

**DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA  
FACULTAD DE MEDICINA**



**Universidad Autónoma  
de Madrid**

**CARACTERIZACIÓN CLÍNICA Y MOLECULAR MEDIANTE  
SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA DE PACIENTES CON  
DEFICIENCIA COMBINADA DE HORMONAS HIPOFISARIAS,  
DISPLASIA SEPTO-ÓPTICA Y DEFICIENCIA AISLADA DE  
HORMONA DE CRECIMIENTO CON ANOMALÍAS ANATÓMICAS  
HIPOTALÁMICO-HIPOFISARIAS**

Memoria para optar al título de Doctor

Presentada por Francisco Javier Rodríguez Contreras

Licenciado en Medicina y Cirugía

Especialista en Pediatría y sus Áreas Específicas

Directores de Tesis:

Dr. Ángel Campos Barros

Dra. Isabel González Casado

Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) y Servicio de  
Endocrinología Pediátrica. Hospital Universitario La Paz

Madrid, 2019

Don Ángel Campos Barros, Doctor en Ciencias Biológicas y Responsable de la Sección de Endocrinología Molecular del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz, y Doña Isabel González Casado, Doctora en Medicina y Cirugía y Jefe de Servicio de Endocrinología Pediátrica del Hospital Universitario La Paz

### **CERTIFICAN:**

Que Don Francisco Javier Rodríguez Contreras ha realizado bajo su dirección el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por Título “Caracterización Clínica y Molecular mediante Secuenciación Masiva Dirigida de pacientes con Deficiencia Combinada de Hormonas Hipofisarias, Displasia Septo-Óptica y Deficiencia Aislada de Hormona de Crecimiento con anomalías anatómicas hipotalámico-hipofisarias”

Revisado el presente trabajo, expreso mi conformidad para la presentación del mismo, por considerar que reúne los requisitos necesarios para ser sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, para optar al grado de Doctor.

En Madrid, a 25 de marzo de 2019.

Dr. Ángel Campos Barros

Responsable de la Sección de  
Endocrinología Molecular,  
Instituto de Genética Médica y Molecular,  
IdiPAZ, Hospital Universitario La Paz,  
Madrid

Dra. Isabel González Casado

Jefe de Servicio de  
Endocrinología Pediátrica  
Hospital Universitario La Paz, Madrid

VºBº Dr. Federico Gutiérrez Larraya

Tutor académico  
Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Madrid

## AGRADECIMIENTOS

A Ángel Campos, mi director. Por haberme guiado, por su paciencia, por sus ánimos, por la enorme cantidad de su tiempo dedicado a mí, por tanta ayuda, por su actitud inclusiva e integradora, por haberme hecho sentir parte del equipo desde el primer instante.

A Isabel González Casado, mi directora. Por su confianza en mi persona, por su cariño, por haberme enseñado tanto, por haberme escuchado tanto, por haberme comprendido.

A Federico Gutiérrez Larraya, mi tutor, por facilitarme siempre todo lo que he necesitado.

Al personal de la Sección de Endocrinología Molecular del INGEMM. A Sara y Miriam por su disposición para ayudar. A Carolina por su hospitalidad y su humor. A Isabel, Valle, María, Nerea y Coral, a quienes tanto trabajo he dado con estudios y más estudios de confirmación. Al personal del laboratorio de Secuenciación Masiva y de la Sección de Bioinformática del INGEMM, Elena Vallespín, Ángela del Pozo y Mario Solís, por su labor imprescindible. Y a Karen Heath, por su tiempo dedicado a enseñarme, por su criterio y rigor científico, y por su respeto hacia cualquiera que no sabe nada, pero que quiere aprender.

A mis por siempre compañeros del Servicio de Endocrinología Pediátrica del Hospital Universitario La Paz. A Julio Guerrero, a Luis Salamanca, a Nerea Itza, a Ana Coral Barreda y a Cristina Mora, quienes siempre tuvieron claro (mucho más que yo mismo) que sería capaz de terminar este proyecto. A Merche y María José, por todas sus facilidades para la revisión de historias clínicas.

Al profesor del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública de la UAM Juanjo de la Cruz Troca por su infinita disposición y ayuda desinteresada en todo lo referente a los estudios estadísticos. A las Dras. Cristina Álvarez Escolá y Beatriz Lecumberri Santamaría, del Servicio de Endocrinología y Nutrición del Hospital Universitario La Paz, por su colaboración y sus ánimos.

A todos los clínicos de otros hospitales que han colaborado con el estudio, especialmente a aquellos que más “me han sufrido”, como Mercedes Marbán Calzón, Marta Ramón Krauel, Jaime Sánchez del Pozo, Purificación Ros Pérez, Nerea Lacámara Ormaechea, Pablo Prieto Matos, Mercedes Palma Moya, Iván Quiroga López, Alfonso Calañas Continente, Vanesa López González, Lucía Garzón Lorenzo y un larguísimo etcétera que resultaría imposible incluir aquí por completo de manera explícita. Mi agradecimiento más sincero.

A los pacientes y familiares participantes en el estudio, especialmente a aquellos con los que hemos tenido un trato directo, por su disposición y su inestimable colaboración. Sin ellos todo este esfuerzo estaría vacío de sentido.

A mis compañeros del Centro de Salud Galapagar, Miguel Ángel, Sandra, Ana, Juncal y Gloria, por su apoyo y por todo lo que les ha repercutido mi dedicación a este proyecto.

A mis padres, quienes, con su ejemplo, inculcaron en mí la importancia del esfuerzo y el trabajo bien hecho, sin mayor premio que la propia satisfacción personal.

A Julia y Henar, por su capacidad de hacerme sonreír al final de cada uno de los muchos y largos días de investigación matutina y asistencia vespertina.

Y muy especialmente a Fuen, mi compañera de pasos, quien tantas veces me ha levantado, quien tanto se ha esforzado en permitirme avanzar, a quien debo tanto, y sin quien todo esto nunca podría haber llegado a buen puerto.

**MUCHAS GRACIAS**

## RESUMEN

Las patologías del espectro del hipopituitarismo congénito (HIC), tales como la deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (DCHH), la displasia septo-óptica (DSO) y la deficiencia aislada de GH con anomalías anatómicas hipotalámico-hipofisarias (DAGH-HP), se caracterizan por una muy baja tasa de diagnóstico genético. Muchas de las alteraciones genéticas relacionadas con ellas muestran penetrancia alélica incompleta y expresividad variable, lo que implica la contribución de otros factores participando en la modulación del fenotipo. En el presente trabajo se analiza la utilidad de la secuenciación masiva dirigida para el estudio diagnóstico de una cohorte de 114 pacientes (72 DCHH, 33 DSO y 9 DAGH-HP) mediante el panel HIPOPIT de diseño propio que incluye todos los genes conocidos implicados en la etiología del HIC, así como genes candidatos que participan en las distintas vías de señalización que regulan el desarrollo embrionario hipotalámico-hipofisario

Hemos identificado variantes patogénicas en el 15,8% y variantes relevantes en el 75,4% de los pacientes incluidos en el estudio, porcentajes muy superiores a los que se obtienen mediante el estudio tradicional por secuenciación Sanger del pequeño grupo de genes clásicamente implicados. Nuestros resultados confirman que existe un solapamiento genético de las tres patologías de estudio entre sí y con otras patologías del espectro del HIC como la holoprosencefalia y el hipogonadismo hipogonadotropo congénito. El 43,9% de los pacientes presenta variantes relevantes en dos o más genes diferentes. Algunas combinaciones de variantes afectando a determinados genes y/o vías de señalización se repiten entre distintos pacientes y se asocian a rasgos fenotípicos comunes. La herencia oligogénica contribuye a explicar la penetrancia incompleta y la expresividad variable, dentro de un modelo de etiología multifactorial en el que también participan factores ambientales, como los insultos obstétricos durante la gestación o el parto.

El presente estudio ha permitido detectar el primer caso de DCHH con una mutación con pérdida de función en el gen *BMP4*, así como describir una de las mayores series de casos de HIC con variantes relevantes en el gen *GLI2*, entre las que se encuentran 3 nuevas variantes con pérdida de función.

## ABSTRACT

Congenital hypopituitarism (CH) spectrum disorders, such as combined pituitary hormone deficiency (CPHD), septo-optic dysplasia (SOD) and isolated GH deficiency with hypothalamic-pituitary anomalies (IGHD-HP), have a very low genetic diagnosis rate. Many of the genetic anomalies related with these disorders show incomplete allelic penetrance and variable expressivity, which indicates the contribution of other factors modulating their phenotypic expression. The present study examines the idoneity of targeted Next Generation Sequencing for the genetic diagnosis of a cohort of 114 patients (72 CPHD, 33 SOD and 9 IGHD-HP) using the custom-designed HIPOPIT panel. This includes all known genes implicated in the etiology of CH as well as candidate genes implicated in the different signaling pathways regulating hypothalamus-pituitary embryonic development.

We identified pathogenic variants in 15.8%, and relevant variants in 75.4%, of the patients included in the experimental cohort. This represents a much higher diagnostic rate than that achieved by screening the small group of classic genes by traditional Sanger sequencing. Our results confirm the previously postulated genetic overlap between the three disorders examined, and other disorders of the CH spectrum such as holoprosencephaly and congenital hypogonadotropic hypogonadism. 43.9% of patients showed relevant variants in two or more different genes. Some combinations of relevant variants affecting certain genes and/or signaling pathways are shared between different patients and are associated with certain common phenotypic features. Oligogenic inheritance contributes to explain incomplete penetrance and variable expressivity, according to a multifactorial etiology model including environmental factors (such as obstetric insults during pregnancy or delivery).

The present study describes the first patient with CPHD presenting with a loss-of-function *BMP4* mutation, as well as one of the most extensive cohorts of CH patients with relevant variants in *GLI2*, including three novel loss-of-function variants.

## ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa o corticotropina
<b>AD</b>	Autosómico dominante
<b>ADH</b>	Hormona antidiurética o vasopresina
<b>AR</b>	Autosómico recesiva
<b>CNV</b>	Variación en el número de copias
<b>DAGH</b>	Deficiencia aislada de hormona de crecimiento
<b>DAGH-HP</b>	Deficiencia aislada de hormona de crecimiento con anomalías anatómicas hipotalámico-hipofisarias
<b>DCHH</b>	Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias
<b>DH</b>	Disfunción hipofisaria
<b>DSO</b>	Displasia septo-óptica
<b>FSH</b>	Hormona foliculoestimulante
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento o somatotropina
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de hormona de crecimiento
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>HHC</b>	Hipogonadismo hipogonadotropo congénito
<b>HIC</b>	Hipopituitarismo congénito
<b>HPE</b>	Holoprosencefalia
<b>LH</b>	Hormona luteinizante
<b>NGS</b>	Secuenciación masiva (" <i>Next Generation Sequencing</i> ")
<b>NMD</b>	Degradación del ARN mensajero mediada por mutación terminadora (" <i>Nonsense Mediated mRNA Decay</i> ")
<b>rhGH</b>	Hormona de crecimiento recombinante humana
<b>RMN</b>	Resonancia magnética
<b>RPBF</b>	Riesgo de pérdida de bienestar fetal
<b>TSH</b>	Hormona estimulante del tiroides o tirotropina
<b>VUS</b>	Variante/s de significado incierto (" <i>Variant of uncertain significance</i> ") según criterios recomendados por el American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)
<b>VUS+</b>	Variante/s de significado incierto cuyas características sugieren elevada probabilidad de patogenicidad (ver apartado 2.5. de <i>Materiales y métodos</i> )

<b>WES</b>	Secuenciación de exoma completo (“ <i>Whole exome sequencing</i> ”)
<b>WGS</b>	Secuenciación de genoma completo (“ <i>Whole genome sequencing</i> ”)

## GLOSARIO

**Branch point:** Región del ADN habitualmente intrónica necesaria, junto con el aceptor y el donador, para el correcto proceso de *splicing*.

**DSO-plus:** Displasia septo-óptica con anomalías de la migración neuronal (esquisecefalia, polimicrogiria).

**DSO “aislada”:** Displasia septo-óptica sin anomalías de la migración neuronal.

**DSO con DH:** Displasia septo-óptica con disfunción hipofisaria.

**DSO sin DH:** Displasia septo-óptica sin disfunción hipofisaria.

**HIC sindrómico:** Hipopituitarismo congénito con anomalías extrahipofisarias.

**HIC no sindrómico:** Hipopituitarismo congénito sin anomalías extrahipofisarias.

**Splicing:** Procesamiento de corte y empalme del ARN transcrito para eliminar las regiones intrónicas y dar lugar al ARN mensajero.

**Variante *delins*:** Variante que implica la delección de 2 o más nucleótidos y la inserción de otros en su lugar.

**Variante *frameshift*:** Variante que genera un cambio en la pauta de lectura del ADN.

**Variante *missense*:** Variante con cambio de sentido o no sinónima (habitualmente referido a variantes que implican un cambio de aminoácido).

**Variante *nonsense*:** Variante sin sentido (referido a variantes con introducción de un codón de parada prematuro o variantes que eliminan el codón de arranque). La variante con introducción de codón de parada prematuro también se conoce como *stop gain*.

**Variante sinónima:** Variante que no implica un cambio de aminoácido.

**Variante *stoploss*:** Variante que altera el codón de parada, y que implica una extensión de la cadena proteica traducida.



# ÍNDICE

	<u>Página</u>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	V
<b>RESUMEN</b> .....	VII
<b>ABREVIATURAS</b> .....	IX
<b>GLOSARIO</b> .....	X
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. FISIOLÓGÍA DE LA GLÁNDULA HIPOFISARIA</b> .....	3
<b>2. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA HIPÓFISIS</b> .....	5
<b>3. HIPOPITUITARISMO CONGÉNITO (HIC)</b> .....	8
<b>4. DEFICIENCIA COMBINADA DE HORMONAS HIPOFISARIAS (DCHH)</b> .....	10
<b>5. SOLAPAMIENTO ETIOLÓGICO DE LA DCHH CON OTRAS PATOLOGÍAS</b> ....	13
<b>5.1. Deficiencia aislada de GH (DAGH)</b> .....	13
<b>5.2. Displasia septo-óptica (DSO)</b> .....	14
<b>5.3. Hipogonadismo hipogonadotrofo congénito (HHC)</b> .....	17
<b>5.4. Holoprosencefalia (HPE)</b> .....	17
<b>6. MODELO DE HERENCIA DEL HIC</b> .....	18
<b>7. INFLUENCIA DE FACTORES AMBIENTALES</b> .....	20
<b>8. LIMITACIONES Y VENTAJAS DE LAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN EN EL ESTUDIO DEL HIC</b> .....	20
<b>9. CONCLUSIÓN</b> .....	24
<b>HIPÓTESIS</b> .....	27
<b>OBJETIVOS</b> .....	28
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	29
<b>1. SUJETOS DE ESTUDIO</b> .....	31
<b>1.1. Selección de los pacientes</b> .....	31
<b>1.2. Clasificación de los pacientes</b> .....	31
<b>1.3. Consentimiento informado</b> .....	33
<b>1.4. Recogida de datos fenotípicos</b> .....	33
<b>2. SECUENCIACIÓN MASIVA DIRIGIDA</b> .....	34
<b>2.1. Extracción de ADN</b> .....	34
<b>2.2. Ensayo de secuenciación masiva dirigida: Panel HIPOPIT_V1</b> .....	34
<b>2.3. Ensayo de secuenciación masiva dirigida: Panel HIPOPIT_V3</b> .....	34
<b>2.4. Diseño y características técnicas de los paneles de ensayo dirigido NGS</b> .....	35

2.5. Análisis bioinformático de los datos generados mediante la secuenciación de los paneles HIPOPIT_V1 e HIPOPIT_V3.....	38
2.6. Análisis de variaciones del número de copias (CNVs) .....	40
2.7. Estudios de validación de las variantes.....	41
2.8. Validación del ensayo.....	41
2.9. Estudios de segregación alélica familiar.....	42
<b>3. VARIABLES DE ESTUDIO.....</b>	<b>42</b>
<b>4. MÉTODO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>44</b>
<b>5. APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>45</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	
<b>A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR MEDIANTE EL PANEL HIPOPIT_V1 DE LA COHORTE COMPLETA.....</b>	<b>49</b>
<b>A.1. Descripción clínica de la cohorte.....</b>	<b>49</b>
A.1.1. Características generales.....	49
A.1.2. Deficiencias hormonales hipofisarias.....	53
A.1.3. Alteraciones hipofisarias en la imagen de RMN.....	55
A.1.4. Antecedentes obstétricos.....	58
<b>A.2. Resultados del estudio genético mediante panel de NGS.....</b>	<b>61</b>
A.2.1. Resultados del estudio genético en la cohorte completa.....	61
A.2.2. Correlaciones genotipo-fenotipo en los tres grupos principales.....	65
A.2.2.1. Pacientes con DCHH.....	65
A.2.2.2. Pacientes con DSO.....	66
A.2.2.3. Pacientes con DAGH-HP.....	67
A.2.3. Correlaciones genotipo-fenotipo por subgrupos.....	68
A.2.3.1. Pacientes con DSO “aislada” <i>versus</i> DSO-plus.....	68
A.2.3.2. Pacientes con DSO y disfunción hipofisaria <i>versus</i> DSO sin disfunción hipofisaria.....	69
A.2.3.3. Pacientes con HIC sindrómico <i>versus</i> HIC no sindrómico.....	70
A.2.4. Correlación genotipo-fenotipo hipofisario en RMN.....	71
A.2.4.1. Anomalías de neurohipófisis y tallo hipofisario.....	71
A.2.4.2. Anomalías del volumen adenohipofisario.....	73
A.2.5. Correlación genotipo-deficiencias hormonales hipofisarias.....	74
A.2.6. Correlación genotipo-antecedentes obstétricos.....	74
A.2.7. Combinaciones de vías de señalización potencialmente alteradas por las variantes encontradas, según patrones repetidos en distintos pacientes.....	75
A.2.7.1. Combinación de variantes relevantes en las vías de la prokineticina y FGF.....	76
A.2.7.2. Combinaciones variables de alteraciones en las vías SHH, FGF y NODAL.....	80
A.2.7.2.1. Combinación de variantes relevantes en las vías FGF y SHH.....	80
A.2.7.2.2. Combinación de variantes relevantes en las vías FGF y NODAL.....	82
A.2.7.2.3. Combinación de variantes relevantes en las vías SHH y NODAL.....	84

<b>B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL PRIMER PACIENTE DESCRITO CON DCHH CON UNA MUTACIÓN CON PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN <i>BMP4</i></b> .....	85
<b>B.1. Datos fenotípicos</b> .....	85
<b>B.2. Resultados del estudio molecular</b> .....	87
<b>C. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL GRUPO DE PACIENTES CON VARIANTES RELEVANTES EN <i>GLI2</i></b> .....	90
<b>DISCUSIÓN</b> .....	117
<b>A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR MEDIANTE EL PANEL HIPOPIT_V1 DE LA COHORTE COMPLETA</b> .....	119
<b>A.1. Diferencias clínicas entre los grupos y subgrupos diagnósticos incluidos en el estudio</b> .....	119
<b>A.2. Utilidad de la secuenciación masiva dirigida (panel HIPOPIT_V1) en el diagnóstico de pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP</b> .....	123
<b>A.3. Posibilidad de una etiología oligogénica en las patologías incluidas en el estudio, y correlaciones genotipo-fenotipo de algunas combinaciones de variantes</b> .....	126
<b>A.3.1. Oligogenicidad en la cohorte estudiada</b> .....	126
<b>A.3.2. Combinación de variantes relevantes en las vías de la prokinetina y FGF</b> .....	128
<b>A.3.3. Combinaciones variables de alteraciones en las vías SHH, FGF y NODAL</b> .....	136
<b>A.4. Consideraciones acerca de algunos de los genes y vías de señalización con mayor frecuencia de variantes relevantes</b> .....	143
<b>A.5. Correlación genotipo-fenotipo según el grupo diagnóstico. Solapamiento genético de las patologías incluidas en el estudio, entre sí, y con patologías como el HHC y la HPE</b> .....	147
<b>A.5.1. Mayor frecuencia de variantes relevantes en <i>PTCH1</i> en pacientes con DSO</b> .....	147
<b>A.5.2. Solapamiento genético de las tres patologías incluidas en el estudio</b> .....	148
<b>A.5.3. Solapamiento genético con el HHC y la HPE</b> .....	149
<b>A.6. Correlaciones genotipo-fenotipo entre subgrupos diagnósticos. Discusión multifactorial conjunta de eventos obstétricos (ambientales)</b> ... 150	
<b>A.6.1. DSO “aislada” versus DSO-plus</b> .....	150
<b>A.6.2. DSO con disfunción hipofisaria versus DSO sin disfunción hipofisaria</b> .....	151
<b>A.6.3. HIC sindrómico versus HIC no sindrómico</b> .....	152
<b>A.6.4. Correlación genotipo-fenotipo hipofisario en RMN</b> .....	153
<b>A.6.4.1. Alteraciones del volumen adenohipofisario</b> .....	153
<b>A.6.4.2. Alteraciones de la neurohipófisis y el tallo hipofisario</b> .....	153

<b>A.7. Posibilidad de contribución de factores no exclusivamente genéticos....</b>	156
<b>A.7.1. Factores ambientales: Correlaciones fenotipo-antecedentes     obstétricos y genotipo-antecedentes obstétricos.....</b>	156
<b>A.7.2. Otros factores potencialmente implicados: CNVs y epigenética.....</b>	159
<b>B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL PRIMER PACIENTE DESCRITO CON DCHH CON UNA MUTACIÓN CON PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN <i>BMP4</i>.....</b>	160
<b>B.1. <i>BMP4</i>: Características principales y gen candidato para el HIC.....</b>	160
<b>B.2. <i>BMP4</i>: Variabilidad fenotípica.....</b>	161
B.2.1. Fenotipo hipofisario .....	161
B.2.2. Fenotipo ocular asociado a alteraciones de <i>BMP4</i> .....	163
B.2.3. Fenotipo craneal asociado a alteraciones de <i>BMP4</i> .....	164
B.2.4. Fenotipo cerebral asociado a alteraciones de <i>BMP4</i> .....	165
B.2.5. Fenotipo genitourinario asociado a alteraciones de <i>BMP4</i> .....	166
B.2.6. Otras anomalías asociado a alteraciones de <i>BMP4</i> .....	166
<b>B.3. Expresividad variable de las alteraciones en <i>BMP4</i>.....</b>	167
B.3.1. Posibles causas de la expresividad variable: Oligogenicidad.....	167
B.3.2. Posibles causas de la expresividad variable: Consideraciones moleculares del propéptido de <i>BMP4</i> .....	171
<b>B.4. Consideraciones finales.....</b>	174
<b>C. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL GRUPO DE PACIENTES CON VARIANTES RELEVANTES EN <i>GLI2</i>.....</b>	175
<b>C.1. <i>GLI2</i>: Consideraciones generales y hallazgos en nuestra cohorte.....</b>	175
<b>C.2. Alteraciones en <i>GLI2</i>: Fenotipo asociado.....</b>	179
C.2.1. Fenotipo hipofisario asociado a alteraciones de <i>GLI2</i> .....	179
C.2.1.1. Hallazgos anatómicos en la RMN hipofisaria de pacientes con alteraciones de <i>GLI2</i> .....	180
C.2.1.2. Deficiencias hormonales hipofisarias asociadas a alteraciones de <i>GLI2</i> .....	183
C.2.1.3. Respuesta al tratamiento con rhGH en pacientes con alteraciones de <i>GLI2</i> .....	184
C.2.1.4. HHC en pacientes con alteraciones en <i>GLI2</i> .....	185
C.2.2. Polidactilia asociada a alteraciones en <i>GLI2</i> .....	186
C.2.3. Patología nefrourológica asociada a alteraciones en <i>GLI2</i> .....	188
C.2.4. Holoprosencefalia (HPE) asociada a alteraciones en <i>GLI2</i> .....	191
C.2.5. Displasia septo-óptica (DSO) asociada a alteraciones en <i>GLI2</i> .....	193
C.2.6. Rasgos faciales asociados a alteraciones en <i>GLI2</i> .....	194
C.2.7. Otros fenotipos asociados a alteraciones en <i>GLI2</i> .....	195
<b>C.3. <i>GLI2</i>: Penetrancia incompleta de las alteraciones en <i>GLI2</i>.....</b>	197
<b>C.4. <i>GLI2</i>: Expresividad variable de las alteraciones en <i>GLI2</i>.....</b>	200
C.4.1. Expresividad variable entre pacientes con distintas variantes patogénicas similares.....	200
C.4.2. Expresividad variable intrafamiliar de una misma variante en <i>GLI2</i> .....	202

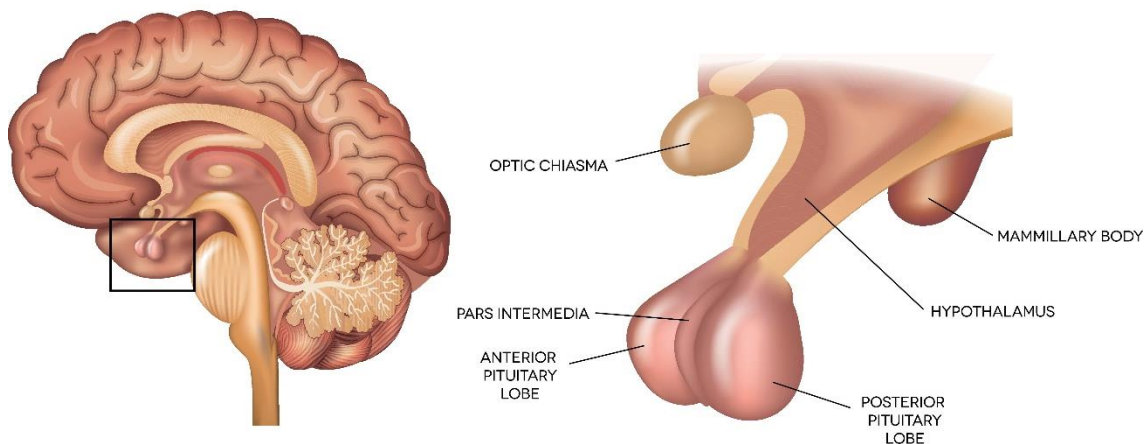
<b>C.5. Etiología multifactorial</b> .....	205
<b>C.5.1.</b> Participación de factores ambientales en la expresividad variable de las alteraciones en <i>GLI2</i> .....	205
<b>C.5.2.</b> Participación multifactorial genética: Oligogenicidad.....	206
<b>C.5.2.1.</b> Agrupación de hitos genéticos procedentes de distintos progenitores.....	207
<b>C.5.2.2.</b> Agrupación de hitos genéticos en una misma vía de señalización.....	209
<b>C.5.2.3.</b> Agrupación de hitos genéticos en la vía de señalización SHH.....	211
<b>C.5.2.4.</b> Agrupación de hitos genéticos aislados en distintas vías de señalización.....	213
<b>C.5.2.5.</b> Agrupación de múltiples hitos genéticos dentro de una misma vía y en distintas vías de señalización.....	215
 <b>CONCLUSIONES</b> .....	 221
 <b>REFERENCIAS</b> .....	 227
 <b>ANEXOS:</b>	
<b>Anexo 1:</b> Cuestionario de recogida de datos clínicos.....	253
<b>Anexo 2:</b> Listado completo de genes incluidos en el panel HIPOPIT_V1 y en el panel HIPOPIT_V3.....	257
<b>Anexo 3:</b> Genes incluidos en el panel HIPOPIT_V1 en los que se ha encontrado alguna variante relevante, agrupados según la/s vía/s de señalización, función o patología con las que se relacionan.....	263
<b>Anexo 4:</b> Tabla de datos fenotípicos de cada uno de los probandos incluidos en el estudio.....	265
<b>Anexo 5:</b> Tabla de variantes relevantes presentes en cada uno de los probandos, detectadas a través del panel HIPOPIT_V1.....	277
<b>Anexo 6:</b> .....	297
- <b>Tabla S6.1:</b> Pacientes publicados con mutaciones con pérdida de función en <i>BMP4</i> : <i>nonsense</i> y <i>frameshift</i> .....	298
- <b>Tabla S6.2.:</b> Pacientes publicados con mutaciones con pérdida de función en <i>BMP4</i> : Grandes deleciones sin incluir <i>OTX2</i> ni <i>SIX6</i> .....	299
- <b>Tabla S6.3.:</b> Pacientes publicados con alteración en <i>BMP4</i> y patología hipofisaria asociada.....	300
<b>Anexo 7:</b> Pacientes publicados en la literatura científica con alteraciones relevantes en <i>GLI2</i> asociadas a la presencia de otras variantes relevantes en otros genes, en un contexto de oligogenicidad.....	301

# **INTRODUCCIÓN**

## 1. Fisiología de la glándula hipofisaria

El sistema endocrino participa en el control de funciones corporales fundamentales, tales como el crecimiento, la reproducción, la lactancia, el metabolismo, la temperatura y la respuesta al estrés. La hipófisis participa en el mismo como centro regulador principal dirigiendo la acción de otras glándulas endocrinas como el tiroides, la corteza suprarrenal o las gónadas, y a su vez recibe del hipotálamo los principales estímulos para su regulación. El hipotálamo es la principal estructura neural encargada del control de la homeostasis corporal. A partir de la integración de señales procedentes del cerebro y del resto del cuerpo, pone en marcha diferentes tipos de respuestas. La respuesta neuroendocrina principal implica la liberación de factores a la circulación portal hipotalámico-hipofisaria, encargados de regular la secreción de hormonas hipofisarias.

La hipófisis, localizada en la línea media de la base del cerebro (**Figura 1**), se sitúa dentro de la silla turca, un receso del hueso esfenoides. Está formada principalmente por dos estructuras anatómica y funcionalmente diferentes: la adenohipófisis (que incluye los lóbulos anterior e intermedio) y la neurohipófisis (o lóbulo posterior).



**Figura 1. Imagen anatómica de la línea media cerebral y de la hipófisis**



En el lóbulo anterior de la hipófisis se localizan los cinco tipos principales de células secretoras: las células somatotropas secretoras de hormona de crecimiento (GH), las lactotropas secretoras de prolactina, las tiotropas secretoras de hormona estimulante del tiroides o tiotropina (TSH), las corticotropas secretoras de corticotropina (ACTH) y las gonadotropas secretoras de gonadotropinas, es decir, de hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Estas hormonas actuarán sobre otros órganos (hígado, tiroides, corteza suprarrenal, gónadas), estimulando la producción de hormonas periféricas (entre otras, IGF-1, hormonas tiroideas, cortisol, estradiol y testosterona) que ejercerán la función última específica de cada eje. Estas hormonas periféricas controlan a su vez, mediante retroalimentación negativa, la función de cada eje hormonal a nivel hipotalámico e hipofisario.

El control de la secreción adenohipofisaria por parte del hipotálamo se lleva a cabo mediante la liberación de péptidos neuroendocrinos estimuladores o inhibidores producidos por neuronas parvocelulares de diferentes núcleos hipotalámicos, que son liberados en la eminencia media, para pasar a la circulación portal hipofisaria. Este sistema circulatorio los transporta rápidamente hasta la adenohipófisis, donde ejercen su función.

La neurohipófisis contiene las terminaciones axonales de las neuronas magnocelulares secretoras de vasopresina (ADH) procedentes de los núcleos hipotalámicos supraóptico y supraquiasmático, y de oxitocina procedentes del núcleo paraventricular. Dichas hormonas son liberadas directamente a la circulación sistémica bajo regulación hipotalámica.

El tallo hipofisario es la estructura que actúa como puente anatómico entre el hipotálamo y la hipófisis, y que establece la conexión vascular y nerviosa entre ambas estructuras. De su integridad depende la adecuada función del sistema hipotalámico-hipofisario.

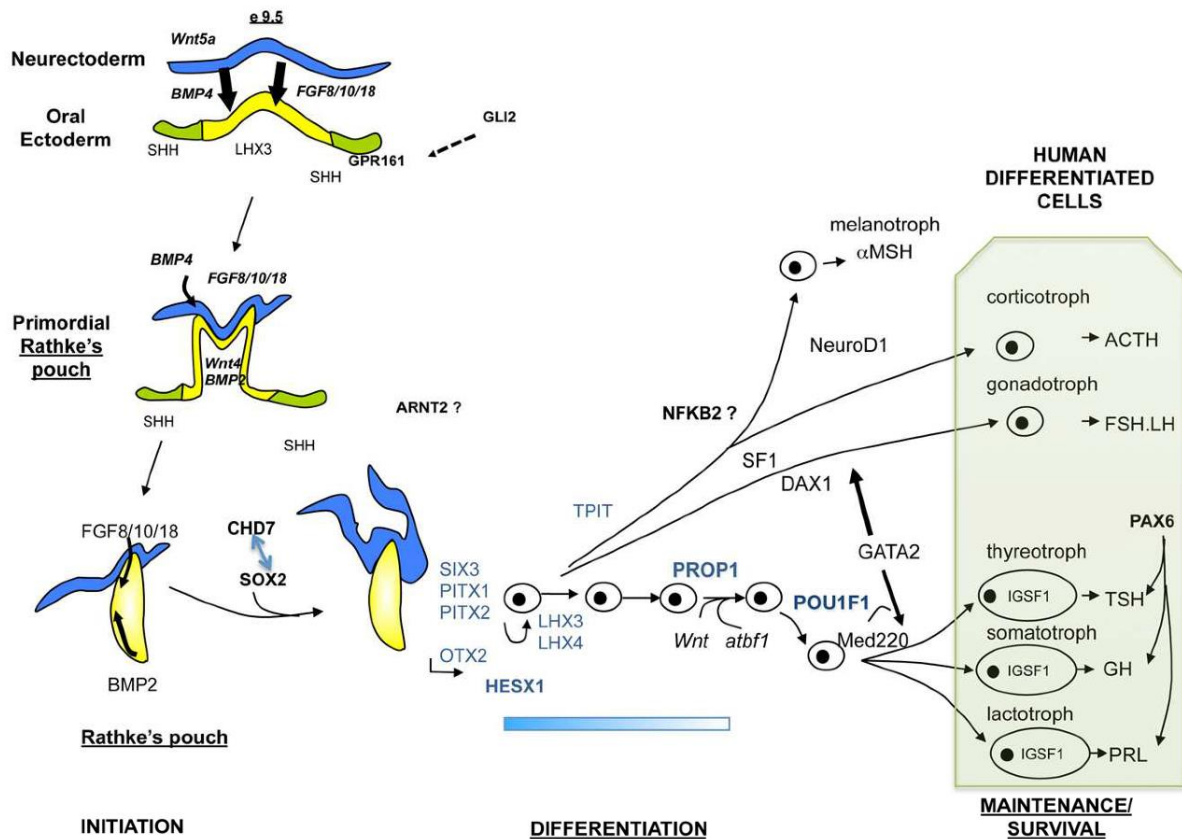
## **2. Desarrollo embrionario de la hipófisis**

El conocimiento acerca del proceso embrionario de desarrollo de la hipófisis deriva del estudio de modelos animales (principalmente ratones, aunque también otros como pez cebra, pollo o anfibios), dado el elevado grado de conservación del proceso entre distintas especies de vertebrados (1).

La hipófisis deriva de dos estructuras ectodérmicas diferentes, el neuroectodermo del que surgirá el infundíbulo y que da lugar al lóbulo posterior (neurohipófisis), y el ectodermo oral que da lugar a la bolsa de Rathke y que formará los lóbulos anterior e intermedio (adenohipófisis y *pars intermedia*) (2).

En el proceso de inducción de la formación de la bolsa de Rathke y su posterior desarrollo inicial participan distintas vías de señalización (BMP, FGF, WNT, SHH, NOTCH), entre las cuales se establece un delicado equilibrio (1). El papel central en el control de este proceso reside inicialmente en el neuroectodermo (diencéfalo ventral). Aquí se encuentra el “centro organizador”, en el que la adecuada expresión espaciotemporal de factores como BMP4, FGF8 y FGF10, controlada a su vez por la regulación recíproca de las vías de señalización mencionadas, provocará la inducción inicial de la bolsa de Rathke en el ectodermo oral subyacente (1–3) (**Figura 2**). BMP4 es el primer factor que se secreta desde dicho “centro regulador” para la inducción de la bolsa de Rathke (4). Del neuroectodermo surge de manera paralela mediante evaginación el infundíbulo, cuyo desarrollo parece regulado especialmente por la vía de señalización FGF (5). El infundíbulo en crecimiento pasa a relacionarse estrechamente con la bolsa de Rathke y a influir en su desarrollo (6). En dicho tejido neuroectodérmico, la diferente expresión espacio-temporal de los factores de transcripción y moléculas señalizadoras del conjunto de vías de señalización mencionadas, principalmente según un patrón dorsal-ventral, inducirá a su vez la adquisición de un tamaño, forma y organización adecuados de la bolsa de Rathke (1). El infundíbulo en desarrollo dará lugar a la eminencia media, al tallo hipofisario y al lóbulo posterior de la hipófisis (5,6). En el desarrollo del infundíbulo será especialmente relevante la adecuada aparición del sistema portal hipofisario (5), en cuyo proceso existen datos que sugieren la participación

de la vía de la prokinetina (cuyo receptor principal a nivel hipotalámico-hipofisario es PROKR2) debido a su conocido papel en la angiogénesis de tejidos endocrinos.



**Figura 2. Esquema representativo del desarrollo embrionario de la hipófisis** [de Castinetti et al. 2016, (3)]. En azul, el neuroectodermo. En verde, el ectodermo oral. En amarillo, la región de ectodermo oral que da lugar a la bolsa de Rathke y de la que derivará la adenohipófisis.

El proceso de organización interna de la bolsa de Rathke, con la diferente proliferación y migración de distintos grupos celulares hasta su situación final en la glándula madura, simultáneo al inicio del proceso de diferenciación celular, resulta especialmente complejo, con múltiples lagunas por aclarar. Parecen igualmente estar implicadas las vías de señalización previamente mencionadas, con participación creciente de la expresión de los genes implicados en las mismas dentro del propio tejido de la bolsa de Rathke, y disminuyendo progresivamente la importancia relativa del estímulo procedente del

neuroectodermo. En este proceso participan factores de transcripción “tempranos”, no específicos de la hipófisis (y cuyas alteraciones se asocian a cuadros sindrómicos con anomalías extrahipofisarias), como LHX3, LHX4, HESX1, OTX2, SOX2, SOX3, PITX1, PITX2, PITX3, SIX1, SIX3, SIX6 o ISL1 (1,3,7).

El proceso de diferenciación celular hacia las distintas estirpes dentro de la hipófisis precisa de la actuación secuencial y escalonada de distintos factores de transcripción. Algunos de los que actúan en las últimas etapas de diferenciación, como PROP1 y POU1F1, son más específicos de la hipófisis y sus alteraciones suelen asociarse a cuadros clínicos no sindrómicos. Especialmente elegante es la demostración de la actuación secuencial de HESX1, factor de transcripción “temprano” cuya disminución con el paso del tiempo permite la actividad de PROP1, que a su vez activa la función de POU1F1 en el camino hacia la diferenciación de las células somatotropas, lactotropas y tiotropas (2). Sin embargo, esta visión de una sencilla cascada con un único factor de transcripción actuando en cada escalón como único condicionante de la diferenciación hacia una estirpe celular concreta (como POU1F1 ya mencionado o TBX19 para la estirpe corticotropa) y con la única participación de factores exclusivamente hipofisarios, es excesivamente simplista. Se ha demostrado que en este proceso de diferenciación celular participan otros elementos, por ejemplo, en la adecuada expresión de PROP1 (como la vía NOTCH, la cual parece presentar una regulación recíproca con PROP1) (8,9), así como en su función (como es el caso de la vía WNT canónica) (10). Y otros factores se han ido relacionando con estos últimos escalones de diferenciación (GATA2, NEUROD1, NR5A1, PITX1, ISL1), con una implicación más compleja, actuación a varios niveles (espaciales y temporales), con posible influencia sobre varias estirpes celulares, y varios de ellos no exclusivamente hipofisarios (1,3,7).

Del proceso de desarrollo embrionario del hipotálamo existe menor grado de conocimiento, debido a su gran complejidad. Algunas de las vías implicadas en el desarrollo de la hipófisis también participan en el desarrollo embrionario del hipotálamo (5,11). Múltiples factores se han ido descubriendo importantes actores en el desarrollo de los distintos núcleos que forman esta estructura

diencefálica en modelos murinos, pero hasta el momento sólo ARNT2 parece haberse relacionado con patología hipofisaria en humanos, dentro de un contexto sindrómico con alteraciones visuales, renales y microcefalia (6,12).

También existe aún un gran desconocimiento acerca de los procesos por los que se regula el desarrollo hipofisario postnatal, así como la supervivencia y mantenimiento a largo plazo de las poblaciones celulares ya diferenciadas. Se conoce la presencia de células madre en el tejido hipofisario maduro, cuya función parece esencial en momentos de aumento de demanda hormonal (pubertad, embarazo) y en los fenómenos de reparación y cicatrización del tejido ante diferentes insultos. En dichos procesos participan vías de señalización como NOTCH, WNT, SHH e Hippo (1,13,14). Actores tan importantes en el desarrollo embrionario como PROP1 y SOX2 parecen tener un papel relevante también en este escenario postnatal y adulto (14,15).

### **3. Hipopituitarismo congénito (HIC)**

El término hipopituitarismo hace referencia a la insuficiente secreción de una o varias hormonas hipofisarias. La insuficiente función de la hipófisis puede deberse a un defecto hipotalámico o a una alteración propiamente hipofisaria. Existen pocos datos sobre la epidemiología del hipopituitarismo, si bien un estudio español realizado en adultos estableció en 1999 una prevalencia de 45,5 casos en 100.000 habitantes, y una incidencia de 4,2 casos en 100.000 habitantes y año (16). Entre las causas adquiridas se encuentran tumores, enfermedades infiltrativas, traumatismos, autoinmunidad o secuelas quirúrgicas. Entre las causas congénitas se encuentran las alteraciones genéticas, si bien también se ha planteado como causa la presencia de determinados eventos obstétricos (principalmente el parto vaginal en presentación podálica). Sin embargo, en una proporción muy elevada de pacientes no se logra encontrar una explicación etiológica.

El hipopituitarismo congénito (HIC) conlleva una importante morbilidad, e incluso una potencial mortalidad, sobre todo en casos neonatales en los que existe deficiencia del eje corticotropo, y en los que no existen antecedentes

familiares de HIC. Sin embargo, el desconocimiento de la causa del HIC en la inmensa mayoría de pacientes dificulta la posibilidad de un adecuado consejo genético y el establecimiento de acciones preventivas en neonatos con mayor probabilidad de padecerlo, que puedan disminuir el riesgo de complicaciones. En el HIC, las deficiencias hormonales pueden estar presentes en el momento del nacimiento, o ir apareciendo progresivamente, incluso en la edad adulta.

El espectro clínico del hipopituitarismo congénito (HIC) incluye diferentes entidades clínicas:

Según la presencia de una o varias deficiencias:

- Deficiencias aisladas:
  - o Deficiencia aislada de GH (DAGH)
  - o Deficiencia aislada de TSH o hipotiroidismo central
  - o Deficiencia aislada de ACTH o insuficiencia suprarrenal central
  - o Hipogonadismo hipogonadotropo congénito (HHC)
  - o Deficiencia aislada de prolactina (muy rara)
  - o Deficiencia de ADH o diabetes insípida central
  - o Deficiencia aislada de oxitocina (muy rara)
  
- Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (**DCHH**): Implica la deficiencia de al menos dos ejes hormonales.

El HIC es considerado no sindrómico cuando la afectación hipofisaria es el único hallazgo patológico. Dentro del HIC sindrómico se incluye una amplia y heterogénea variedad de situaciones patológicas que presentan en común la presencia de disfunción hipofisaria asociada a anomalías extrahipofisarias. Dos entidades clínicas sindrómicas (a su vez heterogéneas en sí mismas) que pueden cursar con HIC son la displasia septo-óptica (**DSO**) y la holoprosencefalia (HPE). El HIC puede ser considerado, por lo tanto, más que una patología en sí mismo, un signo clínico común de una amplia variedad heterogénea de entidades clínicas patológicas diferentes.

#### **4. Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (DCHH)**

La DCHH tiene una prevalencia estimada de 1:8.000 (<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/combined-pituitary-hormone-deficiency>). Las primeras descripciones de pacientes con DCHH en los que se encontró una causa genética (variantes patogénicas en el gen *POU1F1*, antes denominado *PIT1*) fueron publicadas en el año 1992. Entre los años 1998 y 2001, diversas alteraciones en los genes *PROP1*, *LHX3*, *LHX4* y *HESX1*, también fueron relacionadas con este fenotipo hipofisario (si bien *HESX1* se asoció principalmente al fenotipo de DSO, en el que puede existir una DCHH) (17–23).

Las características principales del fenotipo asociado a las mutaciones en este grupo de cinco genes (a los que se denominará genes “clásicos” a lo largo del presente trabajo), son:

**DCHH tipo 1 (MIM# 613038). Herencia autosómico recesiva (AR) o autosómico dominante (AD).** Causada por mutaciones en el gen *POU1F1*. El cuadro clásico consiste en deficiencia de GH, TSH y prolactina debido a mutaciones de herencia AR. Aun así, existen ya descritas varias mutaciones con efecto dominante negativo, una de las cuales, NP\_000297.1:p.(Pro76Leu), es causante de DAGH, con penetrancia completa. La penetrancia incompleta se ha descrito en la mitad de los casos de otra mutación dominante, NP\_000297.1:p.(Arg271Trp).

**DCHH tipo 2 (MIM# 262600). Herencia AR.** Causada por mutaciones en el gen *PROP1*. A día de hoy las mutaciones del gen *PROP1* son las alteraciones más frecuentes en pacientes con DCCH, principalmente entre los casos familiares, no así entre los esporádicos, entre los que la frecuencia disminuye drásticamente. La frecuencia de alteraciones patogénicas en *PROP1* presenta una gran variabilidad interpoblacional, siendo especialmente elevada en Europa oriental y Rusia. El cuadro más habitual consiste en deficiencia de GH, TSH, prolactina, gonadotropinas (que con frecuencia van apareciendo o siendo diagnosticadas progresivamente, y normalmente en este orden) y una inconstante deficiencia de ACTH que, cuando aparece, con frecuencia lo hace en la vida adulta. Se debe a mutaciones con pérdida de función en homocigosis

o heterocigosis compuesta, con penetrancia completa. Aun así, existe variabilidad en su expresividad clínica, de modo que la edad de instauración de cada una de las deficiencias es variable, y existen algunos casos publicados que rompen la regla del orden (comenzando con un hipotiroidismo o hipogonadismo aislado, con aparición posterior de otros déficits) (24,25), e incluso algún caso con talla adulta normal en el que las deficiencias se han constatado en la vida adulta (26). En imagen de RMN se ha descrito hipófisis hipoplásica, aplásica, hiperplásica, paso de hiperplásica a hipoplásica e incluso masas en la región selar (27–29), así como la posibilidad de asociación con un síndrome del tallo hipofisario interrumpido, neurohipófisis ectópica y otras anomalías cerebrales. Se ha sugerido la posibilidad de algún caso de penetrancia incompleta (presencia de portadores sanos) o de mutación en heterocigosis, sin que exista suficiente evidencia para confirmar estos extremos (29).

**DCHH tipo 3 (MIM# 613038). Herencia AR.** Causada por mutaciones en el gen *LHX3*. El cuadro clásico incluye deficiencia de GH, TSH, prolactina, gonadotropinas y ACTH, asociado a limitación de la rotación cervical [aunque no parece ser una condición exclusiva de las alteraciones de *LHX3* (30)]. La variabilidad clínica en este caso implica que, si bien es constante la afectación de GH y TSH, la presencia de deficiencia de prolactina, gonadotropinas y/o ACTH sea más variable. Se ha descrito la asociación con hiperplasia de adenohipófisis, hipoacusia neurosensorial, dificultad respiratoria y anomalías esqueléticas (30). El 20% de los pacientes que asocian HIC e hipoacusia presentan alguna alteración en *LHX3* (30).

**DCHH tipo 4 (MIM# 262700). Herencia AD.** Causada por mutaciones en el gen *LHX4*. Se presenta como deficiencia múltiple de GH, TSH, ACTH, FSH y LH asociada a hipoplasia adenohipofisaria, anomalías cerebelosas, anomalías de la silla turca y de otras estructuras de la base del cráneo. En este caso la penetrancia incompleta es frecuente. Se ha publicado algún caso de herencia recesiva, con una variante patogénica en homocigosis, con fenotipo letal en los primeros días de vida (31).



**DCHH tipo 5 (MIM# 182230). Herencia AD o AR. Causada por mutaciones en el gen *HESX1*.** Si bien es un gen que se ha relacionado directamente con el fenotipo de DSO, la realidad es que el espectro fenotípico de los pacientes publicados con mutaciones en el *HESX1* resulta muy variado. La deficiencia de GH parece constante, pero la presencia de otras deficiencias hipofisarias asociadas sólo aparece en la mitad de los pacientes (29). Las anomalías de nervios ópticos aparecen sólo en el 30% de los pacientes y, a su vez, sólo se encuentran alteraciones significativas en *HESX1* en el 1% de los pacientes con criterios de DSO (32). También el tipo de herencia es variable, existiendo casos con herencia recesiva y dominante (29,32). Recientemente se ha publicado la posibilidad de que alteraciones de *HESX1* puedan relacionarse también con un fenotipo de HHC aislado (29,33).

OMIM recoge un sexto tipo de DCHH. **DCHH tipo 6 (MIM# 613986): Herencia AD. Causada por mutaciones en el gen *OTX2*.** Las alteraciones en *OTX2* se han relacionado principalmente con un fenotipo de microftalmía, justifican el 2-3% de este tipo de pacientes, y hasta un tercio de éstos presentan HIC. Existen, aunque son escasos, los pacientes con HIC sin anomalías oculares ni de la línea media (34). El fenotipo hipofisario incluye una DCHH variable (se han descrito deficiencias de GH, TSH, ACTH, FSH y LH, hipoplasia hipofisaria y neurohipófisis ectópica).

El grupo de genes cuyas alteraciones se han relacionado con el fenotipo de DCHH ha ido creciendo considerablemente con posterioridad. Una exhaustiva revisión en 2016 estableció en ese momento hasta 30 genes distintos relacionados con la DCHH en humanos (29), para los cuales se estableció una clasificación según la mayor o menor seguridad en su relación con la etiología del HIC, la cual se muestra en la **Tabla 1**. Desde entonces, en los últimos tres años, diversas publicaciones han planteado la implicación de nuevos genes (la mayoría de ellos genes candidatos obtenidos mediante estudios de secuenciación de exoma completo) como *FOXA2*, *ROBO1*, *SLC20A1*, *SLC15A4*, *BMP2*, *DCHS1*, *ROBO2*, *CCDC88C*, *KIF14* y *KAT6A* (35–39).

**Tabla 1. Genes relacionados hasta 2016 con el fenotipo de DCHH en humanos, clasificados según el grado de evidencia de dicha relación (29)**

Genes habitualmente analizados y más relevantes hasta el momento en DCHH	Genes relacionados con menor frecuencia con DCHH	Genes implicados que requieren mayor evidencia para demostrar causalidad	Genes candidatos descubiertos por secuenciación de exoma
<p><i>PROP1</i> <i>POU1F1</i> <i>HESX1</i> <i>LHX3</i> <i>LHX4</i> <i>OTX2</i> <i>GLI2</i> <i>SOX2</i> <i>SOX3</i></p>	<p><i>BMP4</i> <i>FGF8</i> <i>FGFR1</i> <i>GLI3</i> <i>IGSF1</i> <i>PAX6</i> <i>PROKR2</i> <i>SHH</i> <i>TCF7L1</i> <i>TGIF1</i> <i>CHD7</i></p>	<p><i>HHIP</i> <i>POLR3A</i> <i>RBM28</i> <i>WDR11</i> <i>IFT172</i></p>	<p><i>ARNT2</i> <i>ZSWIM6</i> <i>GPR161</i> <i>HNRNPU</i> <i>PNPLA6</i> <i>CDON</i></p>

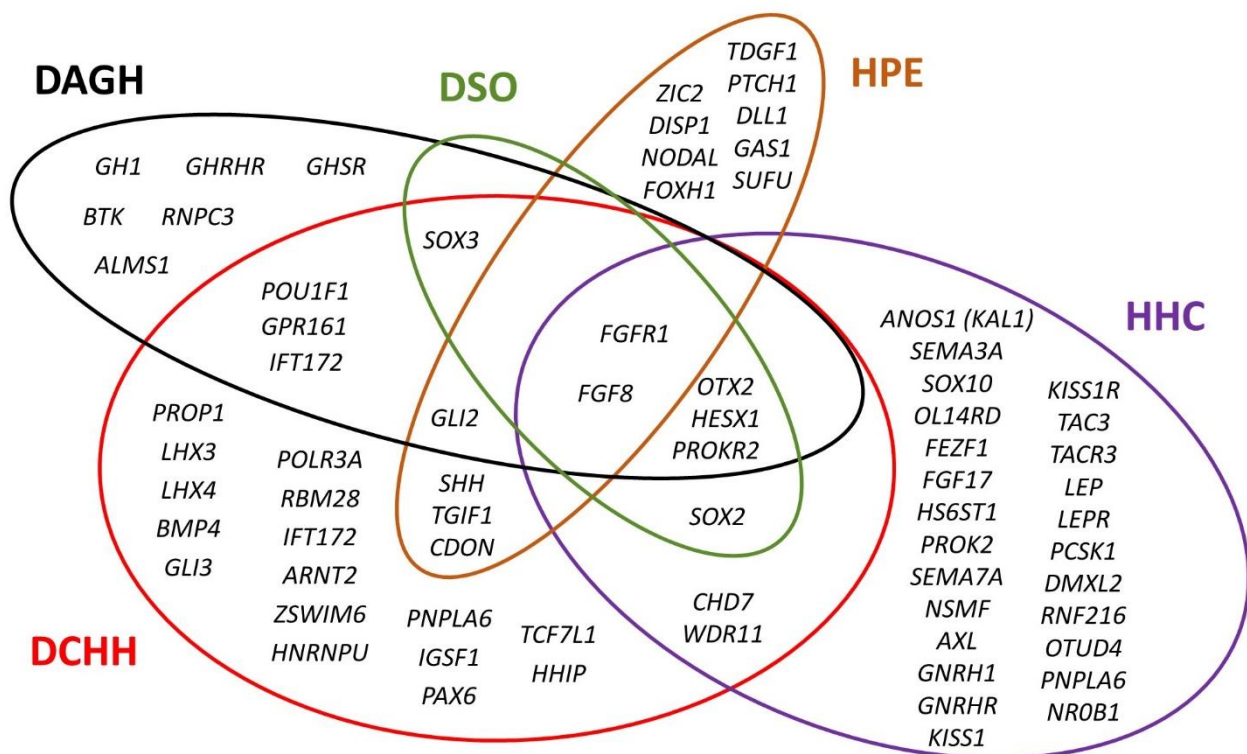
## 5. Solapamiento etiológico de la DCHH con otras patologías

Dentro del espectro clínico del HIC, algunas entidades muestran un solapamiento etiológico con la DCHH. Así, patologías como la DAGH, la DSO, el HHC y la HPE aparecen en algunos pacientes con alteraciones en genes relacionados con la etiología de la DCHH (**Figura 3**).

