013).

CLCNKB

CLCNKB es un canal de cloro expresado en riñón. Este gen causa síndrome de Bartter, tanto AR (MIM#607364) como digénico recesivo (DR) (MIM#613090). Este síndrome causa bajos niveles de potasio, magnesio y calcio en sangre, de manera similar al síndrome de Gitelman. Es interesante que también para este síndrome existen múltiples reportes de pacientes con IGHD (Brambilla et al., 2018, Adachi et al., 2013). Una posible explicación sugerida para esta asociación es que bajos niveles de potasio durante tiempos prolongados puedan causar IGHD (Flyvbjerg et al., 1991).

CLCN5

La enfermedad de Dent (MIM#300008, XLR) es causada por mutaciones en el gen CLCN5, que codifica para un canal de cloro voltaje dependiente, también expresado principalmente en riñón. Esta enfermedad se caracteriza por proteinuria de bajo peso molecular, hipercalciuria, nefrocalcinosis y falla renal progresiva. La presentación de enfermedad de Dent con alcalosis metabólica hipocalémica asociada con hiperaldosteronismo hiperreninémico (síndrome Bartter-like) es extremadamente rara. Uno de estos casos presentaba a su vez IGHD parcial, lo que le da fuerza a la hipótesis del rol de la hipocalemia en IGHD (Bogdanović et al., 2010)

SLC7A7

La lisinuria con intolerancia a proteínas (MIM#222700) es un desorden metabólico raro, causado por mutaciones en *SLC7A7. SLC7A7* codifica para la subunidad liviana de un transportador de aminoácidos catiónicos. Como resultado de un defecto en este transporte los pacientes presentan intolerancia a ciertas proteínas y deben restringir sus niveles de consumo proteico en la dieta. Existen varios reportes de esta enfermedad asociada a IGHD, e incluso pacientes que responden a rGH, pero es posible que la deficiencia en este caso se deba a la dieta que los pacientes deben cumplir o a malnutrición previa (Esposito et al., 2006).

ABCD1

ABCD1 es un transportador de la superfamilia ATP-binding-cassette (ABC) que se ubica en el peroxisoma. Una deficiencia de este transportador lleva a la acumulación de ácidos grasos de cadena muy larga. Esta acumulación lleva a daños en la mielina de los nervios y causa adrenomieloneuropatía XLR (MIM#300100). Existe un único reporte de caso en el que un paciente además de esta neuropatía progresiva presentaba CPHD (Triantafyllou et al., 2014).

KCNN3

KCNN3 codifica para un canal de Ca^{2+} activado por K^{+} y variantes de ganancia de función en este gen han sido recientemente reportadas como las causantes del síndrome de Zimmermann-Laband (Bauer et al., 2019). Este síndrome AD con herencia de novo causa retraso global del desarrollo, rasgos faciales toscos, hiperplasia gingival e hipoplasia o aplasia de las uñas.

Procesamiento del RNA

POLR3A

POLR3A corresponde a la subunidad mayor de la RNA polimerasa III, responsable de la transcripción de los genes 5SRNA, tRNAs y RNAs U6 nucleares pequeños, entre otros. Inicialmente mutaciones en este gen fueron descriptas como causantes del síndrome “4H” por causar hipomielinización, hipogonadismo hipogonadotrófico e hipodoncia (MIM#607694, AR). Sin embargo, existen múltiples reportes de pacientes con síndrome de 4H acompañado de deficiencia de GH, por lo que se considera que algunos de estos pacientes presentan en realidad CPHD y no únicamente hipogonadismo hipogonadotrófico (Potic et al., 2012).

POLR3B

POLR3B codifica para la segunda subunidad de mayor tamaño de la RNA polimerasa III. Mutaciones en este gen pueden generar también síndrome 4H (MIM#614381, AR) con una frecuencia similar. Uno de estos casos también presentaba CPHD con la misma combinación de deficiencias (Battini et al., 2015).

HNRNPU

HNRNPU codifica para una ribonucleoproteína U nuclear heterogénea está involucrada en transcripción y *splicing* alternativo, además de ser necesaria para la inactivación del cromosoma X (Poot 2018). Variantes en este gen están asociadas a problemas variables del neurodesarrollo (MIM#617391), incluyendo un caso reportado con CPHD (Zhu et al., 2015).

PRPF8

PRPFR8 es el factor de splicing procesador del pre-mRNA 8, formando parte del complejo U4/U6.U5 tri-snRNP junto con la RNA helicasa SNRNP200. Defectos en el splicing causados por variantes defectuosas de este gen causan retinitis pigmentosa AD (MIM#600059). Recientemente se ha reportado un caso de IGHD sin retinitis pigmentosa debido a una variante en *PRPFR8* (Koljonen et al., 2024). Dado que esta variabilidad fenotípica es vista en otros desórdenes (ver *PNPLA6*), *PRPFR8* es un gen candidato para IGHD/CPHD.

WDR4

WDR4 es un componente no catalítico del complejo metiltransferasa de tRNAs necesario para la formación de N7-metilguanina (N7-meG), también conocido como CAP, asociado habitualmente a mRNAs. Variantes en este gen causan un síndrome AR asociado a microcefalia, baja talla y malformaciones del sistema nervioso central (MIM#618346). Existen reportes de pacientes con este síndrome y CPHD, con buena respuesta a rGH, lo que explicaría su baja talla (Trimouille et al., 2017).

VARS1

VARS1 es una valil-tRNA sintetasa, una amino-acil-tRNA sintetasa citoplasmática, necesaria para la traducción y correcta síntesis de proteínas. Este gen también está asociado a microcefalia, en este caso con encefalopatías, con epilepsia y atrofia cortical AR (MIM#617802). Varios pacientes con este síndrome presentan también baja talla y existe al menos un reporte de caso con IGHD e hipogonadismo, indicando una posible disfunción hipofisaria (Alsemari et al., 2017).

RBM28

RBM28 codifica para una proteína de unión a ARN, al que se le han asignado múltiples funciones, incluyendo en la biogénesis de snRNPs y de la subunidad 60S ribosomal. Variantes bi-alélicas en *RBM28* causan síndrome ANE (**a**lopecia, defectos **n**eurológicos y **e**ndocrinopatías, MIM# 612079). Dentro de las endocrinopatías se han reportado tanto hipogonadismo hipogonadotrófico como CPHD (Spiegel et al., 2010).

EIF2B5

EIF2B5 es uno de los componentes del complejo de iniciación de la traducción EIF2B. Variantes en este gen han sido asociadas a leucoencefalopatías con falla ovárica precoz AR (MIM#612079). En al menos un paciente se ha visto además CPHD atípico, asociado a deficiencias de TSH y ACTH pero no GH (Woody et al., 2015).

EIF2S3

EIF2S3 es la subunidad 3, también llamada gamma, del complejo de iniciación de la traducción. Mutaciones en este gen causan el síndrome MEHMO de forma AR (MIM#300148). Este síndrome se caracteriza por retraso **m**adurativo, **e**pilepsia, **h**ipogonadismo/hipogenitalismo, **m**icrocefalia y **o**besidad. Algunos de estos pacientes además presentan baja talla, hipoglucemia y CPHD (Stanik et al., 2018).

NONO

NONO es una proteína con la capacidad de unión a ARN, descripta como una proteína multifactorial que funciona como *scaffold* en múltiples procesos biológicos. Variantes en este gen generan retraso global del desarrollo sindrómico (MIM#300967, XL). En al menos un caso, este síndrome ha sido asociado a HC (Carlston et al., 2019).

SON

SON es una proteína asociada a ciclo celular y splicing (Ahn et al., 2011). Variantes en *SON* causan el síndrome de Zhu-Tokita-Takenouchi-Kim (ZTTK, OMIM# 617140). Entre los síntomas más comunes se encuentran el retraso global del desarrollo, malformaciones craneofaciales, problemas de visión, defectos en el corazón y gastrointestinales así como baja talla. Recientemente varios pacientes con baja talla y variantes en este gen fueron diagnosticados con IGHD (Yang et al., 2020a).

Desórdenes de glicosilación

PGM1

PGM1 codifica para la fosfoglucomutasa 1, encargada de transferir fosfato desde la posición 1 a la posición 6 de la glucosa. Este gen está asociado a un desorden de glicosilación AR (MIM#614921). Estos pacientes suelen presentar baja talla y en ocasiones se ha reportado también IGHD (Pérez et al., 2012).

TMEM165

TMEM165 es una proteína transmembrana perinuclear, asociada mayormente al Golgi. Si bien su función no ha sido estudiada en profundidad, mutaciones bi-alélicas en este gen causan un síndrome de glicosilación (MIM#614727). Estos pacientes suelen presentar baja talla, algunos de ellos con IGHD, pero sin aparente respuesta a rGH (Zeevaert et al., 2012).

ALG1

ALG1 codifica para una beta-manosil-transferasa que causa un desorden de glicosilación congénito AR (MIM#608540). Los síntomas de estos pacientes suelen ser extremadamente variables, pero se han reportado casos de deficiencias hipofisarias, tanto de GH como de TSH (Xue et al., 2023).