### 5.1. Deficiencia aislada de GH (DAGH)

La relación de la DAGH con la DCHH es especialmente relevante. Mutaciones en muchos de los genes mencionados implicados en la DCHH se han descrito en pacientes con DAGH como único fenotipo endocrino (*POU1F1*, *HESX1*, *OTX2*, *GLI2*, *SOX3*, *PROKR2*, *FGF8*, *GPR161*) (29). Es conocido que muchas DCHH inicialmente pueden expresarse de manera exclusiva en forma de DAGH. Se ha publicado que hasta la mitad de los niños con DAGH evolucionará a una DCHH en un periodo de 5 años (40), y ya ha sido mencionada la posibilidad de aparición de nuevas deficiencias incluso en la edad adulta, lo que refuerza la importancia del seguimiento de por vida de estos pacientes (41). Los pacientes con DAGH asociada a anomalías anatómicas hipotalámico-hipofisarias en la imagen de RMN (**DAGH-HP**) son los que presentan una mayor

probabilidad de evolucionar a una DCHH (41). En torno al 35% de los pacientes con DAGH-HP evolucionan a DCHH (considerando cualquier anomalía hipofisaria), en torno al 85% al considerar exclusivamente la disgenesia del tallo hipofisario, y entre el 45-100% al considerar el síndrome del tallo hipofisario interrumpido o triada hipofisaria (41). Por tanto, resulta muy probable una etiología común en muchos casos de DCHH y DAGH-HP.



**Figura 3. Solapamiento en la etiología genética entre distintas patologías del espectro clínico del HIC.** Se muestran, dentro de cada óvalo, los genes cuyas alteraciones se han asociado a cada uno de los fenotipos (29,32,42–45). **DAGH:** Deficiencia aislada de GH (negro); **DCHH:** Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (rojo); **DSO:** Displasia septo-óptica (verde); **HPE:** Holoprosencefalia (marrón); **HHC:** Hipogonadismo hipogonadotropo congénito (morado).

## 5.2. Displasia septo-óptica (DSO)

La DSO (antes llamada síndrome de De Morsier) fue descrita inicialmente en un paciente que presentaba hipoplasia de nervios ópticos y agenesia del septo pelúcido (46,47). Con posterioridad se consideró que el HIC constituía

también parte del fenotipo de esta entidad (48). Con la publicación de sucesivas series de casos se desarrollaron los criterios clínicos diagnósticos, que incluyen la presencia de 2 de las siguientes 3 alteraciones (49):

- Hipoplasia de nervio/s óptico/s.
- Anomalías de la línea media, incluyendo agenesia del septo pelúcido o del cuerpo calloso.
- Disfunción hormonal hipofisaria.

Estos criterios diagnósticos se encuentran en constante debate debido a su escasa especificidad. Además, en diversos trabajos se realizan algunas matizaciones o interpretaciones de los mismos, considerando también las anomalías en general del cuerpo calloso o del septo pelúcido y no sólo su agenesia (50–52), o las alteraciones hipofisarias en RMN en vez de exclusivamente la disfunción hormonal (53). Por otro lado, aparte de la clínica visual y endocrinológica, existen otras alteraciones que se asocian con frecuencia, especialmente neurológicas, tanto estructurales (esquisecefalia, trastornos de la migración neuronal) como clínicas (retraso psicomotor, epilepsia, parálisis cerebral, trastornos del espectro autista) (49). En un intento de mejorar la especificidad, Barkovich *et al.* (54) plantearon una posible subdivisión de los pacientes con DSO en dos grupos diferenciados. El primero estaría constituido por pacientes con DSO “aislada”, con agenesia del septo pelúcido, habitualmente con afectación bilateral de la vía óptica y predominancia de la clínica de disfunción hipofisaria sobre la neurológica. El segundo grupo estaría formado por los pacientes que presentan una DSO asociada a anomalías de la migración neuronal o de la organización cortical, habitualmente esquisecefalia o polimicrogiria, grupo denominado “DSO-plus” por Miller *et al.* (55), y con mayor gravedad de la clínica neurológica. Si bien algunos autores han criticado por excesivamente excluyente esta clasificación (32), otros han logrado profundizar en la misma, avalando diferencias clínicas entre los pacientes de ambos grupos (56). Todos estos factores hacen que en la actualidad se considere que la DSO, más que una patología concreta, constituye un grupo heterogéneo y variable de patologías de carácter disgenético, que tienen en común la presencia de diversas combinaciones de anomalías de la vía óptica, eje hipotálamo-hipófisis y

estructuras cerebrales de la línea media, pudiendo asociar otra serie de alteraciones, sobre todo neurológicas. Polizzi *et al.* (57) plantearon que la DSO debería llamarse “complejo DSO”.

Sólo un tercio de los pacientes cumplen la tríada completa de criterios diagnósticos (32). Entre el 50-80% de los pacientes presenta disfunción hipofisaria (49,51,56), siendo la deficiencia de GH la más frecuente. Existe la posibilidad de aparición evolutiva de nuevos ejes alterados, lo que implica la necesidad de seguimiento endocrinológico de por vida (49), aunque a mayor edad, la probabilidad de desarrollar nuevas deficiencias parece disminuir progresivamente (51). Recientemente se ha demostrado una elevada frecuencia de hipoplasia de bulbos y surcos olfatorios (rasgo característico del síndrome de Kallmann) en pacientes con DSO (58).

Genes como *HESX1*, *OTX2*, *SOX2* y *SOX3* se han relacionado con la etiología de la DSO. Pero ya se ha mencionado la escasa sensibilidad y especificidad de las alteraciones de *HESX1* (presentes sólo aproximadamente en el 1% de los pacientes con DSO), las cuales también pueden aparecer en pacientes con DCHH y DAGH sin anomalías oculares (29,32). Las anomalías en *OTX2*, *SOX2* y *SOX3* suelen cursar con fenotipos oculares más graves (microftalmía, anoftalmía), aunque existen excepciones (29,32). Mutaciones en *FGF8*, *FGFR1* y *PROKR2* (genes con conocida implicación en la etiología del HHC) se han relacionado también con el fenotipo de DSO (59). Si bien está aceptada la implicación de alteraciones genéticas en al menos algunos casos de DSO, también se considera que algunos factores ambientales podrían participar en la etiología (49). A esta hipótesis de una participación ambiental en la etiología contribuyen la mayor frecuencia de casos esporádicos que familiares (32) y la mayor incidencia en madres jóvenes, en determinados grupos sociales económicamente desfavorecidos o en determinadas áreas geográficas (50,53,60). Factores como alcohol y otras drogas, así como eventos vasculares intraútero o neonatales son algunos de los que han sido relacionados con mayor frecuencia (49,56,61,62). Se ha sugerido que, si bien parece probable una etiología multifactorial con posible participación de alteraciones genéticas y fenómenos ambientales, el grupo “DSO-plus” podría tener mayor relación con

fenómenos ambientales (62) y el grupo de DSO “aislada”, tener una mayor relación con un fenotipo *minor* de HPE (63) y, por tanto, mayor probabilidad de participación de alteraciones genéticas en su etiología.

### 5.3. Hipogonadismo hipogonadotropo congénito (HHC)

El HHC se caracteriza por una inadecuada producción, secreción o acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), y clásicamente se subdivide en síndrome de Kallmann (HHC con anosmia o hiposmia) y HHC sin anosmia. Numerosos genes relacionados con el desarrollo embrionario de las neuronas GnRH hipotalámicas (que nacen en la placoda olfatoria y migran posteriormente hasta su ubicación hipotalámica definitiva) o con su función han sido relacionados con su etiología. Un grupo de genes cuyas alteraciones inicialmente se habían relacionado exclusivamente con la etiología del HHC (con y sin anosmia), se han demostrado con posterioridad también relacionados con la DCHH (*FGF8*, *FGFR1*, *PROKR2*) (29,59,64). Tanto la placoda olfatoria como la placoda adenohipofisaria tienen un mismo origen embrionario, en el área preplacodal (65). Además, algunas vías de señalización (especialmente la vía FGF) participan en el desarrollo hipofisario y también en funciones específicas del desarrollo y migración de las neuronas GnRH hipotalámicas. Elementos en común como estos podrían justificar este solapamiento genético.

### 5.4. Holoprosencefalia (HPE)

En el extremo de mayor gravedad del espectro de alteraciones de la línea media está la holoprosencefalia (HPE), patología definida por la incompleta separación del prosencéfalo durante el desarrollo embrionario. Varios genes relacionados con su etiología (*SHH*, *CDON*, *GLI2*, *TGIF1*) que participan en vías de señalización con importante implicación en la adecuada conformación de la línea media, parecen estar también relacionados con la etiología del HIC (3,29,66–68). En la mayoría de los casos con anomalías en estos genes, los pacientes con fenotipo de HIC sin HPE son escasos, pero un caso especial lo constituye *GLI2*. De hecho, aunque *GLI2* se incluyó inicialmente en el grupo de genes implicados en la HPE, cada vez existe mayor evidencia de que el fenotipo

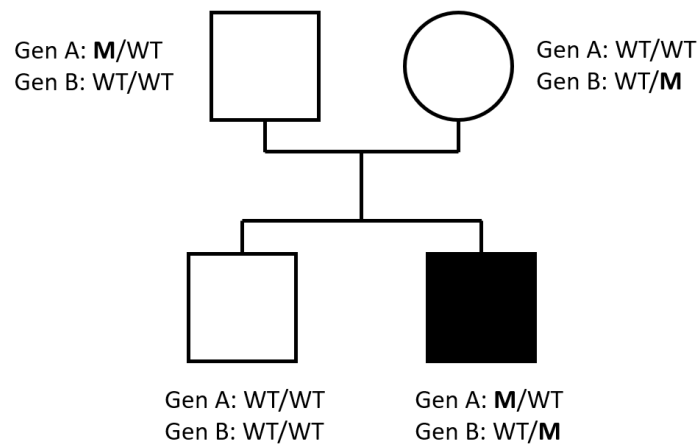
patológico sin HPE es más frecuente. Dicho fenotipo, que presenta una penetrancia incompleta y una expresividad muy variable, suele incluir una combinación variable de HIC, polidactilia y otras anomalías menores de línea media como labio leporino o fisura palatina como se detalla en la sección C de los *Resultados* y la *Discusión* de este trabajo. *FGF8* y *FGFR1*, genes cuyas alteraciones han sido clásicamente implicadas en la etiología del HHC, parecen estar implicados también en casos de HPE (66,67).

## **6. Modelo de herencia del HIC**

La descripción inicial de pacientes con anomalías en el pequeño grupo de genes “clásicos” (*PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4* y *HESX1*) facilitó la concepción de una etiología de la DCHH monogénica y de herencia mendeliana con penetrancia completa (todos los portadores expresan un fenotipo patológico), capaz de explicar un fenotipo más o menos homogéneo y predecible. Con posterioridad se ha demostrado que únicamente un porcentaje muy bajo de los pacientes con HIC estudiados muestran alteraciones en alguno de estos genes que puedan explicar su fenotipo patológico (69–72). Y a pesar del aumento exponencial de genes relacionados con la etiología del HIC que se han ido descubriendo, el fenotipo de una gran proporción de pacientes continúa sin poder ser explicado a través de un modelo exclusivamente monogénico.

La penetrancia incompleta implica la posibilidad de que un portador de una determinada mutación no exprese un fenotipo patológico. La expresividad variable supone la posibilidad de que varios portadores de la misma mutación, incluso dentro de una misma familia, expresen un fenotipo patológico diverso (ya sea en intensidad o gravedad, y/o con signos y síntomas diversos). Fenómenos como la penetrancia incompleta y la expresividad variable, muy habituales entre los pacientes con patologías del espectro clínico del HIC en los que se encuentra alguna causa genética, indican patrones de herencia complejos, alejados de un modelo de herencia mendeliana tradicional. Este escenario implica la necesaria participación de otros determinantes genéticos actuando en la modulación de la expresión fenotípica.

El modelo de herencia oligogénica implica que la expresión de un fenotipo patológico puede ser el resultado de la presencia agrupada de variantes en varios genes distintos en un mismo paciente, habitualmente heredadas de progenitores sanos (**Figura 4**). En dichos progenitores sanos, la presencia aislada de dichas variantes no es capaz de producir patología. Este modelo se ha demostrado capaz de explicar el fenotipo de un porcentaje relevante de pacientes con HHC (44) y de pacientes con HPE (73). En el ámbito de la DCHH, existen hasta el momento tres estudios (37,39,74) (dos de ellos centrados en pacientes con síndrome del tallo hipofisario interrumpido) que han abordado el estudio de pequeños grupos de pacientes (de entre 10 y 24 pacientes) mediante secuenciación masiva. En dichos estudios, llevados a cabo por tres grupos independientes, se avala la posibilidad de un modelo de herencia oligogénica, mostrando la presencia de variantes relevantes en varios genes en el 30-83% de los pacientes estudiados. Existen igualmente casos aislados descritos que se explican mediante este tipo de herencia (75).



**Figura 4. Modelo de herencia oligogénica.** La presencia aislada de una mutación (*M*) en un alelo del gen A o del gen B no es capaz de expresar un fenotipo patológico en ninguno de los progenitores. La presencia agrupada en uno de los hijos de mutaciones en varios genes, permite la expresión del fenotipo patológico. *WT*: Alelo normal (“wild-type”); *M*: Alelo mutado



## **7. Influencia de factores ambientales**

Entre los factores participantes en la modulación de la expresión fenotípica pueden estar implicados también elementos ambientales. Varios estudios realizados en ratones han demostrado la influencia de la exposición prenatal a etanol u otros teratógenos en la penetrancia y expresividad de las alteraciones en genes de la vía de señalización SHH (sobre todo *GLI2* y *CDON*) (76–79). Así, se observa que los ratones con alteraciones en heterocigosis en alguno de estos genes, sometidos a ciertos efectos teratogénicos prenatales, muestran una mayor penetrancia y un fenotipo de mayor gravedad frente a los que portan la misma alteración genética sin ser expuestos al teratógeno y frente a los que son expuestos al teratógeno sin portar la mutación. Por lo tanto, se produce una suma de efectos genéticos y ambientales que condiciona el fenotipo final. Por otro lado, algunos eventos obstétricos (principalmente el parto vaginal en presentación podálica) se consideran potenciales causantes de HIC. Si bien este tipo de eventos han sido considerados una posible causa de HIC, apenas se ha explorado hasta el momento la posibilidad de que participen como cofactores moduladores de la expresión fenotípica de alteraciones genéticas.

## **8. Limitaciones y ventajas de las técnicas de secuenciación en el estudio del HIC**

Durante muchos años, el estudio molecular del HIC se ha realizado mediante un análisis en cascada por secuenciación Sanger del pequeño grupo de genes conocidos implicados en su etiología tras una caracterización fenotípica de los rasgos fenotípicos y deficiencias hormonales predominantes de cada caso. Este proceso, además de ser significativamente lento y costoso, en la inmensa mayoría de los casos, resulta infructuoso para la identificación de la base genética subyacente. Actualmente, la secuenciación tradicional gen a gen sólo resulta de elección ante patologías de causa monogénica secundarias a la alteración de un único gen, o de uno de entre muy pocos genes, y esta no parece ser la realidad de la etiología de la gran mayoría de los casos de HIC, a tenor de lo resumido a lo largo de esta introducción, y considerando la gran complejidad

emergente desde los primeros estudios realizados mediante NGS que parece revestir su etiología.

Los estudios genéticos o moleculares han sufrido una auténtica revolución en la última década de la mano de la secuenciación masiva o NGS (*Next Generation Sequencing*). Esta tecnología, cuyo coste económico se ha visto reducido de manera muy relevante con el paso del tiempo, permite la secuenciación simultánea de un gran número de genes en un solo ensayo, permitiendo aumentar la tasa de diagnósticos y reducir los costes en el estudio genético de múltiples patologías en cuya etiología pueden participar alteraciones en grupos amplios de genes diferentes. Por otro lado, resulta prácticamente el único abordaje analítico posible en patologías de herencia multigénica en las que se sospecha la implicación de alteraciones en varios genes distintos en un mismo paciente, por contribución oligogénica de variantes heredadas y/o *de novo* (39,74).

Las técnicas de NGS permiten un abordaje versátil y flexible, dependiendo del objetivo y las dianas genéticas que pretendamos analizar. Mediante los paneles de genes (o NGS dirigida) se aborda el análisis de un número limitado de genes de interés para las patologías de estudio. La secuenciación de exoma completo (WES; *Whole Exome Sequencing*) implica el estudio de la secuencia de todas las regiones exónicas o codificantes presentes en el genoma humano. Mediante el estudio del genoma completo (WGS; *Whole Genome Sequencing*) se secuencia todo el genoma, incluyendo las regiones codificantes y no codificantes. Si bien puede parecer tentador en principio elegir la técnica de estudio que mayor cantidad de secuencia genética o genómica analice para aumentar la rentabilidad diagnóstica, existen razones que desmienten que, a día de hoy, ese planteamiento sea el más correcto, y cada una de las opciones presenta sus ventajas y desventajas.

En primer lugar, el argumento económico. A pesar de que los costes de cualquiera de estas técnicas se han reducido drásticamente, todavía es válida la fórmula que indica que, a mayor cantidad de secuencia, mayores costes de secuenciación, si bien la tendencia a la disminución de precios se mantiene.

En segundo lugar, la fiabilidad y reproducibilidad del procedimiento. La fiabilidad de los resultados en los estudios de NGS (ya sea dirigida, WES o WGS) depende, en primer lugar, de una cobertura adecuada de las secuencias de interés. La cobertura viene definida por el número de veces que un determinado nucleótido o región está cubierto (secuenciado) y tiene que ser lo suficientemente alta como para compensar la tasa de error de la técnica de secuenciación que se utilice. En los estudios de NGS dirigida y WES se recomienda una cobertura promedio de 100x, lo que asegura un % de cobertura por base de 20x [suficiente para poder detectar una variante de nucleótido único (“SNV”) en heterocigosis con una probabilidad > 95%].

Por un lado, tanto la NGS dirigida como WES presentan la limitación técnica impuesta por la captura y enriquecimiento de las secuencias codificantes de interés. La eficacia de la captura es muy variable a lo largo del exoma y presenta dificultades insalvables en muchas regiones repetitivas o ricas en G/C. Por lo que la capacidad de capturar las secuencias de interés será muy variable y en todo caso limitada por estos dos factores. Por otro, la secuenciación integral del genoma no está sujeta a las limitaciones impuestas por la captura y enriquecimiento, pero sí a las de una cobertura inferior (y por tanto una tasa de error superior) y sobre todo a la necesidad de contar con una infraestructura de hardware y software lo suficientemente potente como para almacenar y analizar de una forma ágil una enorme cantidad de información.

La NGS dirigida se orienta al estudio de un listado concreto de genes o regiones del genoma especialmente relevantes para una determinada enfermedad o espectro de patologías. Limitando el número de secuencias diana de interés aumentamos la probabilidad de una adecuada captura, enriquecimiento y cobertura más uniforme de todas las regiones importantes para dicho contexto clínico. Si bien, sobre el papel, los resultados obtenibles mediante NGS dirigida deberían obtenerse igualmente mediante WES, sin embargo, la captura y cobertura son en este caso mucho más variables, por lo que el WES estaría más indicado como prueba de segundo nivel para intentar identificar la implicación de otros genes, una vez que no se han obtenido resultados mediante el panel de NGS dirigida.

Por todo ello, la NGS dirigida presenta *a priori* unas ventajosas características técnicas (y económicas) que la convierten en la primera opción para abordar el estudio molecular de la gran mayoría de pacientes con patologías del espectro clínico del HIC.

Si bien la complejidad técnica del proceso de preparación de las muestras de ADN y su posterior secuenciación es indudablemente mayor que la de la secuenciación gen a gen tipo Sanger, una de las principales dificultades con las técnicas de secuenciación masiva reside en el complejo análisis de los datos obtenidos. Con este tipo de estudios, invariablemente, se identificará un elevado número de variantes sin implicación patológica, reflejo de la variabilidad genética interindividual. Por ello, sigue siendo esencial una cuidada y detallada caracterización clínica de los pacientes que ayude, junto con la adecuada ponderación de factores como la frecuencia de dicha variante en la población, la afectación de dominios fundamentales para la función de la proteína, la descripción previa de la variante en la literatura asociada al fenotipo, la co-segregación del fenotipo y genotipo en los familiares, la predicción de patogenicidad mediante herramientas bioinformáticas, su asociación funcional con el fenotipo en estudio y, por último, los estudios funcionales que demuestren o excluyan su efecto deletéreo, a concluir el grado de patogenicidad de cada variante encontrada.

Para ayudar a normalizar y unificar criterios diagnósticos en este complejo proceso de clasificación de variantes, el *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) elaboró en el año 2015 unas guías internacionales que establecen los criterios que deberían seguirse para tal fin, y que establecen 5 categorías posibles de variantes: patogénica, probablemente patogénica, probablemente benigna, benigna, y la categoría que incluye a todas las variantes que no cumplen criterios para pertenecer a las 4 previas, que se considerarán variantes de significado incierto (VUS; “*variant of uncertain significance*”) (80). Estos criterios, de uso plenamente extendido para la clasificación diagnóstica de los resultados de estudios moleculares y muy válidos para el manejo diagnóstico de patologías de etiología monogénica, resultan menos útiles para el estudio de patologías de posible etiología oligogénica. En este caso pueden contribuir

sinérgicamente en un mismo paciente múltiples variantes transmitidas, que si bien individualmente no tienen una gran repercusión funcional, al acumularse en el mismo individuo junto con otras variantes en otros genes pueden constituir una carga genética con repercusión funcional que contribuye a la variabilidad fenotípica, como ya se ha demostrado en neuropatías complejas (81). El uso de los criterios del ACMG para evaluar estas variantes de manera individual llevará en muchos casos a que sean clasificadas como VUS o incluso como probablemente benignas (o directamente benignas). Será necesario, por lo tanto, desarrollar una aproximación diferente (y no exclusivamente a través de los criterios del ACMG) para la consideración de la patogenicidad de variantes en patologías de herencia oligogénica.

## **9. Conclusión**

A lo largo del recorrido que se ha realizado en esta introducción se ha podido constatar el elevado grado de incertidumbre aún existente acerca de la etiología del HIC. A dicha incertidumbre contribuyen su gran heterogeneidad clínica, la elevada frecuencia de pacientes en los que no se alcanza un diagnóstico genético mediante abordajes tradicionales, la elevada frecuencia de penetrancia incompleta y expresividad variable de muchas mutaciones conocidas, el solapamiento con otras patologías y la gran complejidad del desarrollo embrionario de la región hipotalámico-hipofisaria, factores todos que respaldan la hipótesis de una posible etiología multifactorial en una proporción significativa de pacientes con HIC. Por todo ello, la secuenciación masiva se presenta como una herramienta de gran utilidad para el estudio molecular de los determinantes genéticos del HIC.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## HIPÓTESIS

La secuenciación masiva dirigida puede mejorar el diagnóstico genético de los pacientes con patologías del espectro clínico del hipopituitarismo congénito (HIC): deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (DCHH; ORPHA:95494), displasia septo-óptica (DSO; ORPHA: 3157) y deficiencia aislada de GH asociada a anomalías hipotalámico-hipofisarias en la imagen de RMN (DAGH-HP) (ORPHA: 631).

La herencia oligogénica puede explicar, al menos parcialmente, la penetrancia incompleta y expresividad variable de las alteraciones en genes implicados en el desarrollo embrionario de la región hipotalámico-hipofisaria identificadas en pacientes con hipopituitarismo congénito.

Las patologías mencionadas presentan un solapamiento genético entre ellas y con otras patologías como el hipogonadismo hipogonadotropo congénito (HHC) y la holoprosencefalia (HPE) lo que sugiere que el espectro clínico asociado a las variantes genéticas es consecuencia de una etiología multifactorial.

La etiología de un elevado porcentaje de pacientes con patologías del espectro clínico del HIC puede ser explicada por la agrupación de alteraciones genéticas y/o eventos ambientales (obstétricos), de manera multifactorial.

## **OBJETIVOS**

### OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar clínica y molecularmente una cohorte de 114 pacientes diagnosticados de deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (DCHH), displasia septo-óptica (DSO) o deficiencia aislada de GH con anomalías hipotalámico-hipofisarias (DAGH-HP), mediante la identificación por secuenciación masiva dirigida de los determinantes genéticos implicados en su etiología y el análisis de las correlaciones genotipo-fenotipo.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterización clínica de la cohorte de pacientes mencionada, evaluando igualmente la posible implicación de eventos perinatales relevantes como factores o cofactores potencialmente implicados en la etiología del hipopituitarismo congénito (HIC).
2. Análisis genético de la cohorte de pacientes mediante el panel de secuenciación masiva dirigida HIPOPIT con el fin de identificar los determinantes genéticos implicados en la etiología de la DCHH, DSO y DAGH-HP.
3. Evaluar la utilidad de la secuenciación masiva dirigida en el diagnóstico de este tipo de pacientes.
4. Evaluar la posibilidad de una etiología oligogénica en las tres patologías incluidas en el estudio.
5. Evaluar el solapamiento genético de las tres patologías incluidas en el estudio entre sí, así como con otras patologías del espectro clínico del HIC como la holoprosencefalia (HPE) y el hipogonadismo hipogonadotropo congénito (HHC).
6. Análisis de las posibles correlaciones genotipo-fenotipo.
7. Evaluar las posibles diferencias clínicas y genéticas entre los subgrupos de DSO “aislada” y DSO-Plus, entre los subgrupos de DSO con disfunción hipofisaria y DSO sin disfunción hipofisaria, y entre los subgrupos de hipopituitarismo sindrómico y no sindrómico.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. Sujetos de estudio

### 1.1. Selección de los pacientes

#### 1.1.1. Criterios de inclusión:

Fueron incluidos en el estudio pacientes diagnosticados de deficiencia combinada de hormonas hipofisarias (DCHH), displasia septo-óptica (DSO) o deficiencia aislada de GH con anomalías anatómicas hipotalámico-hipofisarias en la imagen de RMN (DAGH-HP) para los que se solicitó estudio genético al Laboratorio de Endocrinología Molecular del Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM) del Hospital Universitario La Paz (Madrid) entre los años 2012 y 2017, procedentes de múltiples centros hospitalarios, principalmente del territorio nacional (junto con algunos pacientes procedentes de otros países).

#### 1.1.2. Criterios de exclusión

Fueron excluidos del estudio los pacientes con causa conocida de hipopituitarismo adquirido, tales como tumores, cirugía o radiación.

### 1.2. Clasificación de los pacientes

#### 1.2.1. Clasificación de los pacientes en los tres grupos diagnósticos:

Para la inclusión de los pacientes dentro de uno de los tres grupos diagnósticos principales, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Para la inclusión en el grupo de **DCHH** (n=72) se consideró la presencia de 2 o más deficiencias de ejes hormonales adenohipofisarios, independientemente de que se presentaran en el contexto de un HIC aislado o asociado a anomalías extrahipofisarias. No fueron incluidos en este grupo los pacientes que cumplían criterios simultáneamente de DCHH y de DSO (ver más abajo).
- Para la inclusión en el grupo de **DSO** (n=33) se consideró la presencia de al menos 2 de los 3 criterios diagnósticos establecidos en la literatura (49). El criterio relativo a las anomalías hipofisarias se consideró cumplido, no sólo ante la presencia de disfunción homonal, sino también ante la presencia de alteraciones anatómicas de la hipófisis.

- Para la inclusión en el grupo de **DAGH-HP** (n=9) se consideró la presencia de deficiencia de GH sin otras deficiencias hipofisarias, asociada a anomalías anatómicas hipotalámico-hipofisarias en la imagen de RMN.

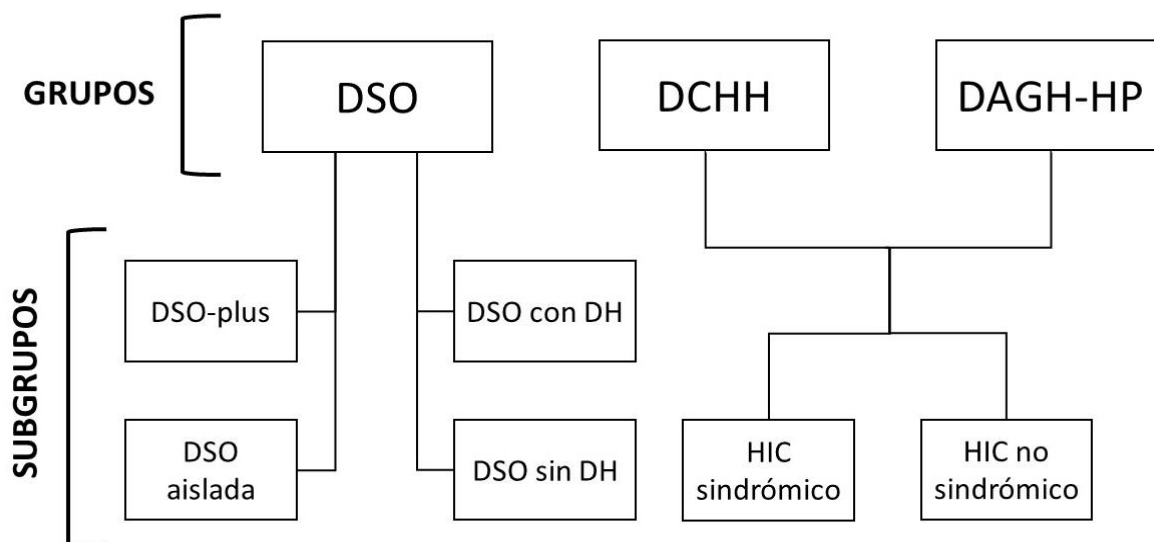
La clasificación de los pacientes en los tres grupos principales DCHH, DSO y DAGH-HP fue realizada a partir de los datos clínicos remitidos (u obtenidos directamente en el caso de las evaluaciones presenciales). En los casos en los que, con los datos clínicos remitidos, no fue posible establecer una categoría diagnóstica concreta, se mantuvo el diagnóstico referido por el clínico colaborador como base para incluir al paciente en una u otra categoría.

### 1.2.2. Clasificación en subgrupos:

Dentro de los pacientes clasificados como DSO, se realizaron dos subclasificaciones independientes en función del tipo anatomo-clínico de DSO y en función de la presencia o ausencia de disfunción hipofisaria (**Figura 5**):

- *Tipo anatomo-clínico de DSO:* El grupo de DSO se subclasificó en “**DSO aislada**” (n=23) frente a “**DSO-plus**” (n=7), siguiendo los criterios de la clasificación anatomo-clínica de Miller *et al.* (55). Se consideró como “DSO-plus” la presencia de anomalías de la migración neuronal o alteraciones de la organización cortical cerebral (fundamentalmente esquisencefalia o polimicrogiria), mientras que la ausencia de este tipo de anomalías se consideró como “DSO aislada”.
- *Presencia o ausencia de disfunción hipofisaria:* El grupo de DSO se subclasificó en DSO con disfunción hipofisaria (**DSO con DH**, n=24) frente a DSO sin disfunción hipofisaria (**DSO sin DH**, n=8), según la presencia o ausencia de algún tipo de deficiencia hormonal adenohipofisaria.

Dentro del conjunto de pacientes con diagnóstico de DCHH o DAGH-HP (y excluyendo el grupo de pacientes con DSO), se realizó una subclasificación, estableciendo los subgrupos de **HIC sintromico** (n=33) e **HIC no sintromico** (n=40) (según la presencia o ausencia respectivamente de anomalías extrahipofisarias) (**Figura 5**).



**Figura 5. Grupos diagnósticos principales incluidos, y subdivisión en subgrupos.** *DCHH*: Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; *DSO*: Displasia septo-óptica; *DAGH-HP*: Deficiencia aislada de GH con anomalías hipotalámico-hipofisarias en la imagen de RMN; *DH*: Disfunción hipofisaria; *HIC*: Hipopituitarismo congénito.

### 1.3. Consentimiento informado

Todos los pacientes, padres/tutores legales y miembros familiares han otorgado el preceptivo consentimiento informado para la extracción de ADN, acceso a sus datos clínicos y la realización del análisis genético mediante panel de NGS en el Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Hospital Universitario La Paz.

### 1.4. Recogida de datos fenotípicos

Los datos sobre el fenotipo de los pacientes (incluyendo datos como el sexo, la edad y clínica en el momento del diagnóstico, las deficiencias hormonales desarrolladas, los hallazgos de la RMN del área selar, los antecedentes gestacionales y perinatales, así como la presencia o ausencia de otros rasgos o anomalías asociados) fueron obtenidos a partir de un cuestionario de datos clínicos, cumplimentado por el especialista endocrinólogo correspondiente a cargo de cada paciente (**Anexo 1**). En los casos en los que ha sido posible, también se procedió a entrevista y evaluación directa del probando y sus familiares, así como a la evaluación directa de imágenes de RMN. Para la obtención y publicación de imágenes fotográficas se ha obtenido

el correspondiente consentimiento por escrito de los pacientes correspondientes y/o sus tutores legales. Las variables concretas utilizadas para el análisis se detallan en el apartado “3. *Variables de estudio*”.

## **2. Secuenciación masiva dirigida**

### **2.1. Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó desde una muestra de sangre entera (2 x 3 ml en tubo EDTA) de cada probando y progenitor en el laboratorio de preanalítica del INGEMM utilizando el kit de extracción “*Chemagic DNA Blood Kit special*” en un equipo Chemagic MSM I de extracción automática. Las muestras para la extracción de ADN han sido remitidas por los profesionales sanitarios de cada centro.

### **2.2. Ensayo de secuenciación masiva dirigida: Panel HIPOPIT\_V1**

El análisis molecular de todos los pacientes incluidos en el estudio se realizó mediante el panel de secuenciación masiva dirigida HIPOPIT\_V1, de diseño propio. La selección de los genes incluidos en el panel HIPOPIT\_V1 se realizó en el año 2014 tras el estudio de la literatura científica disponible hasta ese momento acerca de la etiología genética de la DCHH, la DSO, la HPE y el HHC. La versión 1 de HIPOPIT Incluye un total de 73 genes: 50 de ellos han sido relacionados con alguna de las patologías del espectro clínico del hipopituitarismo congénito mencionadas en humanos, y los restantes 23 son genes candidatos de los que no existe descrita aún relación con patología en humanos, incluidos por las observaciones publicadas sobre sus alteraciones en modelos animales de hipopituitarismo, El listado completo de genes incluidos en HIPOPIT\_V1 se muestra en el **Anexo 2**.

### **2.3. Ensayo de secuenciación masiva dirigida: Panel HIPOPIT\_V3**

Durante el proceso de estudio con el panel HIPOPIT\_V1, partiendo del avance del conocimiento sobre el tema en la literatura y con el objetivo de mejorar la versión inicial, se procedió a diseñar e implementar la versión del

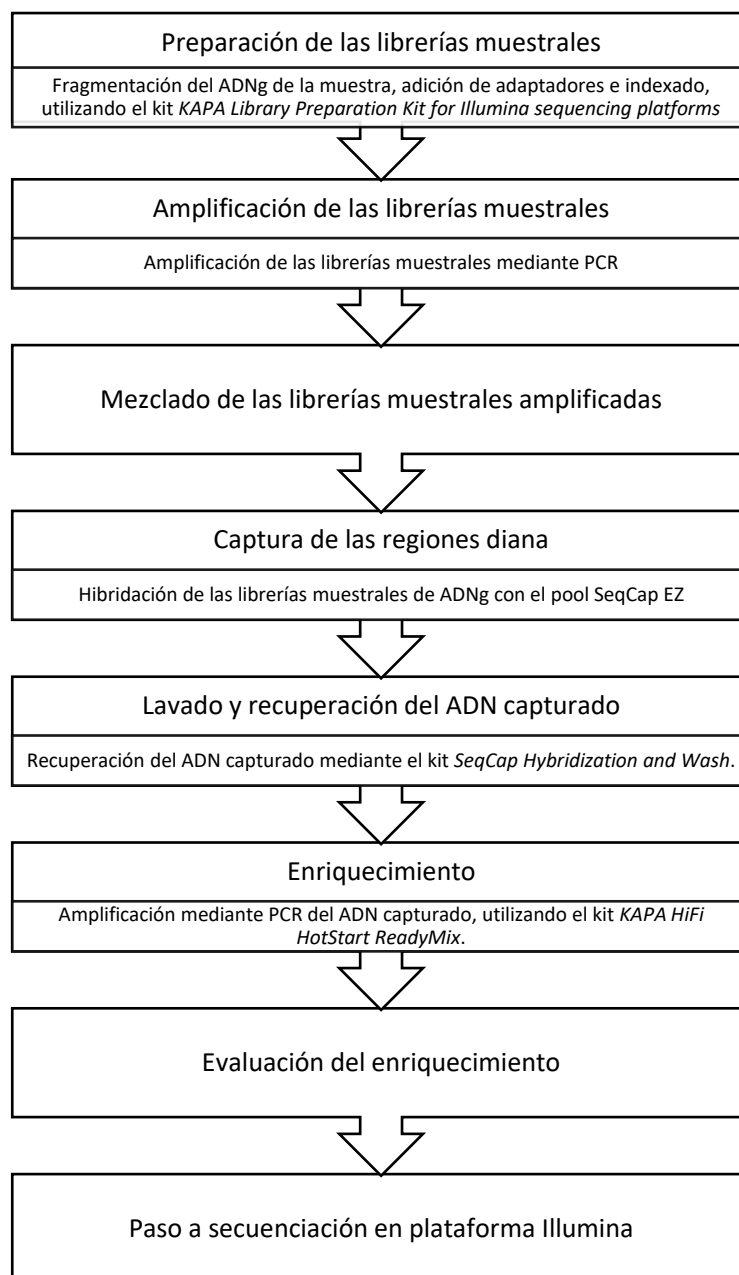
panel HIPOPIT\_V3. Dicha versión HIPOPIT\_V3 se ha aplicado a la profundización del estudio de un paciente con una variante patogénica en el gen *BMP4* (ver *Resultados*, sección B) y de los 11 pacientes con anomalías en el gen *GLI2* (ver *Resultados*, sección C). Se trata de una versión ampliada del panel, que incluye un total de 310 genes: los 73 previamente incluidos en el panel HIPOPIT\_V1 y otros 187 genes candidatos, la gran mayoría codificantes de factores de transcripción y moléculas señalizadoras que intervienen en las 5 vías principales reguladoras del desarrollo hipotálamico-hipofisario (BMP, FGF, WNT, SHH y NOTCH) (1,82). El listado completo de genes incluidos en el panel HIPOPIT\_V3 se muestra en el **Anexo 2**.

#### **2.4. Diseño y características técnicas de los paneles de ensayo dirigido NGS**

Ambos paneles o ensayos de NGS dirigidos (NimbleGen, ROCHE) han sido diseñados y validados por el equipo investigador. El diseño bioinformático de ambas versiones V1 y V3 del panel HIPOPIT se ha realizado con ayuda de la herramienta NimbleDesign <https://design.nimblegen.com/nimbledesign/app/login?execution=e2s2ROCHE>) con un tamaño resultante de 138 y 759 kb, respectivamente, que permite el procesamiento simultáneo de un pool de 90 muestras con una cobertura promedio >100x en una plataforma NextSeq 500 de Illumina, disponible en el laboratorio de Secuenciación Masiva de la Sección de Genómica Funcional del INGEMM.

La preparación de las librerías, su indexado, amplificación, captura y enriquecimiento de las secuencias genómicas de interés (secuencias exónicas de los genes incluidos + 20 pb de los intrones adyacentes), se han realizado según los protocolos recomendados por el fabricante con los kits de KAPA (ROCHE) y el kit customizado de SeqCap EZ-capture (NimbleGen, ROCHE). Este proceso, esquematizado en la **Figura 6**, consiste en lo siguiente. Inicialmente se realiza la fragmentación mecánica del ADN genómico (ADNg) de las muestras en un sonicador Covaris. A continuación, se realiza la incorporación mediante ligación de adaptadores e índices (proceso de indexado) a los

fragmentos de ADNg. Los adaptadores son secuencias complementarias a otras presentes en la superficie de la placa en la que se llevará a cabo posteriormente la secuenciación, que permitirán así la adhesión de los fragmentos de ADN a dicha superficie, y que también funcionan como cebadores para las reacciones de amplificación. Los índices son secuencias identificadoras de la muestra concreta a la que pertenece cada uno de los fragmentos. Tras la adición de adaptadores e índices se procede a una primera amplificación mediante PCR de



**Figura 6. Esquema del proceso de preparación de las librerías de ADN, captura y enriquecimiento, previo al proceso de secuenciación**

la librería muestral. Las distintas muestras que se van a incluir en el mismo proceso de secuenciación son mezcladas a continuación (el indexado previo permitirá reconocer a qué muestra pertenece cada fragmento). Seguidamente, se procede a la captura de las regiones diana, mediante la hibridación del pool de librerías muestrales con el pool SezCap EZ. Este incluye los oligonucleótidos diseñados específicamente para capturar por hibridación las regiones que se desean secuenciar, correspondientes a los genes incluidos en cada uno de los paneles HIPOPIT\_V1 e HIPOPIT\_V3. Tras el lavado y recuperación del ADN “capturado” (unido a los oligonucleótidos mencionados), se procede a su enriquecimiento, mediante un nuevo proceso de amplificación mediante PCR. Las librerías de ADN, tras la captura y el enriquecimiento, están preparadas para pasar al proceso de secuenciación en la plataforma Illumina NextSeq 500.

El proceso inicial en la plataforma Illumina consiste en la adhesión de los fragmentos de las librerías a la placa en la que se llevará a cabo el proceso de secuenciación. Para ello, una vez preparadas las librerías, se procede a la desnaturalización de los fragmentos de ADN para su adhesión como ADN monocatenario a oligonucleótidos (que se encuentran unidos a la placa) complementarios a los de los adaptadores de las librerías. Tras dicha adhesión o hibridación, se procede a la amplificación de los fragmentos mediante un proceso de PCR-puente. En dicho proceso de amplificación, se procede a la duplicación de las cadenas monocatenarias mediante polimerasas, desnaturalización y consiguiente nueva adhesión de los extremos adaptadores recién sintetizados, formando puentes, en un proceso que se repite varias veces hasta la formación de “*clusters*” o conjuntos agrupados de fragmentos de una misma secuencia de interés adheridos a la placa. A continuación, se lleva a cabo el proceso de secuenciación propiamente dicho. La plataforma NextSeq 500 de Illumina utiliza una tecnología basada en la secuenciación por síntesis mediante terminación reversible cíclica (“*Cyclic Reversible Termination*”, CRT), empleando nucleótidos terminadores de cadena marcados con fluoróforos, que permiten identificar el último nucleótido incorporado a través de la detección mediante cámaras de la señal de fluorescencia emitida. Una vez tomada la imagen del último nucleótido incorporado, estos nucleótidos terminadores de cadena se eliminan para desbloquear el carbono 3', y poder continuar la reacción de



secuenciación. La secuenciación se realiza alternando ciclos de terminación reversible cíclica y de toma de imágenes. Illumina utiliza la técnica de secuenciación “*paired end sequencing*”, por la cual se utilizan fragmentos cortos de ADN (2 x 150 pb), y la secuenciación se produce partiendo de ambos extremos de cada fragmento de ADN, de manera emparejada (“*paired end*”).

## 2.5. Análisis bioinformático de los datos generados mediante la secuenciación de los paneles HIPOPIT\_V1 e HIPOPIT\_V3

El procesamiento bioinformático (alineamiento, control de calidad y anotación de las variantes identificadas en las secuencias obtenidas) se ha realizado en la Sección de Bioinformática del INGEMM utilizando las herramientas bioinformáticas utilizadas en el ensayo de validación: trimmomatic-0.32; bowtie2-align version 2.1.0; picard-tools 1.106; samtools Version.0.1.19-44428cd; bedtools v2.18.1; GenomeAnalysisTK version 3.3-0; las variantes fueron anotadas con ayuda de las siguientes bases de datos: dbNSFP version 3.0; dbSNP v138; ClinVar date 20140703; SnpE\_ 4.1I; GnomAD SIFT ensembl 66; Polyphen-2 v2.2.2; MutationAssessor, release 2; FATHMM, v2.3; CADD, v1.4 y dbScSNV1.1. y los archivos .BAM visualizados individualmente con ayuda del Software comercial AlamutVisual V2.11 (Interactive Biosoftware). El filtrado, anotación y priorización final del listado de variantes de los archivos VCFs resultante (análisis terciario) se ha realizado con ayuda de los programas de análisis integrados en los paquetes comerciales AlamutVisual V2.11 (Interactive Biosoftware) e “Ingenuity Variant Analysis” (QIAGEN), utilizando:

- A. Criterios de **confianza y calidad** de las secuencias (“*call quality*” >20, profundidad de lectura >10, calidad del genotipado >30 y una fracción alélica >5).
- B. Criterios de **frecuencia alélica** poblacional:
  - Frecuencia alélica en la población general <1% según las bases de datos públicas gnomAD (<http://gnomad.broadinstitute.org/>), 1000 Genomes Project (<http://www.internationalgenome.org/1000-genomes-browsers>) y ESP6500 (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>).

No obstante, se priorizaron también aquellas variantes con frecuencia alélica >1% siempre y cuando estudios experimentales publicados hayan demostrado una repercusión funcional, por su potencial contribución en un contexto de oligogenicidad.

C. Criterios de **impacto** de la variante:

- Variantes de pérdida de función: variantes sin sentido (“*nonsense*”) que introducen un codón de detención prematuro, que eliminan el codón de arranque o con alteración del marco de lectura (“*frameshift*”) que producen truncamiento prematuro o extensión anómala del transcrito de la proteína.
- Variantes de cambio de sentido (“*missense*”) con predicción de patogenicidad *in silico* mediante la herramienta bioinformática CADD\_V1.4 (score >15) (<https://cadd.gs.washington.edu>) (83) y, además, predicción de patogenicidad por al menos tres de las siguientes herramientas bioinformáticas: SIFT, MutationTaster, Polyphen-2, DANN, FATHMM-MKL, GERP-RS [integradas en los programas bioinformáticos Alamut Visual V2.11 (Sophia Genetics) y Varsome (Saphetor)], o si existe estudio funcional publicado que demuestre repercusión en la función de la proteína.
- Haploinsuficiencia por delección parcial/completa en heterocigosis.
- Las variantes del tipo inserción o delección en fase (sin alteración del marco de lectura) con predicción de patogenicidad *in silico* mediante la herramienta CADD\_V1.4 (score > 15), así como las reguladoras no codificantes ubicadas en los flancos 5'UTR y 3'UTR de los genes, fueron incluidas si cumplían el criterio de frecuencia alélica <1%, dada la dificultad para la interpretación de la predicción de patogenicidad *in silico*.
- Variantes con afectación de *splicing*:
  - Disrupción del donador o aceptor canónico de *splicing*.

- Predicción *in silico* de afectación de *splicing* (para variantes sinónimas e intrónicas) mediante las herramientas bioinformáticas SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, GeneSplicer y EX-SKIP, integradas en el Software Alamut Visual V2.11 (Sophia Genetics).

Se consideró también su descripción previa en la literatura, así como su posible asociación funcional con las patologías en estudio, utilizando la herramienta Biological context (“HPO based” de Ingenuity Variant Analysis, QIAGEN). El análisis de los datos tras el filtrado y anotación de las variantes identificadas se ha realizado considerando la posibilidad de herencia monogénica/digénica/oligogénica con patrones de herencia AD, AR, XL o *de novo*. Las variantes que han superado los criterios de priorización han sido clasificadas inicialmente mediante los criterios del *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) de 2015 (80), que establece las siguientes categorías diagnósticas: patogénica, probablemente patogénica, variante de significado incierto (VUS), probablemente benigna y benigna. En el presente estudio la categoría de variantes de significado incierto [*“Variant of uncertain significance”* (VUS)] se ha subdividido en dos, creando la categoría “VUS+”, que incluye aquellas variantes clasificadas como VUS según los criterios del ACMG, pero algunas de cuyas características hacen muy probable su participación en la etiología en un modelo multifactorial: existencia de estudios publicados que demuestran su repercusión funcional, descripción previa de la variante asociada a un determinado fenotipo patológico o variantes de muy baja frecuencia o no descritas previamente afectando a un dominio funcional importante de la proteína.

## **2.6. Análisis de variaciones del número de copias (CNVs)**

Para descartar la presencia de variaciones en el número de copias (CNVs) se utilizó la herramienta bioinformática CNV Caller, incluida en el software VarSeq v2.1.0 (Golden Helix, Bozeman, MT). Dicha herramienta utiliza un algoritmo ya validado experimentalmente (84) basado en el análisis de profundidad de cobertura (PDC) en cada muestra, en comparación con un grupo de controles de referencia. La detección de un aumento o una disminución de

PDC respecto a los controles, sugiere una ganancia o pérdida respectivamente de material genómico. Ante la incorporación de una muestra de estudio a partir de sus archivos .VCF y .BAM, se escogen, de entre 100 controles, los 30 con la PDC más similar a la muestra. A partir de la *ratio* (entre la PDC de cada región de interés en la muestra y la media de las PDC de los controles en dicha región) y del *z-score* (obtenido mediante el cálculo de desviaciones estándar de la PDC de la muestra respecto de la media de PDC de los controles), se asigna un determinado tipo de CNV (diploidía normal, deleción en heterocigosis, deleción en homocigosis o duplicación). Además, el algoritmo utiliza las frecuencias alélicas en la muestra de las variantes detectadas para aumentar la fiabilidad de la asignación de un determinado tipo de CNV. Dos pacientes de nuestra cohorte presentaban alguna CNV conocida antes de su incorporación al estudio. El probando 36 presentaba una deleción completa de *PROP1* en homocigosis (27). El probando 53 presentaba una deleción que incluía el gen *ANOS1 (KAL1)*, diagnosticada previamente mediante CGH-array. En ambos pacientes se confirmó la presencia de las deleciones respectivas mediante la herramienta CNV Caller. No fueron detectadas otras CNVs en el resto de la cohorte.

## **2.7. Estudios de validación de las variantes**

Todas las variantes de interés identificadas mediante el ensayo de NGS dirigida fueron confirmadas en los probandos mediante amplificación por PCR y secuenciación Sanger de las secuencias de interés.

## **2.8. Validación del ensayo**

El diseño de los paneles HIPOPIT\_V1 e HIPOPIT\_V3 se ha validado experimentalmente mediante el análisis ciego de 10 muestras con mutaciones previamente identificadas y un estudio de 26 muestras con HIC. La cobertura media obtenida fue >100x, 99% de las secuencias alineadas con las secuencias diana con una cobertura >20x. Asimismo, el 100% de las variantes previamente identificadas mediante técnicas tradicionales fueron detectadas por el panel de NGS, confirmando de esta manera la óptima sensibilidad del ensayo. El análisis de las 26 muestras de ADN de pacientes con HIC (19 DCHH; 7 DSO) adicionales incluidas en el estudio piloto identificó variantes posiblemente patogénicas en

11/26 (42%), presentando 7 pacientes (27%) alteraciones relevantes en más de un gen). El estudio piloto permitió, por lo tanto, validar los protocolos experimentales para la realización del ensayo de secuenciación masiva dirigida en la cohorte de 114 pacientes reclutados.

## **2.9. Estudios de segregación alélica familiar**

Se realizó, mediante amplificación por PCR y secuenciación Sanger de las secuencias de interés, el estudio de los miembros familiares disponibles para determinar el patrón de segregación alélica de las variantes identificadas en los probandos. En el caso de la familia del probando 38 (ver *Resultados*, sección C) se realizó el estudio de todos los familiares disponibles mediante el panel de secuenciación masiva HIPOPIT\_V3, excepto en el feto aborto de dicha familia, en el que sólo fue posible realizar confirmación de variantes mediante secuenciación Sanger.

## **3. Variables de estudio**

Las variables fenotípicas recogidas para la descripción y/o análisis fueron:

Variables cuantitativas: Edad al diagnóstico (continua) y número de ejes adenohipofisarios afectados (discreta).

Variables cualitativas: Grupo diagnóstico (DCHH, DSO o DAGH-HP), sexo, clínica al diagnóstico, presencia o ausencia de cada una de las siguientes deficiencias hormonales (GH, TSH, ACTH, gonadotropinas y ADH), características de cada una de las siguientes estructuras en la imagen de RMN (adenohipófisis, neurohipófisis y tallo hipofisario), presencia o ausencia de un síndrome del tallo hipofisario completo en RMN [definido por la combinación de hipoplasia adenohipofisaria, neurohipófisis ectópica y tallo hipofisario interrumpido, no visible o adelgazado (85)], presencia o ausencia de algún antecedente obstétrico relevante [parto vaginal en presentación podálica, nacimiento por cesárea (en ambos casos con o sin complicaciones asociadas), parto instrumental, test de APGAR <8 a los 5 minutos o amenaza de aborto durante la gestación]. Dentro del grupo

diagnóstico de DSO se valoraron las siguientes dos variables cualitativas: tipo anatomoclínico de DSO (“DSO-plus” o “DSO aislada”) y presencia o ausencia de disfunción de algún eje adenohipofisario. Dentro del conjunto de pacientes formado por los grupos diagnósticos DCHH y DAGH-HP, se evaluó la siguiente variable cualitativa: presencia o ausencia de alteraciones extrahipofisarias (HIC sindrómico o HIC no sindrómico).

Para la evaluación de la presencia de deficiencias hormonales se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones. Se consideró como deficiencia de GH fuera del periodo neonatal, la presencia, ante una clínica sugestiva (talla baja, retraso del crecimiento, edad ósea retrasada), de niveles disminuidos para la edad y sexo de IGF-1 y/o IGFBP-3, junto con la presencia de dos pruebas de estímulo de GH con pico  $<7$  ng/ml. En el caso de neonatos y lactantes con clínica sugestiva de hipopituitarismo (hipoglucemia, colestasis, micropene), la presencia de niveles disminuidos de IGF-1, junto con la presencia de deficiencias de otros ejes hormonales hipofisarios y/o de alteraciones anatómicas hipotalámico-hipofisarias en RMN, se consideraron suficientes para establecer el diagnóstico, sin precisar recurrir a pruebas de estímulo de GH. Se consideró como deficiencia de TSH o hipotiroidismo central la presencia de niveles de T4 libre disminuidos para la edad con niveles de TSH normales o disminuidos para la edad. Se consideró como deficiencia de ACTH la presencia de niveles plasmáticos disminuidos de cortisol para la edad y sexo a las 8:00 de la mañana (o inferiores a  $18 \mu\text{g/dl}$  en situación de hipoglucemia), junto con niveles inadecuadamente normales o disminuidos de ACTH. Se consideró como deficiencia de gonadotropinas confirmada la presencia de un test de GnRH con pico de LH inferior a 5 UI/L en situación de pubertad retrasada o detenida, y dentro del contexto clínico de presencia de otras deficiencias hipofisarias. Se consideró igualmente confirmada dicha deficiencia en varones con signos clínicos sugestivos y niveles disminuidos de testosterona, LH y FSH durante el periodo de “minipubertad”. Los ejes lactotropo y melanotropo no han sido analizados en el presente estudio. Para la deficiencia de ADH, se consideró su diagnóstico si éste era referido por el clínico remitente del paciente. En los probandos en los que el clínico colaborador indicaba la presencia de una determinada deficiencia en el

cuestionario de datos clínicos, pero no se aportaban valores analíticos concretos, se aceptó la presencia de la misma.