DPM1

DMP1 codifica para la unidad catalítica de la doliquil-fosfato manosil-transferasa 1. Este gen causa desorden de glicosilación tipo Ie (MIM#608799, AR). Aunque hay menos de veinte casos reportados para este desorden, al menos uno de ellos presentaba CPHD (Celik et al., 2023).

Desórdenes inmunes

STAT5B

STAT5B es una proteína de señalización clave, que participa de múltiples procesos celulares de la vía JAK/STAT. En particular es importante para la respuesta a interleuquinas en glóbulos blancos, como para la respuesta a GH en todo el cuerpo. La activación de STAT5B por parte de GHR, que es activado a su vez por GH, lleva a la transcripción de IGF1, el principal actor responsable de promover el crecimiento y proliferación celular mediados por GH. En este caso los pacientes presentan insensibilidad a GH, que puede ser tanto AR (MIM#245590) como AD (MI#618985) (Scaglia et al., 2012). Dado el rol de STAT5B en los glóbulos blancos estos pacientes pueden también presentar diversos grados

de desregulación inmune (Klammt et al., 2018). Cabe aclarar que la insensibilidad a GH es clínicamente diferente de la insuficiencia o deficiencia de GH por un pico normal de GH, con baja IGF-1, pero dado la sensibilidad de la prueba de estimulación de GH se consideró prudente incluir a este gen dentro de los posiblemente causantes de IGHD.

STAT3

De modo similar a lo que sucede para STAT5B, STAT3 también juega un rol importante en la transducción de señales relacionadas a células inmunes. Sin embargo, para este gen se ha descripto insensibilidad a GH únicamente para variantes consideradas de ganancia de función. Se asume que en este caso la ganancia de función de STAT3 altera de algún modo la acción de STAT5B y lleva a un fenotipo similar, pero el mecanismo de acción aún no es claro (Gutierrez et al., 2018).

ACP5

ACP5 codifica para TRAP, una enzima responsable de regular la función de osteopontina, una molécula proteína clave para el correcto crecimiento de los huesos y funcionamiento del sistema inmune. Variantes bi-alélicas en *ACP5* causan espondiloencondrodisplasia con desregulación inmune. Al día de la fecha únicamente dos reportes han constatado deficiencia de GH en estos pacientes, pero la baja talla es común en estos pacientes, atribuida mayoritariamente al mal desarrollo óseo (Gutierrez et al., 2018)

RGS10

RGS10 es un regulador de la señalización por proteínas G, modulando negativamente la activación de receptores de este tipo. Recientemente se ha demostrado en una familia que variantes en *RGS10* causan un desorden inmune asociado a baja talla, posiblemente por deficiencia aislada de GH (Chinn et al., 2021)

PIK3CA

PIK3CA codifica para la fosfatidilinositol 3 (PIP3) quinasa alfa, que fosforila PIP2 para producir PIP3. Variantes en *PIK3CA* generan una gran cantidad de enfermedades distintas (aunque destacan distintos tipos de cáncer). Una de estas enfermedades es el síndrome de megalencefalia (sobrecrecimiento) y malformación capilar, asociado a malformaciones cerebrales (MIM#602501). Este síndrome se produce por variantes de ganancias de función, en general somáticas. Sin embargo, en algunos pocos casos se ha visto que este mismo síndrome puede ocurrir acompañado de baja talla postnatal, luego de un sobrecrecimiento intra-uterino. Los motivos para esta imposibilidad de crecimiento fueron confirmados como deficiencia de GH en múltiples pacientes (Davis et al., 2019).

PIK3CD

PIK3CD codifica para la fosfatidilinositol 3 (PIP3) quinasa delta, que también fosforila PIP2 para producir PIP3. Su expresión es menos amplia que la de *PIK3CA* y como consecuencia variantes en *PIK3CD* causan desórdenes inmunes, también por variantes de ganancia de función. Recientemente se ha reportado un caso sindrómico con una variante *de novo* en *PIK3CD*, con baja talla causada por deficiencia de GH, similar a lo reportado para *PIK3CA* (Craig et al., 2022).

NFKB2

NFBK2 es un factor de transcripción clave para el correcto funcionamiento del sistema inmune. Se ha demostrado recientemente que variantes en *NFKB2* llevan a deficiencias inmunes común variables (CVID, MIM#615577). En particular una variante puntual de novo, caracterizada como de ganancia de función ha sido reportada como causante de síndrome de DAVID (deficiencia anterior hipofisaria con deficiencia inmune variable) (Brue et al., 2014).

NFKBIA

NFKBIA codifica para el inhibidor de alfa NFKB y variantes en este gen han sido asociadas a displasia ectodérmica con inmunodeficiencias AD (MIM#612132). Dada la íntima relación entre *NFKB2* y *NFKBIA*, y que tanto la hipófisis anterior como la hipófisis posterior derivan del ectodermo oral y neural respectivamente, es lógico pensar que variantes en este gen podrían resultar en hipopituitarismo. Sin embargo, hasta el momento existe un solo caso reportado en el que la displasia ectodérmica ha resultado en hipopituitarismo (Schimke et al., 2013).

AICDA

AICDA es una deaminasa de citidina inducida por activación está implicada en el cambio de clase inmunoglobulinas en linfocitos B. Variantes en este gen causan inmunodeficiencia AR con hiper IgM (MIM#605258), en detrimento de otras inmunoglobulinas. La combinación de IGHD con inmunodeficiencia e hiper IgM ha sido reportada únicamente tres veces en la literatura y tan solo uno de estos pacientes presentaba una variante de pérdida de función AICDA confirmada (Fazel et al., 2016).

G6CP3

G6CP3 corresponde a la tercera subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa. Variantes en *G6CP3* causan una neutropenia congénita severa AR. Un estudio de 31

pacientes con esta enfermedad demostró un espectro de síntomas más amplio del esperado, incluyendo IGHD y malformaciones genitales (Boztug et al., 2011).

Ciliopatías

ALMS1

ALMS1 es una proteína asociada al centrosoma y al cuerpo basal de la cilia. Variantes en este gen causan síndrome de Alström. El síndrome de Alström se caracteriza por pérdida de visión y audición progresivas, cardiomiopatía dilatada, obesidad y baja talla. Se ha probado en un número significativo de pacientes que la baja talla es muy probablemente un resultado de una deficiencia hipofisaria que deriva en IGHD (Romano et al., 2013).

IFT172

IFT172 es una proteína de transporte intraflagelar (IFT). Mutaciones en este gen han sido asociadas a varias enfermedades AR distintas, incluyendo síndrome de Bardet-Biedl (MIM#619471), síndrome de Mainzer-Saldino retinitis pigmentosa (MIM#616394) y síndrome de costillas cortas y polidactilia (MIM#615630). En un paciente que presentaba un fenotipo similar al síndrome de Mainzer-Saldino se describió IGHD con buena respuesta a RGH (Lucas-Herald et al., 2015).

KIAA0753

KIAA0753 codifica para una proteína que interacciona con OFD1 y FOR20 en centrosomas/centriolos y en satélites pericentriolares (Chevrier et al., 2015). Variantes bi-alélicas en este gen han sido asociadas a síndrome de costillas cortas sin polidactilia (MIM#619479), síndrome orofaciodigital (OFD) (MIM#617127) y síndrome de Joubert (MIM#619476). En particular pacientes con síndrome de Joubert y variantes en *KIAA0753* han sido diagnosticados con IGHD (Stephen et al., 2017).

KATNIP (KIAA0556)

KATNIP es una proteína que interacciona con katanina, una proteína capaz de “cortar” microtúbulos, favoreciendo su despolimerización y con CILK1, una proteína clave para regular el crecimiento de las cilias. Este complejo localiza al cuerpo basal de la cilia, donde regula su longitud. Variantes en KATNIP causan síndrome de Joubert AR (MIM#616784). Hasta el momento se han reportado dos pacientes con variantes en KATNIP que presentaban hipopituitarismo (Niceta et al., 2020, Brauner et al., 2020). Interesantemente uno de ellos presentaba una variante LP homocigota en *KATNIP*

acompañada también de una variante VUS homocigota en *KIF7*, otro gen asociado a síndrome de Joubert (MIM#200990) (Niceta et al., 2020).

TMEM67

TMEM67 codifica para una proteína transmembrana requerida para la ciliogenesis que se ubica en la zona de transición, para controlar el ingreso de proteínas asociadas al lumen de la cilia como INPP5E y ARL13B. Este gen está asociado a diversas ciliopatías, como síndrome de COACH (MIM#216360), de Meckel (MIM#607361) y de Joubert (MIM#610688). Recientemente se ha además descripto una asociación a otro síndrome, llamado RHYNS (**R**etinitis pigmentosa, **H**ipopituitarismo, **N**efronoptisis y Displasia esquelética) (Brancati et al., 2018).

PIBF1

PIBF1 codifica para el factor de bloqueo inducido por progesterona 1. Este factor es inducido durante el embarazo por la progesterona, pero su función estaría relacionada a la formación de la cilia, interactuando con PCM1 en los satélites centriolares (Szekeres-bartho et al., 1985, Gippert et al., 2023). Variantes en este gen han sido asociadas a síndrome de Joubert (MIM#617767) y en al menos un caso a HC sindrómico (Gippert et al., 2023).