Las variables relativas al resultado del estudio genético recogidas para la descripción y/o análisis fueron:

Variables cuantitativas: Número de variantes relevantes que cumplen los criterios de priorización, presentes en el mismo paciente (discreta).

Variables cualitativas: Presencia o ausencia de variante/s relevante/s (definidas por los criterios de priorización); presencia o ausencia de variante/s patogénica/s (según los criterios del ACMG); presencia o ausencia de variante/s patogénica/s, probablemente patogénica/s o VUS+ (según los criterios del ACMG); presencia o ausencia de oligogenicidad (presencia de variantes relevantes en 2 o más genes diferentes); gen afectado por cada variante relevante detectada; grupo o grupos a los que pertenece cada gen en el que se detectan variantes relevantes (ver **Anexo 3**).

#### **4. Método estadístico**

Estadística descriptiva: El estudio de la Normalidad de la distribución de las variables cuantitativas se ha realizado con el test de bondad de ajuste a la distribución Normal de Kolmogorov-Smirnov. Al no haberse demostrado distribución Normal en ninguna de las variables, las variables cuantitativas se resumen con la mediana y percentiles 25 y 75. Las variables cualitativas se resumen con el número absoluto de pacientes (n) en cada categoría y su porcentaje respecto al total de pacientes en los que está disponible el dato correspondiente a cada variable.

Estadística analítica: Las diferencias de las variables cuantitativas entre los distintos grupos de comparación, y ya que ninguna se aproxima a la distribución Normal, se han estudiado mediante la U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis según se comparen entre dos o tres grupos respectivamente. Las relaciones entre variables cualitativas se han estudiado mediante comparaciones de proporciones, con el test de chi-

cuadrado de Pearson siempre que las muestras sean suficientemente grandes (<20% de frecuencias esperadas inferiores a 5 en la tabla de contingencia del cruce de las dos variables), y prueba exacta de Fisher o la razón de verosimilitud según sean tablas de 2x2 o superiores respectivamente al analizar muestras pequeñas.

En todos los análisis se establece un nivel de significación inferior a 0,05 o, lo que es lo mismo, un nivel de confianza de al menos el 95%. En el caso de detección de asociación estadísticamente significativa (o próxima a dicha significación) entre dos variables cualitativas dicotómicas, se expresa, como medida de impacto de la asociación, el valor de la *odds ratio* (OR) y su intervalo de confianza al 95% (IC). En los casos en los que alguna de las casillas de la tabla de contingencia 2x2 presenta un valor de 0, no se expresa el valor de OR, por no ser éste calculable en dicha situación.

Todos los análisis se han realizado con el paquete estadístico SPSS 24.0. (Statistical Package for the Social Sciences. IBM Corp. Released 2016. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 24.0. Armonk, NY: IBM Corp).

## **5. Aprobación por el Comité de Ética e Investigación**

El presente estudio ha recibido la aprobación del Comité de Ética e Investigación (CEIm) del Hospital Universitario La Paz, Madrid (Código PI-3511).



# RESULTADOS

## A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR MEDIANTE EL PANEL HIPOPIT\_V1 DE LA COHORTE COMPLETA

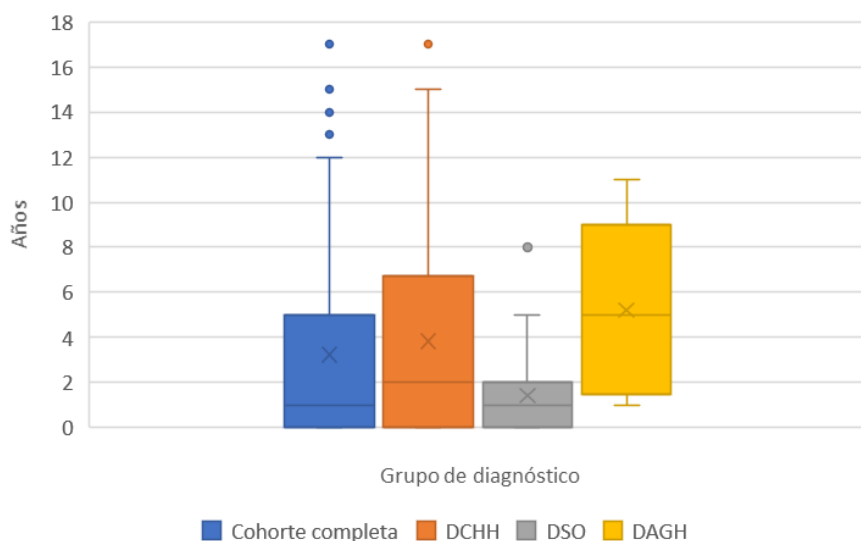
### A.1. Descripción clínica de la cohorte (Objetivo específico 1)

#### A.1.1. Características generales

Un total de 114 pacientes fueron incluidos en el estudio: 72 con DCHH (63,2%), 33 con DSO (28,9%) y 9 con DAGH-HP (7,9%). Al estar incluidas 2 parejas de hermanos (pacientes 17a, 17b, 71a y 71b), se trata de 112 grupos familiares no emparentados entre sí. El resumen del fenotipo de cada uno de los pacientes se muestra en el **Anexo 4**. Las características de la cohorte referentes al sexo, edad al diagnóstico y clínica en el momento del diagnóstico, se muestran en la **Tabla 2**.

En global, en la distribución por sexo predominan ligeramente los varones sobre las mujeres (1,3:1), a expensas de los grupos de DCHH (1,7:1) y de DAGH-HP (1,3:1). De manera opuesta predominan ligeramente las mujeres en el grupo de DSO (1:1,2). Sin embargo, estas diferencias no son significativas ( $p=0,26$ ). Tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas en el sexo entre los distintos subgrupos (DSO “aislada” / DSO-plus; DSO con disfunción hipofisaria / DSO sin disfunción hipofisaria; HIC sindrómico / HIC no sindrómico) (**Tabla 2**). 91 pacientes (81,4%) son de etnia caucásica. El origen poblacional en el resto se reparte entre: Turquía (6,2%), Marruecos (5,3%), etnia gitana, África subsahariana y Sudamérica (1,8% cada uno), y China (0,9%).

La edad al diagnóstico es, en global, generalmente temprana, con un 50% de los pacientes diagnosticados antes del año de vida, y un 75% antes de los 5 años, aunque con dispersión muy asimétrica (**Figura 7**). Existen diferencias en la distribución de la edad al diagnóstico entre los diferentes grupos ( $p=0,03$ ). El diagnóstico es más temprano y con menor dispersión, en el grupo de pacientes con DSO. El grupo de DCHH mantiene una distribución similar a la de la cohorte completa, y el grupo de DAGH-HP presenta el diagnóstico más tardío, con mediana de 5 años y una destacable mayor simetría en la dispersión. No existen diferencias reseñables en la edad al diagnóstico al comparar los distintos subgrupos de DSO e HIC.



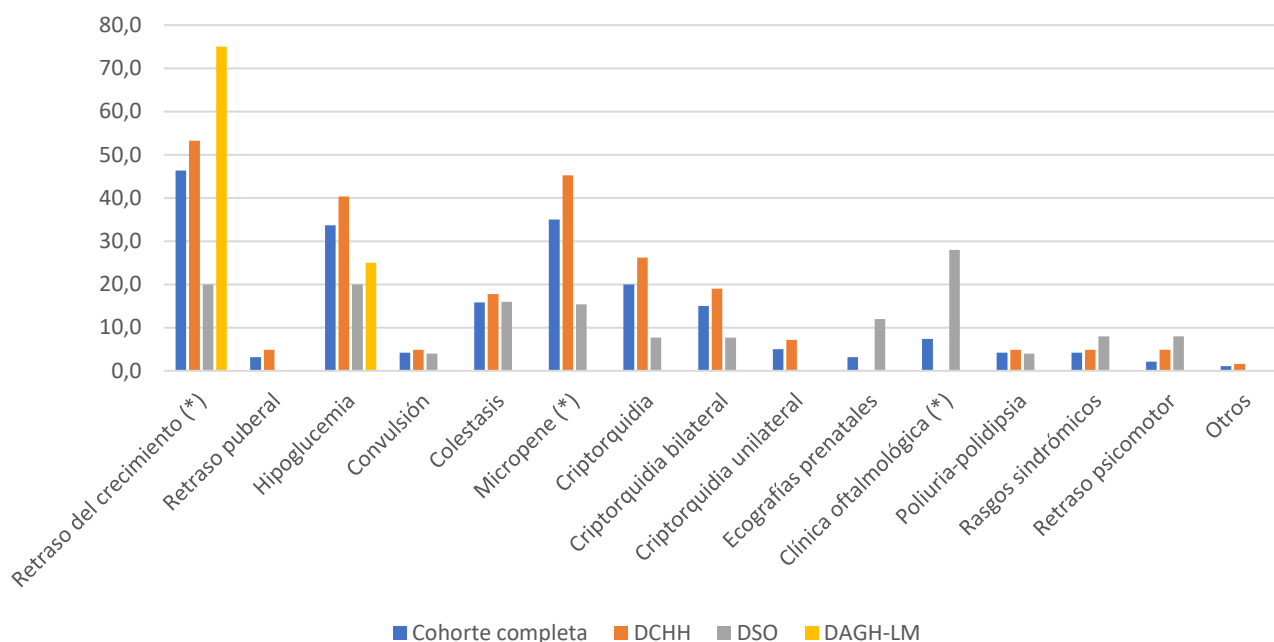
**Figura 7. Edad al diagnóstico de la cohorte completa y por grupos diagnósticos.** En azul, la cohorte completa; el rojo, el grupo de DCHH; en gris, el grupo de DSO; en naranja, el grupo de DAGH-HP. Los datos se muestran como diagrama de cajas y bigotes. Las cajas representan el rango intercuartílico (p25-p75), estando la mediana representada por una línea horizontal dentro de las cajas. Los bigotes muestran los valores máximo y mínimo, hasta un máximo de 1,5 veces el rango intercuartílico. En caso de superar ese máximo los valores extremos se muestran como puntos situados fuera de los bigotes.

El signo más frecuente en el momento del diagnóstico es, en global, el retraso del crecimiento (**Figura 8** y **Tabla 2**). Esto resulta cierto también para los grupos de DCHH y DAGH-HP. Si bien en el grupo de DAGH-HP sólo observamos retraso del crecimiento (en la gran mayoría) y en algunos casos hipoglucemias neonatales, en el grupo de DCHH, además de estas dos situaciones (con mayor relevancia de las hipoglucemias neonatales que en el grupo de DAGH-HP) se observa una clínica más variada, destacando por su frecuencia también la presencia en los varones de clínica genital (sobre todo micropene, y en menor medida criptorquidia). En el grupo de DSO la clínica más frecuente es la oftalmológica, si bien también se observan pacientes con signos clínicos dependientes de hipopituitarismo (con menor importancia relativa del retraso del crecimiento respecto a los otros dos grupos) y en algunos casos hallazgos ecográficos prenatales a nivel cerebral que orientaban al diagnóstico.

**Tabla 2. Número de pacientes, sexo, edad al diagnóstico y clínica al debut en la cohorte completa, por grupos diagnósticos y por subgrupos**

		Cohorte completa		DCHH		DSO		DAGH-HP		DSO "aislada"		DSO-plus		DSO sin disfunción hipofisaria		DSO con disfunción hipofisaria		HIC no sindrómico		HIC sindrómico	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Número (n) y porcentaje (%) DE PACIENTES</b>		114	100	72	63,2	33	28,9	9	7,9	23	69,7	7	21,2	8	24,2	24	72,7	40	49,4	33	40,7
<b>SEXO</b>	<b>MUJERES</b>	49	43,0	27	37,5	18	54,5	4	44,4	14	60,9	2	28,6	3	37,5	14	58,3	16	40,0	13	39,4
	<b>VARONES</b>	65	57,0	45	62,5	15	45,5	5	55,6	9	39,1	5	71,4	5	62,5	10	41,7	24	60,0	20	60,6
<b>EDAD AL DIAGNÓSTICO (años) mediana (p25-p75)</b>		1 (0-5)		2 (0-6,25)		1 (0-2)		5 (2,25-7,5)		0 (0-1,5)		0,5 (0-1)		0 (0-0)		0 (0-1)		2 (0-6,25)		0,6 (0-5)	
<b>CLÍNICA AL DEBUT</b>	<b>Pacientes con el dato disponible</b>	95	83,3	62	86,1	25	75,8	8	88,9	16	69,6	6	85,7	3	37,5	21	87,5	37	92,5	30	90,9
	<b>Retraso del crecimiento</b>	44	<b>46,3</b>	33	<b>53,2</b>	5	20	6	<b>75</b>	3	18,8	1	16,7	-	-	5	23,8	21	<b>56,8</b>	15	<b>50</b>
	<b>Retraso puberal</b>	3	3,2	3	4,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	5,4	1	3,3
	<b>Hipoglucemia</b>	32	33,7	25	40,3	5	20	2	25	4	25	1	16,7	-	-	5	23,8	15	40,5	12	40
	<b>Convulsión</b>	4	4,2	3	4,8	1	4	-	-	-	-	1	16,7	-	-	1	4,8	2	5,4	1	3,3
	<b>Colestasis</b>	15	15,8	11	17,7	4	16	-	-	3	18,8	1	16,7	-	-	4	19,0	6	16,2	5	16,7
	<b>Micropene (§)</b>	21	35	19	45,2	2	15,4	-	-	2	28,5	-	-	-	-	2	20	10	41,7	9	45
	<b>Criptorquidia (§)</b>	12	20	11	26,2	1	7,7	-	-	-	-	1	20	-	-	1	10	2	8,3	9	45
	<b>Criptorquidia bilateral (§)</b>	9	15	8	19,0	1	7,7	-	-	-	-	1	20	-	-	1	10	2	8,3	6	30
	<b>Criptorquidia unilateral (§)</b>	3	5	3	7,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	15
	<b>Ecografías prenatales</b>	3	3,2	-	-	3	12	-	-	2	12,5	1	16,7	1	33,3	2	9,5	-	-	-	-
	<b>Clínica oftalmológica</b>	7	7,4	-	-	7	<b>28</b>	-	-	6	<b>37,5</b>	-	-	1	33,3	6	28,6	-	-	-	-
	<b>Poliuria-polidipsia</b>	4	4,2	3	4,8	1	4	-	-	1	6,3	-	-	-	-	1	4,8	3	8,1	-	-
	<b>Rasgos sindrómicos</b>	4	4,2	3	4,8	2	8	-	-	1	6,25	1	16,7	-	-	2	9,5	-	-	2	6,7
	<b>Retraso psicomotor</b>	2	2,1	3	4,8	2	8	-	-	1	6,25	-	-	1	33,3	-	-	-	-	-	-
<b>Otros</b>	1	1,1	1	1,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	3,3	

Se muestran los datos correspondientes a la cohorte completa, a los 3 grupos de diagnóstico principales, y a los distintos subgrupos analizados. Se resalta el dato clínico al debut más frecuente en cada uno de los grupos (no se resalta ninguno si no hay predominio claro de ninguno). Los datos de % se calculan respecto al número total de pacientes en los que está disponible el dato de cada una de las variables. (§): Los cálculos de % de micropene y criptorquidia están realizados sólo sobre los varones con disponibilidad del dato (cohorte completa: n=60, DCHH: n=42, DSO: n=13, DAGH: n=5). **DCHH**: Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **DSO**: Displasia septo-óptica; **DAGH-HP**: Deficiencia aislada de GH con anomalías hipofisarias en RMN; **HIC**: Hipopituitarismo congénito.



**Figura 8. Clínica al diagnóstico en la cohorte completa y por grupos diagnósticos.** En azul, la cohorte completa; el rojo, el grupo de DCHH; en gris, el grupo de DSO; en naranja, el grupo de DAGH-HP. La altura de cada barra representa el porcentaje de pacientes con ese signo clínico en el momento del diagnóstico.

(\*) Diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos diagnósticos ( $p < 0.05$ )

En el subgrupo de DSO “aislada” predomina la clínica oftalmológica al debut, lo que contrasta con el subgrupo DSO-plus, en el que éste no es un dato clínico de sospecha inicial, pero la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0.13$ ). Los signos oftalmológicos también son el hallazgo al diagnóstico más frecuente en el subgrupo DSO con disfunción hipofisaria, pero seguido de cerca por signos relacionados con la disfunción hormonal. Como es lógico, el subgrupo de DSO sin disfunción hipofisaria no muestra signos al diagnóstico relacionados con disfunción hormonal. No existen grandes diferencias en la clínica al debut entre los casos de HIC sindrómico y no sindrómico, si bien llama la atención una mayor presencia de criptorquidia entre los pacientes con HIC sindrómico [ $p=0.012$ , OR 9 (IC 1.7-49)], además de la presencia lógica de algunos casos con rasgos faciales sindrómicos (**Tabla 2**).

### A.1.2. Deficiencias hormonales hipofisarias

El eje más frecuentemente alterado en la cohorte completa fue el somatotropo, seguido en orden del tirotropo, corticotropo y gonadotropo (**Tabla 3**). Cabe resaltar que, en más de un tercio de los pacientes, por su edad prepuberal, no ha sido posible aún realizar una confirmación analítica definitiva de deficiencia de gonadotropinas.

**Tabla 3. Afectación de los distintos ejes hormonales hipofisarios en la cohorte completa, por grupos diagnósticos y en el subgrupo de DSO con HIC**

DEFICIENCIAS HORMONALES HIPOFISARIAS	Cohorte completa		DCHH		DSO		DSO con disfunción hipofisaria		DAGH-HP		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
Dato no disponible	6		5		1		0		0		
Pacientes con datos disponibles	108		67		32		24		9		
GH	Sí (*)	93	86,1	66	98,5	18	56,3	18	75,0	9	100
	Desconocido	2	1,9	1	1,5	1	3,1	1	4,2	0	0
TSH (*)	75	69,4	62	92,5	13	40,6	13	54,2	0	0	
ACTH	60	55,6	43	64,2	17	53,1	17	70,8	0	0	
LH/FSH	Sí (*)	37	34,3	35	52,2	2	6,3	2	8,3	0	0
	Desconocido	40	37,0	24	35,8	14	43,8	10	41,7	2	22,2
ADH	11	10,2	6	9,0	5	15,6	4	16,7	0	0	

*La columna DSO con disfunción hipofisaria hace referencia exclusivamente al subgrupo de 24 pacientes con DSO que asocian alguna deficiencia hormonal a nivel hipofisario. Los datos de % se calculan respecto al número total de pacientes en los que está disponible el dato de cada una de las variables. Se resaltan las deficiencias hormonales que se presentan en más de la mitad de los pacientes en cada grupo. (\*) Diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de DCHH y DSO ( $p < 0.05$ ). DCHH: Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; DSO: Displasia septo-óptica; DAGH-HP: Deficiencia aislada de GH con anomalías hipofisarias en RMN.*

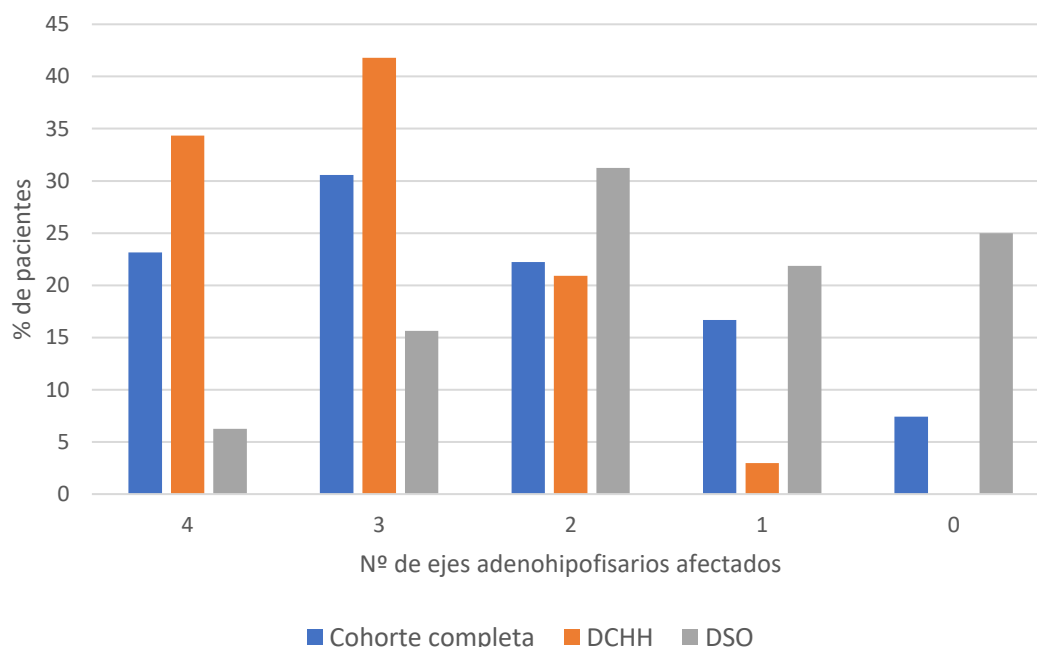
En el grupo de DCHH, la deficiencia de GH aparece en todos los pacientes de los que se dispone del dato clínico (salvo en un único caso en el que no se pudo confirmar clínicamente la deficiencia de GH por fallecimiento a los pocos meses de vida), seguida de la deficiencia de TSH, en más del 90% de los pacientes. Como es obvio, en el grupo de DAGH-HP, el 100% de los pacientes presenta deficiencia de GH, y ninguno asocia ninguna otra deficiencia. No existen diferencias reseñables en la afectación de los distintos ejes hipofisarios entre los subgrupos de HIC sindrómico y no sindrómico.

En el grupo de DSO, si bien el eje somatotropo es también el más frecuentemente alterado, ocurre con menor frecuencia que en los otros grupos (56,3%). En este grupo, la deficiencia de ACTH (presente en el 53,1%) supera a la de TSH (presente en el 40,6%). Sólo el 6,3% de pacientes con DSO presentaba disfunción del eje gonadal. 8 de los pacientes cumplen criterios diagnósticos de DSO sin presentar deficiencias hormonales. Si nos fijamos sólo en el subgrupo de 24 pacientes con DSO con disfunción hipofisaria (el 75% de los pacientes del grupo de DSO), el porcentaje de pacientes que presentan afectación en cada uno de los ejes se eleva de manera proporcional respecto al del grupo global de DSO, pero siguen siendo inferiores a los que presenta el grupo de DCHH (**Tabla 3**), de manera estadísticamente significativa en las deficiencias de GH [ $p=0,001$ , OR 0,05 (IC 0,01-0,4)], en la deficiencia de TSH [ $p<0,001$ , OR 0,1 (IC 0,03-0,32)] y en la deficiencia de gonadotropinas [ $p<0,001$ , OR 0,04 (IC 0,01-0,2)]. En el subgrupo de DSO “aislada” la deficiencia más frecuente es la de GH (59,1%), seguida de la de ACTH (50%) y TSH (36,4%). En el grupo de DSO-plus, las deficiencias más frecuentes son las de TSH (57,1%) y ACTH (57,1%), seguidas de la de GH (42,9%). Sin embargo, ninguna de estas diferencias entre los dos subgrupos anatomoclínicos de DSO alcanza la significación estadística.

El número de ejes hormonales afectados es mayor en el grupo de DCHH, que en el grupo de DSO, incluso excluyendo a los pacientes con DSO sin disfunción hipofisaria ( $p<0,001$ ) (**Figura 9**). No se objetivan hallazgos relevantes entre los distintos subgrupos en esta variable.

Disponemos de datos sobre el tratamiento con rhGH (grado de respuesta clínica en opinión del clínico colaborador) en 51 de los 114 pacientes (44,7%). De ellos, 16 no recibieron dicho tratamiento (por no presentar deficiencia de GH o por algún otro motivo dentro del contexto clínico). Entre los que recibieron tratamiento, el 91,4% tuvo una adecuada respuesta al mismo en opinión del clínico que realiza su seguimiento médico. Dos pacientes (uno con DCHH y otro con DAGH-HP), que suponen el 5,7%, tuvieron una respuesta intermedia o parcial, y un paciente (2,9%), presentó mala respuesta (un caso de DCHH).

Estos tres pacientes sin buena respuesta pertenecen al subgrupo de HIC sindrómico.



**Figura 9. Porcentaje de pacientes según el número de ejes adenohipofisarios afectados, en la cohorte completa, en el grupo de DCHH y en el grupo de DSO.** En el grupo de DCHH (barras naranjas) predominan los pacientes con deficiencia en 3 o 4 ejes, y en el grupo de DSO (barras grises), los pacientes con ninguna, 1 o 2 deficiencias. No se muestra el grupo de DAGH-HP (100% de pacientes con un único eje afectado).

### A.1.3. Alteraciones hipofisarias en la imagen de RMN

Los hallazgos a nivel hipofisario en la imagen de RMN, en la cohorte completa y en los distintos grupos de patología, se muestran en la **Tabla 4**. En global, el hallazgo más frecuente es la disminución de volumen adenohipofisario (75,8%), con un rango de expresión desde una hipoplasia leve a una agenesia completa. La DSO es el grupo en el que se observa normalidad de la imagen de RMN hipofisaria con mayor frecuencia, lo cual no depende exclusivamente del hecho de que algunos pacientes con DSO no presenten deficiencias hipofisarias, ya que considerando sólo los pacientes del subgrupo de DSO con disfunción hipofisaria, la frecuencia de normalidad de la RMN hipofisaria sigue siendo mayor que en los grupos DCHH y DAGH-HP (**Tabla 4**). Mientras la hipoplasia de



adenohipófisis se presenta en la gran mayoría de pacientes con DCHH (y en el 100% en el caso de la DAGH-HP), sólo lo hace en la mitad aproximadamente de los casos de DSO ( $p=0,001$ ), y en la otra mitad la adenohipófisis es normal. En el caso de la neurohipófisis, su ubicación ectópica aparece en dos tercios de los pacientes con DCHH, en la mitad de los del grupo de DAGH-HP, y sólo en una cuarta parte de los pacientes con DSO ( $p=0,002$ ). En cambio, la ausencia de neurohipófisis (o neurohipófisis no visible) se presenta en una proporción casi idéntica en los tres grupos, en torno al 25%. El único hallazgo patológico que resulta más frecuente en el grupo de DSO es el tallo hipofisario adelgazado (26,1%), frente a los grupos de DCHH (10%) y DAGH-HP (12,5%), aunque esta diferencia no alcanza la significación estadística ( $p=0,089$ ). Sin embargo, en global, la presencia de alguna alteración del tallo hipofisario es más frecuente en los grupos de DCHH (80%) y DAGH-HP (75%) que en el grupo de DSO (52,2%) ( $p=0,049$ ), y el hallazgo más frecuente a este nivel es el tallo ausente o interrumpido. El hallazgo de una triada hipofisaria o síndrome del tallo hipofisario interrumpido está presente en aproximadamente la mitad de los casos de DCHH y DAGH-HP, y sólo en un paciente perteneciente al grupo de DSO (4,3%) ( $p=0,007$ ).

En el análisis de los subgrupos cabe destacar algunos hallazgos. En los cuatro subgrupos de DSO, la frecuencia de una hipoplasia adenohipofisaria es prácticamente idéntica, aproximadamente del 50%. En cambio, la frecuencia de una neurohipófisis ectópica o no visible es mayor en el subgrupo de DSO con disfunción hipofisaria (60%) que en el de DSO sin disfunción hipofisaria (0%) ( $p=0,016$ , OR no calculable). Esto sugiere que, a diferencia de lo que ocurre con la presencia de hipoplasia adenohipofisaria, en pacientes con DSO, la neurohipófisis ectópica o no visible se asocia con una mayor probabilidad de desarrollar disfunción hormonal. Aunque se observa una relativa mayor frecuencia de alteraciones de neurohipófisis en el subgrupo de DSO “aislada” (55%) que en el de DSO-plus (16,7%), así como de tallo hipofisario interrumpido o no visible en los subgrupos de DSO con disfunción hipofisaria y DSO “aislada” (aproximadamente un tercio de los casos en ambos subgrupos), y en ningún caso de DSO sin disfunción hipofisaria y DSO-plus, estas diferencias no son estadísticamente significativas. Los únicos 3 casos en los que se ha encontrado

algún tipo de masa a nivel hipofisario son 3 pacientes con DCHH no sintomática. No se observan otras diferencias relevantes entre los hallazgos de RMN de los subgrupos de HIC sintomático y no sintomático.

**Tabla 4. Hallazgos de imagen de RMN a nivel hipofisario en la cohorte completa, por grupos de diagnóstico y en el subgrupo de DSO con disfunción hipofisaria.**

RMN		Cohorte completa		DCHH		DSO		DSO con disfunción hipofisaria		DAGH-HP	
		n	%	n	%	n	%	n	%	N	%
<b>Nº de pacientes en cada grupo</b>		114		72		33		24		9	
<b>Adenohipófisis</b>	<b>Pacientes con el dato disponible</b>	99	86,8	61	84,7	29	87,9	23	95,8	9	100
	Hipoplasia o agenesia (*)	75	75,8	<b>51</b>	<b>83,6</b>	<b>15</b>	<b>51,7</b>	<b>12</b>	<b>52,2</b>	<b>9</b>	<b>100</b>
	Masa	3	3,0	3	4,9	-	-	-	-	-	-
	Normal (*)	21	21,2	<b>7</b>	<b>11,5</b>	<b>14</b>	<b>48,3</b>	<b>11</b>	<b>47,8</b>	-	-
<b>Neurohipófisis</b>	<b>Pacientes con el dato disponible</b>	90	78,9	57	79,2	25	75,8	20	83,3	8	88,9
	Ectópica (*)	47	52,2	<b>37</b>	<b>64,9</b>	<b>6</b>	<b>24</b>	<b>6</b>	<b>30</b>	<b>4</b>	<b>50</b>
	No visible	22	24,4	14	24,6	6	24	6	30	2	25
	Ectópica o No visible (*)	69	76,7	<b>51</b>	<b>89,5</b>	<b>12</b>	<b>48</b>	<b>12</b>	<b>60</b>	<b>6</b>	<b>75</b>
	Hipoplástica	2	2,2	-	-	2	8	-	-	-	-
	Normal (*)	19	21,1	<b>6</b>	<b>10,5</b>	<b>11</b>	<b>44</b>	<b>8</b>	<b>40</b>	<b>2</b>	<b>25</b>
<b>Tallo hipofisario</b>	<b>Pacientes con el dato disponible</b>	81	71,1	50	69,4	23	69,7	18	75	8	88,9
	No visible o interrumpido (*)	45	55,6	<b>34</b>	<b>68</b>	<b>6</b>	<b>26,1</b>	<b>6</b>	<b>33,3</b>	<b>5</b>	<b>62,5</b>
	Adelgazado	12	14,8	5	10	6	26,1	4	22,2	1	12,5
	Leve engrosamiento	1	1,2	1	2	-	-	-	-	-	-
	Normal (*)	23	28,4	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>11</b>	<b>47,8</b>	<b>8</b>	<b>44,4</b>	<b>2</b>	<b>25</b>
<b>NH ectópica + tallo interrumpido, no visible o adelgazado (*)</b>		35	42,7	<b>29</b>	<b>58</b>	<b>2</b>	<b>8,3</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>4</b>	<b>50</b>
<b>Tríada hipofisaria completa (AH hipoplásica + NH ectópica + Tallo no visible, interrumpido o adelgazado) (*)</b>		31	43,7	<b>26</b>	<b>52</b>	<b>1</b>	<b>4,3</b>	<b>1</b>	<b>5,3</b>	<b>4</b>	<b>50</b>

Los datos de % se calculan respecto al número total de pacientes en los que está disponible el dato en cada variable.

(\*) Variables en las que se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos diagnósticos ( $p < 0.05$ ), cuyos resultados se resaltan en la tabla; La significación estadística se mantiene al excluir a los pacientes con DSO sin HIC; Las diferencias entre el grupo DAGH-HP y ambos grupos de DSO sólo alcanzan la significación  $p < 0.05$  en las anomalías de la adenohipófisis. **DCHH**: Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **DSO**: Displasia septo-óptica; **DAGH-HP**: Deficiencia aislada de GH con anomalías hipofisarias en RMN; **HIC**: Hipopituitarismo congénito.

#### A.1.4. Antecedentes obstétricos

Observamos diferencias significativas entre los tres grupos diagnósticos principales en la proporción de pacientes con antecedentes obstétricos potencialmente relevantes ( $p=0,011$ ). Existe menor frecuencia de parto normal en el grupo de DCHH (55,1%), que en el grupo de DSO (76,7%) y en el de DAGH-HP (100%, si bien sólo 6 pacientes en el grupo DAGH-HP son analizables en este aspecto). La diferencia específicamente entre los grupos de DCHH y DSO se queda en el límite de la significación estadística [ $p=0,054$ , OR 2,7 (IC 0,97-7,4)], pero sugiere una influencia mayor de los eventos obstétricos en el fenotipo de DCHH que en el de DSO. Todos los pacientes con DSO que tuvieron cualquiera de los eventos perinatales presentan disfunción hipofisaria o, lo que es lo mismo, ningún paciente del grupo de DSO sin disfunción hipofisaria tuvo ningún evento perinatal (sólo es reseñable un caso de DSO sin disfunción hipofisaria, en concreto un caso de DSO-plus, que presentó una amenaza de aborto a las 6 semanas), si bien con el tamaño muestral actual esta diferencia dista mucho de resultar significativa ( $p=0,635$ ). Se observa mayor frecuencia de eventos perinatales en el grupo de DSO-plus que en el grupo de DSO “aislada”, pero de nuevo, no se alcanza la significación estadística ( $p=0,09$ ). La frecuencia de eventos perinatales es similar entre los subgrupos de HIC sindrómico (42,3%) y no sindrómico (37,9%). Sin embargo, ningún paciente con HIC sindrómico presentó parto en presentación podálica, mientras que este tipo de parto se presentó en 5 de los pacientes con HIC no sindrómico (17,2%), diferencia próxima al límite de la significación estadística ( $p=0,053$ ). Los eventos obstétricos de cada grupo y subgrupo se muestran en la **Tabla 5**.

La presencia de antecedentes obstétricos relevantes se asoció, respecto al antecedente de embarazo y parto normales, con una mayor frecuencia de ectopia o ausencia de neurohipófisis [92% *versus* 64,6%,  $p=0,039$ , OR 5,6 (IC 1,2-26,8)], de hipoplasia o agenesia adenohipofisaria [(96% *versus* 68,5%,  $p=0,016$ , OR 10,4 (IC 1,3-83,5)] y de síndrome del tallo hipofisario interrumpido o tríada hipofisaria [(70,6% *versus* 40,5%,  $p=0,047$ , OR 3,5 (IC 1,1-11,9)].

**Tabla 5. Datos obstétricos relevantes como potenciales factores o cofactores etiológicos, en la cohorte, por grupos de diagnóstico y por subgrupos.**

DATOS OBSTÉTRICOS POTENCIALMENTE RELEVANTES	Cohorte completa		DCHH		DSO		DAGH-HP		DSO "aislada"		DSO-plus		DSO sin DH		DSO con DH		HIC no sindrómico		HIC sindrómico	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Pacientes con datos disponibles sobre embarazo y parto	85		49		30		6		22		6		8		21		29		26	
<b>EMBARAZO Y PARTO NORMALES</b>	56	65,9	27	55,1	23	76,7	6	100	19	86,4	3	50	7	87,5	15	71,4	18	62,1	15	57,7
<b>ALGÚN EVENTO OBSTÉTRICO</b>	29	34	22	44,9	7	23,3	-	-	3	13,6	3	50	1	12,5	6	28,6	11	37,9	11	42,3
Parto en podálica	7	8,2	5	10,2	2	6,7	-	-	1	4,5	1	16,7	-	-	2	9,5	5	17,2	-	-
Parto en podálica SIN otros eventos asociados	2	2,4	2	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6,9	-	-
Parto en podálica CON otros eventos asociados (*)	5	5,9	3	6,1	2	6,7	-	-	1	4,5	1	16,7	-	-	2	9,5	3	10,3	-	-
Cesárea	10	11,8	9	18,4	1	3,3	-	-	-	-	1	16,7	-	-	1	4,8	4	13,8	5	19,2
Cesárea por RPBF o asociada a otros eventos (**)	5	5,9	4	8,2	1	3,3	-	-	-	-	1	16,7	-	-	1	4,8	2	6,9	2	7,7
Cesárea por presentación podálica, sin RPBF	2	2,4	2	4,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	7,7
Cesárea por otros motivos, sin RPBF, ni asociada a otros eventos (***)	3	3,5	3	6,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	6,9	1	3,8
Parto instrumental	7	8,2	5	10,2	2	6,7	-	-	2	9,1	-	-	-	-	2	9,5	1	3,4	4	15,4
APGAR 5 minutos <8	10	11,8	7	14,3	3	10	-	-	1	4,5	1	16,7	-	-	3	14,3	2	6,9	5	19,2
APGAR 5 minutos <6	4	4,7	1	2,0	3	10	-	-	1	4,5	1	16,7	-	-	3	14,3	1	3,4	-	-
Amenaza de aborto (****)	4	4,7	3	6,1	1	3,3	-	-	-	-	1	16,7	1	12,5	-	-	2	6,9	1	3,8
Otros (*****)	2	2,4	1	2,0	1	3,3	-	-	1	4,5	-	-	-	-	1	4,8	1	3,4	-	-

Los datos de % se calculan respecto al número total de pacientes en los que están disponibles datos sobre el embarazo y parto.

(\*) Incluye: test de APGAR <8 a los 5 minutos, prolapso de cordón.

(\*\*) Incluye: 4 casos (3 DCHH y 1 DSO) de cesárea por RPBF (uno de ellos, DCHH, también estaba en presentación podálica), y un caso (DCHH) de cesárea por no progresión sin RPBF, pero asociada a una amenaza de aborto en las primeras semanas de gestación.

(\*\*\*) Incluye: un caso (DCHH) de útero bicornes y dos casos (DCHH) de no progresión del parto sin RPBF.

(\*\*\*\*) Incluye: un caso de DCHH con FIV y amenaza de aborto a los 4 meses y un caso de DSO con amenaza de aborto a las 6 semanas.

(\*\*\*\*\*) Incluye: un caso de DCHH con hemorragia intraparto + nudo de cordón umbilical y un caso de DSO con prolapso de cordón en el contexto de un parto en presentación podálica.

**RPBF:** Riesgo de pérdida de bienestar fetal; **DCHH:** Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **DSO:** Displasia septo-óptica; **DAGH-HP:** Deficiencia aislada de GH con anomalías hipofisarias en la RMN; **DH:** Disfunción hipofisaria; **HIC:** Hipopituitarismo congénito.

El número de ejes hormonales afectados fue mayor en el grupo de pacientes con algún evento obstétrico [mediana (p25-p75): 3 (3-4)] que entre los pacientes sin ningún evento de este tipo [mediana (p25-p75): 2 (1-3)] ( $p=0,001$ ). De manera independiente, cada uno de los ejes adenohipofisarios presentó mayor probabilidad de deficiencia entre los pacientes con eventos obstétricos que entre los pacientes con embarazo y parto normales (**Tabla 6**). En cambio, la proporción de pacientes con diabetes insípida fue mayor en el grupo con embarazo y parto normales, si bien la diferencia no es estadísticamente significativa ( $p=0,14$ ).

**Tabla 6. Presencia o ausencia de deficiencia en cada uno de los ejes hipofisarios en función de la presencia o ausencia de eventos obstétricos relevantes**

Deficiencia de:		ALGÚN EVENTO OBSTÉTRICO		EMBARAZO Y PARTO NORMALES		Significación estadística
		n	%	n	%	
GH	Presente	26	<b>96,3</b>	43	<b>78,2</b>	p=0,051 (*)
	Ausente	1	3,7	12	21,8	
TSH	Presente	25	<b>86,2</b>	34	<b>61,8</b>	p=0,02
	Ausente	4	13,8	21	38,2	
ACTH	Presente	24	<b>82,8</b>	25	<b>45,5</b>	p=0,001
	Ausente	5	17,2	30	54,5	
LH/FSH (**)	Presente	12	<b>70,6</b>	11	<b>36,7</b>	p=0,025
	Ausente	5	29,4	19	63,3	
ADH	Presente	1	<b>3,5</b>	8	<b>14,5</b>	P=0.14
	Ausente	28	96,5	47	85,5	

Los % están calculados sobre el total de pacientes de cada grupo en los que está disponible el dato de cada variable. Se resaltan los porcentajes de presencia de cada deficiencia en cada grupo de pacientes según la presencia o ausencia de eventos obstétricos.

(\*) El nivel de significación estadística en la deficiencia de GH está posiblemente influido por el escaso número de pacientes sin deficiencia de GH incluidos en la cohorte.

(\*\*) El menor valor de n en la categoría de deficiencia de LH/FSH se debe a la elevada proporción de pacientes en los que no ha sido posible aún confirmar analíticamente la presencia de esta deficiencia debido a su edad prepuberal.

## **A.2. Resultados del estudio genético mediante panel de NGS**

### **(Objetivos específicos 2-7)**

#### **A.2.1. Resultados del estudio genético en la cohorte completa**

Tras llevar a cabo el estudio genético mediante el panel de secuenciación masiva dirigida HIPOPIT\_V1, se han detectado variantes relevantes (que cumplen los criterios de priorización establecidos) en el 75,4% de los pacientes incluidos en el estudio (**Tabla 7**). Se han encontrado variantes patogénicas (según criterios ACMG) en el 15,8% de los pacientes. El 32,5% de los pacientes presenta al menos alguna variante patogénica, probablemente patogénica o VUS+. En el **Anexo 5** se muestran las variantes relevantes detectadas en cada uno de los pacientes, así como las características principales de cada una de las mismas.

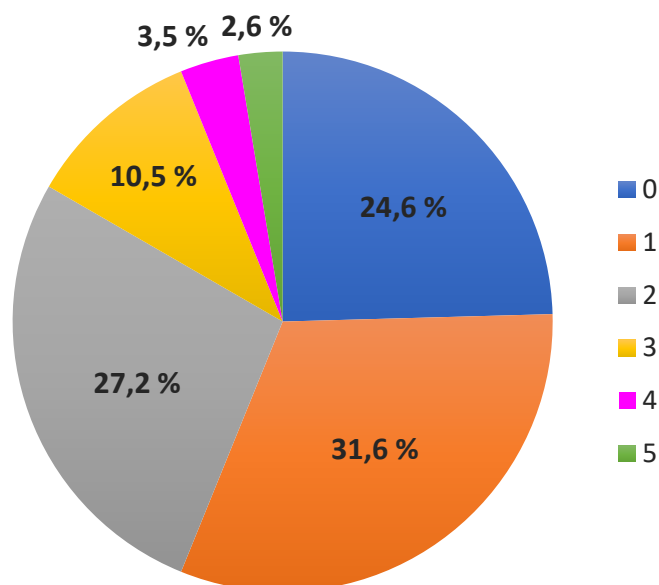
Entre los 3 grupos diagnósticos principales, la proporción de pacientes con alguna variante relevante, con alguna variante patogénica, y con alguna variante patogénica, probablemente patogénica o VUS+ es similar en todos (**Tabla 7**).

**Tabla 7. Número de pacientes con variantes relevantes detectadas, en la cohorte completa y por grupos de diagnóstico.**

PACIENTES CON:	Cohorte completa		DCHH		DSO		DAGH-HP	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Alguna variante	86	75,4	54	75	25	75,8	7	77,8
Ninguna variante	28	24,6	18	25	8	24,2	2	22,2
<b>TOTAL</b>	114	100	72	100	33	100	9	100
<b>Según la clasificación ACMG, pacientes con al menos alguna variante:</b>								
- Patogénica	18	15,8	12	16,7	4	12,1	2	22,2
- Probablemente patogénica	9	7,9	6	8,3	3	9,1	-	-
- VUS+	10	8,8	4	5,6	5	15,2	1	11,1
- VUS	46	40,4	31	43,1	11	33,3	4	44,4
- Sólo variantes benignas o probablemente benignas	3	3,5	1	1,4	2	6,1	-	-
<b>Pacientes con alguna variante patogénica, probablemente patogénica o VUS+</b>	37	32,5	22	30,6	12	36,4	3	33,3

*DCHH: Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; DSO: Displasia septo-óptica; DAGH-HP: Deficiencia de GH con anomalías hipofisarias en RMN; VUS: Variante de significado incierto; VUS+: Variante de significado incierto de especial relevancia por alguna de sus características (ver apartado 2.5 de "Materiales y métodos").*

Encontramos 2 o más variantes relevantes en el 43,9% de los pacientes en la cohorte completa. Entre los tres grupos diagnósticos principales, las diferencias en la proporción de pacientes con esta situación de posible oligogenicidad (DCHH 45,8%, DSO 36,4%, DAGH-HP 55,6%) no son significativas estadísticamente ( $p=0,503$ ) El número de variantes por paciente en la cohorte completa se muestra en la **Figura 10**.



**Figura 10. Porcentaje de pacientes, según el número de variantes que presenta.** Casi la mitad de los pacientes presentan 2 o más variantes, con un máximo de 5 variantes en un mismo paciente en el caso de 3 probandos (2.6%).

Ha sido posible realizar estudio genético familiar en el 61,2% de los casos en los que se ha encontrado alguna variante en el probando. A través del mismo, se ha podido detectar el aparente carácter *de novo* en el 4,9% de las variantes en las que ha sido posible el estudio familiar, herencia materna en el 46,3%, paterna en el 35,4% y presencia en ambos progenitores en el 11%.

Los genes en los que se presentan más variantes relevantes en global son *CHD7* (11,5% de las 165 variantes totales) y *GLI2* (9,7%), seguidos de *PCSK1* (8,5%), *PROP1*, *PROKR2* y *PTCH1* (3,6% cada uno, respectivamente).

Si nos fijamos exclusivamente en las 19 variantes clasificadas como patogénicas por criterios ACMG, 5 de ellas se presentan en *PROP1* (26,3%), 4

en *GLI2* (21,1%), 3 en *PROKR2* (15,8%), 3 en *SEMA3A* (15,8%), 1 en *SOX2* (5,3%), 1 en *BMP4* (5,3%), 1 en *ANOS1 (KAL1)* (5,3%) y 1 en *TDGF1* (5,3%).

Atendiendo al conjunto de 46 variantes entre patogénicas, probablemente patogénicas y VUS+, el gen con mayor número de este tipo de variantes es *GLI2* (19,6% de este tipo de variantes), seguido de *PROP1* y *PROKR2* (10,9% cada uno), *SPRY4* (8,7%), *SEMA3A* (6,5%), *LHX3* y *OTX2* (4,3% cada uno).

Por tanto, independientemente del umbral elegido de confianza en la posible patogenidad de las variantes identificadas, se puede observar cómo, considerados individualmente, ***PROP1*, *GLI2* y *PROKR2* son los genes en los que con mayor frecuencia se identifican variantes con elevada probabilidad de patogenidad entre las variantes encontradas en la cohorte completa.**

Para aproximarnos a la importancia relativa de los diferentes grupos de genes (atendiendo principalmente a las vías de señalización con las que éstos se relacionan) en la etiología de las patologías incluidas en nuestra cohorte, se muestra en la **Tabla 8** la proporción de variantes detectadas afectando a genes de cada uno de los grupos (ver **Anexo 3**). En global, la vía de señalización en la que se encuentran más variantes relevantes es la vía SHH, seguida de la vía WNT.

Un porcentaje muy importante de las variantes encontradas en nuestra cohorte (de manera parecida en los distintos niveles de confianza en su patogenidad) afecta a genes previamente implicados en la etiología del HHC (35,8% de las 165 variantes) y la HPE (21,8%) (**Tabla 8**). Esto demuestra la existencia de un solapamiento genético entre dichas dos patologías y el espectro de patologías incluidas en este estudio.

El grupo de genes “clásicos” implicados en el desarrollo hipofisario (*PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4* y *HESX1*) aparece como uno de los principales al evaluar exclusivamente las variantes clasificadas como patogénicas por los criterios ACMG (**Tabla 8**), a expensas de los 5 pacientes con DCHH (2 de ellos hermanos entre sí) en los que se ha encontrado alguna variante patogénica en *PROP1* en homocigosis.



**Tabla 8. Número y porcentaje de variantes afectando a los distintos grupos de genes según la vía de señalización, función o patología con la que se relacionan (ver Anexo 3)**

Tipo de variantes	Grupos de genes (detalles en Anexo 3)	Cohorte completa		DCHH		DSO		DAGH-HP	
		n	%	n	%	n	%	n	%
<b>GRUPO COMPLETO DE VARIANTES</b> (n=165)	Genes relacionados con las vías <b>WNT</b>	28	<b>17</b>	20	18,3	6	14,6	2	13,3
	Genes relacionados con la vía <b>SHH</b>	43	<b>26,1</b>	25	22,9	12	29,3	6	40
	Genes relacionados con la vía <b>FGF</b>	20	12,1	13	11,9	6	14,6	1	6,7
	Genes relacionados con la vía <b>BMP/TGF-β</b>	19	11,5	11	10,1	4	9,8	4	26,7
	Genes relacionados con la vía <b>NOTCH</b>	8	4,8	6	5,5	1	2,4	1	6,7
	Genes relacionados con la vía <b>NODAL</b>	13	7,9	8	7,3	3	7,3	2	13,3
	Genes relacionados con la vía de la <b>prokineticina</b>	10	6,1	6	5,5	3	7,3	1	6,7
	Genes con función en el <b>desarrollo hipotalámico</b>	22	13,3	17	15,6	4	9,8	1	6,7
	<b>Genes clásicos (desarrollo hipofisario) (*)</b>	12	7,3	11	10,1	1	2,4	-	-
	Genes implicados en la <b>etiología del HHC</b>	59	<b>35,8</b>	39	35,8	17	41,5	3	20
	Genes implicados en la <b>etiología de la HPE</b>	36	<b>21,8</b>	22	20,2	10	24,4	4	26,7
<b>GRUPO DE VARIANTES PATOGENICAS</b> (n=19)	Genes relacionados con las vías <b>WNT</b>	6	<b>31,6</b>	5	38,5	1	25	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>SHH</b>	5	<b>26,3</b>	4	30,8	1	25	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>FGF</b>	1	5,3	1	7,7	-	-	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>BMP/TGF-β</b>	2	10,5	2	15,4	-	-	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>NOTCH</b>	5	<b>26,3</b>	5	38,5	-	-	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>NODAL</b>	1	5,3	1	7,7	-	-	-	-
	Genes relacionados con la vía de la <b>prokineticina</b>	3	15,8	1	7,7	1	25	1	50
	Genes con función en el <b>desarrollo hipotalámico</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Genes clásicos (desarrollo hipofisario)</b>	5	<b>26,3</b>	5	38,5	-	-	-	-
	Genes implicados en la <b>etiología del HHC (*)</b>	7	<b>36,8</b>	2	15,4	3	75	2	100
	Genes implicados en la <b>etiología de la HPE</b>	5	<b>26,3</b>	5	38,5	-	-	-	-
<b>GRUPO DE VARIANTES PATOGENICAS, PROBABLEMENTE PATOGENICAS Y VUS+</b> (n=46)	Genes relacionados con las vías <b>WNT</b>	13	<b>28,3</b>	9	32,1	3	21,4	1	25
	Genes relacionados con la vía <b>SHH</b>	15	<b>32,6</b>	9	32,1	4	28,6	2	50
	Genes relacionados con la vía <b>FGF</b>	8	17,4	5	17,9	3	21,4	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>BMP/TGF-β</b>	6	13,0	4	14,3	1	7,1	1	25
	Genes relacionados con la vía <b>NOTCH</b>	6	13,0	5	17,9	1	7,1	-	-
	Genes relacionados con la vía <b>NODAL</b>	3	6,5	2	7,1	-	-	1	25
	Genes relacionados con la vía de la <b>prokineticina</b>	5	10,9	2	7,1	2	14,3	1	25
	Genes con función en el <b>desarrollo hipotalámico</b>	1	2,2	-	-	1	7,1	-	-
	<b>Genes clásicos (desarrollo hipofisario)</b>	8	17,4	7	25	1	7,1	-	-
	Genes implicados en la <b>etiología del HHC</b>	18	<b>39,1</b>	9	32,1	7	50	2	50
	Genes implicados en la <b>etiología de la HPE</b>	15	<b>32,6</b>	11	39,3	2	14,3	2	50

Los genes incluidos en cada grupo se detallan en el **Anexo 3**. Los grupos de genes no son excluyentes entre sí. Los porcentajes se calculan respecto al total de variantes de cada tipo detectadas en la cohorte completa y en cada grupo diagnóstico de pacientes.

(\*): Diferencias próximas a la significación estadística (valor de p entre 0.05 y 0.1) entre los tres grupos diagnósticos. Se resaltan los grupos de genes con mayor representación de variantes de cada uno de los tres tipos, en la cohorte completa.

**DCHH**: Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **DSO**: Displasia septo-óptica; **DAGH-HP**: Deficiencia aislada de GH con anomalías hipofisarias en RMN; **HHC**: Hipogonadismo hipogonadotropo congénito; **HPE**: Holoprosencefalia; **VUS+**: Variantes de significado incierto de especial relevancia por alguna de sus características (ver apartado 2.5 de Materiales y métodos).

## A.2.2. Correlaciones genotipo-fenotipo en los tres grupos principales

Aunque entre los tres grupos diagnósticos principales se observan algunas diferencias en la frecuencia de variantes en determinadas vías de señalización o grupos de genes (**Tabla 8**), debido a la atomización del tamaño muestral por la variedad de categorías (lo que ocurre aún en mayor medida, salvo algunas excepciones, con el análisis de los hallazgos en genes individuales), apenas se observan diferencias estadísticamente significativas. Por ello, para mostrar los resultados sobre las correlaciones genotipo-fenotipo, se describen a continuación las diferencias moleculares entre los distintos grupos o subgrupos de pacientes, en referencia a las diferencias observadas dentro de la cohorte de estudio y no a su extrapolación poblacional estadística (salvo que se indique expresamente).