CELSR2

CELSR2 es el receptor 2 de tipo G de siete pasos de cadherina EGF LAG. Estos receptores son una clase particular de receptores asociados a proteínas G y son importantes para el desarrollo neuronal y endócrino (pancreático) (Wang et al., 2014). Además, este receptor juega un rol en el establecimiento de la polaridad celular planar, importante para el correcto posicionamiento de la cilia primaria. Este gen se considera un gen candidato para el síndrome de Joubert, IGHD (Vilboux et al., 2017).

TTC26

TTC26 codifica para una proteína que contiene dominios de repeticiones de tetratricopeptidos (TPR). Esta proteína funciona como proteína de transporte intraflagelar (IFT), encargada del transporte de proteínas relacionadas a la motilidad hacia las cilias (Alfadhel et al., 2021). Recientemente mutaciones en este gen han sido asociadas con una nueva ciliopatía (MIM#619534, AR). Los fenotipos de esta ciliopatía son altamente variables, pero hay dos reportes independientes de pacientes con HC (David et al., 2020, Papingi et al., 2023).

Proteínas estructurales de membrana y matriz extracelular

LAMB2

LAMB2 codifica para laminina beta 2, una proteína que forma parte de la matriz extracelular epitelial especializada denominada lámina basal. Mutaciones en LAMB2 causan síndrome de Pierson (MIM#609049) y síndrome nefrótico con anormalidades oculares variables (MIM#614199). En un caso se observaron síntomas compatibles con estos síndromes en un paciente con HC y variantes en *LAMB2*. Estudios en ratón confirmaron un rol para esta proteína durante el desarrollo hipofisario, lo que lo convierte en un fuerte candidato para HC sindrómico (Tahoun et al., 2019).

ACAN

El gen ACAN codifica para agrecano, es una proteoglicano de la matriz extracelular, formando parte principalmente de cartílago. Si bien las variantes en este gen están asociadas a baja talla (MIM#155760) o a síndromes esqueléticos (MIM#155760 y MIM#155760), también se ha sugerido que la baja talla de algunos de estos pacientes podría deberse a IGHD (Wu et al., 2023).

XYLT1

XYLT1 es una enzima xilosil-transferasa, que cataliza la transferencia de UDP-xilosa a serinas en secuencias de reconocimiento XT en proteínas target. En particular este proceso es fundamental para la maduración de los proteoglicanos, una familia de proteínas de matriz extracelular. Mutaciones en *XYLT1* generan una displasia esquelética de Desbuquois (MIM#615777), caracterizada por baja talla. Existe un reporte que sugiere que la baja talla de estos pacientes podría deberse además de a la displasia esquelética a IGHD (Jamsheer et al., 2016).

L1CAM

L1CAM codifica para la proteína de adhesión celular L1, que se encuentra en la superficie celular de las neuronas, implicada en migración y crecimiento de neuritas. Mutaciones en *L1CAM* causan síndrome MASA (MIM#303350, XLR) e hidrocefalia (MIM#307000, XLR). En un caso altamente sindrómico, con hidrocefalia prenatal, el paciente también presentaba HC (Gregory et al., 2019).

GJA1

GJA1 codifica para la proteína de *gap junctions* alfa 1. Mutaciones en este gen pueden causar una gran cantidad de síndromes, tanto AD como AR, que van desde la sindactilia aislada (MIM#186100) hasta síndromes graves como la displasia

oculodentodigital (MIM#257850 y MIM#164200). En este último síndrome se suele observar baja talla y en al menos un caso esta baja talla se adjudicó a IGHD (Choi et al., 2018).

Otros

PNPLA6

PNPLA6 codifica para una enzima comúnmente conocida como NTE (*neuropathy target esterase*). Esta enzima es una lisofosfolipasa anclada a la membrana externa del retículo endoplasmático (Glynn 2005). Defectos en esta proteína, ya sea por mutaciones o por toxicidad (una consecuencia común del contacto con organofosfatos) llevan a problemas motores debido a neuropatías de los axones motores (MIM#612020). Sin embargo, recientemente se ha descubierto que los fenotipos asociados con variantes en *PNPLA6* son altamente variables y muchas veces involucran otros órganos, incluyendo la hipófisis, aunque el más comúnmente afectado es el sistema visual. Dentro de estas afectaciones destaca el síndrome de Oliver-McFarlane (MIM#603197). Estos pacientes presentan ceguera progresiva debida a degeneración de los fotorreceptores, tricomegalia, alopecia progresiva y baja talla por deficiencia de hormona de crecimiento (Kmoch et al., 2015). Además, pueden llegar a presentar retraso general de desarrollo y problemas motores (MIM#603197). Su herencia y la de los dos otros síndromes alélicos, Boucher-Neuhauser (MIM#603197) y Laurence-Moon (MIM#603197), es siempre AR.

IARS2

IARS2 es un gen nuclear que codifica para una isoleucina-tRNA-sintetasa mitocondrial. De este modo, mutaciones en este gen dan lugar a una enfermedad mitocondrial. Las enfermedades mitocondriales se caracterizan por ser altamente variables y el caso de *IARS2* no es una excepción (Khan et al., 2015). Las variantes en *IARS2* causan en principio dos grandes grupos de enfermedades, las tipo CAGSSS (*cataracts, growth hormone deficiency, sensory neuropathy, sensorineural hearing loss, and skeletal dysplasia*, MIM#616007) y síndrome de Leigh. Hasta el momento siete casos de CAGSSS han sido reportados a nivel mundial, de los cuales todos presentaban baja talla, pero solo cuatro presentaban deficiencia de GH comprobada (Jabbour et al., 2016, Vona et al., 2018, Takezawa et al., 2018, Moosa et al., 2017). Hasta el momento no es claro el motivo por el cuál variantes en *IARS2* generan deficiencias hipofisarias.

AKT3

AKT3 es una serina/treonina quinasa, importante en la respuesta a insulina y factores de crecimiento. Mutaciones en AKT3 causan un síndrome complejo que presenta megalencefalia, polimicrogiria, polidactilia e hidrocefalia (MIM#615937, AD). Algunos

pacientes con este síndrome presentan problemas endócrinos, en particular se han reportado casos de IGHD/CPHD (Renard et al., 2024).

CSNK2A1 y CSNK2B

CSNKA1 codifica para la subunidad alfa de la caseína quinasa 2, mientras que *CSNK2B* codifica para la subunidad beta de la caseína quinasa 2, que se expresa abundantemente en el cerebro. Variantes en *CSNKA1* causan el síndrome Okur-Chung, que afecta principalmente el neurodesarrollo, pero suele ser multiorgánico, incluyendo defectos esqueléticos, cardíacos, renales y gastrointestinales. La baja talla es un fenotipo común y en estos casos IGHD ha sido observada en múltiples ocasiones (Wu et al., 2021).

Mutaciones en *CSNK2B* han sido recientemente asociadas a retraso global del desarrollo y epilepsia (síndrome de Poirier-Bienvenu). La baja talla también es un síntoma común en este síndrome y al menos un caso presentaba IGHD confirmado (Aouchiche et al., 2024). Se especula que las afecciones hipofisarias en estos síndromes sean por una fosforilación insuficiente de LHX3 por parte de esta quinas (Parker et al., 2004).

PREPL

PREPL codifica para una serin-hidrolasa citoplasmática, de la familia de las oligopeptidasas, con substratos por ahora desconocidos. Deficiencias de *PREPL* causan síndrome miasténico AR (MIM#616224), caracterizado por hipotonía, dificultades para la alimentación, ptosis, impedimento cognitivo, síntomas musculares, baja talla y en algunos casos deficiencia de hormona de crecimiento e hipogonadismo hipogonadotrófico (Yang et al., 2020b, Silva et al., 2018).

CDC25B

CDC25B es un regulador clave del ciclo celular, encargado de activar a la quinasa CDC2 para la entrada a mitosis. Recientemente un reporte ha vinculado variantes en *CDC25B* con un nuevo síndrome que incluye cataratas, cardiomiopatía severa (letal) y deficiencias endócrinas (Lam et al., 2020).

DLG3

DLG3 codifica para una proteína asociada a sinapsis, parte de la familia de guanilato quinasas asociadas a membranas, importantes para la polarización neuronal. Mutaciones en este gen están asociadas a retraso global del desarrollo XLR (MIM#300850). Un único reporte ha vinculado este síndrome con baja talla producto de IGHD (Sandestig et al., 2019).

NR0B1 (DAX1)

NR0B1 es un receptor huérfano de la superfamilia de receptores nucleares, involucrado en el correcto desarrollo de la glándula adrenal. Variantes en este gen son causantes de hipoplasia adrenal (XLR - MIM#300200) y de disgenesia gonadal 46 XY (XL - MIM#300018). En varios pacientes con hipoplasia adrenal se ha demostrado también IGHD como un síntoma poco frecuente (Zwaveling-Soonawala et al., 2017).

GNAS

GNAS codifica para la subunidad alfa de la pequeña proteína G_s. Este locus es extremadamente complejo y presenta imprinting materno. La mayoría de las mutaciones y rearreglos encontrados en este gen causan pseudohipoparatiroidismo o pseudopseudohipoparatiroidismo (P)PHP. Sin embargo, algunos de estos pacientes presentan IGHD, posiblemente dado que la vía de GH es mediada por receptores que dependen de G_s-α para ejercer su efecto (Goto et al., 2010). Pacientes con mutaciones inactivantes heredadas por vía materna y con baja talla muestran buena respuesta a rGH (Ertl et al., 2023). Recientemente una variante LP ha sido descripta en un paciente con PSIS, sin (P)PHP (Fang et al., 2020).

GNAO1

GNAO1 codifica para una subunidad alfa de la pequeña proteína G_o. Variantes en *GNAO1* generan encefalopatías con epilepsia (MIM#615473) o movimientos involuntarios (MIM#617493). Recientemente se ha reportado un caso de HC con una variante LP en *GNAO1*, aunque sin descripción de otros síntomas (Plachy et al., 2024).

FGFR2

FGFR2 es un factor de señalización clave durante el desarrollo, funcionando como receptor para una gran variedad de FGFs. No es por lo tanto sorprendente que variantes en este gen causen al menos diez síndromes distintos de manera AD. Para al menos uno de estos síndromes, el síndrome de Crouzon (MIM#123500), se ha reportado un paciente con IGHD (Wen et al., 2010).

GRM7

GRM7 es un receptor de glutamato metabotrópico, que en caso de estar mutados ambos alelos puede causar microcefalia, epilepsia y malformaciones cerebrales (MIM#618922). Se presume que como consecuencia de estas malformaciones cerebrales también puede verse afectada la hipófisis, dado que alrededor del 30% de los pacientes con este síndrome presentaban HC (Marafi et al., 2020).

Deleciones y duplicaciones cromosómicas

En el cromosoma 1 las únicas deleciones que han sido reportadas son deleciones que van desde 1q23 hasta 1q31.1, incluyendo en casi todos los casos a *LHX4* (Descartes et al., 2008, Capra et al., 2013, Callier et al., 2007, Budny et al., 2020b, Filges et al., 2012). En el único caso en el que se ha reportado una deleción en este cromosoma que no incluye a *LHX4*, la deleción abarcaba hasta 1q25.1, mientras que *LHX4* se encuentra en 1q25.2, por lo que es posible que la fuente del HC en este caso se deba a una desregulación de la expresión de este gen (Lam et al., 2016). Sin embargo, también es posible que esta región incluya genes causantes de HC aún no identificados.

En el cromosoma 2 diversas deleciones han sido asociadas a HC. Los pacientes con el síndrome de hipotonía-cistinuria, provocado por deleciones homocigotas en 2p21, presentan habitualmente IGHD. En este caso los genes seleccionados son *SLC3A1* y *PREPL,* además de genes cercanos (Bartholdi et al., 2013, Régal et al., 2012). Aunque ninguno de estos genes han sido asociados a HC por su cuenta, se encuentran a alrededor de 500 kb de *SIX3* y *SIX2*, por lo que podrían afectar el desarrollo hipofisario afectando la expresión de estos genes. Una duplicación en *SIX3* ha sido reportada en dos pacientes con HC como VUS (Budny et al., 2020b). La única otra duplicación reportada en el cromosoma 2 es en la región 2p25. Esta duplicación ha sido reportada múltiples veces, pero su significado es incierto (Budny et al., 2020b, Vetro et al., 2014). Esto se debe en parte a que uno de estos pacientes presentaba también una deleción en 2q37, que ha sido vinculado también a HC (Arefzadeh et al., 2018, Devillard et al., 2010). Deleciones en esta región generan síndrome de braquidactilia, baja talla y retraso madurativo. Aunque ninguno de los genes afectados ha sido vinculado directamente a hipopituitarismo, *HID1A* y *HDAC4* surgen como genes candidatos interesantes. Otra deleción frecuente en el cromosoma 2 que causa HC es la deleción en la región 2q14, que involucra a *GLI2* (Kevelam et al., 2011, Gregory et al., 2014).

En el cromosoma 3 se han reportado una duplicación en *HESX1* en un paciente con HC, en la región 3p14, aunque esta variante sea de significado incierto, particularmente dado que las variantes reportadas hasta la fecha en *HESX1* son de pérdida de función (Budny et al., 2020b). El único otro reporte hasta la fecha que involucra este cromosoma es una deleción 3q13.31 que abarcaba únicamente al gen *LSAMP*, que no ha sido caracterizado como un gen causante de HC en otros pacientes (Correa et al., 2017).

En el cromosoma 5 las únicas deleciones reportadas involucran a *PROP1* en la región 5q35.3 (Zhang et al., 2010). En el cromosoma 6 solo existe un reporte de una deleción 6q24.2-q25.2 con IGHD (Stagi et al., 2015). Sin embargo, ninguno de los genes

afectados ha sido asociado a HC ni a genes relacionados. En el cromosoma 7 únicamente se han reportado variantes estructurales en el brazo 7q11.23. En esta región se han reportado tanto duplicaciones como deleciones. Las duplicaciones de esta región han sido asociadas a IGHD en alrededor del 10% de los casos (Morris et al., 2015). Las deleciones en esta región causan síndrome de Williams-Beuren. Alrededor del 40% de estos pacientes presentan baja talla y existen al menos tres reportes de pacientes con IGHD (Levy-Shraga et al., 2017, Abidi et al., 2015). El gen responsable de los fenotipos que presentan estos pacientes aún no ha sido dilucidado, aunque se han sugerido los genes *CLIP2*, *GTF2IRD1* y *GTF2I* como posibles candidatos (Alesi et al., 2020).

En el cromosoma 8, dos síndromes han sido reportados en conjunto con HC, los síndromes tricorrinofalángicos tipo 1 y tipo 2. El síndrome tricorrinofalángico tipo 1 es causado por deleciones en la región 8q23.3, que involucran al gen *TRPS1*. Un paciente con una deleción 8q23.1-q24.11 ha sido reportado junto con HC (Correa et al., 2017). La deleción 8q24.11-q24.13, que abarca a los genes *TRPS1* y *EXT1*, causa síndrome tricorrinofalángico tipo 2. Recientemente se ha descrito un caso familiar con este síndrome e IGHD (Öztürk et al., 2023, Foryś-Dworniczak et al., 2019), lo que fortalece el rol de TRPS1 como un gen candidato para HC.

Dentro del cromosoma 9, únicamente dos casos han sido asociados a HC. En ambos casos se trata de una trisomía, en un caso una trisomía parcial 9p (Fan et al., 2020) y en el otro caso de una trisomía parcial 9q (Tiong et al., 2010). Es interesante que en el caso de la trisomía parcial 9q se ve afectado el gen *ZNF462*, un gen candidato como causante de HC. En el caso de la trisomía 9p el único que gen que aparenta ser de interés por posible ganancia de función es *GLDC*, un marcador de la neurohipófisis (ver capítulo 2).

En el cromosoma 11 una única deleción ha sido reportada, en la región 11q23-q25 (Pivnick et al., 1996). Pacientes con deleciones en esta región presentan síndrome de Jacobsen y suelen presentar baja talla, pero este caso es el único reportado con deficiencia de GH. Si bien esta deleción abarca una gran cantidad de genes, *KMT2A* es uno de los genes delecionados, que ha sido asociado a HC (ver anexo).

En el cromosoma 12 ha sido reportado un caso extremadamente raro, de tetrasomía 12p en mosaico, denominado síndrome de Killian-Pallister, con IGHD. Dentro de este síndrome el hallazgo de IGHD es también raro, y no es clara la causa a nivel genético (Sukarova-Angelovska et al., 2016). El segundo reporte dentro del cromosoma 12 es de una microdeleción en 12q14, también en un paciente con CPHD. En este caso el gen candidato es considerado *HMGA2*, causante del síndrome de Silver Russel (Nso-Roca et al., 2014).

El cromosoma 13 presenta varias regiones que han sido asociadas a HC, todas en el brazo largo. La deleción 13q12.3-q14.3 ha sido asociada a retinoblastoma en combinación con PSIS, una combinación que hasta el momento se considera única (Buenrostro-Aguilar et al., 2016). El segundo locus asociado a HC es 13q31.3. Deleciones en esta región causan síndrome de Feingold tipo II. Recientemente se determinó que estos pacientes pueden presentar anomalías hipofisarias y que estas anomalías están vinculadas a la deleción del microRNA *MIR17HG* (Muriello et al., 2019). Otra deleción reportada es la deleción 13q22.2-q32.1, que interesantemente incluye también a *MIR17HG* y no cuenta con otros genes candidatos (Grigori et al., 2011).

Dentro del cromosoma 14 todas las deleciones reportadas asociadas a HC pueden ser atribuidas a la deleción de la región 14q22.3, en la que se ubica *OTX2* o bien a la deleción de *BMP4* en la región 14q22.2, sino a la deleción de ambos genes (Brisset et al., 2014, Budny et al., 2020b, Kera et al., 2021).