### A.2.2.1. Pacientes con DCHH

El grupo de pacientes con DCHH se caracteriza genéticamente respecto a los otros dos grupos por una mayor frecuencia de variantes relevantes en alguno de los 5 genes “clásicos” (diferencia próxima a la significación estadística,  $p=0.07$ ) (**Tabla 8**). Además, este grupo diagnóstico es el único que presenta en nuestra cohorte variantes clasificadas como patogénicas en genes relacionados con las vías FGF, BMP/TGF- $\beta$ , NOTCH y NODAL, así como en genes “clásicos” (los 5 pacientes mencionados con alguna variante en *PROP1* en homocigosis, 5,6% de los 71 pacientes con DCHH no emparentados) y en genes que hayan sido relacionados con la etiología de la HPE (4 en *GLI2* y 1 en *TDGF1*, 6,9% de los pacientes con DCHH). La presencia de variantes patogénicas en genes relacionados con la etiología del HHC tiende a ser menor que en los otros dos grupos (sin llegar a alcanzar la significación estadística,  $p=0,094$ ).

Los datos más relevantes sobre los hallazgos en genes concretos entre los pacientes con DCHH, comparándolos con los otros dos grupos, se muestran en la **Tabla 9**. ***GLI2* y *PROP1* son los dos genes más importantes en el grupo de DCHH, por la elevada frecuencia de variantes relevantes detectadas y la muy elevada probabilidad de patogenicidad de muchas de ellas.**

**Tabla 9. Comparación de los genes concretos afectados con mayor frecuencia entre los tres grupos diagnósticos principales**

Tipo de variantes	DCHH Gen/es: Nº de pacientes (%)	DSO Gen/es: Nº de pacientes (%)	DAGH-HP Gen/es: Nº de pacientes (%)
<b>Variantes relevantes en global (*)</b>	<i>CHD7</i> : 13 (18,1%) <i>GLI2</i> : 10 (13,8%) <i>PCSK1</i> : 9 (12,5%) <i>PROP1</i> : 6 (8,3%) <i>FGFR1, LHX3, PITX2 y OTP</i> : 4 (5,6%)	<i>CHD7</i> : 5 (15,2%) <i>PTCH1</i> : 4 (12,1%) <i>OTX2, ZIC2</i> : 2 (6,1%)	<i>PCSK1</i> : 3 (33,3%)
<b>Variantes patogénicas</b>	<i>PROP1</i> : 5 (6,9%) <i>GLI2</i> : 4 (5,6%) <i>PROKR2, BMP4, ANOS1 (KAL1), TDGF1</i> : 1 (1,4%)	<i>SEMA3A</i> : 2 (6,1%) <i>SOX2, PROKR2</i> : 1 (3%)	<i>PROKR2, SEMA3A</i> : 1 (11,1%)
<b>Variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+</b>	<i>GLI2</i> : 7 (9,7%) <i>PROP1</i> : 5 (6,9%) <i>SPRY4</i> : 3 (4,2%) <i>LHX3 y PROKR2</i> : 2 (2,8%) <i>FGFR1, SIX3, BMP4, CDON, FOXH1, TDGF1, ANOS1 (KAL1), GNRHR y LEPR</i> : 1 (1,4%)	<i>PROKR2, SEMA3A</i> : 2 (6,1%) <i>PTCH1, OTX2, SOX2, LHX4, FGFR1, GLI2, CHD7, SPRY4, PAX2 y NEUROG2</i> : 1 (3%)	<i>PROKR2, SEMA3A, GLI2, ZIC2</i> : 1 (11,1%)
<b>Comentarios sobre cada grupo de pacientes</b>	Ninguna variante en <i>PROP1</i> ni en <i>LHX3</i> en los grupos de DSO y DAGH-HP. <i>GLI2</i> y <i>PROP1</i> son los genes más relevantes.	Entre los grupos DCHH y DAGH-HP, sólo 1 variante en <i>PTCH1</i> , en <i>ZIC2</i> y en <i>OTX2</i> , y ninguna en <i>SOX2</i> . La diferencia para <i>PTCH1</i> es estadísticamente significativa ( $p=0.024$ ).	Ningún gen con peso suficiente claramente predominante
<p><i>Los genes se muestran ordenados según la cantidad de pacientes que presentan variantes relevantes en cada gen. Los valores de % se refieren en cada columna al total de pacientes con DCHH (n=72), DSO (n=33) o DAGH-HP (n=9) respectivamente. Se resaltan los genes más relevantes por su representación significativa en los distintos grupos de variantes. (*) Se muestran aquí sólo los genes relevantes por su elevada frecuencia de alteraciones o por su mayor representación respecto a otros grupos diagnósticos.</i></p>			

#### A.2.2.2. Pacientes con DSO

El grupo de DSO se caracteriza (al igual que el grupo de DAGH-HP y a diferencia del de DCHH) por la práctica ausencia de variantes estrictamente patogénicas en las principales vías de señalización (posiblemente influido por el menor tamaño muestral de los grupos DSO y DAGH-HP), si bien al evaluar el global de variantes relevantes, o la categoría “intermedia” con variantes patogénicas, probablemente patogénicas y VUS+, sí hay resultados más parecidos en los tres grupos de diagnóstico (**Tabla 8**). Curiosamente, en esta

última categoría “intermedia” de variantes, la presencia de variantes en genes relacionados con la HPE es menor en el grupo de DSO que en los otros grupos diagnósticos (sin significación estadística).

Los genes concretos con mayor afectación en pacientes con DSO se muestran en la **Tabla 9**. Existe asociación estadística entre la presencia de variantes relevantes en *PTCH1* y el fenotipo de DSO: se presentan en 4 de los 33 pacientes con DSO (12,1%), frente a 1 único paciente (con DCHH) entre los 81 pacientes con DCHH o DAGH-HP (1,25%) [(p=0,024, OR 11 (IC 1,2-102,8)]. Así, **la presencia de variantes relevantes en *PTCH1* se asocia** (y en *OTX2* o *SOX2* tiende a asociarse), **con un fenotipo de DSO**.

#### A.2.2.3. Pacientes con DAGH-HP

Este grupo muestra algunas diferencias en lo que se refiere a los grupos de genes afectados respecto los pacientes con DCHH y DSO: mayor frecuencia de variantes relevantes en general en genes relacionados con las vías BMP/TGF- $\beta$  y SHH, y menor en genes relacionados con la vía FGF. En cualquier caso, este dato debe tomarse con precaución, ya que se encuentra condicionado por el tamaño muestral significativamente menor en este grupo de DAGH-HP que en las otras dos categorías diagnósticas. Probablemente debido al pequeño tamaño muestral de este grupo, no se encuentra ningún gen claramente predominante con buen equilibrio entre frecuencia de variantes y su probable patogenicidad (**Tabla 9**).

Si bien la presencia de variantes clasificadas como patogénicas en genes relacionados con las principales vías de señalización implicadas en el desarrollo hipofisario parece ser mayor en el grupo de DCHH (**Tabla 8**), la proporción relativa tiende a igualarse a los otros dos grupos al evaluar en conjunto las variantes patogénicas, probablemente patogénicas y VUS+, así como al evaluar el conjunto global de variantes relevantes. Por otro lado, si bien la presencia de variantes relevantes en algunos genes es más característica de un grupo diagnóstico concreto (*PROP1* en DCHH, *PTCH1* u *OTX2* en DSO), observamos la presencia de variantes especialmente relevantes en genes como *GLI2*,

*PROKR2*, *FGFR1*, *CHD7*, *SPRY4* o *SEMA3A* en pacientes de los distintos grupos. Todo ello confirma la **existencia de un solapamiento genético entre las patologías incluidas en el presente estudio.**

### **A.2.3. Correlaciones genotipo-fenotipo por subgrupos**

De nuevo en este apartado, y por los mismos motivos que en el apartado previo, las diferencias indicadas entre subgrupos se refieren a tendencias o diferencias exclusivamente en la muestra poblacional, sin alcanzar la significación estadística (salvo que se indique expresamente lo contrario).

#### **A.2.3.1. Pacientes con DSO “aislada” (n=23) versus DSO-plus (n=7)**

Se observa tendencia a mayor proporción de pacientes con variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ en el subgrupo de DSO-plus (57,1%) que en el subgrupo de DSO “aislada” (30,4%) (aunque sin significación estadística).

Entre los 23 pacientes con DSO “aislada”, las vías de señalización más representadas por los genes en los que se han identificado variantes relevantes en general son la vía FGF (26,1%) y la vía SHH (21,7%). En cambio, entre los 7 pacientes con DSO-plus, las vías más relevantes son SHH (57,1%), BMP/TGF- $\beta$  (42,9%) y NODAL (28,6%). Es más frecuente la presencia de variantes en genes previamente implicados en HHC en el grupo de DSO “aislada” (43,5% de pacientes versus 28,6%). De manera inversa, en el subgrupo de DSO-plus son más frecuentes las variantes en genes previamente implicados en HPE (42,9% versus 26,1%).

Los genes más frecuentemente afectados en el subgrupo de DSO “aislada” son *PTCH1* (5 de 23 pacientes, 21,7%), *CHD7* (4 pacientes, 17,4%) y *OTX2* (2 pacientes, 8,7%). Ningún paciente con DSO-plus presenta variantes relevantes en ninguno de estos 3 genes.

Entre los pacientes con DSO “aislada”, los genes en los que se han identificado variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ fueron: *OTX2*, *PROKR2*, *FGFR1*, *PTCH1*, *LHX4*, *CHD7*, *SEMA3A*, *SPRY4* y *NEUROG2*

(cada uno, sólo en 1 de los 23 pacientes, 4.3% respectivamente); mientras que en los pacientes con DSO-plus los genes implicados fueron: *PROKR2*, *GLI2*, *PAX2* y *SEMA3A* (cada uno, sólo en 1 de los 7 pacientes, 14.3% respectivamente).

#### A.2.3.2. Pacientes con DSO y disfunción hipofisaria (n=24) versus DSO sin disfunción hipofisaria (n=8)

Se han encontrado variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ en el 41,7% de pacientes del subgrupo de DSO con disfunción hipofisaria (entre ellos 4 con variantes clasificadas como patogénicas), frente al 25% en el caso del subgrupo de DSO sin disfunción hipofisaria (en el que no se observa ninguna variante estrictamente patogénica). La frecuencia de variantes relevantes en global es mayor en los pacientes con DSO sin disfunción hipofisaria (87,5% frente al 70,8%), pero la mitad de dichos pacientes sólo presenta variantes clasificadas como VUS.

No existen grandes diferencias en las vías de señalización más representadas por las variantes identificadas en ambos subgrupos de DSO con y sin disfunción hipofisaria. De las escasas diferencias entre ambos subgrupos, destaca la presencia, entre los 24 pacientes del subgrupo DSO con disfunción hipofisaria, de 3 pacientes con variantes relevantes en genes relacionados con la vía de la prokineticina (2 en *PROKR2* y 1 en *PROK2*), y otros 3 con variantes en genes relacionados con el desarrollo de núcleos hipotalámicos a partir de modelos murinos (*OTP*, *NEUROG2* y *LHX1*), frente a ningún paciente con variantes en estos grupos de genes entre los 8 pacientes del subgrupo DSO sin disfunción hipofisaria.

Los genes más afectados por variantes relevantes en global en el subgrupo de DSO sin disfunción hipofisaria son *CHD7* y *PTCH1* (en 3 de los 8 pacientes cada uno, 27,3% respectivamente). En el subgrupo de DSO con disfunción hipofisaria los genes más afectados son *PROKR2*, *CHD7*, *SEMA3A*, *GLI2*, *ZIC2* y *PTCH1* (que se afectan en 2 de los 24 pacientes cada uno, 6.5% respectivamente).

Si consideramos únicamente las variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+, identificamos únicamente 1 variante en *PTCH1* y otra en *PAX2* en sendos pacientes del subgrupo de DSO sin disfunción hipofisaria, mientras que en el subgrupo de DSO con disfunción hipofisaria observamos 2 variantes en *PROKR2* y en *SEMA3A*, y 1 en *SOX2*, *OTX2*, *GLI2*, *FGFR1*, *LHX4*, *CHD7*, *SPRY4* y *NEUROG2*.

#### A.2.3.3. Pacientes con HIC sintomático (n=33) versus HIC no sintomático (n=40)

Ambos subgrupos muestran proporciones similares de pacientes con variantes relevantes. El subgrupo de pacientes con HIC no sintomático se caracteriza por presentar una mayor proporción de variantes en las vías WNT (32,5%), FGF (20%) y NOTCH (17,5%) respecto al subgrupo de HIC sintomático (12,1%, 12,1% y 0%, respectivamente). De igual manera, muestra una mayor frecuencia de variantes en genes “clásicos” (20% de los pacientes). El subgrupo de HIC sintomático, sin embargo, muestra una ligeramente mayor proporción de pacientes con variantes en la vía SHH (36,4%, frente al 20% en el subgrupo de HIC no sintomático) y en genes relacionados con la HPE. La proporción de pacientes con variantes en el resto de grupos de genes (relacionados con las vías NOTCH, NODAL, de la prokinetina, con funciones en el desarrollo hipotalámico y relacionados con la etiología del HHC) es similar en ambos subgrupos entre sí y similar a los resultados de la cohorte completa.

Los genes concretos más representados en el subgrupo de HIC no sintomático son *CHD7* (22,5% de los pacientes), *PCSK1* (17,5%), *PROP1* (15%), *GLI2* (10%) y *FGFR1* (10%). En el caso del subgrupo de HIC sintomático son *GLI2* (21%), *PCSK1* (15%) y *CHD7* (12,1%). Cabe destacar la ausencia de variantes en *PROP1* y en *FGFR1* entre los pacientes con HIC sintomático (2 de los genes con más variantes en pacientes con HIC no sintomático).

Atendiendo sólo al grupo de variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+, los genes más representados en el subgrupo de HIC no sintomático son: 5 variantes en *PROP1*, 3 en *GLI2*, 2 en *LHX3*, *PROKR2* y *SPRY4*, y 1 variante en *FGFR1*, *ZIC2*, *TDGF1* y *GNRHR*. En el subgrupo de HIC

sindrómico son: 5 variantes en *GLI2* y 1 variante en *PROKR2*, *BMP4* (en un paciente que se presentará en detalle más adelante, en la sección B), *ANOS1* (*KAL1*), *FOXH1*, *SEMA3A* y *LEPR*.

**La presencia de variantes relevantes en *PROP1* se asocia estadísticamente al fenotipo de HIC no sindrómico (p=0,029).**

#### **A.2.4. Correlación genotipo-fenotipo hipofisario en RMN**

##### **A.2.4.1. Anomalías de neurohipófisis y tallo hipofisario**

Entre los pacientes con alteraciones de la neurohipófisis, es más frecuente la presencia de variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ tanto en la vía de la prokineticina como en la vía FGF.

El conjunto de pacientes con neurohipófisis ectópica (independientemente del grupo diagnóstico) y el de pacientes con tallo hipofisario no visible o interrumpido se caracterizan por una mayor frecuencia de variantes relevantes en algunos genes relacionados con la vía de la prokineticina que ante la presencia de neurohipófisis normal o no visible, tallo adelgazado o tallo normal. También presentan menor proporción de pacientes con variantes en genes relacionados con las vías WNT y SHH, y en genes relacionados con la etiología de la HPE (si bien en casi todos los pacientes con neurohipófisis ectópica que presentan alguna variante en algún gen relacionado con la HPE este gen es *GLI2*). En global, los pacientes con anomalías de la neurohipófisis (ectópica o ausencia) o de tallo hipofisario (ausente, interrumpido o adelgazado) presentan en mayor porcentaje variantes en algún gen implicado en el desarrollo hipotalámico o en la vía FGF (en esta vía, fundamentalmente a través de variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+) que los pacientes con neurohipófisis y tallo normales. El grupo de pacientes con neurohipófisis normal y tallo normal presenta en mayor proporción variantes en genes relacionados con las vías BMP/TGF- $\beta$  y NODAL.

Específicamente, observamos que **la combinación concreta de variantes relevantes en el gen *PROKR2* y en algún gen relacionado con la**



vía FGF, se asocia, en todos los casos en los que aparece (3,5% de los pacientes), con un fenotipo de neurohipófisis ectópica y alteración del tallo hipofisario ( $p=0,033$ ). Al evaluar este aspecto sólo entre los pacientes que presentan disfunción hipofisaria (excluyendo por tanto los 8 pacientes con DSO sin disfunción hipofisaria) y de los que disponemos de datos suficientes de la imagen de RMN ( $n=75$ ), observamos que esta agrupación de hallazgos genéticos se presenta en el 5,3% de estos pacientes y que se asocia igualmente a la presencia de neurohipófisis ectópica y alteración del tallo ( $p=0,043$ , OR no calculable).

Atendiendo a la correlación entre las anomalías de neurohipófisis y tallo y la afectación de genes de manera individual, los hallazgos más relevantes son:

- En **PROKR2** identificamos variantes estrictamente patogénicas sólo entre los pacientes con neurohipófisis ectópica (en el 6,4% de estos pacientes). Ocurre algo parecido entre los pacientes con alteraciones del tallo hipofisario (no visible, interrumpido o adelgazado), entre los cuales identificamos variantes patogénicas de **PROKR2** en el 5,3%, frente a ninguna en pacientes con tallo normal. Existe un único paciente en nuestra cohorte (probando 77) que presenta una variante probablemente patogénica en **PROKR2** con neurohipófisis y tallo normales (en un contexto de DSO con hipoplasia de adenohipófisis, esquisencefalia e hipoplasia medifacial). Este paciente, es el único que no asocia una variante relevante en la vía FGF (presenta una variante relevante en **TGIF1**, relacionado con la vía SHH).
- En **FGFR1** no identificamos variantes estrictamente patogénicas, aunque sí aparecen variantes probablemente patogénicas o VUS+ en el 2,9% de los pacientes con alteraciones de neurohipófisis y en el 3,5% de pacientes con tallo alterado, pero ninguna en pacientes con neurohipófisis o tallo hipofisario normales.
- En **GLI2** identificamos variantes estrictamente patogénicas solamente en pacientes con alteraciones de neurohipófisis (en el 5,8% de los pacientes con neurohipófisis ectópica o no visible) y/o con alteraciones del tallo hipofisario (7%). En cambio, sí aparecen variantes probablemente patogénicas o VUS+ en **GLI2** en pacientes con neurohipófisis y tallo

normales. Se discuten en detalle las correlaciones genotipo-fenotipo de los distintos tipos de variantes en *GLI2* en una sección dedicada a este grupo de pacientes (sección C, dentro de *Resultados y Discusión*).

#### A.2.4.2. Anomalías del volumen adenohipofisario

Entre los pacientes con hipoplasia o agenesia adenohipofisaria, el gen que presenta con mayor frecuencia variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ es *GLI2* (12% de estos pacientes), mientras que ningún paciente con adenohipofísis normal presenta variantes de este tipo en *GLI2*. En cambio, entre los pacientes con adenohipofísis normal, identificamos este tipo de variantes en *FGFR1* (4,8%) y *PROKR2* (9,5%) más frecuentemente que en pacientes con adenohipofísis disminuida de volumen (1,3% y 4%, respectivamente). De los 3 pacientes que presentaban algún tipo de masa hipofisaria, 2 presentaban una variante patogénica en *PROP1* en homocigosis (ambos de origen turco).

De los 33 pacientes con variantes relevantes en genes relacionados con la vía SHH y cuyos datos de RMN están disponibles, 24 presentan hipoplasia adenohipofisaria (72,7%), proporción muy similar a la de la cohorte completa (75,8%). Sin embargo, podemos diferenciar aquí dos subgrupos de pacientes. Por un lado, aquellos pacientes con variantes en los genes *GLI2* (n=12), *CDON* (n=3), *TGIF1* (n=2) y *PITX2* (n=5), los cuales presentan hipoplasia adenohipofisaria en el 100% de los casos. Por el otro, pacientes con variantes relevantes en los genes *PTCH1* (hipoplasia hipofisaria sólo en 1 de los 5 pacientes, 20%), *ZIC2* (1 de 2, 50%), *GPR161* (1 de 2, 50%) y *PAX2* (1 de 2, 50%). Y esta diferencia entre ambos grupos es de manera clara estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ , OR no calculable). Entre los pacientes con variantes relevantes en la vía SHH con hipoplasia adenohipofisaria, sólo el 20% (4 de 24) son pacientes con DSO, y en estos cuatro pacientes el gen afectado relacionado con la vía SHH es *GLI2*, *CDON*, *TGIF1* o *SOX2*. En cambio, entre los pacientes con este tipo de variantes y adenohipofísis normal, el 85% (7 de 8) presentan DSO, y la alteración en la vía SHH es a través de variantes en los genes *PTCH1* (4 de 7), *ZIC2* (2 de 7), *PAX2* (1 de 7).

En resumen, en la presente cohorte, las variantes identificadas en los genes *PROKR2*, *GLI2* y *FGFR1* son las que, por su elevada frecuencia y elevado nivel de confianza en su patogenicidad, se relacionan en mayor medida con la presencia de anomalías hipofisarias en la imagen de RMN. *PROKR2* y *GLI2* aparecen implicados en las anomalías de tallo y neurohipófisis principalmente mediante variantes estrictamente patogénicas. La agrupación en el mismo paciente de variantes relevantes en *PROKR2* y en genes relacionados con la vía FGF se asocia a una mayor probabilidad de presentar neurohipófisis ectópica y alteración del tallo. El volumen adenohipofisario parece afectarse en mayor medida por las variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ en *GLI2* que por las que afectan a *FGFR1* y *PROKR2*. Observamos una correlación entre los genes concretos afectados dentro de la vía SHH y un mayor riesgo de presentar hipoplasia de adenohipófisis (alteraciones en *GLI2*, *CDON*, *TGIF1* y *PITX2*), así como una mayor probabilidad de desarrollar un fenotipo de DSO (alteraciones en *PTCH1*).

#### **A.2.5. Correlación genotipo-deficiencias hormonales hipofisarias**

No se han detectado diferencias significativas en los hallazgos moleculares en función de la presencia o ausencia de deficiencia en cada uno de los ejes adenohipofisarios.

#### **A.2.6. Correlación genotipo-antecedentes obstétricos**

Respecto a los antecedentes obstétricos, se ha encontrado:

- Tendencia a mayor proporción de pacientes con variantes patogénicas en el grupo de pacientes sin eventos obstétricos reseñables (27,5%) que en la cohorte completa (15,8%), aunque lejos de la significación estadística ( $p=0,363$ ).
- Ausencia de variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ en los 2 pacientes con parto en presentación podálica no asociado a otros eventos perinatales, si bien cada uno presenta una VUS.

- Aunque 4 de los 5 pacientes con antecedente de cesárea presentan variantes relevantes, éstas se clasifican todas como VUS.
- Entre los 7 pacientes con parto instrumental, se observa mayor proporción de pacientes con variantes relevantes en general (100%, cohorte completa 76,3%), con variantes patogénicas (28,6%, cohorte 15,8%) y con al menos alguna variante patogénica, probablemente patogénica o VUS+ (57,1%, cohorte 32,5%), si bien estas diferencias no son significativas estadísticamente ( $p=0,185$ ,  $p=0,324$  y  $p=0,201$ , respectivamente).
- Hallazgo de variantes relevantes sólo en 1 de los 4 pacientes con test de APGAR < 6 a los 5 minutos (25%), proporción menor que el resto de la cohorte (77,8%) [ $p=0,045$ , OR 0,1 (IC 0,01-0,97)].
- Ausencia de variantes estrictamente patogénicas en los 4 pacientes con antecedente de amenaza de aborto (aunque frecuencia similar de variantes relevantes en general al resto de la cohorte, incluyendo al menos una variante probablemente patogénica en 2 de los 4 pacientes).

Por lo tanto, en general, no encontramos mayores hallazgos genéticos entre los pacientes con embarazo y parto normales y, a su vez, es frecuente la presencia de variantes relevantes en pacientes con antecedentes obstétricos.

### **A.2.7. Combinaciones de vías de señalización potencialmente alteradas por las variantes encontradas, según patrones repetidos en distintos pacientes**

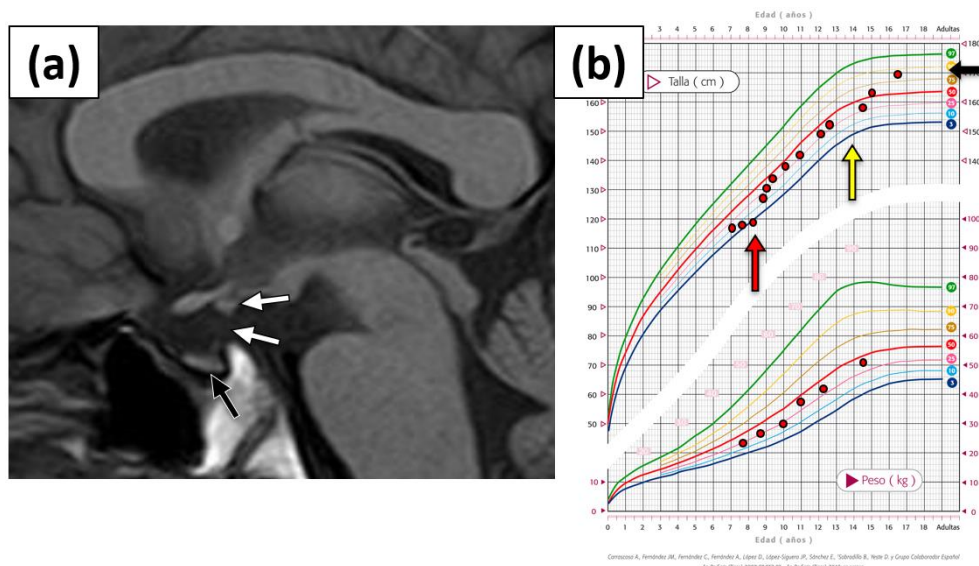
Dentro de nuestra cohorte, identificamos algunos pacientes que presentan agrupaciones de variantes especialmente relevantes que muestran ciertas similitudes. Cinco pacientes (4,4%) muestran agrupación de variantes relevantes en la vía de la prokinetina (4 de ellos con mutaciones patogénicas o probablemente patogénicas en *PROKR2*) y en genes relacionados con la vía FGF. Por otro lado, otro grupo de 11 pacientes (9,6%) presenta distintas combinaciones de variantes afectando al menos a 2 de las siguientes 3 vías: FGF, SHH y NODAL.

### A.2.7.1. Combinación de variantes relevantes en las vías de la prokineticina y FGF (5 pacientes, 4,4% de la cohorte)

El **probando 15** es una mujer con DCHH diagnosticada a los 7 años a raíz de un cuadro clínico de retraso del crecimiento. Presenta deficiencia de GH (con buena respuesta al tratamiento sustitutivo con rhGH), TSH, ACTH y LH/FSH. En la imagen de RMN se observa hipoplasia adenohipofisaria, neurohipófisis ectópica y tallo interrumpido (**Figura 11**). Como antecedentes obstétricos destaca una amenaza de aborto en las primeras semanas y un parto en presentación podálica. Los padres son sanos.

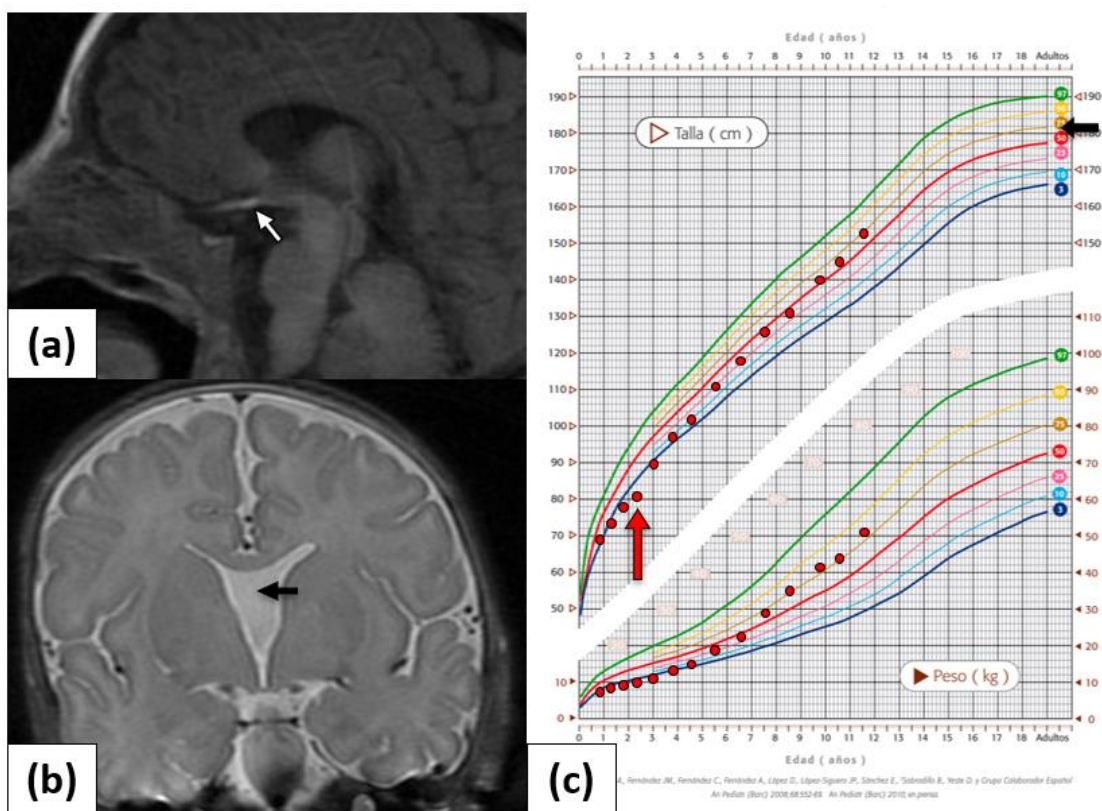
El estudio genético demostró la presencia de:

- La variante en *PROKR2* NM\_144773.2:c.254G>T, p.(Arg85Leu) en heterocigosis, heredada de la madre, en quien también está en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *FGFR1* NM\_023110.2:c.128T>G, p.(Phe43Cys), en heterocigosis, heredada del padre, en quien también está en heterocigosis.



**Figura 11. (a):** Imagen de RMN de la región hipotalámico-hipofisaria del probando 15, a los 16 años de edad, mostrando neurohipófisis ectópica e interrupción del tallo hipofisario (flechas blancas), así como una leve hipoplasia de adenohipófisis (flecha negra). **(b):** Curva de crecimiento. La flecha roja muestra el comienzo del tratamiento con rhGH, y la flecha amarilla, el comienzo del tratamiento sustitutivo con estrógenos.

El **probando 110** es un varón con DSO “aislada” diagnosticada al nacimiento a raíz de un cuadro clínico de HIC, con hipoglucemias, micropene, criptorquidia bilateral e ictericia prolongada. Presenta deficiencia de GH, TSH y ACTH, y probablemente también de gonadotropinas, dada la presencia de micropene y criptorquidia (aunque sin confirmación analítica por la edad prepuberal). En la imagen de RMN (**Figura 12**) muestra neurohipófisis ectópica, tallo hipofisario no visible, adenohipófisis normal y agenesia del septo pelúcido. No se observan alteraciones evidentes de la vía óptica. Asocia algunos rasgos dismórficos como orejas de implantación baja y micrognatia. No presenta antecedentes obstétricos ni familiares reseñables.



**Figura 12. Imágenes de RMN y curva de crecimiento del probando 110. (a):** Imagen de RMN sagital T1 sagital de la región hipotalámico-hipofisaria, mostrando neurohipófisis ectópica (flecha blanca) y ausencia del tallo hipofisario. **(b):** Imagen de RMN T2 coronal mostrando ausencia del septo pelúcido (flecha negra). **(c):** Curva de crecimiento del probando 110. Se señala con una flecha roja el inicio del tratamiento sustitutivo con rhGH.

El estudio genético mostró como hallazgos principales:

- La variante patogénica en *PROKR2* NM\_144773.2:c.518T>G, p.(Leu173Arg), en heterocigosis, situada en el 4º dominio transmembrana.
- La variante probablemente patogénica en *OTX2* NM\_172337.2:c.401C>G, p.(Pro134Arg), en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *IL17RD* NM\_017563.3:c.1371T>G, p.(Ile457Met) en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *SEMA7A* NM\_003612.4:c.1775A>C, p.(Gln592Pro) en heterocigosis. Se trata de una nueva variante *missense* en una posición conservada, con predicción de patogenicidad *in silico* variable y una posible implicación en splicing por posible activación de un aceptor críptico.

No se dispone del estudio molecular en los progenitores.

El **probando 29** es una mujer con DCHH diagnosticada al nacimiento a partir de un episodio de convulsión por hipoglucemia, junto con ictericia prolongada. Presenta deficiencia de GH, TSH y ACTH (sin haber sido posible evaluar aún el eje gonadotropo). Presenta neurohipófisis ectópica y tallo no visible, con adenohipófisis normal. No presenta antecedentes obstétricos destacables y carecemos de datos fenotípicos de los progenitores. El estudio genético demostró la presencia de:

- La variante patogénica en *PROKR2* NM\_144773.2:c.743G>A, p.(Arg248Gln) en heterocigosis, heredada de la madre, en quien también se encuentra en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *FGFR1* NM\_023110.2:c.2314C>T, p.(Pro722Ser) en heterocigosis, heredada de la madre, en quien también se encuentra en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *HMX3* NM\_001105574.1:c.976G>A, p.(Ala326Thr), en heterocigosis, heredada del padre, en quien también se encuentra en heterocigosis.

El **probando 77** es un varón con DAGH diagnosticado a los 5 años a partir de un cuadro clínico de retraso del crecimiento. La respuesta al tratamiento con rhGH ha sido parcial. En la imagen de RMN muestra hipoplasia de adenohipófisis, neurohipófisis ectópica y tallo hipofisario adelgazado. Asocia microcefalia (perímetro cefálico en -5,2 DE), astigmatismo, mancha café con leche en tórax y gliosis de la sustancia blanca subcortical parieto-occipital izquierda. Fue pequeño para la edad gestacional, sin otros antecedentes obstétricos significativos. Los progenitores, sanos, son consanguíneos (primos hermanos). El estudio genético mostró la presencia de las siguientes variantes relevantes:

- La variante patogénica en *PROKR2* NM\_144773.3:c.253C>T, p.(Arg85Cys) en heterocigosis, heredada del padre, en quien también se encuentra en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *HMX2* NM\_005519.1:c.\*1C>T, en heterocigosis, heredada de la madre, en quien también se encuentra en heterocigosis. Esta variante se sitúa en el nucleótido inmediatamente posterior al codón de parada.

El **probando 106** es una mujer con fenotipo de DSO “aislada”, con hipoplasia bilateral de nervios ópticos, DAGH (con buena respuesta clínica al tratamiento sustitutivo) e hipoplasia de adenohipófisis, con neurohipófisis y tallo hipofisario normales. Asocia ceguera y no presenta antecedentes obstétricos ni familiares de interés. El estudio genético demostró la presencia de las siguientes variantes:

- La variante de significado incierto con pérdida del codón de parada en *PROK2* NM\_001126128.1:c.389A>T, p.(\*130Leuext\*9), en heterocigosis. Supone una extensión en el extremo C-terminal de 9 aminoácidos.
- La nueva variante en *FLRT3* NM\_198391.2:c.1433G>A, p.(Cys478Tyr), en heterocigosis.

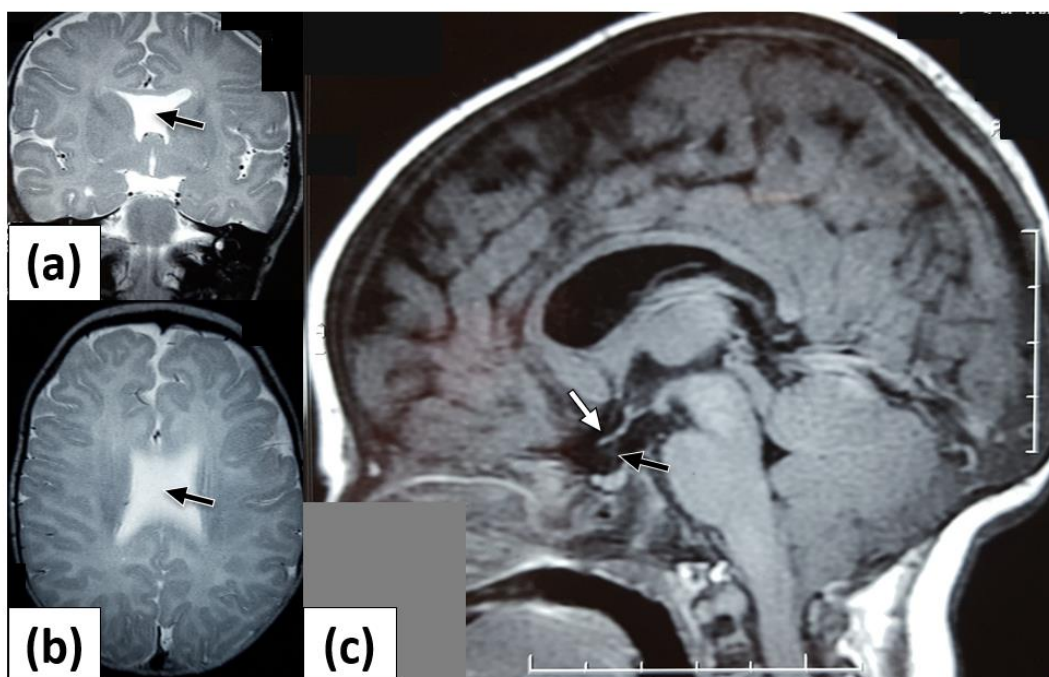
No se dispone del estudio molecular en los progenitores.



### A.2.7.2. Combinaciones variables de alteraciones en las vías SHH, FGF y NODAL

#### A.2.7.2.1. Combinación de variantes relevantes en las vías FGF y SHH (7 pacientes, 6,1% de la cohorte completa)

El **probando 86** es una mujer con DSO diagnosticada a raíz de los hallazgos cerebrales sugestivos en ecografías prenatales. Presenta hipoplasia de ambos nervios ópticos, agenesia del septo pelúcido e hipoplasia del cuerpo calloso. La neurohipófisis no se visualiza, el tallo hipofisario está adelgazado y el volumen adenohipofisario es normal (**Figura 13**). Presenta deficiencia de TSH y diabetes insípida, sin haber sido posible de momento evaluar el eje gonadotropo. Asocia igualmente una malformación de Chiari tipo I, disminución global de la sustancia blanca cerebral y fenestraciones de la hoz cerebral. No presenta antecedentes obstétricos relevantes y su padre presenta un riñón único.



**Figura 13.** Imágenes de RMN cerebral del probando 86 a la edad de 4 meses. (a-b): Imágenes coronal (a) y axial (b) de RMN en T2, que muestran ausencia del septo pelúcido (flechas) y consiguiente fusión de los ventrículos laterales. (c): Imagen sagital de línea media en T1, que muestra hipoplasia del quiasma óptico (flecha blanca), tallo muy adelgazado (flecha negra), ausencia de la hiperseñal de neurohipófisis, adecuado volumen adenohipofisario e hipoplasia del cuerpo calloso.

En ella, el estudio genético muestra tres variantes con elevada predicción de patogenicidad y situadas en posiciones muy conservadas:

- La variante VUS+ en *FGFR1* NM\_023110.2:c.2464C>T, p.(Arg822Cys) en heterocigosis, heredada del padre, quien presenta riñón único y en quien también está en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *PTCH1* NM\_000264.4:c.3220A>G, p.(Ile1074Val) en heterocigosis, heredada de la madre, en quien también está en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *GNRH1* NM\_000825.3:c.153G>C, p.(Glu51Asp) en heterocigosis, heredada del padre, en quien también está en heterocigosis.

El **probando 57** es un varón con DCHH diagnosticada al nacimiento a raíz de la presencia de micropene e hipoglucemias en el periodo neonatal. Presenta deficiencia de GH, TSH y ACTH, sin haberse podido confirmar analíticamente de momento una probable deficiencia de gonadotropinas. En RMN muestra hipoplasia adenohipofisaria y no se visualiza ni la neurohipófisis ni el tallo. Carece de antecedentes obstétricos o familiares de interés. El estudio molecular demostró la presencia de:

- La variante en *CDON* NM\_016952.4:c.3559C>T, p.(Arg1187Cys), en heterocigosis.
- La variante en *HMX3* NM\_001105574.1:c.976G>A, p.(Ala326Thr), en heterocigosis.
- La variante sinónima en *PROKR2* NM\_144773.3:c.1005G>A, p.(Thr335=) en heterocigosis. Si bien se predice la activación de un aceptor crítico de *splicing* dentro del tercer y último exón, la posición nucleotídica no se encuentra conservada.

No se dispone del estudio molecular de los progenitores.

El **probando 91** es un varón con DSO “aislada”, diagnosticada a partir de la detección de anomalías en ecografías prenatales. Muestra agenesia de septo pelúcido e hipoplasia del nervio óptico derecho, sin disfunción hipofisaria, y sin hallazgos patológicos hipofisarios en la imagen de RMN. Tuvo un parto normal y la madre había presentado un aborto previo. El estudio molecular demostró la presencia de:

- La variante probablemente patogénica en *PTCH1* NM\_000264.4:c.3947A>G, p.(Tyr1316Cys) en heterocigosis, heredada del padre, en quien también se encuentra en heterocigosis. Este probando asocia también en *PTCH1* en *cis* la variante de significado incierto NM\_000264.4:c.4324C>T, p.(Arg1442Trp) en heterocigosis, también heredada del padre.
- La variante sinónima en *OTX2* NM\_172337.2:c.420G>C, p.(Pro140=), en heterocigosis, heredada de la madre, en quien también se encuentra en heterocigosis. Supone una posible alteración del proceso de *splicing* por activación de un aceptor críptico dentro del tercer exón.

Otros 4 pacientes (probandos 38, 45, 51 y 54) presentan también agrupación de variantes relevantes en genes relacionados con las vías FGF y SHH, pero, al presentar variantes relevantes en *GLI2*, se describen y discuten dentro de la sección C de *Resultados y Discusión*, dedicada a los pacientes con variantes relevantes en *GLI2*.

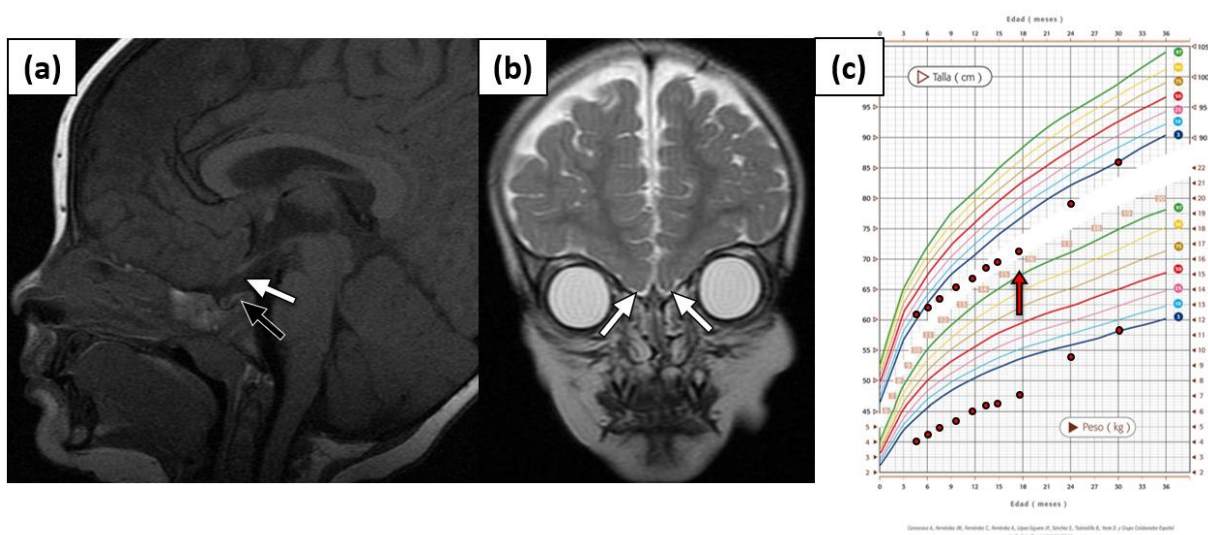
#### A.2.7.2.2. Combinación de variantes relevantes en las vías FGF y NODAL (2 pacientes, 1,8% de la cohorte)

El **probando 53** es un varón con DCHH diagnosticada a los 10 meses de edad a partir de un cuadro de retraso del crecimiento y criptorquidia bilateral. Presenta deficiencia de GH, TSH y gonadotropinas. En la imagen de RMN muestra una silla turca pequeña con adenohipófisis hipoplásica, aparentemente adecuada diferenciación de neurohipófisis, aunque con menor intensidad de lo habitual, un tallo filiforme que nace de un hipotálamo de pequeño espesor e

hipoplasia de ambos bulbos olfatorios (**Figura 14**). Asocia agenesia renal derecha, sincinesias bimanuales, hipotonía axial, cara triangular, leve hipoplasia medifacial, paladar ojival, ojos prominentes y escroto hipoplásico. Nació mediante cesárea por presentación podálica a las 36+5 semanas de gestación, sin precisar reanimación, fue pequeño para la edad gestacional y presentó una hipoglucemia en las primeras horas de vida. No presenta antecedentes familiares relevantes.

El estudio genético demostró la presencia de los siguientes hallazgos:

- Deleción de 1,65 Mb en la región Xp22.31, incluyendo *ANOS1 (KAL1)* y otros 6 genes no asociados de momento a fenotipos patológicos (*MIR651, VCX2, VCX3, FAM9A, FAM9B* y *TBL1X*), en hemicigosis, heredada de la madre, en quien se encuentra en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *FOXH1* NM\_003923.2:c.988C>T, p.(Leu330Phe), en heterocigosis y heredada del padre, en quien se encuentra en heterocigosis.



**Figura 14. Imágenes de RMN cerebral a la edad de 16 meses y curva de crecimiento del probando 53. (a): Imagen de RMN en T1 sagital en línea media, mostrando tallo hipofisario adelgazado (flecha blanca), hipoplasia adenohipofisaria y dudosa, aunque aparente, diferenciación de neurohipófisis en localización normal (flecha negra). (b): Imagen coronal en T2, mostrando hipoplasia de bulbos olfatorios (flechas). (c): Curva de crecimiento. La flecha roja muestra el comienzo del tratamiento con rhGH.**

El **probando 26** es un varón con DCHH, con deficiencia de GH, TSH, ACTH y LH/FSH. No están disponibles los datos sobre la imagen de RMN. El estudio molecular mostró la presencia de las siguientes variantes:

- La variante probablemente patogénica en *SPRY4* NM\_030964.3:c.722C>A, p.(Ser241Tyr) en heterocigosis.
- La variante de significado incierto en *PITX2* NM\_000325.5:c.697A>G, p.(Met233Val), en heterocigosis.

No se dispone del estudio molecular en los progenitores.

#### A.2.7.2.3. Combinación de variantes relevantes en las vías **SHH** y **NODAL** (2 pacientes, 1.8% de la cohorte)

Dos pacientes con DCHH (probandos 42 y 69) presentan simultáneamente anomalías en genes relacionados con la vía SHH y en genes relacionados la vía NODAL. Al presentar ambos probandos variantes relevantes en *GLI2*, son detallados y discutidos dentro de la sección C de *Resultados y Discusión*).

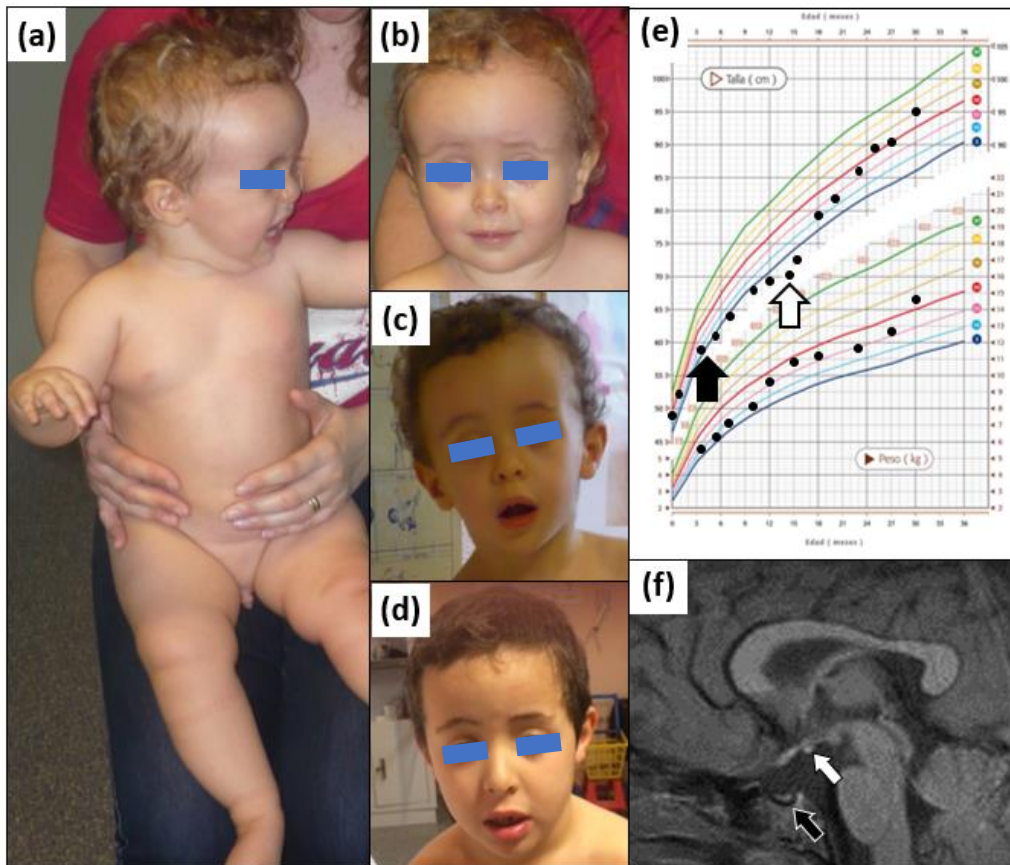
## B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL PRIMER PACIENTE DESCRITO CON DCHH CON UNA MUTACIÓN DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN BMP4

En el **probando 1** del presente estudio se ha detectado una mutación sin sentido en el gen *BMP4*, que implica truncamiento de la proteína debido a la aparición de un codón de parada prematuro. Al tratarse del primer paciente descrito en la literatura con fenotipo de DCHH que presenta una mutación con evidente pérdida de función en *BMP4*, se desarrolla en detalle a continuación.

### B.1. Datos fenotípicos

Paciente caucásico varón, de padres no consanguíneos, nacido tras un embarazo sin complicaciones, a las 40 semanas de edad gestacional mediante parto vaginal, presentación cefálica, con uso de espátulas en la parte final del expulsivo. Test de Apgar de 7 al minuto y de 8 a los 5 minutos de vida. Peso, longitud y perímetro cefálico al nacimiento dentro de límites normales: peso 3.030 gr (-0,93 DE), longitud 49 cm (-0,83 DE), perímetro cefálico 34 cm (-0,68 DE), según las tablas de referencia del Estudio Transversal Español de Crecimiento 2010 (86). Comenzó con retraso del crecimiento hacia los 4-5 meses de vida, asociado a vómitos frecuentes. Se objetivó entonces un fenotipo sugestivo de hipopituitarismo con frente amplia y prominente, fontanela amplia, raíz nasal deprimida, abdomen globuloso, escroto hipoplásico y pene de 2,5 cm (-1,8 DE) (**Figura 15A-D**). En ese momento se diagnosticó de hipotiroidismo central, con T4 libre 0,57 ng/dl (valores normales 0,62-2,46) y TSH 3,16  $\mu$ UI/ml (valores normales 0,01-8,8), similar en varias determinaciones. Se realizó test largo de TRH, con resultado compatible con hipotiroidismo de origen hipotalámico, y comienza tratamiento con levotiroxina sódica. En ese momento, con 4-5 meses, presentaba niveles de IGF1 <25 ng/ml (< -2,5 DE), IGFBP3 0,87  $\mu$ g/ml (-1,31 DE), LH 0,3 mUI/l y FSH 0,4 mUI/l. Una vez normalizados los niveles sanguíneos de T4 libre se realizó, con 8 meses de vida, prueba de estímulo de GH (test de glucagón, con GH basal 1,2 ng/ml, sin elevación tras el estímulo). La imagen de RMN mostraba hipoplasia de adenohipófisis, neurohipófisis ectópica

y tallo no visible (**Figura 15F**). Comenzó tratamiento sustitutivo con rhGH a los 14 meses de edad con buena respuesta (**Figura 15E**). En ese momento, antes de comenzar el tratamiento con rhGH, presentaba un peso de 10,140 gr (-0,65 DE) y una longitud de 71 cm (-2,75 DE, según tablas del Estudio Transversal Español de Crecimiento 2010) (86). Había desarrollado una macrocefalia relativa, con perímetro cefálico 48,5 cm (+0,83 DE). Una ecografía abdominal demostró la presencia de un quiste cortical de 1 cm de diámetro en el polo superior del riñón izquierdo. Un estudio del cariotipo resultó entonces normal.



**Figura 15.** (a-b): Aspecto del paciente con 14 meses de edad, antes del inicio de tratamiento con rhGH. Frente amplia y prominente, raíz nasal deprimida, obesidad troncular, escroto hipoplásico. (c-d): Aspecto a los 2 y a los 6 años de edad; se observan cejas elevadas, leve ptosis y narinas levemente antevertidas. (e): Gráfica de crecimiento; véase el retraso de crecimiento mantenido a pesar del inicio del tratamiento con levotiroxina (flecha negra), y la mejoría tras el inicio de tratamiento con rhGH (flecha blanca). (f): Imagen de RMN del área selar a los 5 años de vida; véase la adenohipófisis hipoplásica (flecha negra) y la neurohipófisis ectópica (flecha blanca).



Actualmente, con 6 años, presenta retraso psicomotor leve (torpeza motora fina y gruesa, estando escolarizado de manera normal con algunas dificultades de aprendizaje). Recibe tratamiento de estimulación, fisioterapia y logopedia en un centro de atención temprana desde los 8 meses. Lenguaje actualmente normal. Ha desarrollado obesidad aparentemente exógena [peso 30,9 Kg (+2,35 DE), talla 120,5 cm (+0,74 DE), IMC 21,28 Kg/m<sup>2</sup> (+2,46 DE)], con metabolismo lipídico y glucídico normal y buen control del hipotiroidismo, con discreta mejoría tras medidas dietéticas y ejercicio físico. La macrocefalia relativa ha evolucionado a macrocefalia franca [perímetro cefálico 55,5 cm (+2,75 DE)], sin datos de hipertensión intracraneal, y con RMN reciente que muestra aumento de los espacios subaracnoideos de la convexidad. En una evaluación oftalmológica reciente se han detectado miopía y astigmatismo bilaterales con disminución de la agudeza visual (0,3 bilateral), por lo que ha precisado comenzar a utilizar lentes correctoras. El paciente presenta paladar ojival muy estrecho con apiñamiento dental, sin labio leporino o fisura palatina y sin anomalías digitales. No se ha detectado patología en ninguno de los progenitores ni en ninguno de sus 3 hermanos, si bien la talla de una de sus hermanas se encuentra en un percentil 8.