El síndrome de Prader-Willi es una de las anomalías cromosómicas más comunes, que involucra la deleción de la región 15q11-q13, heredado por vía paterna, dado que la región sufre de imprinting. Hasta el día de hoy se desconoce el motivo exacto que causa esta enfermedad, pero los pacientes suelen presentar HC (Cohen et al., 2014, Crinò et al., 2008). Otro síndrome recientemente descripto que afecta al cromosoma 15 es el síndrome de microdeleción 15q24. La mayoría de estos pacientes presentan baja talla y al menos dos casos reportados presentaban IGHD. Los genes candidatos en esta región son *CYP11A1*, *SEMA7A*, *CPLX3*, *ARID3B*, *STRA6*, *SIN3A* y *CSK* (Magoulas et al., 2012). La otra región reportada como causante de IGHD es la deleción de la región 15q26.3, que incluye a *IGF1R*, por lo que probablemente estos reportes se correspondan con resistencia a IGF1 y no con IGHD propiamente dicho (Cody et al., 2010).

En el cromosoma 16 se ha reportado únicamente la deleción 16p13.11 que contiene al gen *MYH11*, causante del síndrome MMHIS (megavejiga-microcolon-hipoperistaltismo intestinal). Este síndrome ha sido asociado a CPHD únicamente en el caso de una mutación bi-alélica, donde una de las variantes consistía en la deleción 16p13.11 (Kloth et al., 2017).

El cromosoma 17 presenta varias regiones asociadas a HC. La microduplicación 17p13.1 ha sido reportada como causante de deficiencia intelectual, aunque no se ha sugerido ningún gen en particular como la causa certera. Uno de estos casos presentaba IGHD comprobado en el probando y baja talla en la madre que compartía la deleción (Leka-Emiri et al., 2018). Es interesante que uno de los genes afectados es *DLG4*, que causa retraso global del desarrollo, y cuyo ortólogo *DLG3* ha sido asociado a IGHD (ver anexo). Otra microduplicación de este brazo (17p11.2) causa el síndrome de

Potocki–Lupski. Este síndrome suele presentar baja talla y se especula que la causa sea IGHD, dado que se ha comprobado esta deficiencia en al menos dos pacientes (Franciskovich et al., 2020), pero ninguno de los genes delecionados han sido asociados a HC aún. En el brazo largo también se han reportado varias deleciones patogénicas vinculadas a HC. La microdeleción 17q12 ha sido asociada a IGHD con PSIS, pero ninguno de los genes afectados han sido vinculados a HC aún (Correa-Silva et al., 2022). Otro paciente que presentaba PSIS tenía también una deleción en 17q21.31, abarcando seis genes (Chehadeh-Djebbar et al., 2011). Uno de estos genes es *KANSL1*, en el cual se sabe que mutaciones puntuales de novo pueden causar Koolen-De Vries (MIM#610443), que suele presentarse con baja talla que podría deberse a IGHD (ver anexo). Otra deleción, 17q22, ha sido asociada a IGHD, pero hasta el momento ninguno de los genes afectados presentan un vínculo con HC de forma AD (Durmaz et al., 2020).

En el cromosoma 18 existen varios rearreglos de gran tamaño que han sido vinculados a HC, incluyendo la trisomía 18, en la que se sospecha que los casos de HC ocurren como parte del espectro de HPE (Demir et al., 2013). Una duplicación 18p11.31-p11.23 ha sido asociada con IGHD, pero la causa es poco clara, dado que ninguno de los tres genes afectados han sido vinculados a IGHD previamente (Giordano et al., 2016). La deleción 18p11.32-p11.21, muy cercana a la anterior, ha sido asociada a CPHD, siendo el gen candidato más robusto en esa región *TGIF1*, normalmente asociado a HPE (Correa-Silva et al., 2022). Del mismo modo, la monosomía 18p también ha sido vinculada a HC, siendo *TGIF1* el gen candidato más sólido (Dolek-Cetinkaya et al., 2013, Tatsi et al., 2013). En el brazo largo, la deleción completa de este brazo también ha sido asociada a HC (Kaulfers et al., 2020, Jackowski et al., 2019). La deleción de la región 18q12 ha sido reportada en pacientes con HC, pero sin genes candidatos reportados (Budny et al., 2020b). El resto de los reportes atribuyen el HC a una región crítica alrededor de la región 18q23, como se evidencia por deleciones 18q distales, 18q23 y 18q22-q23 que comparten este fenotipo (Cody et al., 2013, Margarit et al., 2012, Dostal et al., 2009, Rizzolio et al., 2008). El gen candidato más sólido en esta región son *SALL3*, ortólogo de *SALL1* y *SALL4* que también se han sugerido como causantes de HC (ver anexo), que presenta una región regulatoria conservada justo en la región considerada crítica para este fenotipo.

En el cromosoma 19 únicamente una deleción ha sido asociada a HC, en la región 19q13. Es probable que este caso se explique por la deleción del factor de transcripción *KMT2B*, aunque es el único caso hasta el momento reportado con una deleción en esta región con HC (Forzano et al., 2012). En el cromosoma 20 han sido reportadas dos anomalías, la deleción 20p11.22-p11.21, que involucra a *FOXA2* (Wee et al., 2023), y la deleción 20p12.2-p12.3, que involucra a *PROKR2* y *BMP2* (Parsons et al., 2017).

Mientras que en el cromosoma 21 no se han reportado casos, en el cromosoma 22 se han reportado deleciones en la región 22q11.2 (Tovar et al., 2022, Weinzimer et al., 2001), región que posiblemente pueda acotarse a 22q11.21 (Cody et al., 2010). En esta región se encuentra TBX1, que causa síndrome de DiGeorge, donde la baja talla es un síntoma habitual. El síndrome del ojo de gato (MIM#115470) también es causado por rearreglos en este cromosoma. El gen responsable de este síndrome no se ha descripto aún. La enfermedad resulta de un cromosoma extra, derivado de una duplicación invertida del brazo corto del cromosoma 22 y la parte proximal del brazo largo de ese mismo cromosoma (inv dup 22pter-22q11.2). Se han documentado contados casos de este síndrome en los que los pacientes presentan deficiencia de GH o hipogonadismo hipogonadotrófico (Abidi et al., 2015).

En los cromosomas sexuales se han reportado múltiples afecciones asociadas a HC. La deleción Xq21.1 ha sido asociada a HC en un cuadro sindrómico, posiblemente dada la deleción de un conjunto de genes que incluyen *TBX22*, asociada a paladar hendido. (Giordano et al., 2015). El síndrome de Turner (45X) también ha sido asociado a HC (Bonfig et al., 2012), así como la deleción Xq27-qter (46XX) (Yıldırım et al., 2017), que incluye a *SOX3*. Cambios en el número de cromosomas X (Síndrome de Klinefelter - 47XXY- y sindrome 49XXXXY), también han sido asociados a HC (Mazen et al., 2010). Es interesante que se ha visto también HC en un paciente 46 XX SRY positivo (Li et al., 2021) y un paciente con cromosoma Y en anillo (Milenkovic et al., 2011).

Existen además reportes de anomalías cromosómicas complejas (involucrando rearreglos en más de un cromosoma) asociadas a HC, pero la interpretación en estos casos es difícil (Vetro et al., 2014, Correa et al., 2017).

Hipopituitarismo congénito

HHIP, IFT172, RAX, IRS4, HNRNPU, XYLT1, ZBTB20, RBPJ, HID1, SOX2, SOX3, HHAT, SOX1, FGF8, KAT5, CDH2, CDH1, TBC1D32, AKT3, PROK2, PITX2, PITX1, RNF111, CDON, GTF2I, GHSR, NKX2-6, FOXH1, WNT5A, SPINK5, AIP, DIO2, HNF1A, SDHA, ISL1, TRHR, DISP1, SMO, GPR161, KCNQ1, MADD, ANOS1, BTK, MAML3, IGFALS, OBSL1, DSC2, CUL7, MAGEL2, BLM, IGSF1, ARX, CLCNKB, UBR1, RNPC3, GATA2, GHRHR, PRKAR2B, STK36, PRKAR2A, NPHP1, HESX1, NKX2-1, OTX2, OTX1, SLC15A4, MYH10, MORC2, WNT4, EIF2B5, STAT5B, ZRSR2, STIL, EGR4, WFS1, NONO, PTCH2, SMARCA5, HMGA2, NR0B1, BRAF, FUZ, L1CAM, BMP7, PBX1, AICDA, THAP11, NFKB2, BMP4, NFKBIA, GH1, IGSF10, AHI1, BMP2, CDK6, EIF2S3, LHX3, DMXL2, FGF18, GNAS, DCHS1, LHX4, DHCR7, SIM1, GPR101, NODAL, FGF10, FGFR1, ACVRL1, ROBO2, PCSK1, RBM28, NRP2, CDKN1B, THRB, SRA1, SIX1, PIK3CD, TRH, GLI1, GLI3, GLI2,

ROBO1, IKBKB, GHR, GLI4, SHH, SIX6, SPR, SIX4, GRM7, SIX5, SUFU, SIX2, TCTN1, SIX3, GNRHR, ACP5, ANOP1, CC2D2A, GABPA, TSHB, TGIF1, POU1F1, PROP1, NBPF9, NOG, CAD, NBPF10, PAX6, FOXL2, NCOR2, NR5A1, ZEB2, MIR17HG, GAS1, SEMA3A, LRP2, DLL1, NKD2, CDC42, PROKR2, TMEM67, KIAA0753, ZSWIM6, IARS2, TBL1X, SLIT2, MUC4, DUOX2, MAPK3, ARNT2, ZNF462, TCF7L2, TCF7L1, B3GAT3, LAMB2, STAT3, ELP4, TBX19, WDR11, POMC, SMOC2, MARCKS, POLR3A, NFIB, GHRH, CTNNB1, PNPLA6, INSM1, FOXA2, CCDC1

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, FGF

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, PCSK1, 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

Síndromes con involucramiento visual

YAP1, DOCK4, TENM3, POMT1, RAX, HMGB3, HCCS, LRRC32, HDAC6, SOX2, SMCHD1, SIX6, PORCN, PIEZO2, ARD1A, OTX2, OTX1, NDP, STRA6, PITX3, TFAP2A, PRRX1, NAA10, LUM, NR2F1, PAX6, MITF, VAX1, POMGNT2, PAX2, BMP4, ALDH1A3, RBP4, FRAS1, SMOC1, MAB21L2, PXDN, SLCO1A2, RARB, BCOR, PRR12, FREM1, FREM2, VSX2, HM

Holoprosencefalia

TTC26, C2CD3, SMC3, GLI3, GLI2, SHH, TUBA1A, ZIC2, ZIC3, TUBB3, SIX3, DAG1, ZNF526, CASP2, NEK1, DENND5A, CC2D2A, CDON, TGIF1, EMX2, PPP1R12A, FBXW11, TUBB, NOG, NOSIP, AMPD2, IFT80, TUBG1, SMC1A, POMGNT1, RUNX2, TUBB2B, TUBB2A, WDR81, HPE1, AMER1, KMT2D, INTU, ARX, KATNB1, WDR62, HDAC6, TTBK2, PPP2CA, PPP2CB, NUAK2, RAD21, FKTN, SEC31A, TBX1, B3GALNT2, STIL, PRRX1, GPKOW, PTCH1, HUWE1, FUZ, TUBB4A, ICK, VANGL2, STAG2, CNOT1, CCDC88C, FAT1, HYLS1, PLCH1, DHCR7, TDGF1, RAB3GAP1, FGF

Ciliopatías

TRAF3IP1, IFT172, CEP120, CEP164, KIF14, TXNDC15, CCDC28B, TCTN3, TCTN2, CSPP1, SUFU, TMEM107, TCTN1, NEK1, BBS9, BBS7, IFT57, CC2D2A, CEP290, BBS5, CEP55, BBS4, OFD1, 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, CPLANE1, BBIP1, TMEM231, AHI1, TTC8, TMEM237, KIAA0586, ALMS1, MKS1, HYLS1, IFT27, B9D1, B9D2, CEP41, DHCR7, TRIM

Paladar hendido

RPL5, FOXE1, KDM1A, EIF4A3, CHD7, POMT1, LRRC32, ACTB, PHF8, EFTUD2, PPP3CA, SUMO1, OFC14, PIEZO2, HOXA2, EPG5, SOX9, TP63, OFD1, 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, EIF3G, DHCR7, MBTPS2, FGFR2, NECTIN1, FGF

Afectaciones del cuerpo calloso

POMT2, GPSM2, FH, CTBP1, POMT1, HCCS, PDHB, C12ORF57, MED12, EPG5, SLC12A6, SPG11, DIS3L2, FKTN, SEC31A, IGBP1, EOMES, ZNF462, FKRP, PDHA1, CRPPA, NDE1, CASK, L1CAM, POMGNT1, NFIA, KAT6B, KIF26A, DCX, TCF4, FGF

Rasopatías

ELN, CHD7, PPP1CB, GJA1, SPRED1, ZIC3, HRAS, MAP2K1, MAP2K2, NKX2-6, FOXH1, RASA1, HAND1, CRELD1, RAF1, SOS1, ZFPM2, SOS2, MYH6, NOTCH1, GATA6, GATA4, CBL, NRAS, RRAS, NSD1, GPC3, SHOC2, NKX2-5, LEFTY2, TBX1, JAG1, GDF1, A2ML1, BRAF, PTPN11, NR2F2, SMAD6, TBX5, ACVR2B, MEIS2, MED13L, RIT1, ACTC1, ALMS1, NF1, PAF1, KRAS, BCOR, LZTR1, NOD

Genes faltos de evidencia

ASPM (Zwaveling-Soonawala et al., 2017)**,** *B3GAT3* (Bloor et al., 2017), *B9D1* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *BLM* (Verpula et al., 2020), *CCDC141* (Brauner et al., 2020), *CDC42* (Martinelli et al., 2018), *CDH2* (Ferreira et al., 2023), *CEP120* (Brauner et al., 2020), *CHD4* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *CSPP1* (Brauner et al., 2020), *CUL7* (Meazza et al., 2013), *DCHS1* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *DCHS2* (Lodge et al., 2020), *DHCR7* (Brauner et al., 2020, Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *DSC2* (Fang et al., 2020), *EGR4* (Fang et al., 2020), *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCG* (Brauner et al., 2020), *FAT2* (Lodge et al., 2020), *FGFR3* (Brauner et al., 2020), *GCH1* (Lin et al., 2014), *GPR161* (Karaka et al., 2014), *HHAT* (Fang et al., 2020), *HHIP* (Del Blanco et al., 2012a), *HMGA2* (Del Blanco et al., 2011), *IFIH1* (Lin et al., 2023), *IGSF10* (Budny et al., 2020a), *IL17RD* (Brauner et al., 2020), *INPP5E* (Brauner et al., 2020, Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *KIF7* (Niceta et al., 2020), *KIF14* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *KCNJ11* (Liu et al., 2023), *LHX9* (Brauner et al., 2020), *LRP2* (Fang et al., 2020), *MAML3* (Guo et al., 2017), *MAPK3* (Fang et al., 2020), *MUC4* (Wang et al., 2019a), *MYH10* (Fang et al., 2020), *NBPF9* (Wang et al., 2019a), *NBPF10* (Wang et al., 2019a), *NCOR2* (Guo et al., 2017), *NDE1* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *NKD2* (Guo et al., 2017), *NPHP1* (Fang et al., 2020), *NSMF* (Brauner et al., 2020), *OTUD4* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *PRMT7* (Brauner et al., 2020), *PRKAR2A*, *PRKAR2B*, *PTCH2* (Fang et al., 2020), *RAF1* (Brauner et al., 2020), *RBPJ* (Kalina et al., 2010), *RELN* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *RNF111* (Fang et al., 2020), *RPGRIP1L* (Wolf et al., 2007), *SEB2* (Fang et al., 2020), *SEMA3E* (Brauner et al., 2020), *SIM1* (Gonsalves et al., 2020), *SIX5* (Jee et al., 2021), *SIX6* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *SLC12A6* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *SLC15A4* (Simm et al., 2017), *SLC20A1* (Simm et al., 2017), *SLC30A7* (Huang et al., 2023), *SLIT2* (Brauner et al., 2020), *SLX4* (Brauner et al., 2020), *SMARCA2* (Brauner et al., 2020), *SMCHD1* (Kinjo et al., 2020), *SMO* (Fang et al., 2020), *SPR* (Zielonka et al., 2015), *STAR* (Higa et al., 2021), *STIL* (Mouden et al., 2015), *STK36* (Fang et al., 2020), *SUFU* (Yu et al., 2021), *TACR3* (Zwaveling-Soonawala et al., 2017), *TCTN1* (Fang et al., 2020), *VPS13B* (Brauner et al., 2020), *ZIC2* (Tasdemir et al., 2014), *ZNF423* (Brauner et al., 2020).