## B.2. Resultados del estudio molecular

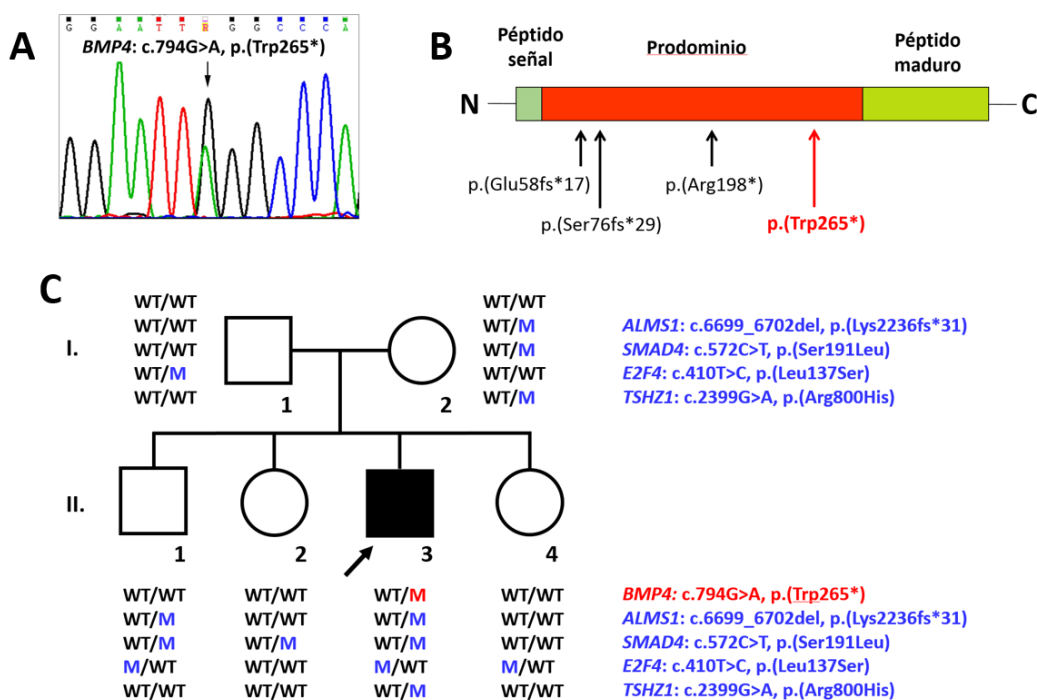
Tras la aplicación del panel HIPOPIT\_V1, en el probando 1 se ha identificado, en el gen *BMP4*, la variante NM\_001202.3:c.794G>A, p.(Trp265\*) en heterocigosis, cuya presencia se confirmó mediante secuenciación Sanger (**Figura 16A**). Dicha variante no se encuentra descrita en las bases de datos ExAC, gnomAD, 1000G y ESP6500. Se trata de una mutación *de novo*, no presente en ninguno de sus progenitores (**Figura 16C**). Debe considerarse patogénica según los criterios ACMG 2015 (PVS1, PS2, PM2) (80).

Este cambio introduce un codón de parada prematuro en la posición aminoacídica 265, dentro de la región del prodominio, lo que impediría la traducción de la región correspondiente al péptido maduro y activo (**Figura 16B**). Existen varios transcritos distintos de este gen, pero en todos es idéntico el exón en el que se incluye este cambio y toda la secuencia posterior al cambio (las



diferencias se encuentran en exones no codificantes o en el extremo 5' del prodominio, por lo que la mutación afecta a todas las isoformas por igual).

La aplicación posterior del panel ampliado HIPOPIT\_V3 permitió detectar, además, otras 3 variantes relevantes en los genes *TSHZ1*, *ALMS1*, *SMAD4* y *E2F4* (Tabla 10). La segregación familiar de todas las variantes se muestra en la Figura 16C.



**Figura 16. A:** Cromatograma que muestra la variante NM\_001202.5:c.794G>A, p.(Trp265\*) en heterocigosis, detectada en el probando. **B:** Representación esquemática de los dominios de la proteína BMP4 y las variantes truncadoras descritas aquí (resaltada en rojo) y en la literatura. Se muestra en la Tabla S6.1 del Anexo 6 información más detallada sobre los pacientes previamente publicados en los que se han descrito estas variantes. **C:** Árbol genealógico que muestra la segregación alélica de las 4 variantes de significado incierto identificadas en este estudio (en azul) (ver también la Tabla 10). El probando presenta la variante sin sentido p.(Trp265\*) en BMP4, la variante con cambio del marco de lectura en ALMS1 y las 3 variantes no sinónimas de significado incierto en SMAD4, E2F4 y TSHZ1, heredadas de los padres sanos. Diferentes combinaciones de estas variantes están presentes en los padres y hermanos sanos, ninguno de los cuales presenta la variante patogénica de novo p.(Trp265\*) en BMP4. WT: alelo salvaje ("wild type"); M: alelo mutante.

Tabla 10. Características de las variantes relevantes detectadas en el probando 1

Gen (#OMIM)	Tránsito, cDNA y proteína	Zigotidad	Tipo de variante	Clasificación ACMG	Predicción de patogenicidad		Frecuencia alélica (%)			Vía de señalización implicada	Comentarios
					CADD Score (†)	DANN Score (‡)	gnomAD	1000 Genomes	ESP6500		
<b>BMP4</b> (112262)	NM_001202.5:c.794G>A <b>p.(Trp265*)</b>	HTZ	<i>stop gain</i>	Patogénica	41	0.997	Ausente	Ausente	Ausente	BMP/TGF-β	<i>De novo</i> . Truncamiento dentro de la región del prodominio, lo que impide la traducción de la región correspondiente al péptido maduro y activo.
<b>ALMS1</b> (606844)	NM_015120.4:c.6699_6702del <b>p.(Lys2236fs*31)</b>	HTZ	<i>frameshift</i>	VUS+	24	ND	Ausente	Ausente	Ausente	NOTCH	Pérdida del 46% de la proteína. Están descritas en el gen <i>ALMS1</i> varias mutaciones truncadoras similares en la extensión del fragmento perdido (tanto mayores como menores en extensión), en las que se ha demostrado pérdida de función (87). En todas ellas se pierde el motivo ALMS en el extremo C-terminal de la proteína.
<b>SMAD4</b> (600993)	NM_005359.5:c.572C>T <b>p.(Ser191Leu)</b>	HTZ	<i>missense</i>	VUS	16.9	0.804	0.001	Ausente	Ausente	BMP/TGF-β	Variante situada entre el dominio MH1 de unión a ADN (aas 18-142) y la región SAD (aas 275-320).
<b>E2F4</b> (600659)	NM_001950.3:c.410T>C <b>p.(Leu137Ser)</b>	HTZ	<i>missense</i>	VUS	17.26	0.941	0.015	0.04	Ausente	BMP/TGF-β	Cambio de aminoácido dentro de la región de dimerización (aas 86-181)
<b>TSHZ1</b> (614427)	NM_005786.5:c.2264G>A <b>p.(Arg755His)</b>	HTZ	<i>missense</i>	VUS	19.89	0.978	0.003	0.0025	0.0077	Prokineticina	Variante situada fuera de los dominios principales de la proteína, a 85 posiciones del dominio de unión al ADN (aas 885-955)
<b>HTZ:</b> Heterocigosis; <b>VUS:</b> Variante de significado incierto; <b>ND:</b> No disponible; <b>(†):</b> Ref. (83); <b>(‡):</b> Ref. (88)											

## C. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL GRUPO DE PACIENTES CON VARIANTES RELEVANTES EN *GLI2*

En la cohorte estudiada se han identificado 11 pacientes con variantes relevantes en *GLI2*, cuyas características clínicas y moleculares se describen en detalle en esta sección de los resultados.

Han sido identificadas variantes relevantes en el gen *GLI2* en 11 probandos y 14 familiares, lo que en suma supone un total de 25 individuos de 11 grupos familiares distintos. En global se trata de 12 variantes diferentes, 3 de las cuales no han sido descritas previamente, concretamente las 3 con efecto truncador de la proteína: 2 por cambio de pauta y una mutación sin sentido: NM\_005270.4:c.2125del, p.(Leu709Trpfs\*15); NM\_005270.4:c.800\_801delinsGA, p.(Ser267\*); y NM\_005270.4:c.2575del, p.(Ser859Profs\*53). El caso de la variante NM\_005270.4:c.2125del, p.(Leu709Trpfs\*15) ha sido recientemente publicado a raíz del presente estudio (89). Otra de las variantes sin sentido identificadas en una de las familias incluidas en este estudio, p.(Arg1226\*), ha sido muy recientemente publicada por otros dos grupos (90,91).

Las variantes truncadoras representan un tercio del total (4/12). Las variantes de cambio de sentido (“*missense*”) representan 7/12 (58,3%). La variante NM\_005270.4:c.132G>A, p.(Ala44=), 1/12 (8,3%), es una variante sinónima con posible repercusión en el proceso de *splicing* por la predicción de aparición de un nuevo “*branch point*”.

Es predecible que las 4 variantes truncadoras causen la pérdida del dominio C-terminal responsable de la activación de la transcripción (**Figura 26**), lo cual implica necesariamente repercusión negativa en la función de la proteína, tal y como ocurre en otras variantes del mismo tipo publicadas con anterioridad (92,93).

3/11 probandos (27,3%) presentan más de una variante relevante en *GLI2*. Éstas están presentes en *cis* en todos los casos. Se han identificado las mismas dos variantes en heterocigosis en dos probandos no emparentados:

p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val). Esta pareja de variantes en *cis* ya ha sido descrita en pacientes con HIC e implica disminución parcial de la actividad transactivadora de la proteína *in vitro* (94). Además de presentarse en *cis*, ambas presentan frecuencias alélicas muy similares, lo que refleja su transmisión alélica conjunta por desequilibrio de ligamiento. Igualmente, la variante NM\_005270.4:c.4332\_4333delinsAT p.(Met1444\_Leu1445delinsIlePhe), presente en dos de los probandos de la presente cohorte, también se ha descrito en pacientes con HIC e implica pérdida parcial de función *in vitro* (94).

Ha sido posible realizar el estudio genético familiar en 8/11 probandos (72,7%). Se ha identificado algún familiar portador de la/s variante/s en *GLI2* en 7/8 familias (87,5%) y se ha demostrado el carácter *de novo* en 1/8 (12,5%). Todas las variantes relevantes se han identificado siempre en heterocigosis, salvo en un único individuo, madre del probando 74, en la que aparecen varias variantes en homocigosis.

En todos los probandos (11/11 - 100%) se han identificado, además, variantes relevantes en algún otro gen o genes con posible implicación en el desarrollo y función hipofisarios.

Se resumen los aspectos principales del fenotipo de los 11 probandos en la **Tabla 11** y las variantes identificadas en los mismos y sus principales características en la **Tabla 12**. Seguidamente, se describen con mayor detalle cada uno de los cuatro casos y familias en los que se han identificado mutaciones patogénicas (con efecto truncador de la proteína) en el gen *GLI2*.

Tabla 11. Resumen del fenotipo de los once probandos con variantes relevantes en *GLI2* incluidos en el estudio

#	Grupo de DX	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de imagen en RMN	Otros datos fenotípicos	Antecedentes obstétricos	Antecedentes familiares
38	DCHH	V	0	Hipoglucemia neonatal, micropene	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Nariz bulbosa, labios gruesos, epicanto, paladar estrecho, estrabismo, obesidad.	Normal	Varios familiares con fenotipo patológico (Figura 22)
32	DCHH	V	0	Micropene, criptorquidia, labio leporino, polidactilia	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible. Atrofia cerebral córtico-subcortical.	Polidactilia postaxial en ambas manos, labio leporino bilateral, hipoplasia malar, microcefalia, RPM grave, epilepsia, escoliosis. Mala respuesta al tratamiento con rhGH.	41 semanas. Fórceps. Apgar 5/7. Hipoglucemia e hiponatremia.	Padre camptodactilia en mano izquierda. Tía paterna sindactilia dedos 3-4 de la mano bilateral. Abuelo paterno polidactilia de ambos pies.
42	DCHH	V	7	Retraso del crecimiento	GH, TSH	NH ectópica, tallo adelgazado, AH hipoplásica	Nariz bulbosa	Normal	Dos primas paternas recibieron rhGH en la infancia (con padres de talla baja). Hermanastra materna sindactilia dedos 2-3 en ambos pies (también el padrastro, no relacionado con el probando)
8	DCHH	M	6	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH	NH ectópica, AH hipoplásica	-	Normal	Origen turco
45	DCHH	M	2	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, silla turca vacía parcial, NH no visible	-	ND	No relevantes
95	DSO	V	0,5	Ictericia prolongada, criptorquidia bilateral	TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	NH normal, tallo fino, AH hipoplásica. Esquisencefalia izquierda, hipoplasia de NO, hipoplasia de CC, hipoplasia de bulbo olfatorio izquierdo.	RPM grave, hipotonía, aplanamiento frontal, ceguera, síndrome pierde-sal cerebral, hepatomegalia.	Parto normal	Desconocidos (adopción). Origen sudamericano.
54	DCHH	M	1	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo normales	-	Normal	No relevantes
51	DCHH	V	13	Micropene, criptorquidia unilateral, retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	NH ectópica, tallo normal, AH hipoplásica	Riñón en herradura	ND	No relevantes

Tabla 11. (Continuación)

#	Grupo de DX	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de imagen en RMN	Otros datos fenotípicos	Antecedentes obstétricos	Antecedentes familiares
69	DCHH	V	0	Micropene, criptorquidia unilateral, hipoglucemia y colestasis neonatales	TSH, ACTH, LH/FSH, GH desconocido	NH no visible, tallo normal, AH hipoplásica	Encefalopatía (convulsiones, RPM), pie equinovaro bilateral, anomalías digitales (camptodactilia de los dedos 2º-4º de las manos y clinodactilia del 5º). Insuficiencia respiratoria desde el nacimiento. Fallecido a los 4 meses de edad por exacerbación de su insuficiencia respiratoria.	Parto eutócico. Apgar 6/7. Precisa soporte respiratorio con CPAP desde el nacimiento.	Consanguinidad (padres primos hermanos). Etnia gitana
74	DAGH-HP	V	11	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, silla turca vacía parcial, NH y tallo normales	Hipotiroidismo primario	ND	ND
63	DCHH	V	1	Hipoglucemia, micropene, retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	NH no visible, tallo no visible, AH hipoplásica	Respuesta parcial al tratamiento con GH. Rasgos faciales peculiares. Realizado estudio previo de sd. Williams negativo.	ND	No relevantes

**DX:** Diagnóstico; **TTO:** Tratamiento; **RMN:** Resonancia magnética nuclear; **DCHH:** Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **DSO:** Displasia septo-óptica; **DAGH-HP:** Deficiencia aislada de GH con anomalías hipofisarias en la imagen de RMN; **V:** Varón; **M:** Mujer; **ND:** No disponible; **AH:** Adenohipofísis; **NH:** Neurohipofísis; **NO:** Nervio/s óptico/s; **CC:** Cuerpo calloso; **SP:** Septo pelúcido; **RGE:** Reflujo gastroesofágico; **CIV:** Comunicación interventricular; **CIA:** Comunicación interventricular; **RPM:** Retraso psicomotor; **TAH:** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad; **HPE:** Holoprosencefalia; **PC:** Perímetro cefálico; **TEA:** Trastorno del espectro autista; **FIV:** Fecundación in vitro; **PEG:** Pequeño para la edad gestacional; **EG:** Edad gestacional; **CPAP:** Presión positiva continua en la vía aérea; **CIR:** Crecimiento intrauterino restringido; **RPBF:** Riesgo de pérdida de bienestar fetal.

**Tabla 12. Variantes relevantes presentes en cada uno de los probandos junto con la(s) variante(s) identificada(s) en GLI2 (panel HIPOPIT\_V3)**

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o función del gen	Frecuencia alélica			GERP Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000 G (%)	ESP6500 (%)				
38	GLI2	NM_005270.4:c.3676C>T, p.(Arg1226*)	HTZ	Nonsense	Padre	Patogénica	SHH	ND	ND	ND	3,87	37	0,996	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor de <i>splicing</i> alternativo)
	FGF8	NM_033163.3:c.477G>A, p.(Thr159=)	HTZ	Sinónima	Madre	VUS	FGF	0,01	ND	0,03	-1,2	ND	0,7797	
	SIM1	NM_005068.2:c.450C>G, p.(Phe150Leu)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,0004	0,02	0,008	-0,6	14,14	0,8473	
	ALK	NM_004304.4:c.4255G>A, p.(Glu1419Lys)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Gen candidato para HHC (95)	0,046	0,1	0,115	5,37	25,3	0,9991	
	TRIP11	NM_004239.3:c.5298G>T, p.(Lys1766Asn)	HTZ	Missense	Madre	VUS	WNT	0,122	0,1	0,092	4,01	24,9	0,9868	
32	GLI2	NM_005270.4:c.2125del, p.(Leu709Trpfs*15)	HTZ	Frameshift	De novo	Patogénica	SHH	ND	ND	ND	4,09	28,8	ND	Nueva variante
	CHD7	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	Padre	Probablemente benigna	WNT	0,609	0,3	0,906	5,36	14,43	ND	
	TGFB2	NM_003238.3:c.272G>A, p.(Arg91His)	HTZ	Missense	Padre	VUS	BMP/TGF-β	0,387	0,1	0,37	5,45	29,2	0,9995	
	BOD1L1	NM_148894.2:c.5974G>A, p.(Glu1992Lys)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Fork protection pathway. Interacción con SOX2	0,021	0,04	0,031	4,7	24,8	0,9969	
42	GLI2	NM_005270.4:c.800_801delinsGA, p.(Ser267*)	HTZ	Nonsense	Madre	Patogénica	SHH	ND	ND	ND	4,91	29	ND	Nueva variante
	FOXH1	NM_003923.2:c.984C>G, p.(Asp328Glu)	HTZ	Missense	Padre o de novo	VUS	NODAL, BMP/TGF-β	0,154	0,04	0,115	-2,27	22,9	0,9819	Variante dentro del "SMAD interaction motif" (SIM) (aas 327-348). Ya descrita previamente, con estudio funcional alterado (96)
	PITX2	NM_000325.5:c.562G>A, p.(Ala188Thr)	HTZ	Missense	Padre o de novo	VUS	NODAL, BMP/TGF-β, SHH, WNT	0,298	0,1	0,246	3,15	17,28	0,9755	
	IL6ST	NM_002184.3:c.721A>G, p.(Lys241Glu)	HTZ	Missense	Padre o de novo	VUS	NOTCH	0,088	0,2	0,031	5,91	22,5	0,9983	Dentro del 2º dominio Fibronectina-III (aas 224 – 324)
	DISP3	NM_020780.1:c.3757G>A, p.(Val1253Ile)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH	0,019	0,1	0,008	4,64	21,4	0,9989	Dentro del 5º bucle extracelular (proteína de 12 dominios transmembrana)

Tabla 12. (Continuación)

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o Función del gen	Frecuencia alélica			GERP Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
8	GLI2	NM_005270.4:c.2575del, p.(Ser859Profs*53)	HTZ	Frameshift	ND	Patogénica	SHH	ND	ND	ND	4,48	35	ND	Nueva variante
	EYA4	NM_004100.4:c.838C>A, p.(Gln280Lys)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH, WNT, interacción con SIX3	0,003	0,02	0,008	5,73	32	0,9964	
	PCSK1	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas	3,846	2,1	3,65	6,06	21,4	0,9955	Misma variante que en el paciente 69. Dentro del dominio Peptidasa S8 (aas 162-451) descrita con anterioridad con repercusión funcional, con disminución del 10,4% de actividad respecto al alelo salvaje (97)
	AXIN1	NM_003502.3:c.43A>C, p.(Ser15Arg)	HTZ	Missense	ND	VUS	WNT	ND	ND	ND	4,17	24,8	0,9979	
	RBPJ	NM_005349.3:c.244dupA, p.(Glu85Argfs*10)	HTZ	Frameshift	ND	VUS	NOTCH	0,017	ND	ND	5,21	34	ND	Variante truncadora con pérdida de todos los dominios importantes de la proteína
	AXL	NM_021913.3:c.1082A>C, p.(Gln361Pro)	HTZ	Missense	ND	VUS	Migración, supervivencia y expresión de neuronas GnRH	0,141	0,1	0,162	4,36	25,7	0,9949	Dentro del 2º dominio Fibronectina-III (aas 336-428)
	DNER	NM_139072.3:c.121C>T, p.(Pro41Ser)	HTZ	Missense	ND	VUS	NOTCH	0,718	0,3	ND	2,63	20,4	0,9934	
	FKBP8	NM_012181.4:c.123_134del, p.(Glu43_Glu46del)	HTZ	Delección en fase	ND	VUS	SHH	0,016	ND	ND	ND	ND	ND	Delección de 4 residuos Glu en una cadena de 11 Glu (aas 36-46), a su vez dentro de una región rica en residuos Glu (aas 22-92)



Tabla 12. (Continuación)

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o Función del gen	Frecuencia alélica			GERP Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
45	GLI2	NM_005270.4:c.621C>A, p.(His207Gln)	HTZ	Missense	Padre	VUS	SHH	0,0004	ND	ND	-3,13	23,5	0,9819	
	HMX2	NM_005519.1:c.555C>G, p.(Ser185Arg)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico FGF	0,06	0,02	0,06	4,39	31	0,9982	Dentro del homeodominio de unión a DNA (aas 149–208).
	ARNT2	NM_014862.3:c.84G>A, p.(Ala28=)	HTZ	Sinónima	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,0008	0,02	ND	-1,3	ND	0,8717	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico de <i>splicing</i> )
	CHD7	NM_017780.3:c.1696C>G, p.(Pro566Ala)	HTZ	Missense	Madre	VUS	WNT	0,001	ND	ND	4,33	20,8	0,9894	Dentro de una región rica en residuos Pro (aas 383–568)
	CHD7	NM_017780.3:c.3379-33A>G	HTZ	Intrónica	Padre	Probablemente benigna	WNT	0,42	0,2	0,5	-11,2	ND	0,2801	Variante intrónica con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico de <i>splicing</i> )
	IFT172	NM_015662.1:c.3401G>T, p.(Arg1134Leu)	HTZ	Missense	Padre	Probablemente benigna	SHH	0,54	0,3	0,4	5,47	35	0,9987	
	PPRC1	NM_015062.3:c.475C>T, p.(Arg159Trp)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Gen candidato para DCHH (37)	ND	ND	ND	4,77	34	0,9991	
	AXL	NM_021913.3:c.1549G>A, p.(Gly517Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo de neuronas GnRH	0,425	0,2	0,48	4,88	33	0,9987	
	PPHLN1	NM_016488.6:c.38C>T, p.(Pro13Leu)	HTZ	Missense	Padre	VUS	WNT	0,011	0,02	ND	5,34	29,5	0,9989	
	ZFYVE9	NM_004799.2:c.2755G>C, p.(Val919Leu)	HTZ	Missense	Madre	VUS	BMP/TGF-β	ND	ND	ND	5,26	26,1	0,9949	
	TGFBR2	NM_003242.5:c.1159G>A, p.(Val387Met)	HTZ	Missense	Padre	VUS	BMP/TGF-β	0,114	0,02	0,231	4,15	24,5	0,9987	Dentro del dominio tirosín kinasa (aas 244–544), situada a 8 aas de distancia del sitio activo aceptor de protones (aa 379)
	SYNPO2	NM_133477.2:c.857T>C, p.(Val286Ala)	HTZ	Missense	Padre	VUS	WNT	0,005	ND	0,077	5,11	23,8	0,9984	
	KLF4	NM_004235.4:c.716_766del, p.(Gly239_Pro255del)	HTZ	Delección en fase	Madre	VUS	WNT, NOTCH, interacción con SOX2	0,171	ND	ND	ND	ND	ND	Delección en fase de 17 codones (Gly239_Pro255), incluyendo un residuo de serina que se fosforila en posición 254
AKT1S1	NM_001098633.2:c.227G>A, p.(Arg96Gln)	HTZ	Missense	Madre	VUS	NOTCH	0,085	0,1	0,165	1,76	23,1	0,9964		

Tabla 12. (Continuación)

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o Función del gen	Frecuencia alélica			GERP Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
95	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4332_4333delinsAT, p.(Met1444_Leu1445delinsIlePhe)	HTZ	Delección-Inserción	ND	VUS +	SHH	0,93	0,7	0,077	3,69	16,78	ND	Mismas 2 variantes que en el probando 54. Variante ya descrita en pacientes con HIC. Menor actividad transcripcional en estudio funcional <i>in vitro</i> (94)
	<i>NR4A1</i>	NM_001202233.1:c.1292G>A, p.(Arg431His)	HTZ	Missense	ND	VUS	Regulación de POMC. Relación con la regulación del eje tiroideo.	0,51	0,4	0,008	4,95	34	0,9995	Dentro de la región de unión al ligando (aas 409-459)
	<i>WISP1</i>	NM_003882.3:c.577C>T, p.(Arg193Cys)	HTZ	Missense	ND	VUS	WNT	0,0004	ND	ND	4,59	33	0,9988	
	<i>NOTCH1</i>	NM_017617.3:c.6430G>A, p.(Gly2144Ser)	HTZ	Missense	ND	VUS	NOTCH	0,002	ND	ND	3,18	18,07	0,9202	
	<i>AGAP1</i>	NM_001037131.2:c.1435G>A, p.(Asp479Asn)	HTZ	Missense	ND	VUS	Interacción con las redes SOX2 y GATA2	0,002	ND	0.0001	5,36	26,8	0,9988	Variante dentro del dominio PH (aas 346-588)
54	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4332_4333delinsAT, p.(Met1444_Leu1445delinsIlePhe)	HTZ	Delección-Inserción	ND	VUS +	SHH	0,93	0,7	0,077	3,69	16,78	ND	Ver paciente 95
	<i>GLI3</i>	NM_000168.5:c.2179G>A, p.(Gly727Arg)	HMZ	Missense	Padre o Madre	Probablemente patogénica	SHH	0,541	0,3	0,546	5,82	26,8	0,9994	Variante recogida en OMIM, en una familia con polidactilia postaxial tipo A/B (98)
	<i>SPRY4</i>	NM_030964.3:c.722C>A, p.(Ser241Tyr)	HTZ	Missense	Madre	Probablemente patogénica	FGF, WNT	0,455	0,2	0,431	5,45	27,3	0,9946	Dentro del dominio SPR (aas 166-273)
	<i>DVL2</i>	NM_004422.2:c.1351A>G, p.(Asn451Asp)	HTZ	Missense	Padre	VUS	WNT, NOTCH	0,001	ND	ND	4,66	28,4	0,9975	Dentro del dominio DEP (aas 433-507)
	<i>TRAPPC9</i>	NM_001160372.1:c.853C>T, p.(Arg285Trp)	HTZ	Missense	Padre	VUS	NFKB, interacción indirecta con PITX1 y NR5A1	0,046	0,02	0,054	5,72	35	0,9993	

Tabla 12. (Continuación)

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o Función del gen	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
51	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4558G>A, p.(Asp1520Asn)	HTZ	Missense	Padre	VUS	SHH	0,919	0,5	1,092	4,98	29,6	0,9992	Mismas 2 variantes que en el paciente 10. Combinación descrita en pacientes con HIC, incluyendo estudio funcional <i>in vitro</i> que muestra menor actividad transcripcional, tanto de
	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4054A>G, p.(Met1352Val)	HTZ	Missense	Padre	Probablemente benigna	SHH	0,855	0,3	1,069	-5,33	0,007	0,6522	p.(Asp1520Asn) aislada como de la combinación de ambas (39,94,99,100)
	<i>LHX3</i>	NM_014564.3:c.876G>A, p.(Ser292=)	HTZ	Sinónima	Padre	VUS	Desarrollo hipofisario ("gen clásico")	ND	ND	ND	-4,38	14,44	0,9029	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico)
	<i>ZNF8</i>	NM_021089.2:c.1450C>T, p.(Arg484Trp)	HTZ	Missense	Madre o <i>de novo</i>	VUS	BMP/TGF-β	0,007	ND	0,008	3,46	34	0,9992	Dentro del 7º dominio de dedos de zinc (aas 467 – 489)
	<i>OVOL1</i>	NM_004561.3:c.173C>T, p.(Pro58Leu)	HTZ	Missense	Padre	VUS	WNT, BMP/TGF-β	0,711	0,3	0,716	4,95	23,1	0,9859	
	<i>FGFR2</i>	NM_022970.3:c.1370A>G, p.(Asp457Gly)	HTZ	Missense	Padre	VUS	FGF	ND	ND	ND	6,03	26,3	0,9957	

Tabla 12. (Continuación)

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o Función del gen	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
69	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4558G>A, p.(Asp1520Asn)	HTZ	Missense	Padre o Madre	VUS	SHH	0,919	0,5	1,092	4,98	29,6	0,9992	Ver paciente 51 (misma combinación de variantes en <i>GLI2</i> )
	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4054A>G, p.(Met1352Val)	HTZ	Missense	Padre o Madre	Probablemente benigna	SHH	0,855	0,3	1,069	-5,33	0,007	0,6522	
	<i>DISP3</i>	NM_020780.1:c.2075T>A, p.(Val692Glu)	HTZ	Missense	Padre	VUS	SHH	0,0195	ND	0,0078	5,39	27,3	0,9866	Dentro del 4º dominio intracelular (aas 617-729) (proteína de 12 dominios transmembrana)
	<i>SMAD2</i>	NM_001003652.3:c.941G>T, p.(Gly314Val)	HTZ	Missense	De novo	Probablemente patogénica	BMP/TGF-β, NODAL	ND	ND	ND	5,81	34	0,9979	Dentro del dominio MH2 (aas 274-467).
	<i>TSPYL2</i>	NM_022117.3:c.1037G>A, p.(Arg346Gln)	Hemicigosis	Missense	Madre	VUS	BMP/TGF-β	0,004	ND	ND	3,33	26,7	0,9994	En hemicigosis.
	<i>STAT3</i>	NM_139276.2:c.373C>G, p.(Gln125Glu)	HTZ	Missense	Madre	VUS	BMP/TGF-β, vías de señalización de prolactina y leptina, interacción con SOX2	0,037	0,04	ND	5,6	15,09	0,9773	Cambio en el primer nucleótido del exón 5.
	<i>ROR2</i>	NM_004560.3:c.2395C>T, p.(Pro799Ser)	HTZ	Missense	Padre	VUS	WNT	0,207	0,04	0,254	4,65	15,12	0,9989	Dentro de una secuencia rica en prolinas (aas 784-857)
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Procesamiento de prohormonas	3,846	2,1	3,65	6,06	21,4	0,9955	Ver paciente 8 (misma variante)
	<i>IGSF10</i>	NM_178822.4:c.4804G>T, p.(Glu1602*)	HTZ	Nonsense	Padre o Madre	VUS	Participa en la migración de neuronas GnRH	0,246	0,3	0,277	4,88	36	0,9881	Variante truncadora con pérdida del 39% de la proteína, incluyendo casi todos los dominios IG-like C2. Descrita en pacientes con retraso puberal (101)
<i>PLEKHA5</i>	NM_019012.5:c.350G>A, p.(Arg117Gln)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Gen candidato para HHC (102)	0,238	0,02	0,023	4,08	25,6	0,9996		

Tabla 12. (Continuación)

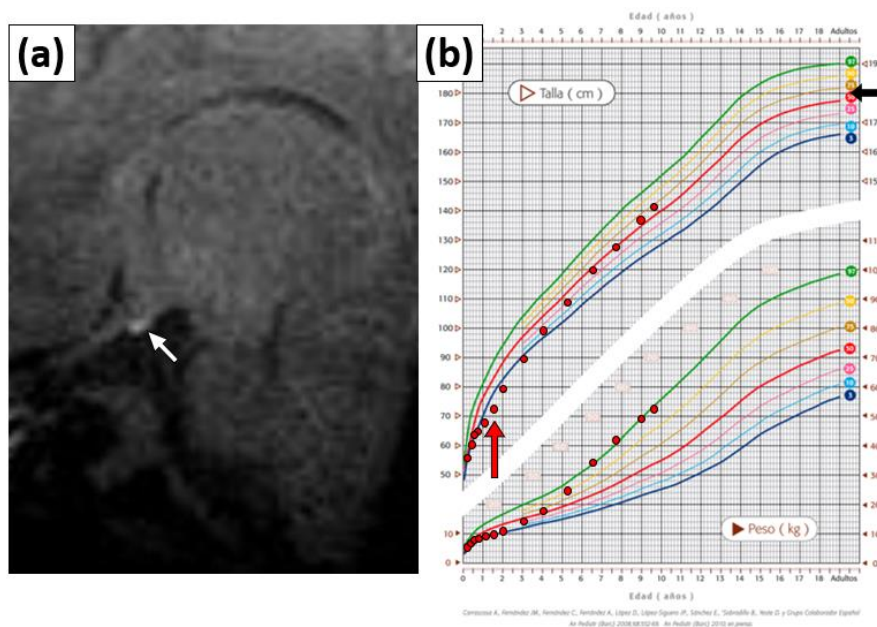
#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación (ACMG) (*)	Vías de señalización implicadas o Función del gen	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
74	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4560T>G, p.(Asp1520Glu)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH	0,067	0,1	0,008	0,46	15,57	0,9954	En la misma posición aminoacídica que la variante p.(Asp1520Asn), presente en los pacientes 51 y 69 (ver paciente 51)
	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.2708C>G, p.(Thr903Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH	0,065	0,1	ND	4,6	23,3	0,9905	
	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.595G>A, p.(Gly199Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH	0,035	0,04	ND	2,9	14,52	0,9969	
	<i>ZIC2</i>	NM_007129.3:c.1399_1413del, p.(Ala467_Val471del)	HTZ	Delección en fase	Madre	VUS	SHH, WNT	0,123	ND	ND	ND	ND	ND	Pérdida en fase de 5 aas (4 Ala y 1 Val), afectando a una región rica en residuos Ala (456-470)
	<i>ALMS1</i>	NM_015120.4:c.9289 <sup>a</sup> >T, p.(Thr3097Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	NOTCH	0,0004	ND	ND	3,27	25,4	0,9872	
63	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.132G>A, p.(Ala44=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	SHH	0,003	ND	0,023	-11,7	ND	0,5217	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (aparición de un nuevo "branch point")
	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.8366C>T, p.(Ala2789Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	WNT	0,008	0,02	0,008	5,32	22,5	0,9886	
	<i>TXNDC5</i>	NM_030810.3:c.1208G>A, p.(Arg403Gln)	HTZ	Missense	ND	VUS	BMP/TGF-β	0,707	0,4	0,9	5,8	33	0,9994	Dentro del dominio <i>Thioredoxin 3</i> (aas 304-429)

**HTZ:** Heterocigosis; **HMZ:** Homocigosis; **ND:** No disponible; **VUS:** Variante de significado incierto; **HHC:** Hipogonadismo hipogonadotropo congénito; **aas:** aminoácidos.

(\*): Ref. (80); (\*\*): Ref. (103); (\*\*\*): Ref. (83); (\*\*\*\*): Ref. (88).

**Probando y familia 38:**

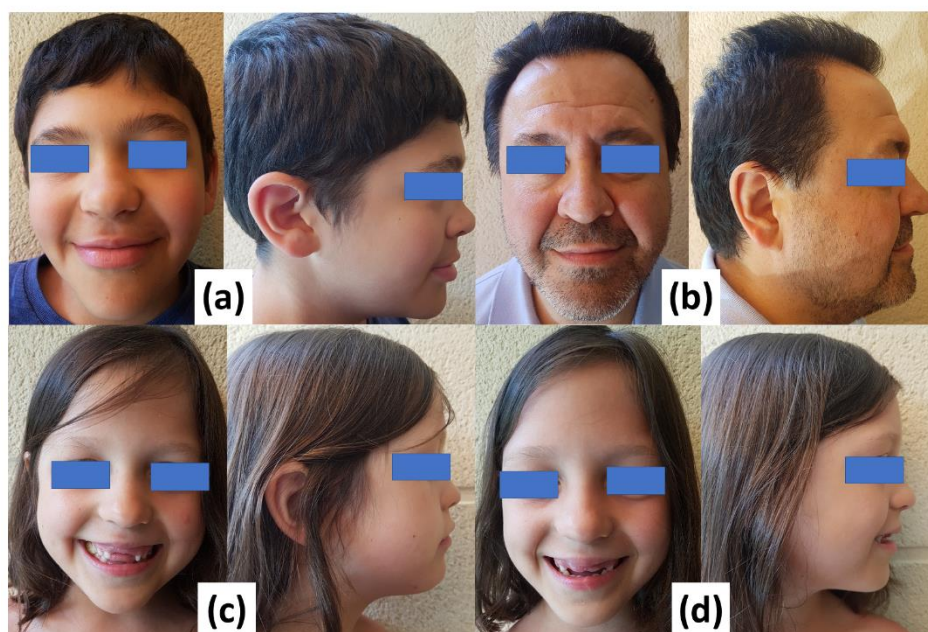
Paciente varón caucásico remitido para estudio genético a los 8 años de edad con DCHH diagnosticada al nacimiento a raíz de un cuadro neonatal de micropene e hipoglucemias (mínimo 27 mg/dl). Embarazo y parto eutócico sin complicaciones, a las 41+1 semanas de edad gestacional, test de Apgar 8/9. Peso y longitud normales al nacimiento [peso 3.985 g, +1.19 DE; longitud 53 cm, +1,22 DE; según tablas de referencia del Estudio Transversal Español de Crecimiento 2010 (86)]. A los 4 días de vida, con glucemia espontánea de 38 mg/dl, presentaba cortisol 0.4 µg/dl (valores normales >18). La imagen de RMN a los 5 días de vida mostró un síndrome del tallo hipofisario interrumpido (hipófisis marcadamente hipoplásica, neurohipófisis ectópica y tallo hipofisario ausente) (**Figura 17A**). A los 20 días de vida presentaba T4 libre 0.65 ng/dl (valores normales 1.16-2.5), sin elevación de TSH (2.73 mUI/ml, valores normales 0.01-3.48). A los 13 meses de vida, con una talla en -3.06 DE y tras 6 meses con velocidad de crecimiento de 7.7 cm/año [-2.94 DE, según tablas del Estudio Longitudinal Español de Crecimiento 1978-2000 (86)], presentaba



**Figura 17. (a):** Imagen de RMN cerebral a los 5 días de vida, centrada en el área selar, mostrando neurohipófisis ectópica (flecha), ausencia de tallo hipofisario e hipoplasia marcada de adenohipófisis. A pesar de la limitada calidad de la imagen, una nueva RMN a los 3 años confirmó definitivamente estos hallazgos (imagen no disponible). **(b):** Curva de crecimiento. Se señala con una flecha roja el inicio del tratamiento sustitutivo con rhGH.

valores indetectables de IGF-1 e IGFBP-3, lo que, unido a las deficiencias ya diagnosticadas y las anomalías anatómicas de la hipófisis en RMN llevó al diagnóstico de deficiencia de GH. Aunque existe sospecha de deficiencia de gonadotropinas (presentó micropene al nacimiento y determinaciones de LH indetectable y FSH 0.4 mUI/ml a las 48 horas de vida), no se ha confirmado aún analíticamente debido a su edad prepuberal. El tratamiento sustitutivo de los tres ejes deficitarios (GH, TSH y ACTH) ha resultado efectivo, incluyendo una buena respuesta al tratamiento con rhGH (**Figura 17B**). Presenta un fenotipo facial con nariz bulbosa, labios gruesos, pliegues epicánticos, estrabismo intervenido quirúrgicamente y paladar estrecho que ha precisado ortodoncia (**Figuras 18A, 19E, 21D**). Asocia, a los 8 años de edad, una obesidad con IMC en +3.5 DE, aparentemente exógena y en mejoría con medidas dietéticas. No ha presentado polidactilia.

Mediante el estudio genético del probando con el panel HIPOPIT\_V1 se detectó, como hallazgo principal, la variante en *GLI2* NM\_005270.4:c.3676C>T, p.(Arg1226\*) en heterocigosis. Dicha variante implica la introducción de un codón de parada prematuro y la pérdida de más del 20% de la proteína, incluyendo el



**Figura 18.** Rasgos faciales del probando 38 y algunos de sus familiares con la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2*. (a): Probando 38. (b): Padre. (c-d): Hermanas gemelas.

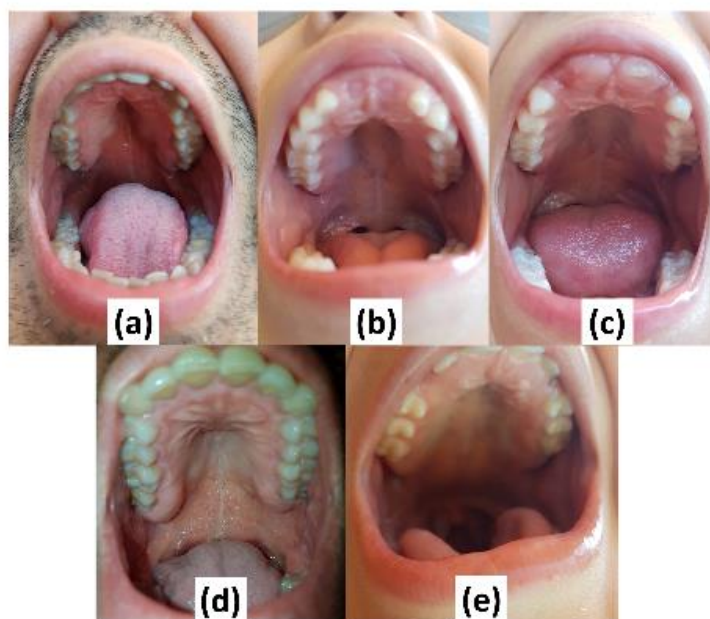
dominio C-terminal responsable de la activación de la transcripción. La misma variante, que no figura recogida en las bases de datos gnomAD, 1000 Genomes y ESP6500, ha sido muy recientemente publicada afectando a 10 miembros de una misma familia, con una expresividad muy variable, dentro de la que se encuentran el hipopituitarismo, la polidactilia y las anomalías faciales de línea media (90) y también en un paciente aislado, en el que aparentemente se presenta *de novo* (91). Igualmente, en nuestro probando 38 se encontraron en heterocigosis otras dos variantes de significado incierto, una en el gen *SIM1*, NM\_005068.2:c.450C>G, p.(Phe150Leu), y otra en *FGF8*, NM\_033163.3:c.477G>A, p.(Thr159=), esta última sinónima, sin cambio de aminoácido, con posible alteración del *splicing*, por activación de un aceptor críptico.

El estudio ampliado con el panel HYPOPIT\_V3 en el probando permitió detectar otras dos variantes de significado incierto en heterocigosis, una en el gen *ALK*, NM\_004304.4:c.4255G>A, p.(Glu1419Lys), y otra en el gen *TRIP11*, NM\_004239.3:c.5298G>T, p.(Lys1766Asn). Las características principales de dichas variantes se muestran en la **Tabla 12**.

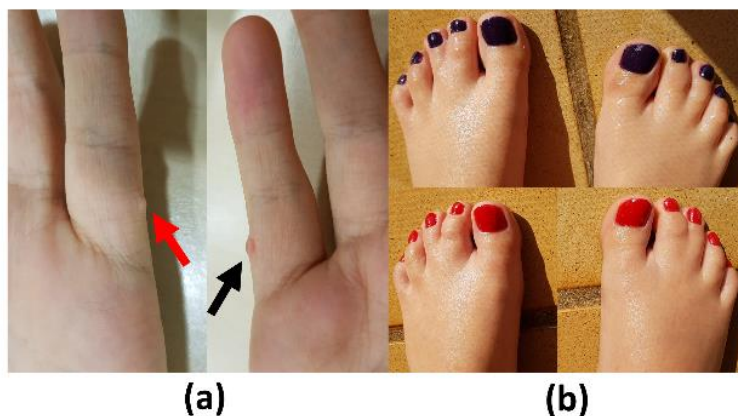
La variante en *GLI2* p.(Arg1226\*) se encuentra en heterocigosis en el probando y es heredada del padre, quien también la presenta en heterocigosis. El padre no tiene afectación hormonal, su RMN hipofisaria es normal y no presenta polidactilia, si bien presenta paladar ojival, nariz bulbosa e hipotelorismo (**Figuras 18B, 19A y 21A**). Antes del nacimiento del probando hubo, fruto de la unión de sus mismos progenitores, 3 abortos tempranos y uno tardío a las 27 semanas de edad gestacional (**Figura 22**). Este último presentaba un síndrome polimalformativo, incluyendo hipotelorismo, paladar hendido bilateral, labio leporino bilateral, agenesia parcial de la porción central del hueso maxilar, agenesia de nariz, agenesia de bulbos olfatorios, orejas de implantación baja, pies equinovaros, hipoplasia renal izquierda y displasia quística renal derecha. Una RMN prenatal a las 27 semanas mostraba HPE (fusión de ambos lóbulos frontales en su porción basal y anterior, ausencia de septo pelúcido, ausencia de margen anterior y rodilla del cuerpo calloso, fusión parcial de los tálamos), si bien en el informe de la necropsia posterior, que presentó dificultades



técnicas para el estudio cerebral, se refiere adecuada separación de ambos hemisferios cerebrales. La hiperintensidad difusa y bilateral de sustancia blanca supratentorial que se observó en la RMN prenatal coincidió con imagen microscópica de gliosis intensa en la necropsia. Dicho feto aborto (del que ha sido posible su estudio a partir de muestras en parafina de la necropsia) presentaba igualmente la variante en *GLI2* p.(Arg1226\*) en heterocigosis. Dos hermanas gemelas, también portadoras de la variante p.(Arg1226\*) en heterocigosis, presentan sindactilia de los dedos 2º y 3º de ambos pies, nariz bulbosa y paladar estrecho, éste más marcado en la primera gemela (**Figuras 18C-D, 19B-C, 20B y 21B-C**). Precisamente sólo esta primera gemela presentó al nacimiento un riñón derecho ectópico, sospechoso de displasia multiquística en ecografías prenatales, que involucionó posteriormente, no siendo visualizable en las ecografías realizadas después de los 6 meses de edad. Otro hermano menor de un año, sano, no es portador de la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2*.



**Figura 19.** Paladar de varios miembros de la familia 38, todos con la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2*. **(a)**: Padre (38.II.4), en el que el paladar es especialmente estrecho a pesar de tratamiento ortodóncico previo. **(b)**: 1ª hermana gemela (38.III.8) y **(c)**: 2ª hermana gemela (38.III.9), en las cuales, aun siendo también estrecho el paladar, lo es de manera más moderada, aunque algo más acentuado en la primera. **(d)**: Tío paterno (38.II.3) y **(e)**: Probando (38.III.7), en los cuales, el tratamiento ortodóncico ha logrado ensanchar de manera significativa el paladar, no resultando tan evidente la estrechez previa en la imagen actual.



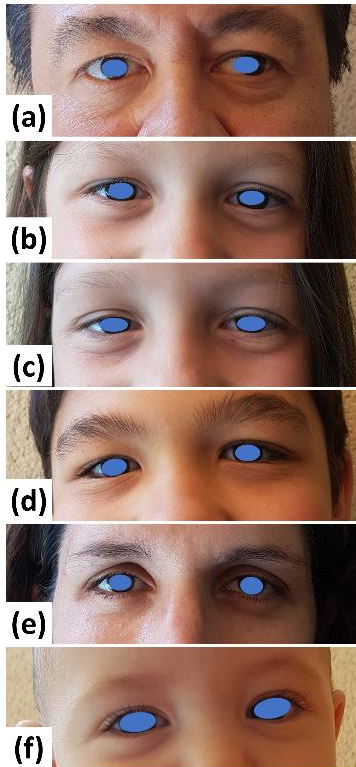
**Figura 20.** Anomalías digitales en miembros de la familia 38, portadores de la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2*. **(a):** *Polidactilia postaxial* en ambas manos en la prima del probando (38.III.1). En la mano izquierda se trata exclusivamente del rudimento observable en la imagen (flecha roja), mientras que la derecha presentaba un colgajo de dedo rudimentario del que se realizó exéresis, quedando exclusivamente un pequeño muñón residual (flecha negra). **(b):** *Sindactilia* de los dedos 2 y 3 de ambos pies en ambas hermanas (38.III.8 y 38.III.9, gemelas idénticas) del probando 1. La *sindactilia* sólo afecta a tejidos blandos, no estando afectado el tejido óseo. Curiosamente la intensidad de la *polidactilia* es levemente asimétrica en ambas hermanas, y el lado de mayor afectación está invertido entre las dos (izquierdo en la imagen superior y derecho en la imagen inferior).

En la rama paterna de la familia existen varios casos con algunos rasgos característicos de las alteraciones en *GLI2*, tales como *polidactilia postaxial* o anomalías de la línea media facial. Un tío paterno considerado sano, con la variante en *GLI2* p.(Arg1226\*) en heterocigosis, presenta *hipotelorismo* y paladar estrecho. Su hija (prima del probando), también la misma variante en heterocigosis, presenta *polidactilia postaxial* en ambas manos (**Figura 20**) e *hipotelorismo*, mientras su otro hijo (primo del probando), no portador de la variante en *GLI2*, no presenta ninguno de dichos rasgos clínicos. El abuelo paterno, también con la variante p.(Arg1226\*), presenta *polidactilia postaxial* en ambas manos. También presenta *polidactilia postaxial* en ambas manos un hermano del abuelo (al que no ha sido posible realizar estudio genético), el cual tuvo un hijo que falleció a los dos días de vida en el contexto de un cuadro *sindrómico* que incluía *fisura palatina* y *labio leporino* y cuya madre padeció aparentemente una *toxoplasmosis* durante la *gestación* (**Figura 22**).

Las medidas interoculares de distancia intercantal interna, intercantal externa e interpupilar del probando y familiares en los que ha sido posible su medición se muestran en la **Tabla 13**. Todos los miembros de la familia 38 que presentan la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2* presentan disminución de al menos alguna de las tres medidas interoculares, salvo el probando, en quien no son valorables por su epicanto y estrabismo. El esquema resumido de la segregación familiar del fenotipo y de todas las variantes halladas en el probando se muestra en la **Figura 22**.

**Tabla 13. Medidas de la distancia intercantal interna (ICD, "Inner canthal distance"), externa (OCD, "Outer canthal distance") e interpupilar (IPD, "Interpupillar distance") de los individuos en los que ha sido posible su evaluación.**

Caso (código del pedigrí)	Edad (años)	ICD		OCD		IPD		Variante y otros datos
		(cm)	(DE)	(cm)	(DE)	(cm)	(DE)	
<b>FAMILIA 38</b>								
Probando (38.III.7)	9,4	2,9	-0,53	7,7	-1,19	5,1	-0,75	<i>GLI2</i> p.(Arg1226*) Pliegues epicánticos, estrabismo intervenido
Padre (38.II.4)	45	2,45	<< -2	7,7	< -2	5,8	-1,8	<i>GLI2</i> p.(Arg1226*) Estrabismo divergente leve
Madre (38.II.5)	38	2,8	ND	7,8	ND	5,4	<b>-2,31</b>	Sin variante en <i>GLI2</i>
Hermana 1 (38.III.8)	7,3	2,6	-1,28	7,1	<b>-2,02</b>	4,9	-0,9	<i>GLI2</i> p.(Arg1226*)
Hermana 2 (38.III.9)	7,3	2,7	-0,88	7,1	<b>-2,02</b>	5,1	-0,23	<i>GLI2</i> p.(Arg1226*)
Hermano (38.III.10)	0,4	2,4	+0,25	6,5	-0,47	4,3	0	Sin variante en <i>GLI2</i>
Tío (38.II.3)	ND	2,4	<< -2	ND	ND	ND	ND	<i>GLI2</i> p.(Arg1226*)
Prima (38.III.1)	15	2,4	<b>-2,51</b>	ND	ND	ND	ND	<i>GLI2</i> p.(Arg1226*)
Primo (38.III.2)	12	2,6	-1,83	ND	ND	ND	ND	Sin variante en <i>GLI2</i>
Feto (38.III.4)	Hipotelorismo referido en la necropsia fetal							<i>GLI2</i> p.(Arg1226*)
<b>FAMILIA 42</b>								
Probando (42.II.1)	16,6	3	< -2	8	≈ -2	5,8	-1,8	<i>GLI2</i> p.(Ser267*)
Madre (42.I.2)	ND	3,5	ND	7,8	ND	5,9	-0,92	<i>GLI2</i> p.(Ser267*)
<b>FAMILIA 45</b>								
Probando (45.II.1)	18	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<i>GLI2</i> p.(His207Gln)
Padre (45.II.1)	ND	3,5	ND	8,8	ND	5,5	<b>-2,61</b>	<i>GLI2</i> p.(His207Gln)
Madre (45.II.2)	ND	3,5	ND	10	ND	6,5	-0,75	Sin variante en <i>GLI2</i>
Cada medida se muestra en cm y en desviaciones estándar (DE) respecto a la media poblacional. Para el cálculo de las DE se han utilizado las tablas de referencia de Feingold et al. (104) para la edad de 0 a 14 años y la base de datos ANSUR (105) para la edad adulta. Si bien para los mayores de 14 años sólo podríamos considerar la distancia interpupilar, que es el dato registrado en la base de datos ANSUR, se ha considerado también disminuida la distancia intercantal interna o externa si la medida era ya claramente inferior a -2 DE en las tablas de Feingold et al. (104) para 14 años de edad; cuando no es claramente inferior a -2 DE a los 14 años, se ha considerado como dato no disponible. Se resaltan los valores situados por debajo de -2 DE. <b>ICD</b> : Distancia intercantal interna; <b>OCD</b> : Distancia intercantal externa; <b>IPD</b> : Distancia interpupilar; <b>DE</b> : Desviaciones estándar; <b>ND</b> : No disponible.								

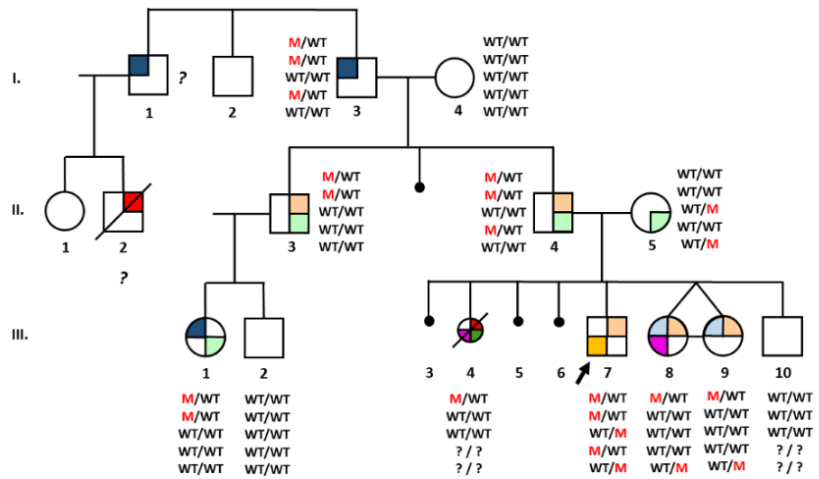


**Figura 21.** Región facial periorbitaria del probando 38 y sus familiares de primer grado. **(a):** Padre (38.II.4), en el que las medidas intercantales están claramente disminuidas (a pesar de un leve epicanto) y la distancia interpupilar no, pero ésta no es valorable por presentar estrabismo divergente. **(b):** 1ª hermana gemela (38.III.8) y **(c):** 2ª hermana gemela (38.III.9), con distancia intercantal externa ligeramente por debajo de la normalidad. **(d):** Probando (38.III.7), sin alteración evidente de ninguna de las 3 medidas, pero no valorables por pliegues epicánticos y estrabismo intervenido. **(e):** Madre (38.II.5), no portadora de la variante p.(Arg1226\*), pero con hipotelorismo. **(f):** Hermano (38.III.10), no portador de la variante p.(Arg1226), con distancias interorbitarias completamente normales.

**Figura 22: Estudio de segregación del fenotipo y genotipo en la familia 38**

**Familia 38**

**GLI2:** p.(Arg1226\*)  
**SIM1:** p.(Phe150Leu)  
**FGF8:** c.477G>A  
**ALK:** p.(Glu1419Lys)  
**TRIP11:** p.(Lys1766Asn)



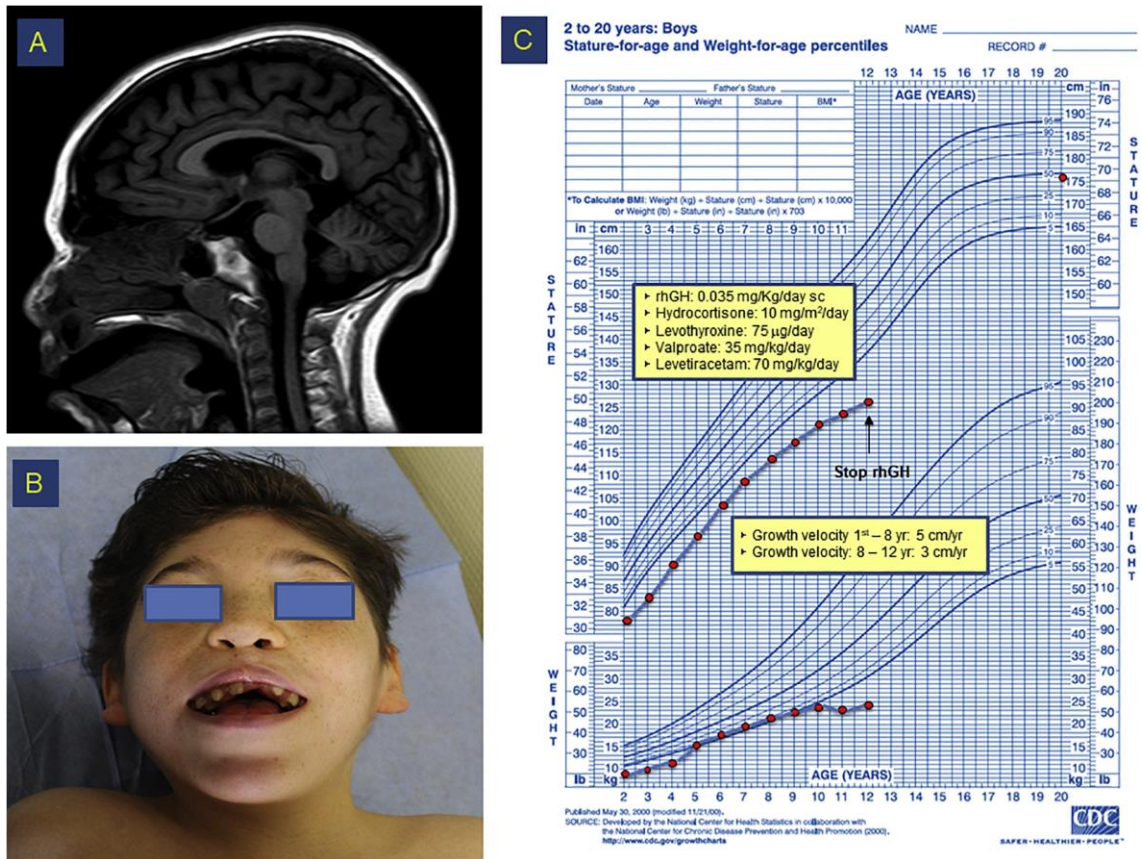
Legenda	
Fenotipo	Genotipo
Polidactilia postaxial	Otras anomalías digitales
Fisura palatina/labio leporino	Paladar ojival o estrecho
Hipopituitarismo	Anomalías renales
Holoprosencefalia	Hipotelorismo

Junto a cada individuo estudiado genéticamente se expresa, en el mismo orden, la presencia o ausencia de cada una de las variantes halladas en el probando (mostradas a la izquierda de la figura).  
 ? : Individuo sin genotipo estudiado  
 WT/WT: Wild type en homocigosis  
 WT/M: Variante en heterocigosis  
 M/M: Variante en homocigosis  
 - /M: Variante en hemicigosis  
 - /WT: Wild type en hemicigosis  
 ? / ? : Variante no estudiada

**Probando 32:**

Se trata de un varón remitido para estudio genético a los 10 años de edad con un cuadro sindrómico que incluye DCHH, polidactilia postaxial en ambas manos, labio leporino bilateral con paladar íntegro, hipoplasia malar, retraso psicomotor severo y crisis convulsivas. Tras un embarazo controlado sin complicaciones, presentó un parto a las 41 semanas de gestación en el que fue preciso el uso de fórceps, con un test de Apgar de 5/7. Antropometría neonatal dentro de límites normales: peso 3480 gr (0 DE), longitud 49,5 cm (-0,75 DE), perímetro cefálico 35 cm (-0,32 DE), según tablas del Estudio Transversal Español de Crecimiento 2010 (86). En la exploración neonatal se objetivaron los rasgos malformativos descritos, además de micropene y criptorquidia bilateral. Presentó hipoglucemias neonatales. Los resultados analíticos durante el periodo neonatal mostraron IGF-1 <10 ng/ml (valores normales 46-270), IGFBP-3 0.3 µg/ml (valores normales 0,88-4,29), T4 libre 0,25 ng/dl (valores normales 0,55-1,65), TSH 0,085 mUI/ml (valores normales 0,55-12,5), cortisol <0,5 µg/dl (valores normales 7,8-27,2), LH 0,01 mUI/ml (valores normales 0,88-4,29) y FSH 0,06 mUI/ml (valores normales 0,2-1,8). En la imagen de RMN (**Figura 23A**) presenta una adenohipófisis hipoplásica, con ausencia de neurohipófisis y tallo hipofisario. A nivel cerebral se observa atrofia córtico-subcortical, hipoplasia frontal y aberrancia de opérculo. Las deficiencias de hormonas hipofisarias demostradas hasta el momento actual incluyen GH, TSH y ACTH. Aunque aún no ha sido posible la confirmación analítica por la edad prepuberal, las anomalías genitales neonatales, así como unos niveles disminuidos de LH y FSH en el periodo neonatal, sugieren una probable deficiencia asociada de gonadotropinas. El tratamiento sustitutivo con rhGH permitió normalizar analíticamente los niveles de IGF-1 y de IGFBP-3, pero no logró una adecuada respuesta de la velocidad de crecimiento, por lo que ha sido recientemente suspendido (**Figura 23C**). Mantiene tratamiento sustitutivo de los ejes tiroideo y adrenal.





**Figura 23. A:** RMN craneal mostrando hipoplasia/agenesia hipofisaria, así como ausencia de tallo hipofisario y neurohipófisis. **B:** Rasgos fenotípicos del probando 32, incluyendo labio leporino bilateral. **C:** Curva de crecimiento, indicando el momento de suspensión del tratamiento con rhGH por falta de respuesta. Figura por cortesía del Dr. Argente Oliver (Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid) (89)

El estudio genético mediante la aplicación inicial del panel HIPOPIT\_V1 demostró, como hallazgo principal, la presencia en heterocigosis de la variante NM\_005270.4:c.2125del, p.(Leu709Trpfs\*15), en el exón 12 del gen *GLI2*. Dicha variante aparece *de novo* en el paciente, y no está presente por tanto en ninguno de sus progenitores sanos. Esta variante, secundaria a la delección de un nucleótido (c.2125del), implica un cambio de la pauta de lectura con la aparición tras 15 codones de un codón de parada prematuro con el correspondiente truncamiento proteico que supone la pérdida de más del 50% de la proteína, incluyendo el dominio C-terminal activador de la transcripción. Este caso, con

dicho hallazgo genético en *GLI2* detectado en el contexto del presente estudio, ha sido motivo de una reciente publicación colaborativa (89).

Tras la ampliación del estudio con la versión del panel HIPOPIT\_V3 se han detectado, en el probando, otras tres variantes relevantes en heterocigosis, heredadas de distintos progenitores, en los genes:

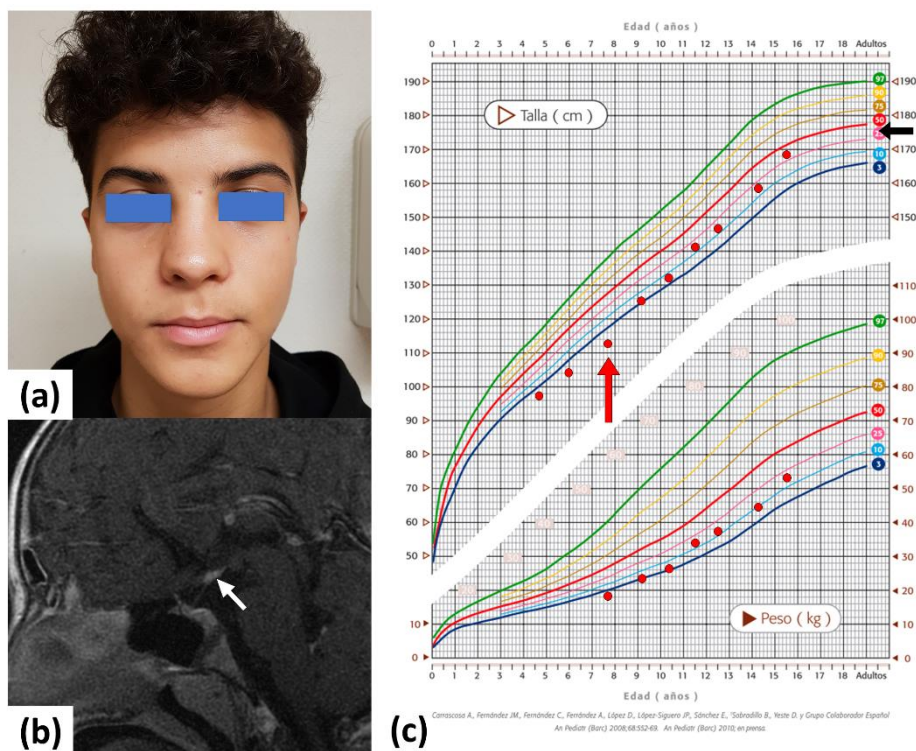
- *TGFB2*: NM\_003238.3:c.272G>A, p.(Arg91His)
- *BOD1L1*: NM\_148894.2:c.5974G>A, p.(Glu1992Lys)
- *CHD7*: NM\_017780.3:c.2053\_2058dup, p.(Ala685\_Lys686dup)

Las características principales de dichas variantes se muestran en la **Tabla 12**. El estudio de segregación familiar del fenotipo y de todas las variantes se muestra en la **Figura 25**.

#### **Probando 42:**

Varón con DCHH remitido para estudio genético a los 15 años de edad. Embarazo y parto sin complicaciones. Nacido a término (40 semanas) con somatometría neonatal dentro de límites normales: peso 3400 g (0 DE), longitud 50 cm (-0,23 DE). Presenta progresivo retraso del crecimiento. A los 7 años y 8 meses, con talla 113 cm (-3,09 DE), presenta IGF-1 de 27 ng/ml (-3,71 DE), así como dos pruebas de estímulo (propranolol-ejercicio e hipoglucemia insulínica) con pico máximo de GH de 2,19 y 2,6 ng/ml respectivamente (valores normales >7). Comienza entonces tratamiento sustitutivo con rhGH, con buena respuesta clínica (**Figura 24C**). A los 14 años se detecta T4 libre 0,68 ng/dl (valores normales 0,75-1,85) con TSH 2,06 µUI/ml (valores normales 0,35-4,51), por lo que se diagnostica de hipotiroidismo central. En imagen de RMN presenta hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica y tallo hipofisario adelgazado (**Figura 24B**). Presenta nariz bulbosa y disminución de la distancia intercantal interna, así como distancia intercantal externa e interpupilar en el límite bajo de la normalidad (**Tabla 13**). Su padre falleció debido a un cáncer de pulmón y su madre es sana. Una hermanastra por rama materna presenta sindactilia de los

dedos 2º y 3º de ambos pies, rasgo que también presenta el padrastró del probando de manera unilateral. No refieren antecedentes familiares de hipopituitarismo, polidactilia, labio leporino o fisura palatina.



**Figura 24. (a):** Rasgos faciales del probando 42, incluyendo nariz levemente bulbosa. **(b):** RMN craneal mostrando hipoplasia hipofisaria, tallo adelgazado y neurohipófisis ectópica (flecha). **(c):** Curva de crecimiento, indicando el momento de inicio del tratamiento con rhGH (flecha roja), con buena respuesta posterior.

El estudio genético mediante el panel HIPOPIT\_V1 demostró, como hallazgo principal, la presencia en heterocigosis de la variante en *GLI2* NM\_005270.4:c.800\_801delinsGA, p.(Ser267\*). Dicha variante introduce un codón de parada prematuro, que supone la pérdida de un fragmento proteico muy extenso (83,2% de la cadena proteica), incluyendo los 5 dominios de dedos de zinc de unión a ADN y el dominio de activación de la transcripción C-terminal. Igualmente, se encontraron, en el estudio mediante el panel HIPOPIT\_V1, dos variantes relevantes de significado incierto en los genes:



- *FOXH1*: NM\_003923.2:c.984C>G, p.(Asp328Glu)
- *PITX2*: NM\_000325.5:c.562G>A, p.(Ala188Thr)

Posteriormente, con el estudio mediante el panel HIPOPIT\_V3, se detectaron otras dos variantes relevantes de significado incierto, en los genes:

- *IL6ST*: NM\_002184.3:c.721A>G, p.(Lys241Glu)
- *DISP3*: NM\_020780.1:c.3757G>A, p.(Val1253Ile)

Todas estas variantes se encontraron en heterocigosis, y sus características principales se muestran en la **Tabla 12**. La variante en *GLI2* p.(Ser267\*) es heredada de la madre, sana (no estudiada hormonalmente ni mediante RMN hipofisaria, pero sin signos o síntomas sugestivos de endocrinopatía), quien también la presenta en heterocigosis. El padre, fallecido, no ha podido ser estudiado genéticamente, por lo que no podemos confirmar si las variantes detectadas en los genes *FOXH1*, *PITX2* e *IL6ST*, no presentes en la madre, son heredadas del padre o *de novo*. El estudio de segregación familiar del fenotipo y de todas las variantes se muestra en la **Figura 25**.

### **Probando 8:**

Mujer de origen turco remitida para estudio genético a los 17 años de edad con diagnóstico de DCHH. Nació a término (38 semanas) con antropometría neonatal normal, tras un embarazo y parto sin complicaciones. A los 6 años, en el contexto de retraso del crecimiento, presenta valores de IGF-1 de 13 ng/ml (-5.25 DE), así como dos pruebas de estímulo de GH (hipoglucemia insulínica y clonidina) con picos de GH de 0.1 y 0.17 ng/ml respectivamente (valores normales >7), por lo que se diagnostica de deficiencia de GH. Se detecta entonces también hipotiroidismo central. La imagen de RMN hipofisaria mostraba hipoplasia hipofisaria y neurohipófisis ectópica. Tras un inicio puberal espontáneo, pero con una pubertad detenida en un estadio de Tanner 3, a los 17 años un test de LHRH mostró pico máximo de LH de 4 mUI/ml, por lo que se diagnostica de hipogonadismo hipogonadotropo. El eje corticotropo no presenta deficiencia por el momento. No presenta otros rasgos fenotípicos significativos.

Ambos padres y dos hermanos son sanos. No refieren antecedentes familiares de hipopituitarismo, polidactilia, labio leporino o fisura palatina. No ha sido posible realizar estudio genético en los familiares.

El estudio genético inicial mediante el panel HIPOPIT\_V1 mostró, como hallazgo principal, la variante en *GLI2* NM\_005270.4:c.2575del, p.(Ser859Profs\*53) en heterocigosis, la cual supone un cambio en el marco de lectura con introducción de un codón de parada prematuro y la pérdida de más del 45% de la proteína, incluyendo el dominio C-terminal responsable de la activación de la transcripción. También se encontraron otras dos variantes de significado incierto en heterocigosis, en los genes:

- *EYA4*: NM\_004100.4:c.838C>A, p.(Gln280Lys)
- *PCSK1*: NM\_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)

Posteriormente, con el estudio mediante el panel HIPOPIT\_V3, se detectó otro grupo de variantes relevantes de significado incierto, todas en heterocigosis, en los genes:

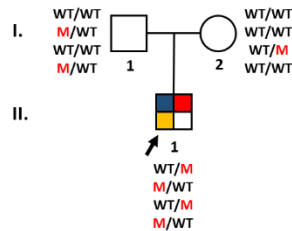
- *AXIN1*: NM\_003502.3:c.43A>C, p.(Ser15Arg). Esta variante no se encuentra en las bases de datos gnomAD, 1000 Genomes y ESP6500.
- *RBPJ*: NM\_005349.3:c.244dupA, p.(Glu85Argfs\*10). Esta variante supone un cambio en la pauta de lectura y el truncamiento de la proteína en una posición muy inicial, por lo que impide la traducción de todos los dominios relevantes de la proteína.
- *AXL*: NM\_021913.3:c.1082A>C, p.(Gln361Pro)
- *DNER*: NM\_139072.3:c.121C>T, p.(Pro41Ser)
- *FKBP8*: NM\_012181.4:c.123\_134del, p.(Glu43\_Glu46del).

Las características principales de todas estas variantes se muestran en la **Tabla 12**. El estudio de segregación familiar del genotipo y fenotipo se muestra en la **Figura 25**. El fenotipo del resto de probandos con variantes relevantes en *GLI2* se muestra en la **Tabla 11**.

**Figura 25. Estudio de segregación del genotipo y fenotipo de las familias con variantes relevantes en *GLI2*. No se incluye la familia 38, que ha sido previamente detallada en la Figura 22. La leyenda se muestra en la página siguiente.**

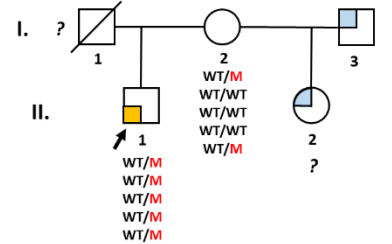
**Familia 32**

*GLI2*: p.(Leu709Trpfs\*15)  
*TGF $\beta$ 2*: p.(Arg91His)  
*BOD1L1*: p.(Glu1992Lys)  
*CHD7*: p.(Ala685\_Lys686dup)



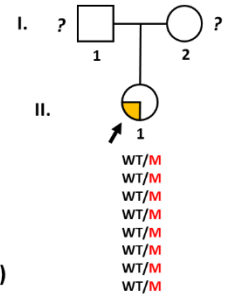
**Familia 42**

*GLI2*: p.(Ser267\*)  
*FOXH1*: p.(Asp328Glu)  
*PITX2*: p.(Ala188Thr)  
*IL6ST*: p.(Lys241Glu)  
*DISP3*: p.(Val1253Ile)



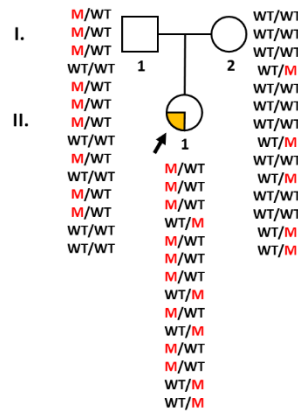
**Familia 8**

*GLI2*: p.(Ser859Profs\*53)  
*EYA4*: p.(Gln280Lys)  
*PCSK1*: p.(Asn221Asp)  
*AXIN1*: p.(Ser15Arg)  
*RBPJ*: p.(Glu81Argfs\*10)  
*AXL*: p.(Gln361Pro)  
*DNER*: p.(Pro41Ser)  
*FKBP8*: p.(Glu43\_Glu46del)



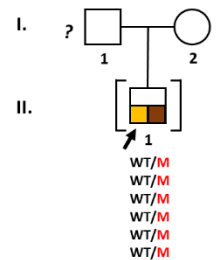
**Familia 45**

*GLI2*: p.(His207Gln)  
*HMX2*: p.(Ser185Arg)  
*ARNT2*: c.84C>A, p.(Ala28=)  
*CHD7*: p.(Pro566Ala)  
*CHD7*: c.3379-33A>G  
*IFT172*: p.(Arg1134Leu)  
*PPRC1*: p.(Arg159Trp)  
*AXL*: p.(Gly517Ser)  
*PPHLN1*: p.(Pro13Leu)  
*ZFYVE9*: p.(Val919Leu)  
*TGFBR2*: p.(Val387Met)  
*SYNPO2*: p.(Val286Ala)  
*KLF4*: p.(Gly239\_Pro255del)  
*AKT1S1*: p.(Arg96Gln)



**Familia 95**

*GLI2*: p.(Met1444Ile)  
*GLI2*: p.(Leu1445Phe)  
*NR4A1*: p.(Arg431His)  
*WISP1*: p.(Arg193Cys)  
*NOTCH1*: p.(Gly2144Ser)  
*AGAP1*: p.(Asp479Asn)



**Familia 54**

*GLI2*: p.(Met1444Ile)  
*GLI2*: p.(Leu1445Phe)  
*SPRY4*: p.(Ser241Tyr)  
*GLI3*: p.(Gly727Arg)  
*TRAPPC9*: p.(Arg285Trp)  
*DVL2*: p.(Asn451Asp)

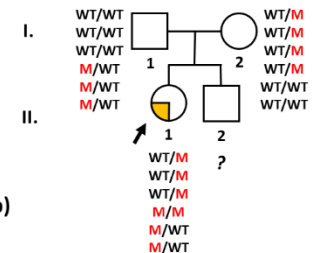
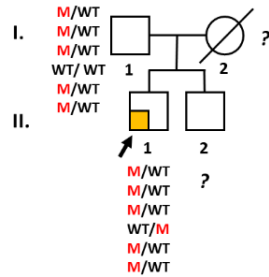


Figura 25. (Continuación)

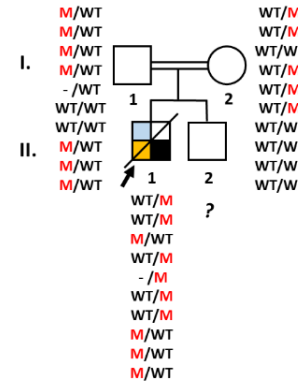
**Familia 51**

*GLI2*: p.(Asp1520Asn)  
*GLI2*: p.(Met1352Val)  
*LHX3*: c.876G>A  
*ZNF8*: p.(Arg484Trp)  
*OVOL1*: p.(Pro58Leu)  
*FGFR2*: p.(Asp457Gly)



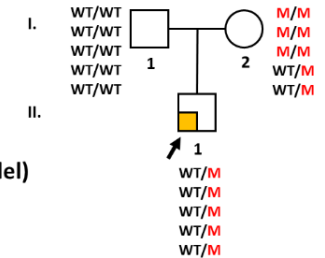
**Familia 69**

*GLI2*: p.(Asp1520Asn)  
*GLI2*: p.(Met1352Val)  
*PCSK1*: p.(Asn221Asp)  
*IGSF10*: p.(Glu1602\*)  
*TSPYL2*: p.(Arg346Gln)  
*STAT3*: p.(Gln125Glu)  
*SMAD2*: p.(Gly314Val)  
*DISP3*: p.(Val692Glu)  
*PLEKHA5*: p.(Arg117Gln)  
*ROR2*: p.(Pro799Ser)



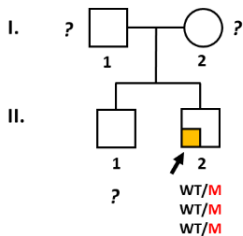
**Familia 74**

*GLI2*: p.(Asp1520Glu)  
*GLI2*: p.(Thr903Ser)  
*GLI2*: p.(Gly199Ser)  
*ZIC2*: p.(Ala467\_Val471del)  
*ALMS1*: p.(Thr3097Ser)



**Familia 63**

*GLI2*: c.132G>A  
*CHD7*: p.(Ala2789Val)  
*TXNDC5*: p.(Arg403Gln)



Leyenda		
Fenotipo		Genotipo
	Polidactilia postaxial	Junto a cada individuo estudiado genéticamente se expresa, en el mismo orden, la presencia o ausencia de cada una de las variantes halladas en el probando (mostradas a la izquierda de la figura).  ? : Individuo sin genotipo estudiado WT/WT: Wild type en homocigosis WT/M: Variante en heterocigosis M/M: Variante en homocigosis -/M : Variante en hemicigosis -/WT : Wild type en hemicigosis ? / ? : Variante no estudiada
	Otras anomalías digitales	
	Fisura palatina/labio leporino	
	Paladar ojival o estrecho	
	Hipopituitarismo	
	Anomalías renales	
	Holoprosencefalia	
	Hipotelorismo	
	DSO-Plus	
	Patología neurológica no englobada en otros	

# DISCUSIÓN

## **A. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR MEDIANTE EL PANEL HIPOPIT\_V1 DE LA COHORTE COMPLETA**

El conocimiento acerca de la etiología del HIC está aún plagado de incertidumbres. A ello contribuye probablemente la heterogeneidad del espectro clínico que se engloba bajo este término, lo que probablemente ha contribuido a que la proporción de pacientes con alteraciones en los genes tradicionalmente relacionados con la patología sea muy baja (71). La penetrancia incompleta y la gran variabilidad de la expresión fenotípica son características muy habituales entre las variantes patogénicas identificadas en genes relacionados con el HIC (29), lo que igualmente sugiere una elevada complejidad de sus bases genéticas, difícilmente abordable mediante técnicas tradicionales de análisis genético. El presente estudio pretende, por ello, avanzar en la mejora del diagnóstico molecular y en el conocimiento de las causas de fenómenos como la penetrancia y expresividad variables, a partir de la hipótesis de una etiología multifactorial, y a través de la valoración clínica y el estudio molecular mediante secuenciación masiva dirigida de pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP, tres patologías del espectro clínico del HIC.

### **A.1. Diferencias clínicas entre los grupos y subgrupos diagnósticos incluidos en el estudio (Objetivo específico 1)**

Aunque el solapamiento clínico entre las tres patologías incluidas en el estudio es evidente debido al nexo común de alteración funcional y/o anatómica de la hipófisis, es igualmente evidente que existen diferencias clínicas entre ellas, que se repasan a continuación sin discutir en profundidad, para pasar a centrar la discusión posteriormente en los hallazgos sobre su posible etiología.

La edad al diagnóstico constituye una de las diferencias, habida cuenta de que la clínica que conduce al diagnóstico es diferente en muchos casos. Los hallazgos cerebrales en las ecografías prenatales o las anomalías oftalmológicas al nacimiento en el caso de la DSO, así como la clínica neonatal característica de hipopituitarismo (hipoglucemia, colestasis, micropene) en la DCHH y algunos

casos de DSO, hacen que el diagnóstico de estas entidades sea en general más precoz que la DAGH-HP, que suele diagnosticarse con mayor frecuencia a través de un retraso del crecimiento.

Aunque muchos casos de DSO presentan disfunción hipofisaria, ésta presenta en general algunas características diferenciales respecto a la DCHH sin criterios de DSO. Entre ellas, la disfunción hipofisaria en la DSO muestra un menor número de ejes afectados y, en concreto, menor frecuencia de afectación de los ejes somatotropo, tirotrópico y gonadotropo.

Las anomalías hipofisarias en la imagen de RMN también se presentan con diferente frecuencia en los distintos grupos. Incluso excluyendo los pacientes de DSO sin disfunción hipofisaria, en la DSO se observa una menor proporción de hipoplasia o agenesia adenohipofisaria respecto a los grupos con DCHH y DAGH-HP, y menor frecuencia de alteraciones de neurohipófisis y tallo hipofisario que en el grupo con DCHH.

Para tratar de avanzar en la discriminación de entidades más homogéneas dentro del espectro de patologías estudiadas y relacionadas con el HIC, el presente estudio ha tratado de evaluar características diferenciales entre distintos subgrupos.

En un intento de explicar parte de la heterogeneidad clínica de los pacientes con DSO, Barkovich *et al.* (54) y posteriormente Miller *et al.* (55) diferenciaron dos grupos de pacientes que responden de manera resumida a las siguientes características: un grupo denominado DSO-plus caracterizado por la presencia de anomalías corticales del tipo esquisencefalia o polimicrogiria y menor afectación de la vía óptica (que predominantemente es unilateral o asimétrica afectando más al lado al que afecta la esquisencefalia), y un grupo de DSO “aislada” con mayor frecuencia de hipoplasia bilateral de nervios ópticos e hipopituitarismo, sin anomalías corticales (32,56). En nuestra cohorte observamos dificultades para la clasificación en estos subgrupos en varios pacientes en relación con las alteraciones hipofisarias y de la vía óptica, por lo que el criterio exclusivo de diferenciación finalmente ha sido la presencia de anomalías corticales (DSO-plus) o su ausencia (DSO “aislada”). Entre estos dos

subgrupos, no hemos encontrado ninguna diferencia estadísticamente significativa sobre el fenotipo hipofisario (hay que recordar que no se ha realizado un análisis estadístico pormenorizado de otras variables clínicas no relacionadas con el hipopituitarismo). Aunque se observan algunas diferencias en la frecuencia de afectación de los distintos ejes hormonales y una tendencia a mayor afectación de la neurohipófisis y el tallo hipofisario en el subgrupo de DSO “aislada”, el escaso tamaño muestral del subgrupo DSO-plus no ha permitido confirmar estas diferencias. Sin embargo, sí se han detectado algunas diferencias en los resultados del estudio molecular, que se discuten en el apartado “A.6. *Correlaciones genotipo-fenotipo entre subgrupos diagnósticos*”.

Dado que el diagnóstico de la DSO requiere el cumplimiento de 2 de los 3 criterios establecidos (49), resulta lógico suponer que puedan existir diferencias entre los pacientes que cumplen combinaciones distintas de criterios diagnósticos. En este trabajo, centrado en el estudio de las causas del HIC, se ha distinguido entre los pacientes con DSO que presentan disfunción hipofisaria (DSO con disfunción hipofisaria) y los que cumplen criterios diagnósticos sin presentar disfunción hipofisaria (DSO sin disfunción hipofisaria). El único aspecto relevante estadísticamente en cuanto a diferencias entre estos subgrupos es la mayor frecuencia de alteraciones de la neurohipófisis en el grupo de DSO con disfunción hipofisaria (y una tendencia a mayor afectación del tallo, sin significación estadística). En cambio, la proporción de pacientes con hipoplasia adenohipofisaria es prácticamente igual, aproximadamente del 50% en ambos subgrupos. Esto sugiere que los pacientes con DSO y alteraciones de la neurohipófisis presentan mayor probabilidad de presentar disfunción hipofisaria que los que presentan una hipoplasia adenohipofisaria aislada. Este resultado debe tomarse con precaución ya que el grupo de pacientes con DSO sin disfunción hipofisaria de los que se dispone de estudio de imagen mediante RMN, está compuesto por sólo 6 individuos. Los 3 pacientes con hipoplasia adenohipofisaria sin disfunción fueron remitidos con la edad de 2, 6 y 10 años, y existe la posibilidad de que, evolutivamente, aparezca alguna deficiencia hormonal posteriormente que modifique la conclusión sobre estos hallazgos. Otro aspecto a tener en cuenta es la subjetividad con la que en la práctica clínica se evalúa frecuentemente el volumen hipofisario. La información sobre los



hallazgos de RMN que se ha utilizado en este estudio ha sido remitida por los clínicos colaboradores solicitantes, a partir del correspondiente informe radiológico, sin poder afirmar si se han hecho mediciones objetivas de volumen o altura de la adenohipófisis. En cualquier caso, no se trata del único hallazgo que se obtiene en este estudio sobre la posible diferente etiología de las anomalías adenohipofisarias respecto a las del tallo y neurohipófisis.

Los subgrupos de HIC sintromico e HIC no sintromico incluyen pacientes indistintamente de los grupos DCHH y DAGH-HP (se excluyen los de DSO) y se distinguen entre sí por la presencia o ausencia de alguna manifestación clínica extrahipofisaria. Si bien el subgrupo de HIC no sintromico puede presentar una homogeneidad razonable, el subgrupo de HIC sintromico es muy heterogeneo, al incluir pacientes con cuadros sintromicos complejos y otros con HIC asociado a alguna alteración extrahipofisaria leve. No hemos encontrado prácticamente diferencias significativas en las variables clínicas analizadas entre ambos subgrupos. De manera posiblemente anecdótica, se observa mayor frecuencia de criptorquidia entre los casos sintromicos. Del mismo modo, aunque sin capacidad de confirmación estadística, los 3 pacientes en los que se observa una falta de respuesta o una respuesta sólo parcial al tratamiento con rhGH pertenecen al subgrupo de HIC sintromico. La lógica heterogeneidad etiológica de este subgrupo probablemente condicione esta respuesta subóptima en algunos pacientes.

La posible implicación de los antecedentes obstétricos en la etiología de las entidades clínicas incluidas en el estudio se discute más adelante, en el apartado “A.7.1. Factores ambientales: Correlaciones fenotipo-antecedentes obstétricos y genotipo-antecedentes obstétricos”.

## **A.2. Utilidad de la secuenciación masiva dirigida (panel HIPOPIT V1) en el diagnóstico de pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP (Objetivos específicos 2 y 3)**

En el presente estudio hemos detectado variantes relevantes en aproximadamente el 75% de los pacientes estudiados, proporción muy similar en los 3 grupos diagnósticos. Se identifican variantes patogénicas (según criterios ACMG) en el 15,8% de los pacientes, y un 32,5% de los pacientes presenta variantes patogénicas, probablemente patogénicas y/o VUS+. En la literatura encontramos que las 3 patologías incluidas en el presente estudio presentan tradicionalmente una muy baja tasa de diagnóstico genético tras analizar mediante secuenciación Sanger los genes “clásicamente” relacionados con su etiología (*PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4* y *HESX1*). En el caso de la DCHH, si bien una revisión sistemática estableció en 2015, a nivel mundial, una frecuencia de diagnóstico genético del 12.4% en casos esporádicos y del 63% en casos familiares (69), debe tenerse en cuenta que dichas cifras se obtienen a partir de estudios muy heterogéneos, influidos por frecuencias muy variables de mutaciones en *PROP1* en distintas poblaciones geográficas. En el mismo estudio, al analizar población italiana, más parecida a la nuestra, estos porcentajes disminuyen al 2.9% en casos esporádicos y 12.5% en casos familiares (69). El rango de resultados en los distintos estudios resulta extremadamente amplio (desde 0% a más de la mitad de los pacientes) (71). Sin embargo, porcentajes elevados de diagnóstico genético en el HIC sólo se observan en estudios que incluyen una alta proporción de casos familiares (106,107) y fundamentalmente a expensas de mutaciones en *PROP1* en determinadas regiones geográficas en las que se conoce la mayor prevalencia de las mismas (108–110). Así, son también varios los estudios que muestran una tasa de detección de mutaciones en *PROP1* del 0% (71,72,111–113). La detección de mutaciones en *POU1F1* varía entre el 0-10%, y en los genes *HESX1*, *LHX3* y *LHX4*, entre el 0-2% de los pacientes con DCHH, dependiendo de los estudios (71). En el caso de la DSO, las mutaciones en *HESX1* sólo son capaces de explicar aproximadamente el 1% de los pacientes que cumplen criterios diagnósticos (32). Un reciente estudio de Blum *et al.* (114), reporta un porcentaje de diagnóstico genético del 14,7% en 415 pacientes con DCHH

procedentes de 25 países, al analizar mediante secuenciación Sanger los genes *PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4*, *HESX1*, *GLI2* y *SOX3*. Este dato se reduce al 11,8% si se consideran sólo los pacientes no emparentados (aunque no se especifica la proporción de casos familiares y esporádicos). No obstante, un análisis detallado de las variantes identificadas revela que la mayoría de los pacientes (9%) presenta variantes en *PROP1* en homocigosis, y más aún, el 71% de esos pacientes presenta la misma mutación: NM\_006261.4:c.301\_302del. Esto se explica probablemente por la existencia de un sesgo en el origen geográfico de los pacientes, ya que la mayoría de los casos con diagnóstico genético procede de sólo 4 países: Lituania, Rusia, República Checa y Alemania (cuatro países con elevada frecuencia poblacional de mutaciones patogénicas en *PROP1*, y en concreto de la mutación NM\_006261.4:c.301\_302del) (108,109). Si excluimos estos 4 países y consideramos los 21 países restantes, en dicho estudio de Blum *et al.*, la frecuencia de mutaciones en *PROP1* en pacientes no emparentados se sitúa por debajo del 2,5%, y la tasa de diagnóstico genético positivo, por debajo del 5%. En dicho estudio, no se obtuvo diagnóstico genético en ninguno de los 19 pacientes clasificados como DCHH procedentes de España.

En el presente estudio, si nos centramos exclusivamente en los 5 genes “clásicos” (*PROP1*, *POU1F1*, *LHX3*, *LHX4* y *HESX1*), sólo en el 8,8% de los pacientes de la cohorte completa se detectan variantes, sólo en el 4,4% se detectan variantes estrictamente patogénicas por criterios ACMG (5 pacientes con mutación en *PROP1* en homocigosis) y sólo en el 7% se encuentran variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+. Por ello, incluso considerando exclusivamente las variantes clasificadas como patogénicas (15,8% de los pacientes de este estudio al analizar todos los genes del panel), podemos afirmar que la secuenciación masiva dirigida utilizando el panel HIPOPIT\_V1 mejora el diagnóstico genético de los pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP respecto al abordaje tradicional [p=0.004, OR 4.1 (IC 1.46-11.43)].

Sin embargo, la clasificación de patogenicidad de variantes según los criterios del ACMG publicados en 2015 (80) presenta en este caso algunas limitaciones importantes. Si bien se trata de una herramienta de gran utilidad por

su intención de unificar los criterios de análisis de los resultados de estudios moleculares, está enfocada principalmente al estudio diagnóstico de patologías de etiología monogénica. En patologías con posible participación multigénica resulta menos práctica y de difícil aplicación. La estratificación en 5 categorías [“Patogénica”, “Probablemente patogénica”, “Variante de significado incierto (VUS)”, “Probablemente benigna” y “Benigna”], con los criterios actuales, facilita que una gran cantidad de variantes, incluso con conocida repercusión funcional en la proteína resultante, queden diluidas dentro de la categoría “VUS”. Debido a este sesgo monogénico, la amplia categoría “VUS” incluye variantes con fundada potencial implicación en un contexto multifactorial, diluidas entre infinidad de variantes de muy dudosa relevancia.

En el presente estudio hemos tratado de minimizar la pérdida de variantes de probable relevancia en un contexto multigénico mediante dos estrategias. Por un lado, hemos subdividido la categoría “VUS” en dos, escindiendo un grupo denominado “VUS+” en el que se incluyen aquellas variantes cuyas características sugieren de manera importante una probable implicación en la etiología. Aun así, es probable que, dentro de la categoría VUS, se clasifiquen variantes con evidencia suficiente de su posible contribución en un contexto multifactorial. Por otro lado, hemos mostrado los resultados del estudio genético agrupando las variantes en tres grupos: variantes exclusivamente patogénicas; variantes patogénicas, probablemente patogénicas y VUS+; y el conjunto completo de variantes que cumplen los criterios de priorización detallados en el apartado 2.5 de *Materiales y métodos*. Consideramos que este tipo de abordaje puede resultar más informativo al analizar el estudio molecular de patologías con probable etiología oligogénica, al poder evaluar el equilibrio entre la frecuencia de detección de variantes relevantes y la mayor o menor probabilidad de su patogenicidad.

Si consideramos el porcentaje de pacientes con variantes relevantes en general, y la proporción de pacientes con variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+, de nuevo el presente estudio demuestra la mejoría del éxito diagnóstico (respecto al estudio exclusivo de los 5 genes “clásicos”) de este tipo de pacientes, con  $p < 0.0001$  [OR 31.9 (IC 14.7-69.4)] y  $p < 0.0001$  [OR 7.3 (IC 3.1-17.3)] respectivamente.

Resulta muy interesante resaltar que, de los 3 genes más relevantes en global en nuestra cohorte (no sólo por su frecuencia, sino también por la elevada proporción de pacientes con variantes en las categorías de mayor patogenicidad del ACMG), sólo uno (*PROP1*) pertenece al mencionado grupo de genes “clásicamente” relacionados con la etiología. Los otros dos, *GLI2* y *PROKR2*, son dos genes, cuya implicación en la etiología del HIC ha sido postulada mucho más recientemente (29,59,100). Los resultados de este estudio, no sólo confirman dicha implicación, sino que sugieren su consideración dentro de un pequeño grupo de genes “principales”. El papel de *PROKR2* se discute a continuación dentro del apartado A.3. (“*Posibilidad de una etiología oligogénica en las patologías incluidas en el estudio, y correlaciones genotipo-fenotipo de algunas combinaciones de variantes*”) y el papel de las alteraciones de *GLI2* en el HIC se discute en detalle en la sección C de esta *Discusión* (“*Caracterización fenotípica y molecular del grupo de pacientes con variantes en GLI2*”).

### **A.3. Posibilidad de una etiología oligogénica en las patologías incluidas en el estudio, y correlaciones genotipo-fenotipo de algunas combinaciones de variantes (Objetivos específicos 4 y 6)**

#### **A.3.1. Oligogenicidad en la cohorte estudiada**

El 43,9% de los pacientes incluidos en el presente estudio presenta variantes relevantes (que cumplen los criterios de priorización utilizados) en 2 o más genes. Existen muy pocos estudios publicados por el momento que hayan abordado el diagnóstico genético del HIC mediante secuenciación masiva desde un punto de vista multigénico, y reúnen en conjunto menos de 60 pacientes (37,39,74). Un reciente estudio de Zwaveling-Soonawala *et al.* (39), realizado en 20 pacientes con síndrome del tallo hipofisario interrumpido, mediante secuenciación de exoma completo, detectó la presencia de variantes potencialmente patogénicas en al menos 2 genes diferentes en 12 de los 20 pacientes (60%), incluyendo entre los mismos, como en nuestro caso, genes relacionados anteriormente con la HPE y el HHC. Guo *et al.* (74) llevaron a cabo un estudio similar, mediante secuenciación de exoma completo en 24 pacientes

con síndrome del tallo hipofisario interrumpido, en el que hasta el 83% de los mismos presentaba alteraciones potencialmente patogénicas en más de un gen. Simm *et al.* (37) comunicaron el estudio mediante secuenciación del exoma de 10 pacientes con DCHH, entre los que se detectan de media 5,1 variantes relevantes en 3,8 genes por paciente. Otro caso aislado, también con fenotipo de síndrome del tallo hipofisario interrumpido, y estudiado mediante secuenciación de exoma, ha sido descrito con sendas mutaciones patogénicas en *PROKR2* y *WDR11* (ambos genes previamente relacionados con la etiología del HHC), heredadas de progenitores diferentes (75).

La proporción de pacientes con varios genes afectados por variantes potencialmente patogénicas es mayor en los estudios mencionados que en nuestra cohorte. El estudio mediante exoma completo en dichos trabajos podría justificar esta mayor detección. En cualquier caso, como se ha mencionado en las secciones B y C de los *Resultados*, en el 100% de los 12 pacientes ya estudiados mediante el panel ampliado HIPOPIT\_V3 (310 genes) se identifican variantes potencialmente patogénicas en al menos 2 genes diferentes, mejorando los resultados obtenidos con el panel reducido (HIPOPIT\_V1, 73 genes).

Desde el punto de vista de la etiología oligogénica, resulta interesante evaluar, no solamente en qué genes concretos (o en qué combinaciones concretas de genes) se identifican variantes relevantes con mayor frecuencia, sino en qué vías de señalización implicadas en el desarrollo hipotalámico-hipofisario se acumulan con mayor frecuencia las variantes encontradas, o si existen combinaciones características de vías alteradas asociadas a fenotipos específicos.

En nuestro caso, las diferencias entre grupos y subgrupos diagnósticos en las vías de señalización más afectadas por las variantes detectadas por el panel HIPOPIT\_V1, de manera general no han resultado estadísticamente significativas. El diseño del panel HIPOPIT\_V1 se realizó incluyendo genes relacionados con patología hipofisaria en humanos y genes candidatos por modelos animales. El futuro próximo análisis de la cohorte completa con el panel ampliado HIPOPIT\_V3, con una mejor representación de genes relacionados

con las principales vías implicadas en el desarrollo hipofisario, permitirá mejorar previsiblemente este resultado.

A pesar de esta limitación, hemos identificado, de manera novedosa, determinadas combinaciones de alteraciones en vías de señalización, cuyo patrón se repite en distintos pacientes. Esto nos ha permitido en algunos casos identificar asociaciones genotipo/fenotipo estadísticamente significativas que se discuten a continuación. Hasta donde conocemos, este es el primer estudio sobre la etiología del HIC que demuestra una correlación genotipo-fenotipo referida a combinaciones de alteraciones en diferentes genes.

### **A.3.2. Combinación de variantes relevantes en las vías de la prokineticina y FGF**

Existen casos descritos en la literatura de portadores asintomáticos de variantes patogénicas tanto en *PROKR2* como en genes de la vía FGF (como *FGFR1* y *FGF8*), lo cual sugiere que de manera individual no son causa por sí mismas de patología, sino en asociación con otros factores genéticos o ambientales (59,115). 5 probandos (4,4% de los pacientes de nuestra cohorte) presentan conjuntamente variantes relevantes en la vía de la prokineticina (4 de ellos con variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *PROKR2* y 1 con una variante con pérdida del codón de parada en *PROK2*), así como en genes relacionados con la vía FGF tales como *FGFR1* (principal receptor de la vía FGF a nivel hipofisario), *OTX2*, *FLRT3*, *IL17RD* (los tres con función reguladora de la vía FGF), *HMX2* y *HMX3* (genes diana ambos de la vía FGF). Se discute a continuación el posible papel de cada uno de estos genes en la etiología del HIC, así como el de dicha combinación de variantes en este grupo de cinco pacientes, cuyo fenotipo se ha detallado individualmente en el apartado A.2.7.1. de los *Resultados*.

***PROKR2*** (*Prokineticin-receptor 2*, MIM# 607123) codifica un receptor perteneciente a la familia de receptores de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Se trata de un gen cuyas variantes patogénicas han sido implicadas en la etiología del HHC con y sin anosmia (44). Este hecho se

justifica por la expresión de PROKR2 durante el desarrollo embrionario en la placoda olfatoria y en las neuronas GnRH (116), así como por el fenotipo de ratones knockout para *Prokr2*, con alteración del desarrollo de los bulbos olfatorios y de las neuronas GnRH hipotalámicas (117), que remeda al síndrome de Kallmann en humanos. En pacientes con HHC, las alteraciones en *PROKR2* se presentan en heterocigosis, homocigosis, heterocigosis compuesta o asociadas a otras alteraciones en otros genes en un contexto de herencia oligogénica (29). Aunque la evidencia de la relación entre *PROKR2* y otros escenarios clínicos de disfunción hipofisaria es de momento menor que en el caso del HHC, existen varios casos documentados de pacientes con DCHH con variantes patogénicas en *PROKR2* con pérdida de función demostrada *in vitro* (59,64,75,115,118–120). Otros estudios han sugerido un papel relevante de *PROKR2* en la etiología del síndrome del tallo hipofisario interrumpido (118,121).

Cuatro pacientes de nuestra cohorte presentan variantes patogénicas o probablemente patogénicas en *PROKR2* [p.(Arg85Leu), p.(Arg85Cys), p.(Leu173Arg) y p.(Arg248Gln)]. La variante p.(Arg85Cys), presente en el probando 77, situada en un punto caliente del primer bucle intracelular, está descrita como patogénica en pacientes con DCHH y HHC (115). La variante p.(Arg85Leu) presente en el probando 15, ubicada en el mismo codón, se clasifica como probablemente patogénica, aunque ya ha sido descrita en un paciente con DCHH, agenesia hipofisaria y neurohipófisis ectópica, en un trabajo en el que es considerada patogénica (64). Existen varios estudios funcionales que demuestran la disminución de función *in vitro* de las variantes p.(Arg85Cys), p.(Arg85Gly) y p.(Arg85His) (59,122,123). La variante p.(Leu173Arg), presente en el probando 110, ha sido descrita en pacientes con DCHH, DSO y HHC (64,124), y existe demostración *in vitro* de la evidente pérdida de función de la proteína mutada (122). La variante p.(Arg248Gln) presente en el probando 29, situada en el último bucle intracelular, está descrita en pacientes con HHC y existe estudio funcional *in vitro* que muestra disminución al 72% de la actividad movilizadora de calcio (125). Un reciente estudio, relativamente crítico con los abordajes de estudios funcionales previos de las variantes en *PROKR2*, si bien refuerza especialmente la probable patogenicidad de las variantes p.(Leu173Arg), p.(Arg85Gly) y p.(Arg85His) por afectación de al menos 2 de las



3 vías de señalización intracelular que utiliza PROKR2, en forma de haploinsuficiencia, muestra también disminución de función en al menos una de las 3 vías en las variantes p.(Arg85Leu) y p.(Arg85Cys) (126). En dicho estudio, la patogenicidad de la variante p.(Arg248Gln) se mantiene principalmente en un modelo de herencia recesiva (126).

**PROK2** (*Prokineticin 2*, MIM# 607002) codifica el ligando de PROKR2. Como *PROKR2*, sus alteraciones se han relacionado anteriormente con el HHC (44). En cambio, a diferencia de *PROKR2*, la posible relación con la etiología de la DCHH o la DSO resulta menos evidente por el momento, dada la ausencia de detección de variantes relevantes en *PROK2* en grandes cohortes de pacientes con estos fenotipos (64,118). La variante p.(\*130Leuext\*9), presente en el probando 106, implica la pérdida del codón de parada y una extensión en el extremo C-terminal de la proteína de 9 aminoácidos. Su significado patológico resulta incierto por el momento.

**FGFR1** (*Fibroblast growth factor receptor 1*, MIM# 136350) codifica un receptor del tipo tirosín kinasa. Se trata también de un gen cuyas mutaciones con pérdida de función se han asociado principalmente al fenotipo de HHC con y sin anosmia, donde con frecuencia se presentan en un contexto de oligogenicidad (44,127), si bien otras alteraciones del gen se asocian a otros fenotipos patológicos como los síndromes de Pfeiffer, Harstfield y Jackson-Weiss (29). Pero, al igual que ocurre con *PROKR2*, varios casos de pacientes con fenotipo de DCHH o DSO han sido publicados con variantes patogénicas en *FGFR1* (59,115,128). *FGFR1* se expresa en la bolsa de Rathke (mientras su ligando, FGF8, se expresa en el diencefalo ventral) durante el desarrollo embrionario en humanos (66). En la hipófisis en desarrollo la unión de *FGFR1* con su ligando es necesaria para regular la expresión de otros elementos de la vía FGF (82). Actualmente está aceptada la implicación de la vía FGF en el proceso de inducción de la bolsa de Rathke, en el proceso de proliferación de progenitores celulares en la adenohipófisis en desarrollo (1), así como en el correcto desarrollo del infundíbulo (5).

En nuestro estudio hemos identificado las siguientes variantes de *FGFR1*:

- p.(Phe43Cys), presente en el probando 15, ausente de las bases de datos poblacionales, con elevada predicción de patogenicidad y ubicada en una posición conservada dentro del dominio “Ig-like C2”. Una variante próxima p.(Gly48Ser), situada en el mismo dominio, fue identificada anteriormente en pacientes con HHC con y sin anosmia (129,130).
- La variante p.(Pro722Ser), presente en el probando 29, y situada en una posición muy conservada dentro del dominio tirosín kinasa, ha sido descrita en varios casos de síndrome de Kallmann (129,131) y de DCHH (115). Un estudio concluye su probable repercusión funcional a partir del cambio estructural que supone el cambio aminoacídico dentro del dominio tirosín kinasa (132). Otro estudio analiza su repercusión funcional *in vitro*, pero conjuntamente con la variante p.(Asn724Lys) en el mismo alelo, demostrando pérdida llamativa de función (133). Sin embargo, otros estudios que han evaluado funcionalmente la variante p.(Pro722Ser) de manera aislada no han confirmado un efecto deletéreo sobre su función (115), lo que junto a su relativamente elevada frecuencia alélica sugiere que, si bien individualmente no parece jugar un papel determinante en la expresión de un fenotipo patológico, podría contribuir a la expresión fenotípica cuando se presenta junto con otras variantes que afecten a la vía de señalización de FGF, como es el caso en el probando 29, quien presenta igualmente una variante relevante en *HMX3*.

***OTX2*** (*Homolog of Orthodenticle, drosophila, 2*, MIM# 600037) codifica un factor de transcripción implicado en el desarrollo cerebral y de otras estructuras craneales, especialmente ojos e hipófisis (29). Se trata de un gen cuyas alteraciones en heterocigosis explican un 2-3% de los casos de microftalmía o anoftalmía, un tercio de los cuales presenta HIC (29). Existen también casos de HIC sin anomalías oculares (134). La expresión de *OTX2* precede y es necesaria para la expresión de *HESX1* en las etapas iniciales del desarrollo hipofisario (34). Pero también tiene un papel regulador en la vía FGF. *OTX2* y *FGF8* presentan una regulación recíproca, fundamental para el adecuado desarrollo del prosencéfalo ventral y la eminencia media (135). En modelos murinos, la delección de *Otx2* en el ectodermo oral del que deriva la adenohipófisis, supone una evidente alteración del desarrollo hipofisario, pero también su delección en el

neuroectodermo (del que deriva la neurohipófisis) implica una hipoplasia adenohipofisaria (sin clara alteración de la diferenciación de las distintas estirpes celulares), además de una inadecuada formación del tallo y lóbulo posterior, todo ello mediado a través de la anulación de la señalización por la vía FGF (136). Como ocurre con las variantes en otros genes, la expresividad de las variantes de *OTX2* es muy variable y la penetrancia incompleta no es infrecuente (29). Se ha demostrado la existencia de modificadores genéticos de la expresividad de las alteraciones en *Otx2* en ratones (137).