Anexo - Capítulo 2

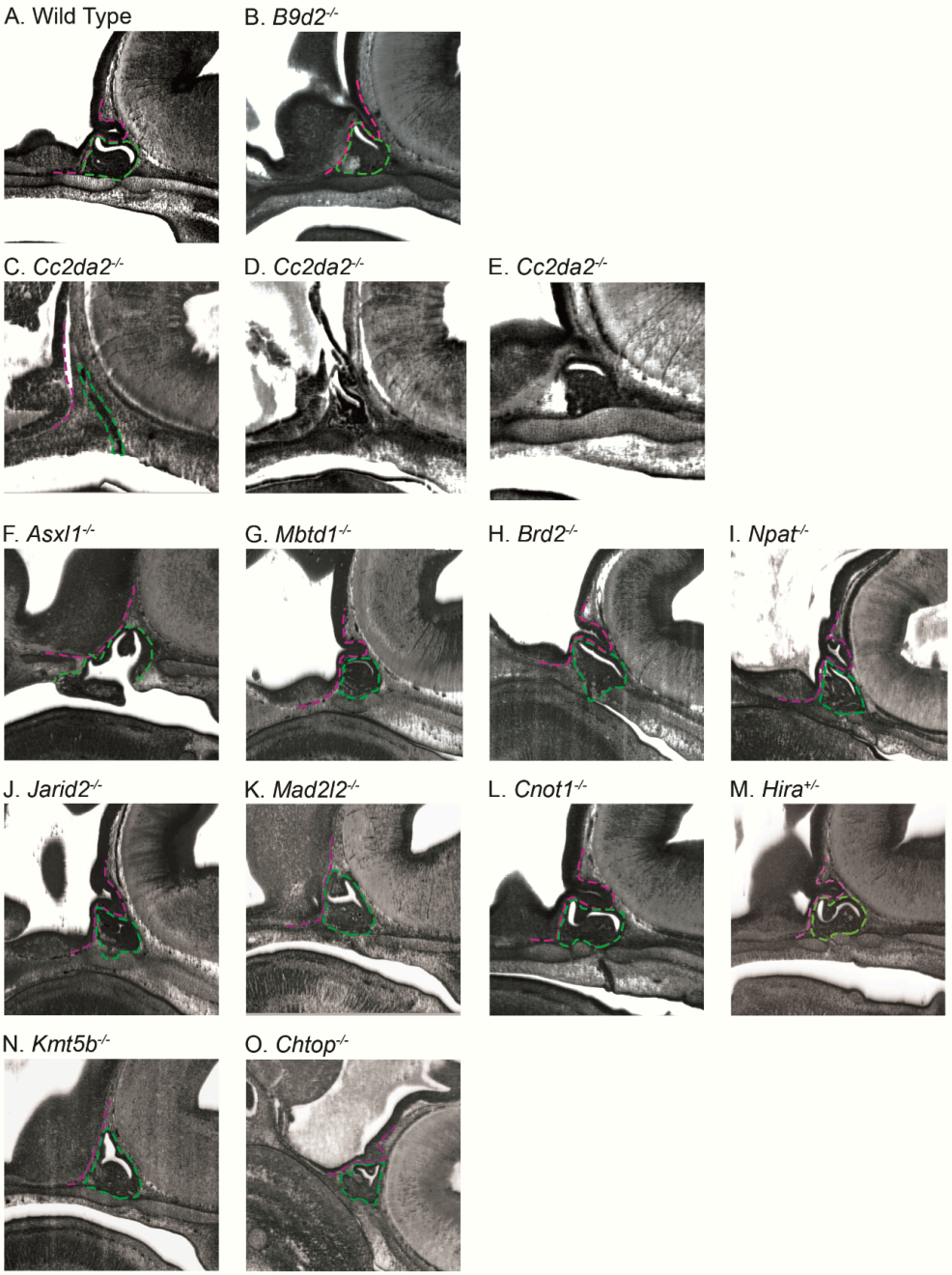

Figura suplementaria 2.1. Malformaciones hipofisarias observadas en los genes candidatos a causar HC. Se muestran imágenes de HREM sagitales, capturadas del *stackviewer* de DMDD a E14.5. Se muestran las hipófisis de un embrión *wild-type* **(A)** y de embriones nulos para **(B)** *B9d2*, **(C)** *Cc2d2a*, **(D)** *Cc2d2a*, **(E)** *Cc2d2a* (se muestra la variabilidad intrínseca del *knock-out*), **(F)** *Asxl1*, **(G)** *Mbtd1*, **(H)** *Brd2*, **(I)** *Npat*, **(J)** *Jarid2*, **(K)** *Mad2l2*, **(L)** *Cnot1,* **(M)** *Hira,* **(N)** *Kmt5b* y **(O)** *Chtop*. En todos los casos la hipófisis anterior y el lóbulo intermedio se delinean con una línea verde punteada y el diencéfalo ventral cercano a la hipófisis con una línea magenta punteada. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024b.

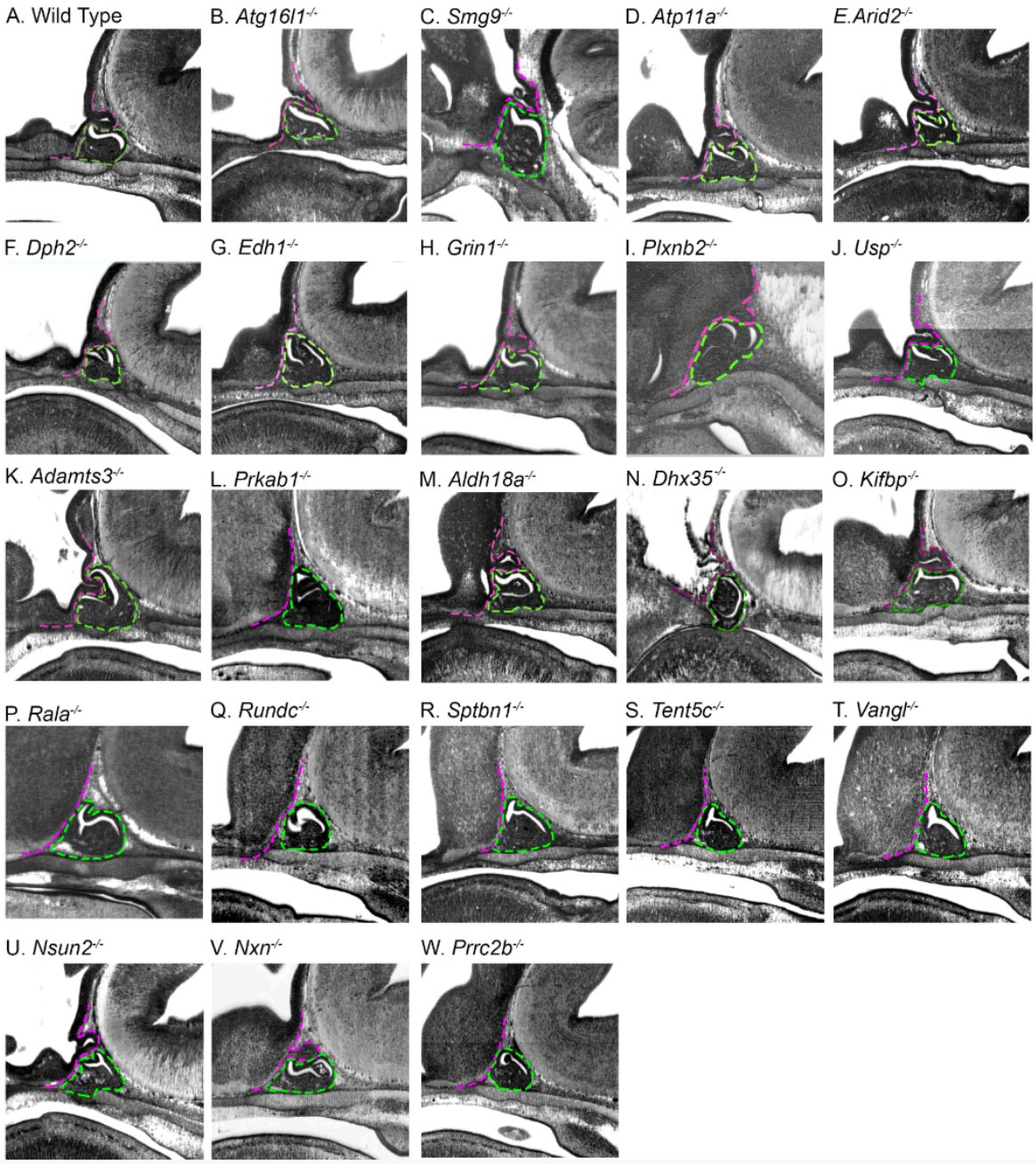

Figura suplementaria 2.2. Malformaciones hipofisarias observadas en los genes candidatos a causar HC. Se muestran imágenes de HREM sagitales, capturadas del *stackviewer* de DMDD a E14.5. Se muestran las hipófisis de un embrión *wild-type* **(A)** y de embriones nulos para **(B)** *Atg16l1*, **(C)** *Smg9*, **(D)** *Atp11a*, **(E)** *Arid2*, **(F)** *Dph2*, **(G)** *Edh1*, **(H)** *Grin1*, **(I)** *Plxnb2*, **(J)** *Usp*, **(K)** *Adamts3*, **(L)** *Prkab,* **(M)** *Aldh18a,* **(N)** *Dhx35,* **(O)** *Kifbp,* **(P)** *Rala,* **(Q)** *Rundc,* **(R)** *Sptbn1,* **(S)** *Tent5c,* **(T)** *Vangl,* **(U)** *Nsun2,* **(V)** *Nxn* y **(W)** *Prrc2b*. En todos los casos la hipófisis anterior y el lóbulo intermedio se delinean con una línea verde punteada y el diencéfalo ventral cercano a la hipófisis con una línea magenta punteada. Extraído de Martínez Mayer et al., 2024b.

Anexo - Capítulo 3

Video suplementario 3.1. *Time-lapse* de microscopía confocal cada 30 mins durante 18 horas, desde 30 hpf. Se observa el movimiento de invaginación de la placoda hipofisaria (rojo), superpuesta con la imagen de campo claro. Se observa también el movimiento anterior de células de la cresta neural, que conserva la marca reportera.

Video suplementario 3.2. *Time-lapse* de microscopía confocal cada 30 mins durante 18 horas, desde 30 hpf. Se observa el movimiento de invaginación de la placoda hipofisaria (rojo) sin campo claro. Se observa también el movimiento anterior de células de la cresta neural, que conserva la marca reportera.