En nuestro estudio hemos identificado la variante probablemente patogénica p.(Pro134Arg) de *OTX2*, presente en el probando 110, la cual ha sido descrita previamente en un paciente que cumple (como este probando 110) criterios clínicos de DSO (DCHH junto a hipoplasia de nervio óptico unilateral), en un trabajo que demuestra la pérdida de función *in vitro* de la proteína, con efecto dominante negativo (138).

***FLRT3*** (*Fibronectin-like domain-containing leucine-rich transmembrane protein 3*, MIM# 604808) e ***IL17RD*** (*Interleukin 17 receptor D*, MIM# 606807) tienen ambos una función reguladora dentro de la vía FGF. Mientras *FLRT3* (proteína transmembrana que interacciona con el receptor *FGFR1*) parece facilitar y estimular la señalización de la vía FGF, *IL17RD* (que puede actuar también a nivel transmembrana o en el citosol como proteína libre) parece modular negativamente dicha señalización (139,140). A pesar de estas diferencias en su función reguladora, su implicación en la etiología del HIC es muy probable, debido a la necesidad de mantener el fino equilibrio de regulación espacio temporal de la vía FGF (además de su equilibrio recíproco con otras vías) durante el desarrollo embrionario de la hipófisis (59,139,140). Mutaciones en ambos genes se han relacionado anteriormente con el fenotipo de HHC, dentro de un contexto de probable herencia oligogénica (139).

En nuestro estudio, la variante p.(Cys478Tyr) de *FLRT3*, presente en el probando 106, se encuentra situada en una posición muy conservada dentro del dominio fibronectina tipo-III y presenta una muy elevada predicción de patogenicidad *in silico*. La variante p.(Ile457Met) de *IL17RD*, presente en el probando 110, si bien se sitúa en una posición poco conservada, presenta una

frecuencia alélica muy baja, es predicha como patogénica *in silico* y está situada dentro del dominio SEFIR, necesario para las interacciones proteína-proteína (140).

**HMX2** (*H6 family homeobox 2*, MIM# 600647) y **HMX3** (*H6 family homeobox 3*, MIM# 613380) son dos genes implicados en el desarrollo de núcleos hipotalámicos relevantes para la función neuroendocrina (141). La vía de señalización FGF regula la expresión de Hmx2 y Hmx3 (142). Ratones knockout para *Hmx3* presentan anomalías del desarrollo del oído e infertilidad (143). Ratones knockout para *Hmx2* y *Hmx3* muestran, además de anomalías del oído, hipoplasia adenohipofisaria, deficiencia de GH, grave hipocrecimiento postnatal, menor expresión hipofisaria de Lhx3 y alteración del desarrollo de varios núcleos hipotalámicos, con ausencia de secreción de GHRH (141). Sin embargo, el mismo estudio sugiere que podría existir cierto solapamiento funcional entre Hmx2 y Hmx3, siendo posible que la presencia correcta de uno de ellos pueda compensar la haploinsuficiencia del otro (141). En humanos, hasta el momento, sólo deleciones en 10q en heterocigosis incluyendo ambos genes se han relacionado con sordera neurosensorial bilateral (144).

En nuestro estudio, la variante p.(Ala326Thr) de **HMX3**, presente en heterocigosis en el probando 29, se encuentra situada en una posición conservada y presenta una elevada predicción de patogenicidad. La variante NM\_005519.1:c.\*1C>T de **HMX2**, presente en el probando 77, se sitúa en la región 3'UTR, en el nucleótido inmediatamente posterior al codón de parada. Por ello, resulta por el momento incierta la probabilidad de su repercusión patogénica, si bien no se puede descartar por completo un efecto no codificante.

Como se ha mencionado previamente, variantes patogénicas en **PROKR2** han sido descritas en portadores sanos. Incluso la variante con clara repercusión funcional *in vitro* p.(Leu173Arg) (126) ha sido descrita en homocigosis en una madre sana (64). Casos similares se han descrito con variantes patogénicas en **FGFR1** o en **OTX2**. De hecho, la misma variante del probando 110 en **OTX2** p.(Pro134Arg), descrita anteriormente en un paciente con DSO (DCHH e hipoplasia unilateral de nervio óptico) y considerada patogénica por la

demostrada pérdida de función *in vitro* con efecto dominante negativo, también está presente en el padre sano de ese paciente (138). Todo esto implica necesariamente la contribución de otros factores en la expresión del fenotipo clínico.

En nuestro caso, 4 de los 5 probandos que acabamos de mencionar (2 DCHH, 1 DSO y 1 DAGH-HP) presentan anomalías tanto en *PROKR2* como en genes relacionados con la vía FGF, que se acumulan en los pacientes heredadas de progenitores diferentes (salvo en el probando 110 del que aún no se dispone del resultado del estudio genético familiar). Algunos además asocian otras variantes en otros genes [como *IL17RD* en el probando 110, gen también implicado en la regulación de la vía FGF (139)], aunque su relevancia puede ser más discutible debido a sus características.

Los 4 probandos presentan en común deficiencia de GH, la situación ectópica de la neurohipófisis y la alteración del tallo hipofisario. El probando 77, con 9 años en la actualidad, sólo tiene afectado de momento el eje somatotropo, si bien las anomalías hipofisarias en RMN implican un elevado riesgo de aparición posterior de otras deficiencias (41). El probando 110 presenta un cuadro compatible con DSO debido a la suma de DCHH y agenesia de septo pelúcido, hallazgo este último explicable por la presencia de la variante p.(Pro134Arg) en *OTX2*, la cual ya ha sido descrita en un paciente con fenotipo similar de DSO sin anoftalmía ni microftalmía (138). Los probandos 15 y 29 pertenecen al grupo de DCHH. Si bien la micrognatia del probando 110 puede explicarse por la presencia de la alteración de *OTX2* (137), el resto de rasgos sindrómicos del probando 77 resultan más difíciles de justificar por las variantes encontradas. Cabe recordar aquí la consanguinidad de los progenitores de este probando 77, que podría justificar la presencia de alguna alteración genética en homocigosis en algún gen no relacionado con el desarrollo de la hipófisis. El probando 106 es el único cuya variante en la vía de la prokineticina se sitúa en *PROK2* y no en *PROKR2*. Y si bien también presenta deficiencia de GH (dentro de un contexto clínico de DSO), es el único paciente de este grupo de 5 que presenta neurohipófisis normal y tallo hipofisario sin alteraciones. Este hecho disminuye la probabilidad de que la variante de significado incierto en *PROK2*

p.(\*130Leuext\*9) interfiera funcionalmente de manera similar a como lo hacen las otras 4 de variantes en *PROKR2*.

Cómo puede producirse la sinergia de efectos deletéreos causados por las alteraciones de la vía FGF y la vía de la prokinetina es por el momento una cuestión no resuelta. Pero es evidente que la relación o interacción entre las mismas existe, habida cuenta de que las anomalías de ambas vías se relacionan con el fenotipo del síndrome de Kallmann, tanto en humanos como en modelos murinos, afectando en ambos casos a los mismos procesos de desarrollo embrionario en los bulbos olfatorios y neuronas GnRH. Un posible nexo de unión se ha planteado recientemente, al demostrar que la anosmina, codificada por el gen *ANOS1 (KAL1)* puede interaccionar, no sólo con receptores de la vía FGF, sino también con *PROKR2* (145). La implicación de la vía FGF en el desarrollo hipofisario está claramente demostrada (1,2,5). Si bien la implicación de *PROKR2* en dicho desarrollo es menos conocida [estando establecida con mucha mayor evidencia su implicación en el desarrollo del olfato y las neuronas GnRH hipotalámicas (116,146)], sí existen algunos datos al respecto. Ratones knockout para *Prokr2* muestran una aparente disminución del tamaño hipofisario (64). *Prokr2* se expresa en varias áreas hipotalámicas, como la región preóptica, el núcleo paraventricular, la eminencia media o el núcleo arcuato (146), este último principal localización de neuronas secretoras de GHRH (147). En humanos, *PROKR2* tiene expresión postnatal en la hipófisis y el sistema nervioso central (incluido el hipotálamo) (148,149). También parece estar implicado en el proceso de angiogénesis microvascular de tejidos endocrinos (146,149,150), cuya alteración a nivel hipofisario es una de las hipotéticas causas potenciales del síndrome del tallo hipofisario interrumpido (118). Aunque de manera simple se podría plantear que, en el caso de pacientes con DCHH, *PROKR2* justificaría la alteración del eje gonadotropo y las alteraciones en otros genes el resto de deficiencias hipofisarias de manera independiente, este no parece ser el mecanismo que aquí participa, habida cuenta de la presencia de variantes patogénicas tanto en *PROKR2* como en genes de la vía FGF en portadores sanos. Resulta más probable una interacción y sinergia de efectos sobre el desarrollo hipotalámico y/o del infundíbulo, en los que ambas vías parecen tener un papel relevante, que suponga secundariamente una alteración del desarrollo

y función hipofisarios. Es especialmente interesante la consistente asociación de neurohipófisis ectópica y alteración del tallo hipofisario con la presencia conjunta de variantes relevantes en *PROKR2* y en genes de la vía FGF. Sobre los mecanismos por los que esta asociación de variantes puede influir en el desarrollo infundibular y determinar la expresión de este fenotipo concreto, se profundizará dentro del apartado “A.6.4. *Correlación genotipo-fenotipo hipofisario en RMN*” de esta *Discusión*.

### **A.3.3. Combinaciones variables de alteraciones en las vías SHH, FGF y NODAL**

11 pacientes (9,6% de la cohorte) presentan alguna combinación de variantes afectando al menos a dos de las siguientes 3 vías de señalización (SHH, FGF y NODAL). Así, 7 pacientes presentan variantes afectando a las vías SHH (genes *GLI2*, *PTCH1*, *CDON*, *GLI3*) y FGF (*FGFR1*, *OTX2*, *HMX2*, *HMX3*, *FGF8*, *SPRY4*, *FGFR2*), otros 2 a las vías SHH (*GLI2*, *DISP3*) y NODAL (*FOXH1*, *PITX2*, *SMAD2*), y otros 2 a las vías FGF (*ANOS1*, *SPRY4*) y NODAL (*FOXH1*, *PITX2*).

Hemos discutido ya el posible papel patogénico de las alteraciones en varios genes implicados en la **vía de señalización FGF** (*FGFR1*, *OTX2*, *HMX2*, *HMX3*, *FLRT3* e *IL17RD*). Entre estos genes, en este grupo de pacientes encontramos algunas variantes en *FGFR1*, *HMX3* y *OTX2*. La variante de *FGFR1* p.(Arg822Cys), presente en heterocigosis en el probando 86 con DSO, ha sido descrita con anterioridad en un paciente con síndrome de Kallmann (151). Resulta interesante valorar el hecho de que el padre del probando, con agenesia renal unilateral, también presenta esta variante, siendo *FGFR1* uno de los genes cuyas alteraciones se han asociado con el fenotipo renal mencionado (152). La variante p.(Ala326Thr) de *HMX3*, presente en el probando 57, supone el cambio de un residuo de alanina por uno de treonina dentro de una cadena de poli-alanina. Se encuentra en una posición conservada y presenta elevada predicción de patogenicidad. La variante sinónima en *OTX2* NM\_172337.2:c.420G>C, p.(Pro140=), presente en el probando 91, implica una posible alteración del proceso de *splicing* por activación de un aceptor críptico.

El *splicing* alternativo podría dar lugar a la pérdida de 60 codones al comienzo del tercer exón, afectando a parte del homeodominio de unión a ADN, con cambio de la fase de lectura y truncamiento de la proteína, si bien este potencial efecto deletéreo queda pendiente de ser demostrado mediante estudios experimentales.

Se discute a continuación la posible patogenicidad de las variantes encontradas en este grupo de pacientes en los genes *ANOS1* y *SPRY4* (también relacionados con la vía FGF).

***ANOS1*** (previamente denominado *KAL1*, MIM# 300836) es uno de los genes principales cuyas alteraciones se han relacionado con el síndrome de Kallmann. Codifica una proteína denominada anosmina, capaz de secretarse a la matriz extracelular, desde donde parece desempeñar funciones relacionadas con la ramificación dendrítica y la migración neuronal (especialmente estudiado en las neuronas GnRH que surgen en la placoda olfatoria y migran hacia su ubicación definitiva en el hipotálamo durante el desarrollo embrionario). Se ha demostrado que la anosmina funciona como regulador de la vía FGF, actuando como cofactor, implicado en la modulación de la señalización activada por la unión del ligando FGF con el receptor (140). No en balde, *FGFR1* y *FGF8* son dos de los principales genes relacionados con el síndrome de Kallmann (así como otros genes de la vía FGF como *FLRT3*, *HS6ST1*, *SPRY4* o *DUSP6*) (44,139). Si bien las anomalías de *ANOS1* no han sido relacionadas frecuentemente con el fenotipo de DCHH, se han reportado varios casos de DSO con anomalías hipofisarias, que presentan variantes en dicho gen con pérdida de función *in vitro* (153). La implicación funcional de *ANOS1* como cofactor de la vía FGF hace probable un papel de sus variantes en la etiología del HIC más allá del HHC, en un contexto oligogénico. En el paciente 53 hemos identificado una delección completa del gen *ANOS1* en hemicigosis. Esta delección, heredada de la madre sana, puede explicar parte del fenotipo del paciente (deficiencia de gonadotropinas, criptorquidia bilateral, escroto hipoplásico, agenesia renal, sincinesias bimanuales, hipoplasia de bulbos olfatorios). Pero el paciente presenta además otros rasgos que exceden al fenotipo de síndrome de Kallmann (deficiencia de GH y TSH, tallo hipofisario e hipotálamo adelgazados, hipoplasia mediofacial, paladar ojival, hipotonía axial), que sugieren la implicación de otras



alteraciones que afecten a estructuras de la línea media. En este caso, la presencia de la variante p.(Leu330Phe) en *FOXH1*, sobre la que discutimos más adelante al hablar de la vía NODAL, resulta un excelente candidato para la explicación del fenotipo completo, en conjunto con la delección de *ANOS1*.

***SPRY4*** (*Homolog of sprouty, Drosophila, 4*, MIM# 607984) codifica una proteína intracelular que actúa como modulador negativo de la señalización de receptores tirosín kinasa (139,154). Por ello, actúa, de manera similar a *FLRT3*, inhibiendo la señalización de la vía FGF desencadenada por la activación del receptor *FGFR1* (139,140,154). Sus alteraciones se han relacionado, como en el caso de *IL17RD* y *FLRT3*, con el fenotipo de HHC, dentro de un contexto de probable herencia oligogénica (139). La variante probablemente patogénica p.(Ser241Tyr) de *SPRY4*, presente en el probando 26, ya ha sido descrita como patogénica, y se considera factor de riesgo de HHC (139).

La **vía de señalización SHH** en el neuroectodermo del diencefalo ventral es capaz de inhibir la expresión de las vías BMP y FGF. A su vez, la vía BMP es capaz de reprimir la expresión de la vía SHH (1). El gradiente espacial de expresión de SHH regula así la adecuada localización y extensión del “centro organizador” ubicado en el diencefalo ventral, desde el que la expresión de factores como BMP4, FGF8 y FGF10 permitirá la adecuada inducción de la bolsa de Rathke en el ectodermo oral adyacente, y su crecimiento (1). Este gradiente, dependiente del control recíproco de las distintas vías, establece un delicado equilibrio que puede perderse ante la presencia de alteraciones en alguno de los genes relacionados con dichas vías. Por otro lado, recientemente se ha demostrado la necesidad de un correcto funcionamiento de la vía SHH para la adecuada diferenciación inicial de las células progenitoras hipofisarias y la expresión de LHX3 y LHX4, para la proliferación de dichas células progenitoras en el proceso de expansión de la bolsa de Rathke, y para la diferenciación de la región anterior del hipotálamo (155). El posible papel en concreto de *GLI2*, uno de los efectores principales de la vía SHH, se discute en detalle en la sección C de esta *Discusión*.

***PTCH1*** (*Homolog of Patched, Drosophila, 1*, MIM# 601309) codifica una proteína transmembrana, que constituye el receptor del ligando SHH (junto con otro grupo de proteínas que en conjunto forman un complejo heteromérico). En ausencia del ligando, *PTCH1* tiene una función represora de la señalización intracelular de la vía SHH, al permanecer unido y reprimir a la también proteína transmembrana SMO, iniciadora de dicha señalización intracelular. La unión del ligando SHH al receptor *PTCH1*, libera la proteína SMO y permite el inicio de la cascada intracelular (156). Se trata de un gen cuyas alteraciones se han asociado principalmente con patología oncológica, sobre todo a nivel cutáneo (síndrome de nevus basocelular o síndrome de Gorlin), pero varias de ellas han sido relacionadas anteriormente con un fenotipo de HPE (157,158).

Dentro del grupo de 11 pacientes que estamos analizando con combinaciones de variantes en genes de las vías SHH, FGF o NODAL, dos de ellos presentan variantes relevantes en el gen *PTCH1*. La variante p.(Ile1074Val), presente en el probando 86, presenta una frecuencia alélica extremadamente baja [presente únicamente en 2 alelos de los 111.698 registrados en gnomAD (0,0018%) y ausente en las bases de datos 1000 Genomes y ESP6500], y se encuentra ubicada en una posición muy conservada dentro del 9º dominio transmembrana. El probando 91 presenta 2 variantes en *cis* en *PTCH1* en heterocigosis: p.(Tyr1316Cys) y p.(Arg1442Trp). La variante probablemente patogénica p.(Tyr1316Cys), heredada del padre, está descrita en un paciente con anomalías del desarrollo ocular y ha sido publicado un estudio funcional *in vivo* que demuestra pérdida de función (159). La variante p.(Arg1442Trp), también heredada del padre, es de significado incierto. Resulta interesante observar cómo estos dos probandos (86 y 91), que son los dos únicos que presentan variantes relevantes en *PTCH1* dentro de este grupo de 11 pacientes, son igualmente los únicos que muestran un fenotipo de DSO. También, que ambos pacientes presentan un progenitor sano portador de alguna de esas variantes en *PTCH1*. Y finalmente, que ambos heredan también una variante relevante en algún gen relacionado con la vía FGF (*FGFR1* y *OTX2*) transmitida por el otro progenitor (en este caso no sanos por completo, ya que el padre del probando 86 presenta agenesia renal, en la que probablemente ha influido la variante en *FGFR1*). Así, la acumulación de las variantes de *PTCH1* y

las presentes en genes relacionados con la vía FGF en los dos probandos, explicaría la expresión del fenotipo de DSO en los mismos, ausente en los progenitores por no presentar dicha agrupación de variantes.

**CDON** (*Cell adhesion molecule-related/downregulated by oncogenes*, MIM# 608707) codifica una proteína transmembrana que actúa, junto con PTCH1 y otras proteínas, en el complejo proteico que actúa como receptor de SHH. De los 3 dominios fibronectina tipo-III que posee, los dos primeros sirven para la interacción con PTCH1 y el tercero para la unión a SHH (160). Su función como elemento regulador es facilitadora de la señalización intracelular de la vía SHH (160). Mutaciones con pérdida de función en *CDON* se han descrito principalmente en pacientes con un amplio rango fenotípico incluido dentro de la HPE, con afectación hipofisaria en alguno de ellos (67,161,162). Un paciente con la mutación sin sentido p.(Glu922\*) en *CDON* ha sido descrito con un fenotipo de DCHH y síndrome del tallo hipofisario interrumpido sin ningún otro dato de alteración de la línea media, siendo su madre portadora sana de la misma (163), lo que indica penetrancia incompleta que sugiere la contribución de otros factores en la expresión del fenotipo del paciente.

En nuestro estudio, el probando 57 presenta la variante en *CDON* p.(Arg1187Cys), la cual, si bien presenta una frecuencia alélica poblacional relativamente elevada (0,19% en gnomAD, 0,7% en 1000 Genomes), se sitúa en una posición nucleotídica muy conservada y presenta una elevada predicción de patogenicidad.

**La vía de señalización NODAL**, rama de la gran vía BMP/TGF- $\beta$ , es necesaria para la adecuada expresión de la vía SHH en el prosencéfalo ventral, y ambas colaboran en el desarrollo de esta región del cerebro (164).

**FOXH1** (*Forkhead box H1*, MIM# 603621) codifica una proteína que actúa como cofactor, en unión con las proteínas SMAD, para poder llevar a cabo la activación de la transcripción de genes diana de la vía NODAL (96). Mutaciones con pérdida de función en *FOXH1* se han relacionado principalmente con defectos cardíacos congénitos, pero también con HPE (96). Dos de nuestros pacientes (probandos 53 y 42) presentan variantes relevantes en *FOXH1*. Se

trata de dos variantes muy próximas entre sí, p.(Leu330Phe) en el probando 53 y p.(Asp328Glu) en el probando 42. Ambas se encuentran dentro del dominio de interacción con proteínas SMAD y, dentro de éste, en el motivo SIM (*Smad Interaction Motif*) (aminoácidos 327 – 348). Dentro de este motivo SIM, se han descrito variantes con pérdida de función *in vitro* en los codones 328, 331, 336 y 339 (96). La variante p.(Asp328Glu), presente en el probando 42, es una de ellas. La variante p.(Phe331Val), ubicada en el codón adyacente a p.(Leu330Phe) está descrita en un caso con HPE y presenta pérdida de función *in vitro* (96). Por todo ello, es muy probable que la variante p.(Leu330Phe), presente en el probando 53, no descrita con anterioridad, tenga igualmente un efecto deletéreo. La agrupación en el probando 53 de dicha variante, heredada del padre sano, junto con la deleción completa de *ANOS1 (KAL 1)*, heredada de la madre sana, explicaría el fenotipo de DCHH con anomalías de línea media que presenta, además de los rasgos característicos del síndrome de Kallmann.

***PITX2*** (*Paired-like homeodomain transcription factor 2*, MIM# 601542) codifica un factor de transcripción implicado en varios procesos del desarrollo embrionario, incluyendo un papel importante en las etapas iniciales del desarrollo hipofisario (2). La vía de señalización NODAL activa la transcripción de *PITX2* (165). Las mutaciones en *PITX2* se han relacionado fundamentalmente con anomalías oftalmológicas del segmento anterior (principalmente con el síndrome de Axenfeld-Rieger), si bien existe un caso publicado con una traslocación t(4;14)(q25)(q13) que se sitúa dentro del gen *PITX2* en un paciente con un cuadro sindrómico que incluye anomalías de la línea media craneofacial como agenesia de cuerpo calloso y paladar ojival (166).

En nuestro estudio identificamos la variante p.(Met233Val) de *PITX2* en el probando 26. Dicha variante se localiza en una posición conservada, su predicción de patogenicidad *in silico* es elevada y se encuentra acompañada por la variante probablemente patogénica p.(Ser241Tyr) en *SPRY4* (regulador de la vía FGF).

El probando 42, además de presentar la variante sin sentido p.(Ser267\*) en *GLI2* (más detalles en la sección C de esta *Discusión*) heredada de la madre, presenta otra variante en *PITX2*, p.(Ala188Thr), junto con la variante de *FOXH1*

con repercusión funcional *in vitro* p.(Asp328Glu) (ambas variantes ausentes en su madre; estudio de segregación incompleto por fallecimiento del padre por neoplasia pulmonar). Así, en este caso, la afectación conjunta en el probando de las vías SHH y NODAL justificaría la expresión de su fenotipo de DCHH, no presente en sus padres.

Entre los 7 pacientes descritos que presentan agrupación de variantes en las vías SHH y FGF, se ha observado la presencia de determinados rasgos fenotípicos compartidos. En este grupo se diferencian 2 subgrupos de pacientes. Los dos pacientes con DSO (probandos 86 y 91, cuyo gen alterado de la vía SHH es *PTCH1*) presentan una adenohipófisis normal en RMN, agenesia de septo pelúcido e hipoplasia unilateral o bilateral de nervios ópticos. En cambio, los 5 pacientes con DCHH (probandos 38, 45, 51, 54 y 57, cuyos genes alterados de la vía SHH son *GLI2* o *CDON*) presentan hipoplasia adenohipofisaria y deficiencia de, al menos, GH, TSH y probablemente gonadotropinas (3 tienen confirmación analítica y en 2 no ha podido realizarse por su edad prepuberal, pero presentaron micropene al nacimiento).

Las 2 parejas de pacientes con anomalías afectando a las vías FGF y NODAL y a las vías SHH y NODAL muestran en común un fenotipo de DCHH con presencia de hipoplasia adenohipofisaria y deficiencia, al menos, de GH y TSH.

Una limitación del presente estudio en lo que se refiere a la evaluación de las distintas vías de señalización afectadas reside, como ya ha sido comentado, en la incompleta representación de algunas de dichas vías en el panel HIPOPIT\_V1. Aun así, hemos identificado combinaciones repetidas de afectación de determinadas vías de señalización en distintos pacientes. En el caso de la combinación de alteraciones en genes de la vía de la prokineticina y la vía FGF, el fenotipo de los distintos pacientes presenta como características comunes la deficiencia de GH y alteraciones de neurohipófisis y tallo compatibles con el síndrome del tallo hipofisario interrumpido. En el caso de la agrupación de variantes en genes relacionados con las vías SHH y FGF, también hemos detectado correlaciones genotipo-fenotipo, distinguiendo dos subgrupos según los genes de la vía SHH que están afectados.

En conjunto, y por todo lo expuesto en este apartado, podemos afirmar que el presente estudio aporta nuevas evidencias que respaldan la hipótesis de herencia oligogénica en la etiología de la DCHH, la DSO y la DAGH-HP.

#### **A.4. Consideraciones acerca de algunos de los genes y vías de señalización con mayor frecuencia de variantes relevantes**

##### **Vía de señalización SHH**

La vía de señalización que acumula un mayor número de variantes es la vía SHH, con un 46,6% de los pacientes con alguna variante en alguno de los genes relacionados con esta vía. En este grupo de pacientes observamos dos fenotipos diferentes según los genes de la vía SHH afectados. Mientras que los pacientes con variantes en *GLI2*, *CDON*, *TGIF1* o *PITX2* aparecen asociadas a DCHH o DAGH-HP con hipoplasia de adenohipófisis, el fenotipo de DSO con adenohipófisis normal en RMN aparece más frecuentemente asociado a variantes relevantes principalmente en *PTCH1*. La asociación de anomalías en genes de la vía SHH con el fenotipo de hipoplasia hipofisaria, por la influencia de dicha vía en la proliferación de células progenitoras en la adenohipófisis en desarrollo, se ha postulado anteriormente desde observaciones en modelos animales (68,167,168). En el presente estudio, además de confirmar dicha asociación en un amplio grupo de pacientes, observamos una correlación diferencial en función de los genes de la vía SHH implicados. En este contexto, el fenotipo diferencial, sin hipoplasia adenohipofisaria, asociado a las variantes de *PTCH1*, podría explicarse por su papel represor de la vía SHH (156). Por ello, mutaciones de *PTCH1* con pérdida de función implicarían una menor represión de la vía, lo que resultaría en fenotipos diferentes a los asociados a variantes en otros genes que impliquen déficits funcionales de la señalización SHH. Además, la complejidad funcional que caracteriza al complejo heteromérico que actúa como receptor de SHH (156) podría ser uno de los condicionantes implicados en la variabilidad fenotípica asociada a las variantes de *PCTH1*.

Hemos discutido con anterioridad en esta sección algunos de los genes más representados en nuestra cohorte por la frecuencia de variantes relevantes identificadas en los mismos (*PROKR2*, *FGFR1*, *SPRY4*). Comentamos a continuación algunas consideraciones sobre otros genes con un elevado número de variantes relevantes en nuestra cohorte (*CHD7* y *PROP1*).

### **Gen *CHD7***

*CHD7* representa el gen en el que encontramos mayor número de variantes relevantes en nuestra cohorte de pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP (13 variantes distintas en 18 pacientes, 11,5% de todas las variantes relevantes detectadas), si bien es cierto que sólo una de estas variantes alcanza la clasificación de VUS+. 13 de estos 18 pacientes presentan además variantes relevantes en otros genes.

Mutaciones en ***CHD7*** (*Chromodomain helicase DNA-binding protein 7*, MIM# 608892) se relacionan principalmente con el fenotipo de síndrome CHARGE, pero también se consideran causa de HHC aislado (MIM# 612370), con y sin anosmia (44). El retraso del crecimiento es habitual entre los pacientes con síndrome CHARGE, y en hasta un tercio de los pacientes se debe a una deficiencia de GH (169–172). De hecho, la deficiencia de GH se propone como uno de los criterios menores en el diagnóstico de síndrome CHARGE por algunos autores (173). El fenotipo de DCHH también se ha descrito en pacientes con mutaciones en *CHD7*, habitualmente con anomalías hipofisarias en la imagen de RMN, y principalmente en pacientes con algún rasgo asociado del fenotipo CHARGE (170,172,174). En algunos de estos pacientes, las mutaciones en *CHD7* también estaban presentes en alguno de los progenitores sanos (174), sugiriendo de nuevo la participación de algún otro factor en la expresión del fenotipo. Algunos pacientes con fenotipo CHARGE y mutaciones en *CHD7* incluyen rasgos de línea media como hipoplasia del cuerpo calloso o incluso HPE (169). *CHD7* regula la expresión de *BMP4* en la línea media del telencéfalo durante el desarrollo embrionario (175) y se ha demostrado su papel regulador de la cascada intracelular de la vía BMP en el corazón en desarrollo (176). También se ha demostrado su interacción con *SOX2* en células progenitoras neurales para regular la expresión de, entre otros, *GLI3*, así como su capacidad

de regular la expresión de FGF8 y OTX2 durante el desarrollo del cerebelo (176). Asimismo, es capaz de participar en las vías WNT, FGF, BMP y NOTCH en el oído en desarrollo (177). Si bien no conocemos estudios sobre estas funciones de CHD7 estrictamente a nivel hipofisario, salvo el hecho de que la expresión hipotalámica de OTX2 también parece ser regulada por CHD7 (178), sí sabemos que CHD7 se expresa en la hipófisis durante el desarrollo embrionario en humanos (179), y que las vías BMP, WNT, FGF, SHH y NOTCH, así como OTX2 y SOX2, son actores fundamentales en el desarrollo embrionario de la región hipotalámico-hipofisaria (1).

Un caso particularmente significativo es el del probando 81, mujer con diagnóstico de DSO, con deficiencia de GH, TSH y ACTH, con hipoplasia hipofisaria, tallo adelgazado, neurohipófisis no visible, hipoplasia de nervios ópticos, hipoplasia de bulbos olfatorios e hipoplasia cerebelosa, con antecedente de parto pretérmino (32 semanas), vaginal, en presentación podálica, con prolapso del cordón. Esta paciente presenta, en *CHD7*, la variante VUS+ NM\_017780.3:c.3949C>T, p.(Arg1317Cys) en heterocigosis, heredada de la madre sana; y en el gen *CDON* la variante NM\_016952.4c.2462G>A, p.(Arg821His) en heterocigosis, heredada del padre sano. La variante de *CHD7* p.(Arg1317Cys), de frecuencia alélica extremadamente baja y ubicada en una posición muy conservada dentro del dominio helicasa C, ya ha sido descrita en un paciente con síndrome de Kallmann (180). Nuestra paciente presenta hipoplasia de bulbos olfatorios e hipoplasia cerebelosa. La implicación de las alteraciones de *CHD7* en la hipoplasia de bulbos olfatorios está claramente establecida (169). La hipoplasia cerebelosa se observa en ratones con haploinsuficiencia de *CHD7* y se ha detectado como rasgo frecuente en pacientes con mutaciones en este gen (169,181). La variante en *CDON* p.(Arg821His), poco frecuente y con elevada predicción de patogenicidad, se encuentra en una posición conservada dentro del 2º dominio fibronectina tipo-III, necesario para la interacción de CDON con PTCH1, receptor de SHH (160).

En este caso, la herencia digénica podría explicar el fenotipo del paciente, siendo ambos progenitores portadores sanos de cada una de las dos variantes identificadas en el probando. Resulta interesante igualmente valorar la presencia de los antecedentes obstétricos descritos. Es conocida la capacidad de



determinados factores ambientales de modular la expresión fenotípica de las alteraciones de *CDON* en modelos animales (77,182). Así, el caso de este probando 81 resulta especialmente gráfico para respaldar la posibilidad de una contribución multifactorial tanto de determinados insultos ambientales (obstétricos) como de una determinada carga genética acumulada en el probando según un modelo de herencia oligogénica (digénica en este caso).

La elevada frecuencia de variantes relevantes en *CHD7* en nuestra cohorte contrasta con un estudio previo en el que no se identificaron mutaciones en *CHD7* tras analizar 100 pacientes (77 DSO, 21 DCHH sin anomalías de línea media y 2 DAGH) sin ningún rasgo CHARGE (174). Estas diferencias se explican probablemente por los diferentes criterios de filtrado de variantes del presente estudio, más orientadas a evaluar una posible etiología oligogénica de las patologías en estudio, que han priorizado como potencialmente relevantes variantes de significado incierto no consideradas por los criterios de patogenicidad de Gregory *et al.* (174). De las 13 variantes identificadas en nuestra cohorte, la base de datos *chd7.org* (183), partiendo de un modelo monogénico, clasifica 3 de ellas como benignas (fundamentalmente por su presencia en controles), 4 de ellas como no clasificadas (patogenicidad indeterminada) y las otras 6 no aparecen recogidas. Según el modelo de herencia oligogénica, variantes de *CHD7* con una probablemente menor repercusión funcional que otras evidentemente patogénicas de manera individual, podrían contribuir a la variabilidad fenotípica en un contexto multifactorial.

### **Gen *PROP1***

5 pacientes de nuestra cohorte presentan mutaciones patogénicas en *PROP1* en homocigosis (4,4%). Al tratarse sólo de casos con DCHH, el porcentaje en este grupo asciende al 6,9% de los pacientes del grupo de DCHH. Teniendo en cuenta que dos de los pacientes con mutaciones en *PROP1* son hermanos, la frecuencia de mutaciones en *PROP1* alcanzaría el 50% de los casos familiares (2 de 4) y el 4,3% de casos esporádicos. Esta mayor proporción de pacientes con DCHH esporádicos por mutaciones en *PROP1* respecto al 2.9% del estudio italiano de De Rienzo *et al.* (69) puede justificarse por la

presencia en nuestra cohorte de 6 pacientes con DCHH procedentes de Turquía, dos de los cuales presentan mutación en homocigosis en *PROP1* (33,3%) [el probando 36 con una deleción completa de *PROP1* y el probando 31 con la mutación p.(Leu102Cysfs\*8)], y por ser Turquía una región en la que ambas variantes son más frecuentes que en nuestro medio (108, 182). Sin contabilizar dichos 6 pacientes turcos, la frecuencia de mutaciones en *PROP1* en pacientes con DCHH esporádicos en nuestro medio sería del 1,6%, incluso inferior a la de la población italiana del estudio de De Rienzo *et al.* (69). En el reciente estudio de Blum *et al.* (114) ninguno de los 19 pacientes con DCHH procedentes de España (0%), y sólo 1 de los 30 procedentes de Italia (3,3%) presentaban alguna mutación en *PROP1* en homocigosis. Si bien la deficiencia de ACTH no es especialmente característica de las mutaciones en *PROP1*, encontramos en nuestro estudio este tipo de deficiencia en 2 de los 5 pacientes.

En conclusión, podemos afirmar que las variantes patogénicas en homocigosis en *PROP1* continúan siendo la causa monogénica de DCHH más frecuente, pero, en nuestro medio, sólo son capaces de explicar menos del 5% de los casos con DCHH.

#### **A.5. Correlación genotipo-fenotipo según el grupo diagnóstico. Solapamiento genético de las patologías incluidas en el estudio, entre sí, y con patologías como el HHC y la HPE (Objetivos específicos 5 y 6)**

##### **A.5.1. Mayor frecuencia de variantes relevantes en *PTCH1* en pacientes con DSO**

Una de las principales aportaciones del presente estudio es el hallazgo de una mayor frecuencia de variantes relevantes en *PTCH1* en pacientes con fenotipo de DSO, respecto a los pacientes con DCHH o DAGH-HP, de manera estadísticamente significativa. Las características principales de este gen (implicado en la regulación represora dentro de la vía SHH) han sido ya

previamente discutidas (apartado “A.3.3. *Combinaciones variables de alteraciones en las vías SHH, FGF y NODAL*”).

Si bien anteriormente, las alteraciones en *PTCH1* se han relacionado con patologías relacionadas y solapadas como la HPE (157,158) y las anomalías del desarrollo ocular (159), no hemos encontrado ningún trabajo previo en el que se estudie y demuestre la relación entre las anomalías en *PTCH1* y la DSO. En concreto, en los 4 pacientes con DSO que presentan variantes relevantes en *PTCH1* (probandos 86, 91, 101 y 108), observamos un fenotipo común consistente en DSO “aislada” con hipoplasia unilateral o bilateral de nervios ópticos, agenesia del septo pelúcido, sin antecedentes obstétricos de interés y, en 3 de los 4, imagen de hipófisis normal en RMN. El probando 86, único de los 4 pacientes que presenta anomalías de la hipófisis en RMN (neurohipófisis no visible y tallo hipofisario adelgazado), presenta además la variante VUS+ en *FGFR1* p.(Arg822Cys) heredada del otro progenitor, lo que podría justificar esta diferencia (combinación ya discutida en el apartado A.3.3 de esta *Discusión*). Aunque quedan aún por dilucidar muchos de los mecanismos que explican la variabilidad fenotípica de las alteraciones en *PTCH1*, estos resultados sugieren que debe ser considerado uno de los genes potencialmente causales del fenotipo de DSO.

#### **A.5.2. Solapamiento genético entre sí de las tres patologías incluidas en el estudio**

No se han detectado asociaciones específicas entre las vías de señalización afectadas y los fenotipos de DCHH, DSO y DAGH-HP representados en nuestra cohorte de pacientes (**Tabla 8**). Esta ausencia de asociaciones significativas, puede deberse, como ya se ha comentado, a una incompleta representación de los genes de cada una de las vías en el panel HIPOPIT\_V1. Únicamente en el grupo de DCHH observamos una mayor presencia de variantes estrictamente patogénicas (según criterios ACMG) en varias de las vías de señalización que en los otros dos grupos de diagnóstico. Sin embargo, si consideramos el conjunto de variantes clasificadas como patogénicas, probablemente patogénicas y VUS+ (un planteamiento más apropiado para el análisis de los resultados en un modelo de etiología

oligogénica), tampoco observamos grandes diferencias entre los tres grupos de diagnóstico, y las que encontramos podrían estar influidas por el diferente tamaño muestral, sobre todo en el caso del grupo de DAGH-HP.

Existen algunos hallazgos genéticos predominantes en cada grupo. *PROP1* es (junto con *GLI2*) uno de los genes más relevantes en el grupo de DCHH. Variantes relevantes en genes como *PTCH1*, *OTX2* o *SOX2* se presentan con mayor frecuencia en el grupo de DSO. Pero también observamos con frecuencia en los distintos grupos diagnósticos variantes relevantes en genes como *GLI2*, *PROKR2*, *FGFR1*, *CHD7*, *SPRY4* o *SEMA3A*.

### **A.5.3. Solapamiento genético con el HHC y la HPE**

Hemos identificado variantes relevantes en genes anteriormente implicados en la etiología del HHC en el 35,8% de los pacientes (entre el 20 y el 41,5% según el grupo diagnóstico) y en genes relacionados anteriormente con la HPE en el 21,8% (20,2-26,7%) (**Tabla 8**). No en vano, algunos de los genes más relevantes en cuanto a la frecuencia de variantes relevantes en este estudio son *GLI2* y *PTCH1* (relacionados con el fenotipo de HPE), así como *CHD7*, *PROKR2*, *FGFR1*, *SPRY4* o *SEMA3A* (relacionados con el fenotipo de HHC).

Raivio *et al.* (59) sugirieron la posibilidad de la existencia de un solapamiento genético entre la DCHH, la DSO y el HHC tras identificar variantes patogénicas en *PROKR2*, *FGFR1* y *FGF8*, relacionados anteriormente con el HHC, en pacientes con DCHH o DSO. Hallazgos parecidos se muestran en otros trabajos similares (64,115,118). Otros estudios han planteado este tipo de solapamiento genético entre la HPE y el HHC, tras identificar variantes en *SIX3* y *GLI2* en pacientes con HHC (185) o variantes en *FGF8* y *FGFR1* en pacientes con HPE (186), y entre la DSO y el HHC, tras identificar variantes en *HESX1* en pacientes con síndrome de Kallmann (33) o una delección del gen *LEPR* en un paciente con DSO que asociaba DCHH y anomalías de la hipófisis (187).

Nuestros resultados, junto con los hallazgos previos en la literatura, confirman la existencia de un solapamiento genético entre las patologías incluidas en el presente estudio, así como con el HHC y la HPE. El presente

estudio, además de confirmar la implicación transversal de genes como *PROKR2* y *FGFR1* en el espectro clínico del HIC, aporta evidencia sobre la implicación de otros genes (como *CDH7*, *SPRY4* o *SEMA3A*, previamente implicados en el HHC) en la etiología de la DCHH, DSO o DAGH-HP, dentro de un modelo de contribución oligogénica.

## **A.6. Correlaciones genotipo-fenotipo entre subgrupos diagnósticos. Discusión multifactorial conjunta de eventos obstétricos (ambientales) (Objetivos específicos 1 y 7)**

Con el objetivo de profundizar en el conocimiento de las causas de la heterogeneidad fenotípica dentro de las patologías incluidas en el estudio, hemos realizado un análisis de los hallazgos moleculares en distintos subgrupos de pacientes con determinadas características clínicas comunes.

### **A.6.1. DSO “aislada” versus DSO-plus**

Los resultados del estudio molecular han puesto de manifiesto algunas diferencias entre los dos subgrupos (diferenciados por la ausencia o presencia de anomalías corticales del tipo esquisencefalia o polimicrogiria). Entre ellas, destaca la identificación de una mayor proporción de pacientes con variantes patogénicas, probablemente patogénicas o VUS+ en el grupo de DSO-plus. Este hallazgo se contrapone a la hipótesis etiológica planteada por Lubinski *et al.* (62), quienes sugirieron que este subtipo de DSO podría ser causado por una disrupción vascular al nivel de la arteria cerebral anterior en algún momento del desarrollo embrionario y, por tanto, con una menor incidencia de alteraciones genéticas que el grupo de DSO “aislada”. Además, en nuestro análisis se pone de manifiesto que el 50% de los pacientes con DSO-plus han presentado algún evento obstétrico potencialmente relevante, en comparación con el 13,6% de los pacientes con DSO “aislada”.

Si bien las variantes relevantes identificadas tanto en el subgrupo de DSO-plus como en DSO “aislada”, afectan predominantemente a genes relacionados con la vía SHH, la identidad de los genes afectados es diferente en ambos subgrupos: *TGIF1*, *GLI2* y *PAX2* en DSO-plus, y fundamentalmente *PTCH1* en DSO “aislada”. En el grupo de DSO “aislada” también resulta significativa la presencia de variantes en *OTX2*, gen cuya implicación en la etiología de la DSO está claramente aceptada (32), y en *CHD7*, cuya implicación ya ha sido discutida en un apartado anterior. En ambos subgrupos algún paciente presenta también alguna variante relevante en *ZIC2* o en *PROKR2*.

En conjunto, estos datos sugieren que, si bien es posible y razonable la participación de fenómenos ambientales, especialmente en la etiología de la DSO-plus, éstos probablemente tengan mayor repercusión en presencia de una carga genética predisponente (la cual parece predominantemente relacionada con genes de la vía SHH distintos a *PTCH1*), configurando así un escenario de probable etiología multifactorial que combina insultos genéticos y ambientales. La contribución de fenómenos ambientales parece menos relevante en la expresión de la DSO “aislada” (en cuya etiología parecen más relevantes las alteraciones en genes como *PTCH1* y *OTX2*).

#### **A.6.2. DSO con disfunción hipofisaria versus DSO sin disfunción hipofisaria**

No hemos observado importantes diferencias en el estudio molecular entre los distintos pacientes con DSO según presenten o no disfunción hipofisaria. Cabría destacar la mayor frecuencia de variantes en *PROKR2* en pacientes con DSO y deficiencias hormonales (ausentes en el subgrupo de DSO con función hipofisaria normal), lo cual parece respaldar la implicación de este gen en la etiología del HIC. Igualmente, en el grupo de DSO con disfunción hipofisaria se han observado variantes en genes candidatos (*OTP*, *NEUROG2*, *LHX1*), implicados en el adecuado desarrollo de núcleos hipotalámicos según se ha demostrado en modelos animales. La ligeramente mayor frecuencia de eventos obstétricos en el subgrupo que presenta disfunción hipofisaria no supone en absoluto una diferencia estadísticamente significativa. El dato de que el 71,4% de los pacientes con DSO con disfunción hipofisaria no hayan

presentado aparentemente insultos perinatales es relevante, ya que indica que éstos no son fundamentales en la etiología de la disfunción hipofisaria.

Aunque estos datos respaldan la hipótesis de una contribución multifactorial, siendo ligeramente más frecuente la presencia de disfunción hipofisaria en la DSO cuando se presentan determinadas alteraciones genéticas con potencial implicación en el desarrollo hipotalámico-hipofisario, precisan su confirmación en futuros estudios con tamaños muestrales mayores.

### **A.6.3. HIC sindrómico versus HIC no sindrómico**

Tanto entre los pacientes con HIC sindrómico como no sindrómico, observamos una elevada frecuencia de variantes relevantes en genes como *GLI2* o *CHD7*. Aunque la presencia de alteraciones en *GLI2* es mayor entre los pacientes con un cuadro sindrómico, vemos cómo tampoco es infrecuente en el HIC no sindrómico (estos y otros aspectos sobre el fenotipo asociado a las alteraciones de *GLI2* se detallan en la sección C de esta *Discusión*). La diferencia más relevante entre los subgrupos de HIC sindrómico y no sindrómico es la presencia exclusiva de variantes en *PROP1* en el grupo de pacientes con HIC no sindrómico, diferencia estadísticamente significativa. Otros hallazgos que diferencian a ambos subgrupos son la presencia exclusiva de algunas variantes en *FGFR1* en el subgrupo no sindrómico y en *BMP4* en el subgrupo sindrómico, en los probandos 1 y 73, que comparten los rasgos de deficiencia de GH, hipoplasia hipofisaria y macrocefalia con aumento de los espacios subaracnoideos de la convexidad (las correlaciones genotipo/fenotipo de las alteraciones de *BMP4* se discuten en detalle en la sección B de esta *Discusión*). No existen diferencias significativas en la proporción de pacientes con antecedente de eventos obstétricos significativos entre los dos subgrupos. Por tanto, en nuestra cohorte, sólo los hallazgos diferenciales en unos pocos genes (*PROP1*, *FGFR1*, *BMP4*, *GLI2*) contribuyen a explicar de manera relevante parte de las diferencias fenotípicas entre ambos subgrupos. La implicación de otros factores genéticos o ambientales no determinados por el momento no está por lo tanto excluida.

#### **A.6.4. Correlación genotipo-fenotipo hipofisario en RMN**

En nuestra cohorte, tres genes parecen tener una mayor relevancia a la hora de determinar la expresión de un determinado fenotipo hipofisario visible en RMN, tanto por la frecuencia de sus variantes relevantes como por el elevado nivel de evidencia sobre la patogenicidad de las mismas: *PROKR2*, *GLI2* y *FGFR1*.

##### A.6.4.1. Alteraciones del volumen adenohipofisario

Las afectaciones del volumen adenohipofisario parecen asociadas en mayor medida a las variantes patogénicas, aparentemente patogénicas o VUS+ de *GLI2* que a las que afectan a *FGFR1* y *PROKR2*. Como ya hemos comentado, existe una correlación entre las alteraciones en los genes de la vía SHH y la hipoplasia de adenohipófisis, debida al papel fundamental de dicha vía en el control de la proliferación de progenitores celulares en la bolsa de Rathke en desarrollo, lo que explicaría la implicación de las alteraciones de *GLI2* en este rasgo fenotípico. La menor frecuencia de variantes en *PROKR2* y *FGFR1* en pacientes con hipoplasia hipofisaria que en pacientes con hipófisis de tamaño normal, sugiere un papel menos relevante de dichos genes en el proceso de expansión de progenitores durante fases tempranas del desarrollo embrionario de la hipófisis.

##### A.6.4.2. Alteraciones de la neurohipófisis y el tallo hipofisario

La presencia de variantes relevantes en *PROKR2* y *GLI2* parece asociarse con la expresión de anomalías del tallo hipofisario y la neurohipófisis, principalmente en el caso de variantes clasificadas como patogénicas por criterios ACMG. La implicación de *PROKR2* está respaldada por los hallazgos de otros estudios, que han sugerido un papel determinante de las alteraciones de *PROKR2* en la etiología del síndrome del tallo hipofisario interrumpido (118,121). La relación de *GLI2* con las anomalías de la neurohipófisis, aparente, aunque más discutible, se desarrolla en detalle en la sección C de esta *Discusión*.



Es especialmente interesante la consistente asociación observada entre las variantes relevantes en *PROKR2* junto con otras en algún gen relacionado con la vía FGF, con el fenotipo de neurohipófisis ectópica y alteración del tallo. El único paciente con una variante patogénica o probablemente patogénica en *PROKR2* que presenta una neurohipófisis normal (probando 85), es igualmente el único que no presenta asociada una variante relevante en un gen relacionado con la vía FGF. La vía FGF es considerada el controlador principal del desarrollo embrionario del infundíbulo, que dará lugar a la eminencia media, el tallo hipofisario y el lóbulo posterior (5). La vía FGF controla aspectos como la evaginación que constituye el origen del propio infundíbulo desde el suelo del hipotálamo ventral, su crecimiento, la migración de neuronas secretoras de péptidos neuroendocrinos hasta su localización definitiva en determinados núcleos hipotalámicos (como las neuronas GnRH), la dirección de crecimiento de las proyecciones axonales de dichas neuronas hacia la eminencia media (en el caso de neuronas parvocelulares que secretarán sus péptidos reguladores al sistema portal) o hasta el lóbulo posterior de la hipófisis (en el caso de neuronas magnocelulares secretoras de oxitocina o vasopresina), e incluso parece participar estimulando el desarrollo de las primeras estructuras vasculares que darán luego lugar al sistema portal hipofisario (5). Por otro lado, *PROKR2* es uno de los 2 receptores de la vía de la prokinetina, a la cual se le atribuyen, entre otras, funciones relacionadas con la migración neuronal y la estimulación del desarrollo de la microvasculatura de órganos endocrinos (118,146,150). La expresión de *PROKR2* y *PROK2* en los bulbos olfatorios y el hipotálamo durante el desarrollo embrionario está ampliamente demostrada por trabajos orientados a estudiar la etiología del síndrome de Kallmann (146). Si bien se ha detectado la presencia de variantes patogénicas en *PROKR2* o en genes de la vía FGF (como *FGFR1*) de manera aislada en individuos sanos, nuestros datos indican que la agrupación de variantes relevantes en *PROKR2* y en genes de la vía FGF en un mismo individuo se asocia en todos los casos con neurohipófisis ectópica y alteración del tallo. La combinación de los efectos deletéreos de estas variantes sobre el desarrollo embrionario del infundíbulo (por la propia disfunción de la vía FGF como reguladora del proceso, sumada a una inadecuada formación de la red microvascular que facilite su completo desarrollo) representa el probable nexo causal que permite explicar todos estos eventos.

Sólo uno de los pacientes (probando 106) con agrupación de variantes relevantes en genes relacionados con las vías de la prokineticina y FGF, no presenta alteraciones del tallo hipofisario y neurohipófisis. Pero en este caso hay que destacar que se trata del único paciente en el que la variante relevante de la vía de la prokineticina no afecta a *PROKR2*, sino al gen que codifica a su principal ligando, *PROK2* [p.(\*130Leuext\*9)]. La variante identificada en la vía FGF afecta al gen *FLRT3*: p.(Cys478Tyr). Si bien las anomalías tanto de *PROKR2* como de su ligando *PROK2* se han relacionado en humanos y en modelos murinos con alteraciones de los bulbos olfatorios y de la migración de neuronas GnRH, características principales del síndrome de Kallmann (146), el fenotipo de DCHH sólo se ha relacionado claramente con las alteraciones de *PROKR2*, no así de *PROK2* (64). Esto puede tener su explicación en el hecho de que, en la vía de la prokineticina, los dos ligandos (*PROK1* y *PROK2*) pueden unirse a cualquiera de los 2 receptores (*PROKR1* y *PROKR2*) (146). *PROK1* se expresa en la hipófisis (146,188), pero no es tan evidente su expresión hipotalámica (146). Por tanto, las anomalías de *PROK2* probablemente no puedan ser compensadas por *PROK1* en los bulbos olfatorios o las neuronas GnRH hipotalámicas. En cambio, la expresión hipofisaria de *PROK1* podría eventualmente compensar funcionalmente la alteración de *PROK2* lo que explicaría en teoría que no se manifieste un fenotipo de DCHH en pacientes con alteraciones en *PROK2*. En cambio, aunque los dos receptores *PROKR1* y *PROKR2* se expresan tanto en la hipófisis como en el hipotálamo y ambos presentan una muy elevada homología, parecen desempeñar funciones diferentes pero complementarias en la angiogénesis (150,189). Por ello, las alteraciones en *PROKR2* probablemente no puedan ser compensadas con una adecuada función de *PROKR1*.

Serán necesarios futuros estudios, que profundicen en el estudio de las interacciones entre las vías de la prokineticina y FGF durante el desarrollo hipotalámico-hipofisario, para aclarar de manera definitiva los mecanismos causales aquí planteados.

## **A.7. Posibilidad de contribución de factores no exclusivamente genéticos**

### **A.7.1. Factores ambientales: Correlaciones fenotipo-antecedentes obstétricos y genotipo-antecedentes obstétricos**

La presencia de algún antecedente obstétrico relevante [considerando aquí el parto vaginal en presentación podálica, el nacimiento por cesárea (en ambos casos con o sin complicaciones asociadas), el parto instrumental, un test de APGAR <8 a los 5 minutos o la amenaza de aborto durante la gestación] se asocia en nuestra cohorte con una mayor probabilidad de presentar anomalías hipofisarias en la imagen de RMN, así como de presentar deficiencia en un mayor número de ejes hormonales adenohipofisarios. Algunas diferencias (no significativas estadísticamente, aunque próximas a la significación) sugieren una tendencia a la asociación entre la presencia de algún tipo de antecedente obstétrico, y una mayor probabilidad de expresar un fenotipo de DCHH que de DSO o DAGH-HP, de HC no sindrómico que de HC sindrómico y de DSO-plus que de DSO “aislada”. El tamaño muestral no ha permitido confirmar estas diferencias, ni determinar qué eventos perinatales de los aquí considerados son los que muestran una mayor relevancia.