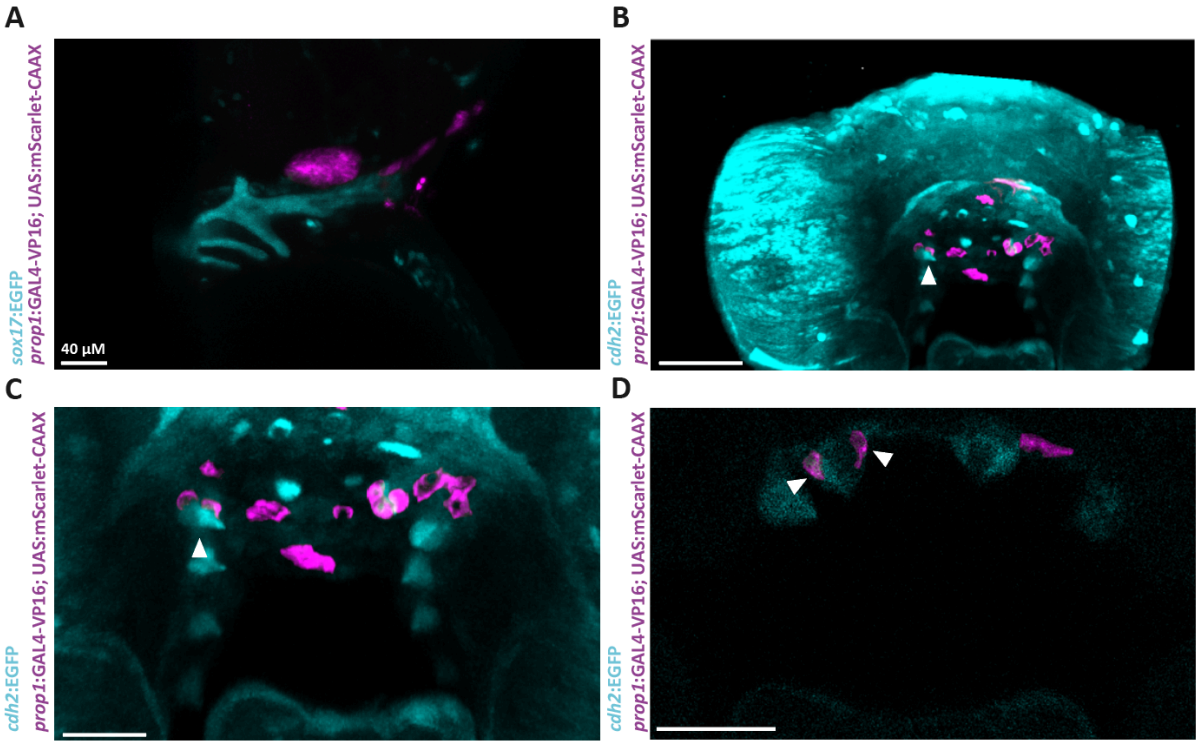

Figura suplementaria 3.1. (A) Ubicación de la hipófisis respecto al endodermo, marcado con sox17:EGFP. Se observan células extra-hipofisarias, anteriores al endodermo faríngeo. **(B)** Fotografía confocal de un embrión de 115 hpf. **(C)** Ampliación de la imagen B. Se observan múltiples dientes y estructuras bucales con señal positiva para mScarlet. **(D)** Se muestra un solo z-stack de la ampliación anterior. Se observa como un diente (punta de flecha blanca) está conformado por una combinación de células, tanto positivas como negativas para el reportero. En este caso dos células positivas forman parte de la base del diente, mientras que el resto del diente es negativo.

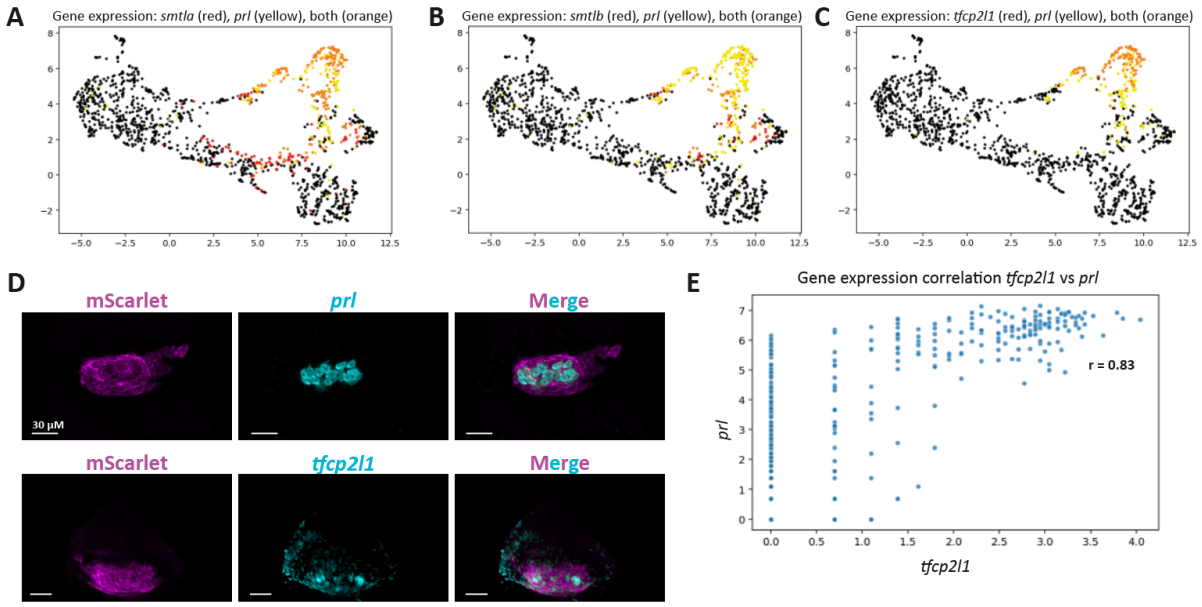

Figura suplementaria 3.2. (A) Análisis de co-expresión para *smtla* y *prl*. Se muestran las células que expresan *smtla* en rojo, las células que expresan *prl* en amarillo y las que expresan ambas en naranja. **(B)** Análisis de co-expresión para *smtlb* (rojo) y *prl* (amarillo). La combinación se muestra en naranja. **(C)** Análisis de co-expresión para *tfcp2l1* (rojo) y *prl* (amarillo). La combinación se muestra en naranja. **(D)** Análisis de expresión de *prl* y *tfcp2l1* pr FISH, a las 28 hpf. Se muestra también la expresión del reportero de *prop1* por IHQ contra mScarlet. Se observa que la expresión de *tfcp2l1* y *prl* se dan en la misma región de la hipófisis en desarrollo. **(E)** Correlación de las expresiones de *tfcp2l1* y *prl*. Se muestra también el coeficiente de correlación de Pearson. Se observa que toda célula que expresa altos niveles de *tfcp2l1* expresa también altos niveles de *prl*.

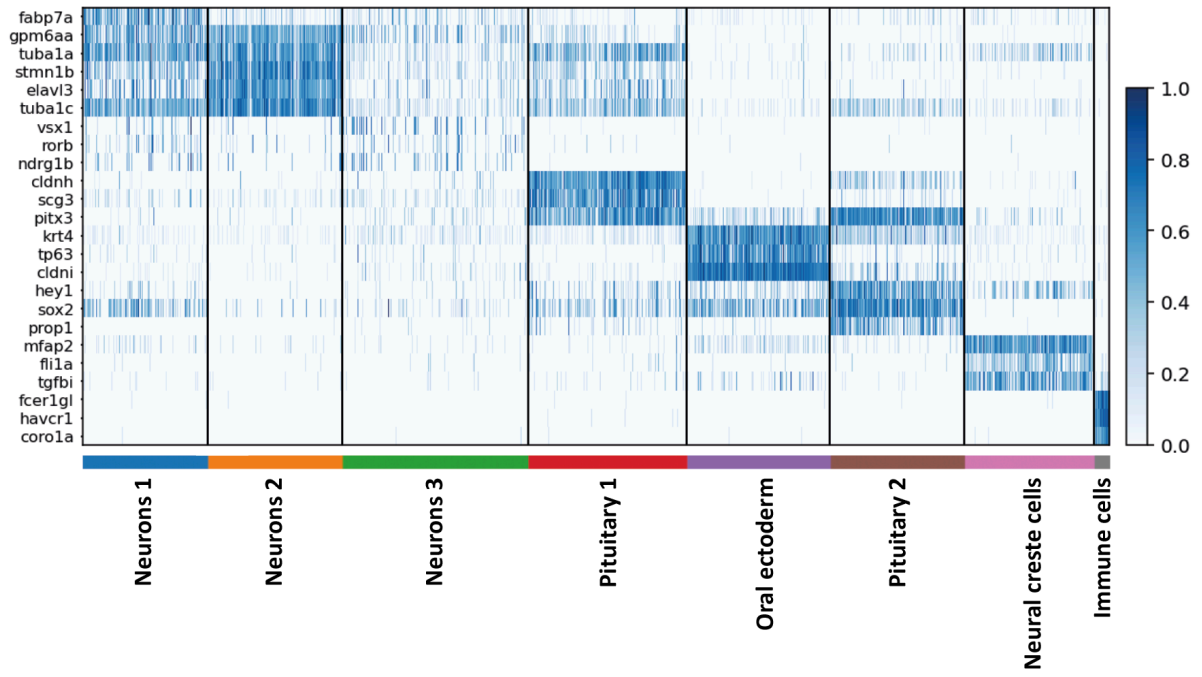

Figura suplementaria 3.3. *Heatmap* de marcadores seleccionados para la determinación manual de la identidad celular de los *clusters* identificados en la figura 3.4c.