Varios estudios han sugerido la relación de algún evento obstétrico (fundamentalmente el parto vaginal en presentación podálica) con la etiología del HIC. Especialmente en estudios realizados en China y Japón, se han detectado porcentajes muy elevados (del 50-91%) de antecedente de parto en presentación podálica en cohortes de pacientes con HIC (121,190–192). Estudios llevados a cabo en Europa o EEUU muestran proporciones más moderadas (4-35%) (193–198). Las anomalías hipofisarias en la RMN, especialmente la neurohipófisis ectópica o el síndrome del tallo interrumpido, son los hallazgos que más se han relacionado con el parto en presentación podálica, también especialmente en países orientales, (121,190,191,199–202), si bien se ha planteado que no puede ser el único ni el principal determinante etiológico (197,203), e incluso que una mayor tendencia a este tipo de presentación pueda ser consecuencia, y no necesariamente causa, del HIC (204). Pham *et al.* (193) hallaron el antecedente de parto en podálica con mayor frecuencia en pacientes

con DCHH (35%) que con DAGH (4%) en una serie francesa de 53 pacientes con síndrome del tallo hipofisario interrumpido, lo que respalda la tendencia similar (10,2% frente a 0%) observada en nuestra cohorte, así como nuestro hallazgo de mayor número de ejes adenohipofisarios afectados en pacientes con eventos obstétricos. Otros eventos obstétricos como la asfixia perinatal (202,205,206) o la compresión uterina excesiva (207) han sido estudiados en menor profundidad en la literatura científica que el parto en presentación podálica, y su relación resulta más incierta.

La exposición prenatal a etanol es otro de los factores ambientales gestacionales (teratogénicos) que se han planteado como posible causa de HIC. La ingesta materna de etanol durante la gestación no es un dato referido en ninguno de los pacientes incluidos en nuestra cohorte. Existen algunos estudios que sugieren la posible influencia de la exposición prenatal al etanol en la disfunción de la secreción hormonal (sobre todo de los ejes adrenal y tiroideo) (208–210) y en las anomalías anatómicas de la hipófisis, habitualmente relacionadas con otras anomalías de la línea media craneofacial (211,212). Especialmente interesantes son los estudios que han demostrado que la exposición prenatal a etanol en presencia de determinadas alteraciones en genes como *GLI2* y *CDON*, se asocia con una expresividad más grave de anomalías craneofaciales (77–79,182). Aunque no sea un antecedente referido en nuestra cohorte, la gran dificultad para la obtención del dato de ingesta prenatal de etanol en la práctica clínica habitual, hace que no pueda descartarse por completo la implicación de este factor en los pacientes de la cohorte experimental estudiada.

La frecuencia de variantes relevantes es similar entre los pacientes con y sin potenciales insultos obstétricos, lo que indica que los eventos obstétricos no son determinantes en la expresión del fenotipo clínico. En nuestra cohorte, únicamente la presencia de una puntuación en el test de Apgar inferior a 6 a los 5 minutos del nacimiento, se ha asociado significativamente a una menor probabilidad de presentar alguna variante relevante. Si bien la asociación no implica un nexo de causalidad, este dato podría sugerir que un sufrimiento fetal periparto significativo es el único de los eventos obstétricos potencialmente determinantes de la patología hipofisaria. Osorio *et al.* (213) publicaron una serie

de pacientes brasileños con DAGH o DCHH, identificando el antecedente de parto en presentación podálica o hipoxia perinatal en el 39% de aquellos pacientes que no presentaron alteraciones en *GH1*, *GHRHR* o *PROP1*, y en ninguno de los pacientes con alteraciones en dichos genes. Sin embargo, las alteraciones en estos genes son causa demostrada de DAGH o DCHH de manera independiente y monogénica. En cambio, recientemente, Guo *et al.* (74) refirieron una serie de 24 pacientes con síndrome del tallo hipofisario interrumpido estudiados mediante exoma completo, entre los que observaron antecedentes de parto en presentación podálica en el 45% y de distocia del parto o asfixia perinatal en el 37%, en presencia de variantes relevantes en genes de las vías SHH, WNT o NOTCH en prácticamente todos los pacientes.

Los resultados aquí expuestos, junto con los descritos en la literatura, demuestran que los insultos obstétricos (o al menos algunos de ellos), son factores con potencial influencia en la expresión del fenotipo patológico dentro de las entidades clínicas incluidas, sobre todo a través de la mayor expresión de anomalías anatómicas hipofisarias en la imagen de RMN y una mayor probabilidad de afectación de cada uno de los ejes hormonales. En cambio, observamos un porcentaje muy elevado de pacientes en los que no se refiere ningún evento obstétrico significativo, al igual que ocurre en estudios previos (193–196). Si bien no es posible asegurar que no hayan existido eventos ambientales durante la gestación y parto que puedan haber pasado desapercibidos, o no hayan sido referidos, tanto el elevado porcentaje de pacientes con gestación y parto *a priori* normales, como la similar frecuencia de variantes genéticas relevantes en los pacientes con y sin eventos obstétricos [al igual que en el estudio de Guo *et al.* (74)], respaldan la conclusión de que en la mayoría de los casos analizados, las patologías relacionadas con el HIC no son consecuencia de este tipo de fenómenos ambientales. Por lo tanto, tanto los insultos obstétricos como otros factores ambientales, probablemente actúen, en muchos casos, como factores contribuyentes adicionales (no necesariamente únicos o imprescindibles) dentro de un contexto multifactorial en el que la carga genética parece tener un papel determinante.

### **A.7.2. Otros factores potencialmente implicados: CNVs y epigenética**

Sólo hemos identificado 2 pacientes (1,8%) con alguna variación de interés en el número de copias (CNV): una delección completa de *PROP1* en homocigosis y una delección completa de *ANOS1 (KAL1)* en hemicigosis en sendos pacientes con DCHH. Un reciente estudio sugiere que hasta el 8% de los pacientes con DCHH sindrómico podrían presentar algún tipo de CNV (214).

Por otro lado, un trabajo reciente ha identificado alteraciones epigenéticas en pacientes con HIC mediante un estudio de array de metilación a escala genómica (215). Las regiones alteradas identificadas afectan a genes relacionados con procesos metabólicos o celulares, con el sistema inmune y con la función reproductiva. En ningún paciente de nuestro estudio se ha llevado a cabo un estudio de metilación.

A pesar de la significativa mejora de la tasa de éxito diagnóstico demostrada en el presente estudio con la aplicación de técnicas de secuenciación masiva dirigida al estudio de los determinantes genéticos del HIC, en un porcentaje importante de pacientes de nuestra cohorte las bases moleculares subyacentes no han sido identificadas. Si bien se ha demostrado que la aplicación de algoritmos específicos para la detección de CNVs pueden detectar con elevada sensibilidad este tipo de eventos en los ensayos de secuenciación masiva dirigida (84), sería necesario confirmar la ausencia de este tipo de alteraciones mediante la realización sistemática de un estudio genómico con técnicas específicas como el SNP-Array, un análisis previsto dentro del presente proyecto de investigación.

Por otro lado, el conocimiento sobre la implicación de posibles fenómenos epigenéticos en la etiología del HIC se encuentra en un estado muy inicial, por lo que es necesaria aún mayor evidencia a este respecto para considerar su estudio de manera generalizada.

## **B. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL PRIMER PACIENTE DESCRITO CON DCHH CON UNA MUTACIÓN DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN BMP4**

Se ha presentado aquí el primer paciente conocido hasta el momento con fenotipo de DCHH que presenta una mutación necesariamente patogénica en *BMP4*: p.(Trp265\*). Dicho paciente presenta, además, otras 4 variantes de significado incierto en los genes *ALMS1*, *SMAD4*, *E2F4* y *TSHZ1*, todos ellos también implicados en el desarrollo hipotálamico-hipofisario.

### **B.1. BMP4: Características principales y gen candidato para el HIC**

*BMP4* (*Bone morphogenetic protein 4*, MIM# 112262, localizado en 14q22.2) forma parte de la familia de “proteínas morfogenéticas del hueso” (BMP) y de la superfamilia de factores de crecimiento fibroblástico  $\beta$ -1 (TGF- $\beta$ 1). Consta de 4 exones, de los que sólo los dos últimos son codificantes. Codifica un propéptido inactivo, formado por un prodominio y un péptido maduro (o dominio TGF- $\beta$ ) (**Figura 16B**). La forma activa requiere la formación de homodímeros del propéptido y un procesamiento posterior por la acción de convertasas específicas que liberan el péptido maduro. Una vez activados, los dímeros se unen a receptores serín o treonín kinasa tipos 1 y 2, que activan una cascada de señalización intracelular mediada por las proteínas SMAD (216).

Se considera que BMP4 es el primer factor que participa en la inducción de la formación de la bolsa de Rathke y en su posterior mantenimiento (se detecta en embriones murinos en el infundíbulo en desarrollo muy precozmente desde el día E8.5, y hasta el día E14.5) (2,4,217). Por su papel durante fases tempranas del desarrollo embrionario de la hipófisis está considerado como un buen gen candidato, potencialmente implicado en patología hipofisaria. Existe evidencia del importante papel de la vía de señalización BMP (y en concreto de BMP4), conjuntamente con las vías FGF, SHH, WNT y NOTCH, en la regulación del proceso de inducción y desarrollo inicial de la bolsa de Rathke, sobre todo a través de su expresión en el “centro organizador” del diencéfalo ventral (1). Si

bien la delección completa de *Bmp4* suele implicar letalidad embrionaria temprana, los pocos embriones que sobreviven 10 días no muestran ningún signo de desarrollo de la bolsa de Rathke (2,218). En embriones humanos se observa expresión de BMP4, además de en tejidos oftálmicos (vesículas y copas ópticas) y manos, en el diencéfalo ventral, lo cual es compatible con su implicación en la inducción de la formación y mantenimiento de la bolsa de Rathke (así como con su papel en patología ocular y digital) (6,216).

Mutaciones con pérdida de función en *BMP4* en humanos se han relacionado anteriormente con diversos fenotipos patológicos, principalmente defectos oculares, digitales, cerebrales (216,219), labio leporino con o sin fisura palatina (220) y anomalías nefrourológicas (221–223) (**Anexo 6: Tablas S6.1, S6.2, y S6.3**).

## **B.2. BMP4: Variabilidad fenotípica**

### **B.2.1. Fenotipo hipofisario**

El paciente que aquí se describe presenta alteración hipofisaria tanto estructural (hipoplasia de adenohipófisis, neurohipófisis ectópica, tallo no visible) (**Figura 8F**) como de la función secretora hormonal (deficiencia de GH e hipotiroidismo central). La relación de las anomalías en *BMP4* con alteración hipofisaria en humanos surgió inicialmente tras la publicación de algunos casos de grandes delecciones en la región 14q22-q23, incluyendo *BMP4*, que asociaban anoftalmía/microftalmía y anomalías de la hipófisis (216,224–228). En estos casos la delección incluía, además de *BMP4*, los genes *OTX2* y/o *SIX6*, ambos asociados a patología oftalmológica y también a problemas hipofisarios (29,229,230). Todos los pacientes publicados con este tipo de delecciones y anomalías hipofisarias se encuentran resumidos en el **Anexo 6 (Tabla S6.3)**. La afectación de *OTX2* y/o *SIX6* dificulta la interpretación de la ausencia de *BMP4* en dicho fenotipo hipofisario. Posteriormente, se han descrito otros 5 pacientes con este tipo de delecciones, también afectando a *OTX2* y/o *SIX6*, en los que no se menciona patología hipofisaria (231–234). La antigüedad de algunos casos, la variable extensión de las delecciones, la afectación de varios genes



potencialmente implicados en patología hipofisaria, así como la escasa descripción del fenotipo hipofisario en muchos de estos pacientes, dificulta el establecimiento de correlaciones genotipo-fenotipo que impliquen a *BMP4*. Nuestro paciente no presenta alteraciones en *OTX2* ni *SIX6*. Se trata, por lo tanto, del primer paciente descrito con DCHH que presenta una variante con evidente pérdida de función en *BMP4* p.(Trp265\*) no atribuible a alteraciones que afecten a *OTX2* y/o *SIX6*.

Existen muy pocos pacientes descritos en la literatura con alguna variante relevante en *BMP4* asociada a patología hipofisaria (resumidos en el **Anexo 6, Tabla S6.3**). En 2013, Breitfeld *et al.* (235) publicaron el caso de un paciente con fenotipo de DCHH que portaba la variante de significado incierto en *BMP4* p.(Arg300Pro) en heterocigosis, asociada a deficiencia de GH, TSH, gonadotropinas y ACTH, así como hipoplasia de adenohipófisis. Presentaba también algunas anomalías esqueléticas sugestivas de un diagnóstico de displasia espondiloepifisaria tarda. Dicha variante p.(Arg300Pro) se encuentra dentro de la región correspondiente al péptido maduro en una posición altamente conservada (score GERP\_RS 5.3) y no estaba presente en un grupo de 1046 controles sanos. La predicción de patogenicidad por herramientas bioinformáticas es alta (CADD score 32, DANN score 0.983). No se pudieron obtener muestras de material genético de familiares, aunque no se refería ninguna alteración de la función hipofisaria en los mismos. Aunque existen datos que sugieren la posible patogenicidad de la variante, no se ha publicado de momento estudio funcional que la avale de manera definitiva. Otro paciente recientemente publicado (39), con un fenotipo de síndrome del tallo hipofisario interrumpido y DCHH, presentaba la variante de significado incierto p.(Arg269\_Leu272del), que implica la delección de 4 codones sin pérdida del marco de lectura dentro de la región del propéptido, sin afectar de manera directa a los dominios principales de la proteína, pero ubicada entre los dos puntos de corte S1 y S2 que permiten la liberación del péptido maduro por proteólisis postraduccional. Esta variante, en heterocigosis y heredada del padre sano, se encontraba asociada en el paciente a otras variantes de significado incierto en *GLI2* y *GLI3*, así como a una variante *de novo* en *KAT6A* considerada patogénica y responsable principal del fenotipo del paciente (39). Por último, un paciente con

fenotipo de síndrome de Kallmann ha sido presentado recientemente, portando la variante p.(Thr359Ile), localizada en el péptido maduro (236). Estudios funcionales demostraron una disminución *in vitro* de la capacidad transcripcional y de la expresión del péptido maduro. No obstante, ninguno de estos pacientes previamente descritos presentaba un fenotipo de DCHH asociado a variantes patogénicas de *BMP4*.

Existen unos pocos casos publicados con mutaciones con evidente pérdida de función en *BMP4*, ya sean mutaciones con codón de parada prematura sin sentido o por alteración del marco de lectura, o deleciones completas del gen (resumidos en el **Anexo 6, Tablas S6.1 y S6.2**). Si bien varios de estos pacientes publicados con alteraciones en *BMP4* con pérdida de función presentan retraso del crecimiento, prácticamente en ninguno de los estudios se ha descartado un posible déficit hormonal hipofisario. Hay que tener en cuenta que en la mayoría de los estudios publicados se han centrado en el estudio de cohortes de pacientes con rasgos fenotípicos predominantemente no hipofisarios, ya sea ocular (216,219), labio leporino/fisura palatina (220), anomalías genitourinarias (221) o cáncer colorrectal (237). Por tanto, es posible que los pacientes con un fenotipo hipofisario predominante hayan sido excluidos del estudio y, por lo tanto, que un sesgo de selección no haya permitido demostrar por el momento la relación de las alteraciones de *BMP4* con un fenotipo hipofisario patológico.

La descripción de probando 1 del presente estudio aporta, por lo tanto, evidencia relevante para la confirmación de la implicación de la vía BMP-TGF- $\beta$  en la etiología del HIC.

### **B.2.2. Fenotipo ocular asociado a alteraciones de *BMP4***

Las alteraciones con pérdida de función de *BMP4* descritas hasta la fecha se asocian frecuentemente con anomalías oculares de gravedad variable, desde anoftalmía/microftalmía, pasando por disgenesias del segmento anterior, hasta defectos de refracción (216,219). Todos los casos descritos con deleciones que incluyen, además de *BMP4*, los genes *OTX2* y *SIX6* presentan anoftalmía

(**Anexo 6, Tabla S6.3**), en el extremo de mayor gravedad del espectro fenotípico ocular, mientras que, en los casos con otras alteraciones, tales como deleciones que no afectan a *OTX2* ni *SIX6*, con codón de parada prematuro o variantes *missense*, la afectación suele ser más leve y variable (**Anexo 6, Tablas S6.1 y S6.2**). En nuestro paciente observamos únicamente miopía y astigmatismo bilaterales, que suponen una agudeza visual de 0,3 bilateral. Este defecto de refracción se detectó mediante estudio oftalmológico realizado a raíz del hallazgo genético en *BMP4*. Si bien no se trata en este caso de una malformación ocular mayor, sí ejemplifica la utilidad práctica del estudio para este paciente, con 6 años e incapaz hasta el momento de referir problemas de visión, y sobre los que se ha podido intervenir través de lentes correctoras evitando una mayor interferencia en su desarrollo psicomotor.

### **B.2.3. Fenotipo craneal asociado a alteraciones de *BMP4***

La macrocefalia, relativa o absoluta, está descrita también en varios pacientes con alteraciones con pérdida de función de *BMP4* (**Anexo 6, Tablas S6.1 y S6.2**) (219). En nuestro paciente dicha macrocefalia ha seguido una evolución progresiva. Si bien el perímetro cefálico al nacimiento era normal (34 cm, -0,68 DE) y armónico con las mediciones de peso y longitud, a los 14 meses ya presentaba una macrocefalia relativa (48,5 cm, +0,83 DE) y a los 6 años una macrocefalia absoluta (55,5 cm, +2,75 DE). En RMN a los 6 años se observa aumento de los espacios subaracnoideos de la convexidad. Curiosamente, el probando 79 del presente estudio, del grupo de DAGH-HP, con hipoplasia hipofisaria, presenta igualmente macrocefalia con aumento de los espacios subaracnoideos de la convexidad y la variante de *BMP4* NM\_001202.5:c.860G>A, p.(Arg287His) en heterocigosis. Esta variante ha sido descrita previamente en un paciente con síndrome de Kallmann (236), si bien el estudio funcional *in vitro* no demostró pérdida de función. Sólo un paciente de los previamente descritos en la literatura con anomalías en *BMP4* parece haber presentado una hidrocefalia con necesidad de una válvula de derivación de líquido cefalorraquídeo [(13), paciente 3], si bien se indica la presencia de dilatación de ventrículos cerebrales también en otros pacientes (**Anexo 6, Tablas S6.1 y S6.2**) (238–240). Pero debe tenerse en cuenta que esta dilatación

podría igualmente ser secundaria a una posible atrofia cerebral difusa, también descrita en algunos de estos pacientes (216) y no representar una verdadera hidrocefalia. Por otro lado, la macrocefalia relativa con abombamiento frontal es un signo asociado también a la deficiencia de GH. Nuestro paciente, que ha desarrollado una macrocefalia absoluta, sigue controles por neuropediatría, sin que de momento se haya detectado hipertensión intracraneal o la necesidad de intervención. Recientemente se ha demostrado la participación de *BMP4* en el proceso de fusión de suturas craneales, objetivando su expresión elevada en células aisladas de suturas metópicas y lambdoideas precozmente cerradas (241). Basándonos en ello, podemos hipotetizar que una pérdida de función de *BMP4* podría suponer un cierre tardío de suturas y facilitar el desarrollo de una macrocefalia relativa o absoluta en ausencia de una evidente hidrocefalia.

#### **B.2.4. Fenotipo cerebral asociado a alteraciones de *BMP4***

Una RMN realizada a los 5 años de vida en el probando 1 demostró, además de las anomalías hipofisarias descritas previamente, pequeñas áreas de retraso de mielinización en la sustancia blanca que rodea los ventrículos laterales. Los pacientes con alteraciones patogénicas en *BMP4* pueden tener anomalías cerebrales y/o retraso del desarrollo psicomotor (**Anexo 6, Tablas S6.1, S6.2 y S6.3**). Hallazgos cerebrales similares con retraso de mielinización se observaron en un paciente previamente descrito con la variante *missense* p.(Glu93Gly) en *BMP4* [(6), caso 4]. Alteraciones de la sustancia blanca, incluyendo hipoplasia o agenesia parcial de cuerpo calloso se observan en varios de los pacientes publicados (216,238,240) y debe tenerse en cuenta que, en ocasiones, la dilatación leve de ventrículos cerebrales previamente mencionada en otros pacientes puede deberse a una atrofia difusa de la sustancia blanca adyacente. La atrofia de la sustancia blanca (al igual que el fenotipo ocular) es más frecuente y severa en pacientes con grandes deleciones de la región 14q22-q23 (216,226,227,234,240) y se ha propuesto que probablemente sea progresiva (234). Nuestro paciente presenta un retraso leve del desarrollo, con torpeza motora fina y gruesa y algunas dificultades de aprendizaje, pero pudiendo de momento participar de una escolarización normal para su edad, con refuerzo en varias áreas y atención multidisciplinar (estimulación precoz, fisioterapia,

logopedia...) que se inició con 8 meses de vida. El retraso psicomotor leve está presente en muchos de los pacientes descritos en la literatura con anomalías con pérdida de función de *BMP4* (216,219,238–240). En algunos pacientes publicados no se hace una referencia expresa sobre este aspecto, y sólo en dos familias descritas se da a entender que existía una inteligencia normal (219,231).

#### **B.2.5. Fenotipo genitourinario asociado a alteraciones de *BMP4***

Nuestro paciente presenta un quiste cortical en el riñón izquierdo. Algunas anomalías genitourinarias han sido relacionadas con alteraciones en *BMP4*. En humanos la evidencia disponible consiste en el hallazgo de algunas variantes *missense* en pacientes con anomalías congénitas, fundamentalmente agenesia, hipoplasia y displasia renal (221), siendo las variantes p.(Thr116Ser) y p.(Ser91Cys) las que presentan mayor evidencia de patogenicidad en estudios experimentales *in vivo* (221,222). También se ha publicado la asociación de algunos polimorfismos de *BMP4* con trastornos como la displasia renal quística y la obstrucción de la unión ureteropélvica (242). Si bien el quiste cortical renal de nuestro paciente puede ser un hallazgo frecuente en población sana, curiosamente un paciente previamente descrito con la variante *frameshift* p.(Glu58Argfs\*17) presenta igualmente un pequeño quiste renal izquierdo [(13), paciente 4].

#### **B.2.6. Otras anomalías asociadas a alteraciones de *BMP4***

Los pacientes con alteraciones en *BMP4* también pueden presentar labio leporino/fisura palatina (incluso defectos subepiteliales no visibles mediante inspección ocular) (220), así como anomalías digitales tales como polidactilia/sindactilia. El probando 1 presenta un paladar ojival muy estrecho con apiñamiento dental, con integridad de paladar y labios, y sin anomalías digitales.

### **B.3. Expresividad variable de las alteraciones en *BMP4***

Las repercusiones moleculares de las variantes truncadoras en *BMP4* publicadas hasta el momento, y resumidas en la **Figura 9B** y la **Tabla S6.1 del Anexo 6**, [p.(Trp265\*) (este estudio), p.(Arg198\*) (219,220), p.(Arg286\*) (237), p.(Glu58Argfs\*17) (219) y p.(Ser76Cys\*29) (216)], son muy similares, al introducir codones de parada prematuros en la secuencia correspondiente al prodominio e impidiendo por lo tanto la traducción de la secuencia correspondiente al péptido maduro. En todos los casos descritos se encuentran en heterocigosis y presentan una expresión fenotípica muy heterogénea. Si bien es relativamente frecuente la afectación ocular, la gravedad de la misma y el resto de alteraciones son muy variables, existiendo varias familias descritas con alteraciones de parada prematura (216) o grandes deleciones (219,231,238,239) en las que se observa una gran variabilidad fenotípica intrafamiliar. Esto sugiere la contribución de otros factores que posiblemente actúen modulando o modificando el fenotipo final.

#### **B.3.1. Posibles causas de la expresividad variable: Oligogenicidad**

En el caso del probando 1 de este estudio, el paciente presenta, además de la variante *de novo* en p.(Trp265\*) en *BMP4*, otras 4 variantes relevantes de significado incierto en 4 genes involucrados en tres vías de señalización implicadas en la regulación del desarrollo embrionario de la hipófisis: en *SMAD4* y *E2F4* (también, como *BMP4*, integrantes de la vía de señalización BMP/TGF- $\beta$ ); en *ALMS1* (integrante de la vía NOTCH) y en *TSHZ1* (regulador de la expresión de PROKR2 y por tanto, implicado en la de vía de la prokineticina), transmitidas por ambos progenitores. Sus características principales se resumen en la **Tabla 10**, y su potencial contribución se discute a continuación.

La variante de ***SMAD4***, heredada en heterocigosis en el alelo de origen materno, es una rara variante *missense*, p.(Ser191Leu), de baja frecuencia, que afecta a un residuo muy conservado. *SMAD4* participa como actor fundamental en la cascada intracelular de la vía de señalización de BMP/TGF- $\beta$ , siendo un elemento imprescindible común de varias de sus ramas (BMP, TGF- $\beta$ , NODAL). Mutaciones con pérdida de función en heterocigosis en *SMAD4* se han asociado

con un espectro de enfermedad variable que incluye el síndrome de poliposis juvenil y el síndrome de telangiectasia hemorrágica hereditaria (MIM# 175050 y 174900) (243). Mutaciones con ganancia de función afectando a los codones 494 o 500 en heterocigosis son causa del síndrome de Myhre (MIM# 139210), trastorno del tejido conectivo con fibrosis progresiva de afectación multiorgánica, clásicamente caracterizado por estenosis laringotraqueal, artropatía, prognatismo y talla baja (244). Todos estos trastornos están descritos con herencia autosómica dominante. Es de suponer, por tanto, que la variante de significado incierto p.(Ser191Leu) no implica una alteración suficiente de la función de la proteína como para producir de manera aislada este espectro de patología, si bien es cierto que no se ha evaluado por el momento la posible presencia de pólipos gastrointestinales en los portadores de esta variante en la familia de nuestro caso. Pero una disfunción parcial afectando a la vía BMP/TGF- $\beta$  podría tener relevancia desde un punto de vista de agrupación oligogénica de efectos, en conjunto con las variantes encontradas en *BMP4* y *E2F4*, ambas participantes de la misma vía de señalización.

La variante en *E2F4* es igualmente una rara variante missense p.(Leu137Ser) en heterocigosis, heredada del padre. Supone la alteración de un residuo muy conservado localizado en el dominio de heterodimerización de la proteína necesario para la interacción de E2F4 con diversas proteínas con las que establece complejos funcionales, entre las que se encuentra SMAD4 (245). E2F4 es un factor de transcripción implicado en diversos procesos, entre los que destacan funciones reguladoras de la proliferación y diferenciación celular en determinados tejidos. Así, se trata de un gen relacionado con la génesis tumoral, fundamentalmente cuando se encuentra sobreexpresado. Una de las vías de señalización en las que participa de manera significativa es la vía BMP-TGF- $\beta$ . La interacción entre E2F4 y las proteínas SMAD (especialmente SMAD4) constituye uno de los pasos más importantes de la cascada intracelular en esta vía. Por otro lado, su implicación a nivel hipofisario ha sido sugerida en modelos animales en diferentes estudios. Por un lado, parece participar dentro de un complejo represor de SOX2, cuya función resulta necesaria para permitir una adecuada diferenciación celular en la hipófisis (246). Por otro, su regulación al alza parece ser causa de hiperplasia celular hipofisaria, e incluso de aparición

de adenomas (247). De manera inversa, podemos hipotetizar una inadecuada proliferación de las distintas estirpes celulares en la hipófisis en desarrollo, ante su regulación a la baja. El probando presenta, por tanto, tres variantes relevantes en la misma vía de señalización BMP/TGF (la patogénica *de novo* en *BMP4* y las dos variantes *missense* en *SMAD4* y *E2F4*, transmitidas por la madre y el padre, respectivamente), que sinérgicamente pueden ejercer un efecto deletéreo sobre la funcionalidad de la vía durante el desarrollo hipofisario.

La variante truncadora p.(Lys2236fs\*31) de ***ALMS1***, transmitida a través del alelo materno, no ha sido descrita previamente. *ALMS1* codifica un factor de transcripción implicado en la vía de señalización de NOTCH. Mutaciones de *ALMS1* (ya sea en homocigosis o en heterocigosis compuesta) están implicadas en la etiología del síndrome de Alström (MIM# 203800) y endocrinopatías asociadas (248,249). Este síndrome se caracteriza por distrofia de los conos de la retina, sordera, obesidad, resistencia a la insulina con hiperinsulinemia, diabetes mellitus tipo 2, miocardiopatía dilatada y disfunción hepática y renal progresivas. Si bien las endocrinopatías más frecuentes y características en el síndrome de Alström son la obesidad y la diabetes tipo 2, existen múltiples casos con afectación de la función hipofisaria (249–251), así como con alteraciones hipofisarias en la RMN (248). Por otro lado, se ha demostrado que *ALMS1* participa como regulador negativo de la vía de señalización NOTCH (252), una de las vías principales en el desarrollo hipofisario (1). Aunque la variante p.(Lys2236fs\*31) se clasifica como VUS+, por su transmisión en heterocigosis, existen publicadas ya múltiples variantes truncadoras muy similares consideradas claramente patogénicas por su patrón de herencia autosómico recesivo, en pacientes con síndrome de Alström (87). Parece claro que, de manera aislada, esta variante truncadora de *ALMS1* en heterocigosis no es causante de patología (la madre y un hermano son portadores sanos de la misma; **Figura 9C**: I.2 y II.1). Sin embargo, es posible que su presencia, teniendo en cuenta la concurrencia de las vías BMP y NOTCH en el delicado equilibrio que controla el desarrollo embrionario de la hipófisis, sumada a las variantes ya descritas en la vía de señalización BMP/TGF- $\beta$  (la variante patogénica en *BMP4* p.Trp265\* y las variantes de significado incierto en *SMAD4* y *E2F4*), contribuya igualmente en la modulación del fenotipo hipofisario en nuestro paciente.



La variante de **TSHZ1** es una variante *missense*, p.(Arg755His), en heterocigosis y heredada del padre. Mutaciones con pérdida de función en heterocigosis en **TSHZ1** se han asociado con alteraciones en el desarrollo de los bulbos olfatorios y atresia aural congénita, que incluye anomalías del desarrollo del conducto auditivo externo con o sin anosmia/hiposmia (253). Se ha demostrado igualmente la implicación de **TSHZ1** en la regulación de la expresión de **PROKR2**, gen que codifica el receptor fundamental de la vía de la prokineticina y cuya implicación en la etiología del HIC (y en concreto en la expresión de un síndrome del tallo hipofisario interrumpido) ha sido discutida ampliamente en la sección A de esta *Discusión*. En nuestro paciente, una RMN a los 12 meses de vida mostraba bulbos olfatorios aparentemente normales y, de manera subjetiva, parece discriminar olores de forma adecuada, aunque no se han podido realizar pruebas objetivas de olfacción. No presenta anomalías del desarrollo del conducto auditivo externo (si bien ha presentado una hipoacusia leve intermitente, en contexto de otitis media serosa de repetición secundaria a hipertrofia adenoidea y amigdalar, con mejoría tras adenoamigdalectomía). Sí presenta un síndrome del tallo interrumpido en RMN, con hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica y tallo no visible.

En resumen, en nuestro paciente se agrupan, por un lado, tres variantes implicadas en la vía BMP/TGF- $\beta$ : una variante patogénica *de novo* en **BMP4** (agente principal de la vía BMP en el desarrollo hipofisario) y dos variantes de significado incierto en **SMAD4** y **E2F4** (genes que participan en la cascada intracelular de la vía BMP/TGF- $\beta$ ), las cuales se heredan cada una de un progenitor diferente; y además, otras dos variantes de significado incierto en **ALMS1** y **TSHZ1**, dos genes igualmente implicados en dos vías reguladoras del desarrollo hipofisario (NOTCH y prokineticina, respectivamente). Se trata por ello de otro buen ejemplo de la utilidad de la secuenciación masiva para poner de manifiesto la concurrencia de múltiples variantes de riesgo en el probando afecto y su probable contribución oligogénica al fenotipo hipofisario del paciente.

Así, la presencia asociada de anomalías en distintos genes podría justificar parte de la variabilidad fenotípica de las alteraciones en **BMP4**.

Resulta evidente que el hallazgo más relevante en el probando 1 parece ser la variante patogénica *de novo* en *BMP4* p.(Trp265\*), pero la expresividad variable de las alteraciones en *BMP4* sugiere que la suma de efectos del resto de variantes relevantes detectadas esté produciendo una modulación de la expresión fenotípica de dicho hallazgo principal. Estos resultados respaldan la hipótesis de la etiología oligogénica en al menos algunos casos de HIC.

### **B.3.2. Posibles causas de la expresividad variable: Consideraciones moleculares del propéptido de BMP4**

El probando 1 de nuestro estudio presenta una variante truncadora en la posición 265, dentro del prodominio de *BMP4*, a poca distancia en dirección N-terminal del comienzo del péptido maduro (posición 293). Los estudios que han descrito previamente variantes *nonsense* y *frameshift* en *BMP4* (todas ellas en la región del prodominio) han atribuido su disminución de función a la ausencia de traducción del péptido maduro o a una degradación de mRNA mediada por mutación terminadora (NMD, “*Nonsense Mediated mRNA Decay*”).

Pero otro aspecto que podría influir en la variable expresividad fenotípica de las alteraciones truncadoras de *BMP4* reside en su complejo procesamiento postraducciona. *BMP4* se expresa inicialmente en forma de propéptido inactivo, con un largo prodominio N-terminal y un péptido maduro o ligando C-terminal de 116 aminoácidos (254) (**Figura 16B**). Una vez traducido el propéptido, se une formando homodímeros. Tras la formación de los dímeros se produce la liberación del prodominio (sin actividad señalizadora), mediante su clivaje por convertasas específicas, que actúan secuencialmente sobre 2 sitios conservados de reconocimiento: S1 (secuencia -RAKR- en las posiciones 289-292) y S2 (secuencia -RISR- en las posiciones 253-256). Tras el clivaje en la posición S1, el prodominio permanece unido de manera no covalente al dipéptido maduro, hasta que se produce el clivaje en el sitio S2 a pocos aminoácidos de distancia en dirección N-terminal de S1 (255,256). Este procesamiento en el punto de corte S2 es tejido-específico, mediante la expresión diferencial de las convertasas implicadas, lo cual explica al menos parte de la modulación diferencial de la actividad de *BMP4* en diferentes órganos y tejidos (256).

Si bien el prodominio de BMP4 no tiene función de señalización, ejerce otras funciones intrínsecas que afectan al nivel de actividad del dímero maduro, regulando la dimerización, plegamiento y secreción de los dímeros maduros (257). Además, tras la secreción de los complejos formados por dímeros maduros y prodominios unidos de manera no covalente, se produce su unión a determinadas proteínas de la matriz extracelular (proceso en el que también participa el prodominio), permaneciendo inactivos hasta su liberación de dicha matriz (255). Esto supone un consiguiente nuevo punto de modulación de la actividad tejido-específica.

Además de formar homodímeros, BMP4 también es capaz de formar heterodímeros con BMPs de clase II (BMP5-8), que presentan por lo general mucha mayor actividad que los homodímeros (257). Si bien parece existir un papel significativo *in vivo* de estos heterodímeros, carecemos de suficiente evidencia aún sobre su expresión y papel en humanos. Dado que tanto BMP4 como BMP7 se expresan en la hipófisis durante el desarrollo embrionario (146, 191), resulta de especial interés el heterodímero BMP4/BMP7, con un nivel de actividad mucho mayor que cualquiera de los homodímeros correspondientes (259). Recientemente se ha demostrado que el prodominio de BMP4 es imprescindible y suficiente para la formación y estabilidad de estos heterodímeros más activos, y no lo es el prodominio de BMP7 (257). El prodominio de BMP4 parece incluso favorecer la heterodimerización frente a la homodimerización. Además, a diferencia de lo que ocurre en los homodímeros, el prodominio de BMP4 permanece unido no covalentemente al heterodímero BMP4/BMP7 maduro tras el clivaje en ambos puntos S1 y S2.

Todo esto hace evidente el importante papel del prodominio en la función final de BMP4 y abre la posibilidad a que, dependiendo de la posición del codón de parada prematuro y la consecuente expresión de la secuencia del prodominio en mayor o menor longitud, pueda existir alguna funcionalidad de las distintas variantes con parada prematura no sometidas a degradación del ARN mensajero por NMD. En nuestro caso, la variante truncadora está situada en el último exón codificante de *BMP4* y, por ello, es probable que no esté sujeta a degradación por NMD (260) y genere un prodominio truncado de BMP4 que carece del punto de corte S1 (pero no del S2). Aunque no es posible predecir la posible

funcionalidad del prodominio mutante generado, se ha visto anteriormente en otros casos con mutaciones truncadoras en el prodominio, que los péptidos mutantes generados son capaces de formar homodímeros con los precursores endógenos inhibiendo su actividad (256).

Si bien la haploinsuficiencia de *BMP4* debida a la presencia de mutaciones sin sentido es probablemente el mecanismo más relevante relacionado con la expresión de un fenotipo patológico, dada la aparente importancia del prodominio de *BMP4* en el proceso de dimerización y estabilidad de dímeros maduros, podemos hipotetizar un posible efecto añadido dominante negativo por la producción de prodominios casi completos, consecuencia de mutaciones como la aquí descrita p.(Trp265\*), que puedan entorpecer la adecuada formación de dímeros con propéptidos completos. Por otro lado, es posible que la disminución del nivel de producción de *BMP4* por haploinsuficiencia, no sólo influya en la patología por disminución de la cantidad de *BMP4*, sino también por desequilibrio entre las cantidades de *BMP4* y otras BMPs de clase II como *BMP7*, con disminución de heterodímeros y formación de un mayor número de homodímeros *BMP7* menos activos. Para la formación de heterodímeros es preciso que se produzca expresión de ambos propéptidos simultáneamente en la misma célula. Si bien se ha descrito claramente la producción de *BMP4* y *BMP7* en la hipófisis durante el desarrollo hipofisario (4,258), no está claro de momento si se producen simultáneamente en las mismas células.

Son necesarios más estudios que aporten una evidencia más concreta sobre la expresión de *BMP4* y otras BMPs en la región hipotalámico-hipofisaria en desarrollo que permitan avanzar en el conocimiento del posible papel de los mecanismos postraduccionales en la expresividad variable de los pacientes con anomalías en este gen.

#### **B.4. Consideraciones finales**

El caso que aquí presentamos es el primero descrito en la literatura con fenotipo de DCHH con una mutación necesariamente patogénica en *BMP4* sin afectación adicional de *OTX2* o *SIX6*. Este caso respalda la implicación directa de anomalías en *BMP4* y su vía de señalización BMP/TGF- $\beta$  en la etiología del HIC. Por otro lado, la presencia de alteraciones relevantes en otros genes implicados en la propia vía BMP/TGF- $\beta$  como *BMP4* (genes *SMAD4* y *E2F4*) y en otras dos vías involucradas en el correcto desarrollo hipofisario [la vía NOTCH (gen *ALMS1*) y la vía de la prokineticina (gen *TSHZ1*)], respalda la hipótesis de una contribución oligogénica de estas variantes heredadas en la modulación del fenotipo patológico.

Son necesarios más estudios que aporten más información sobre las causas de la heterogénea expresividad fenotípica de las anomalías de *BMP4*. Por otro lado, teniendo en cuenta el elevado número de tejidos en cuya formación y función participa BMP4 y la mencionada heterogeneidad fenotípica de sus alteraciones, resulta muy importante la descripción clínica exhaustiva (o al menos de los órganos y sistemas que parecen afectarse con el conocimiento actual) de los futuros casos que se identifiquen, para avanzar en el conocimiento de las correlaciones genotipo/fenotipo, evitando el estudio exclusivo de un órgano o sistema concreto.

## C. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DEL GRUPO DE PACIENTES CON VARIANTES RELEVANTES EN *GLI2*

### C.1. *GLI2*: Consideraciones generales y hallazgos en nuestra cohorte

Presentamos aquí un grupo de 25 individuos procedentes de 11 grupos familiares distintos, portadores de una o varias variantes potencialmente patogénicas en *GLI2*. En conjunto, se trata de 12 variantes diferentes, de las cuales 3 no han sido descritas previamente, las 3 con efecto truncador de la proteína: p.(Leu709Trpfs\*15), p.(Ser267\*) y p.(Ser859Profs\*53). Además, una de las familias descritas, con hasta 8 individuos portadores de la variante truncadora en *GLI2* p.(Arg1226\*), representa el tercer grupo familiar más amplio descrito hasta la fecha en la literatura con este tipo de alteración, sólo por detrás de una familia con la variante p.(Leu788Serfs\*7) (261–263) y otra familia muy recientemente publicada de 10 miembros con la misma variante, p.(Arg1226\*), que nuestra familia (90). El caso del probando 32 es el único de los aquí tratados que de momento ha sido recientemente publicado (89).

Bear *et al.* (100) publicaron, en el año 2014, una exhaustiva revisión de los 112 individuos reportados hasta esa fecha con variantes potencialmente patogénicas en *GLI2*, procedentes de 65 grupos familiares. Presentaban hasta 53 variantes diferentes. De éstas, sólo 18 eran variantes evidentemente patogénicas: 15 truncadoras (de las cuales 7 *nonsense* y 8 *frameshift*), 1 afectando a un lugar de *splicing* y 2 deleciones completas o casi completas del gen. Actualmente existen descritas en la literatura unas 88 variantes diferentes de *GLI2* potencialmente patogénicas, de las cuales 32 son evidentemente patogénicas: 25 truncadoras (9 *nonsense* y 16 *frameshift*), 7 grandes deleciones y 2 afectando a un lugar de *splicing*. El resto de variantes son de cambio de sentido, incluyendo una con pérdida del codón de parada (<https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/gene.php?gene=GLI2>).

Por todo ello, los datos que se aportan en el presente estudio representan una considerable contribución al aumento del conocimiento sobre la implicación clínica de las alteraciones de *GLI2* en el HIC.

*GLI2* (*Gli-kruppel family member 2*, MIM# 165230, localizado en 2q14.2) es uno de los genes que ha cobrado una mayor importancia en los últimos años debido a su aparente relación causal con el HIC y las anomalías del desarrollo de la hipófisis (29,100,263). Codifica un factor de transcripción con una región de dedos de zinc de unión al ADN, y es el principal efector de la vía de señalización SHH, junto con *GLI1* y *GLI3* (264). Se trata de un gen extenso, formado por 13 exones, que codifican un péptido de 1586 aminoácidos. Posee un dominio N-terminal con actividad represora, y otro dominio C-terminal implicado en la activación de la transcripción, además del dominio de dedos de zinc de unión a ADN, localizado en una posición central (92,265) (**Figura 26**).

La posible relación de las alteraciones de *GLI2* con un fenotipo hipofisario patológico surge inicialmente a partir del estudio de modelos animales con disminución de su expresión (168,266,267). En dichos estudios se observa la tendencia a presentar una hipófisis aceptablemente estructurada, pero hipoplásica, como consecuencia, aparentemente, de una menor proliferación celular adenohipofisaria. *GLI2* se expresa ampliamente en el hipotálamo en desarrollo y en la bolsa de Rathke en etapas tempranas del desarrollo embrionario en humanos, de manera similar a lo que ocurre en ratones (268,269). La vía de señalización SHH (que juega un papel fundamental en el desarrollo embrionario de la línea media craneofacial y cerebral, así como en la diferenciación neuronal de la región ventral del cerebro), de la cual *GLI2* es el principal efector, participa en el control del proceso de inducción y desarrollo de la bolsa de Rathke junto con las vías BMP, FGF, WNT y NOTCH, a través de un delicado equilibrio entre las mismas (1). En ratones, se ha demostrado que *Gli2* es imprescindible para la adecuada expresión de *Bmp4* y *Fgf8*, principales factores implicados en el “centro organizador” del diencéfalo ventral para inducir la formación de la bolsa de Rathke (168).

Por otro lado, en humanos, se conoce desde hace ya más de dos décadas la implicación de las alteraciones del gen *SHH* en la etiología de la HPE (270,271). Teniendo esto en cuenta y asumiendo el papel fundamental de *GLI2* en la vía SHH, los primeros estudios en humanos en busca de alteraciones en este gen se llevaron a cabo en pacientes con HPE y anomalías relacionadas (265). Por ello, las alteraciones con pérdida de función en *GLI2* fueron asociadas

inicialmente a este fenotipo de HPE. Sin embargo, con posterioridad se ha observado que sólo un porcentaje mínimo (<2-3%) de pacientes con alteraciones en *GLI2* expresa un fenotipo evidente de HPE (100,272). Así, este tipo de alteraciones se han asociado con mucha más frecuencia con fenotipos patológicos sin datos evidentes de HPE, incluyendo hipopituitarismo (DCHH y DAGH), alteraciones faciales de línea media y/o polidactilia postaxial (100,262,263,268,273,274). Pero, además, se ha descrito una elevada frecuencia de familiares sanos portadores de las variantes. Por tanto, si bien las alteraciones en *GLI2* se presentan habitualmente en heterocigosis y en principio seguirían una herencia autosómica dominante, ésta queda modificada por la expresividad variable y una penetrancia incompleta del fenotipo patológico.

*GLI2* es un gen altamente polimórfico (263), lo que puede dificultar la discriminación entre variantes patogénicas y polimorfismos de baja frecuencia. Las variantes truncadoras (*frameshift* y *nonsense*) de *GLI2*, que impidan la transcripción del extremo C-terminal, encargado de la función activadora de la transcripción (92), serán forzosamente patogénicas por pérdida de función. La mayoría de variantes potencialmente patogénicas descritas en la literatura científica son variantes no sinónimas (*missense*). De ellas, sólo unas pocas han sido evaluadas hasta el momento mediante estudios funcionales. Se ha demostrado una reducción de actividad *in vitro* muy significativa en el caso de las variantes p.(Arg516Pro) (94), p.(Glu518Lys) (268), p.(Tyr575His) y p.(Ala593Val) (91). Las cuatro afectan al dominio de dedos de zinc de unión a ADN. En el caso de las variantes, descritas en nuestro estudio, p.(Met1444\_Leu1445delinsIlePhe) y la presencia conjunta en *cis* de p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val) (94), los estudios funcionales realizados han demostrado una reducción parcial. La mayoría de las variantes publicadas reciben su consideración de potencialmente patogénicas *in silico*, por distintos predictores bioinformáticos en base a su baja frecuencia alélica poblacional, elevado grado de conservación y/o el dominio proteico afectado por la variante.

Las 4 variantes truncadoras identificadas en nuestro estudio [p.(Arg1226\*), p.(Leu709Trpfs\*15), p.(Ser267\*) y p.(Ser859Profs\*53)] deben considerarse patogénicas según los criterios ACMG (80). Roessler *et al.* (92) demostraron que la pérdida del extremo C-terminal de *GLI2* implica la



desaparición de su actividad activadora de la transcripción, incluso con efecto dominante negativo si el fragmento perdido no afecta al dominio represor N-terminal ni al dominio de unión a ADN. Un reciente estudio confirma igualmente estas observaciones (93).

Entre las variantes de cambio de sentido aquí identificadas, algunas presentan demostrada pérdida de función *in vitro*: una variante tipo *delins*, NM\_005270.4:c.4332\_4333delinsAT, p.(Met1444\_Leu1445delinsIlePhe) y otras dos que se transmiten en bloque por hallarse en desequilibrio de ligamiento sobre el mismo alelo: p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val). Flemming *et al.* (94) evaluaron la posible repercusión funcional de dichas variantes, demostrando que tanto la presencia de la variante *delins* como la pareja de variantes en *cis* disminuye de manera parcial, pero significativamente, la función activadora de la transcripción de *GLI2*. La frecuencia alélica de estas variantes es relativamente elevada en determinadas poblaciones. Si bien de manera global es inferior a 0,1% en gnomAD, 1000 Genomes y ESP6500, en la población latina en gnomAD es de hasta el 5,5% en el caso de p.(Met1444\_Leu1445delinsIlePhe) y del 1,45% en el caso de p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val). Si bien, de manera aislada, estas frecuencias alélicas elevadas llevarían a clasificar como benignas estas variantes, en el modelo de herencia oligogénica que se analiza en este trabajo, debemos tener en cuenta su demostrada repercusión funcional. Además, recientemente se ha demostrado que los pacientes con síndrome del tallo hipofisario interrumpido presentan una mayor frecuencia alélica de la combinación en *cis* de las variantes p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val) que la población general (39). Por ello, debemos considerar este grupo de variantes, al menos, como posibles cofactores implicados (aunque no suficientes), en la etiología del HIC de los pacientes portadores, que contribuyen junto con otras variantes relevantes en otros genes, transmitidas por la vía materna y paterna, al variable fenotipo del espectro clínico del HIC.

No se han realizado estudios funcionales del resto de variantes no truncadoras identificadas en nuestro estudio: 4 variantes de cambio de sentido [p.(His207Gln), p.(Asp1520Glu), p.(Thr903Ser) y p.(Gly199Ser)] y una variante sinónima con posible afectación del proceso de splicing [c.132G>A, p.(Ala44=)]. La variante p.(Asp1520Glu) afecta al mismo codón que la previamente

mencionada p.(Asp1520Asn), cuya caracterización funcional ha confirmado su efecto deletéreo sobre la actividad transcripcional *in vitro* (94). Si bien estas últimas 5 variantes tienen frecuencias alélicas muy bajas (claramente < 0,1%), la variante p.(His207Gln) no está registrada en las bases de datos poblacionales 1000 Genomes ni ESP6500, y sólo se encuentra presente en un único alelo, procedente del grupo “*South asian*”, en gnomAD (0,0004%).

Bear *et al.* (20) plantearon que sólo los pacientes con variantes con clara disminución de función (fundamentalmente variantes truncadoras) presentan rasgos fenotípicos característicos, presentes en mucha menor medida en los pacientes con variantes no truncadoras (100). Se discute a continuación, a partir de nuestros resultados, el espectro de alteraciones fenotípicas observadas en los pacientes con variantes relevantes en *GLI2*.

## **C.2. Alteraciones en *GLI2*: Fenotipo asociado**

En OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>, último acceso 24-03-2019), las alteraciones en *GLI2* figuran como causantes de los fenotipos patológicos HPE tipo 9 (MIM# 610829) y síndrome de Culler-Jones (MIM# 615849) (previamente llamado síndrome de Pallister-Hall tipo 2). Este último se resume como un trastorno de herencia autosómico dominante que incluye entre sus rasgos el hipopituitarismo (sobre todo deficiencia de GH) y/o polidactilia postaxial, con un fenotipo muy variable que puede incluir anomalías faciales de línea media y retraso del desarrollo, con penetrancia incompleta y expresividad variable. Esta definición incide en los rasgos fenotípicos que, en la revisión de Bear *et al.* (100), se establecieron como los de mayor relevancia en las anomalías de *GLI2*: las alteraciones hipofisarias y la polidactilia postaxial.

### **C.2.1. Fenotipo hipofisario asociado a alteraciones de *GLI2***

En el presente trabajo, centrado en el estudio de la etiología del HIC, la cohorte experimental examinada fue seleccionada por la presencia de patologías del espectro del HIC y, por tanto, estos rasgos fenotípicos y su asociación con las variantes de *GLI2* pueden estar sobrerrepresentados. De la misma forma, la

mayoría de los pacientes publicados con alteraciones en *GLI2* han sido evaluados en el marco de estudios centrados en patología hipofisaria (91,94,99,262,263,268), por lo que cabe la posibilidad de que dicho fenotipo se encuentre sobrerrepresentado en las revisiones encaminadas a establecer la correlación genotipo-fenotipo de las alteraciones de *GLI2* (100), no siendo la proporción de su presencia del todo representativa de la que presenta el conjunto de pacientes portadores de alteraciones de *GLI2*.

#### **C.2.1.1. Hallazgos anatómicos en la RMN hipofisaria de pacientes con alteraciones de *GLI2***

El 100% de los pacientes descritos en este estudio con variantes relevantes en *GLI2* presentan hipoplasia hipofisaria, frente al 72,4% del resto de la cohorte ( $p=0,06$ ), diferencia próxima a la significación estadística. En cambio, las alteraciones de la neurohipófisis se observan en el 75% de los pacientes con variantes relevantes en *GLI2* y en el 75,9% en el resto de la cohorte. Esto sugiere que las alteraciones en *GLI2* se relacionan de manera más específica con el fenotipo de hipoplasia hipofisaria que con las alteraciones de neurohipófisis, contrariamente a lo que se ha sugerido en algunos estudios previos (99,100,263).

Observamos algunas diferencias cualitativas en las alteraciones neurohipofisarias entre los pacientes con variantes relevantes en *GLI2*, según la variante en *GLI2* sea o no truncadora. Tres de los cuatro probandos aquí descritos con mutaciones truncadoras (75%) presentan hipoplasia hipofisaria y neurohipófisis ectópica, (características principales del síndrome del tallo hipofisario interrumpido) y en el otro (probando 2) la neurohipófisis y el tallo no son visibles. En cambio, si bien todos los probandos con variantes no truncadoras (7/7) también presentan hipoplasia hipofisaria, la neurohipófisis es ectópica sólo en 1/7, no visible en 3/7 y normal en 3/7. Pero estas diferencias observadas en las alteraciones de neurohipófisis según el carácter truncador o no de la variante, no son significativas estadísticamente y podrían ser casuales debido al limitado tamaño muestral. Amplias revisiones de pacientes con variantes en *GLI2* han encontrado proporciones muy similares de alteraciones de la neurohipófisis, independientemente del carácter truncador o no de la

variante (100,263): en torno al 65% de los pacientes (50% ectopia, 10-15% no visible), cifra global que sí es similar a nuestros resultados (8/11, 72%).

La localización ectópica de la neurohipófisis se presenta con frecuencia en pacientes con HIC. Este hallazgo radiológico se ha observado en algunos de los escasos pacientes portadores de mutaciones en algunos genes correspondientes a factores de transcripción “tempranos” en el desarrollo hipofisario como *HESX1*, *LHX4*, *OTX2* y *SOX3* (34,275–277), además de en un contexto poligénico en algunos trabajos recientes (39,74). Es bastante frecuente también su hallazgo en pacientes con HIC y alteraciones en *GLI2* (99,100,263). Un estudio muestra, en un grupo de 24 pacientes con HIC y portadores de alguna variante *missense* (ninguna truncadora), neurohipófisis ectópica en 16/24 (67%) y no visible en 4/24 (17%) (99). Pero en 10 de los 16 casos con neurohipófisis ectópica y en 3 de los 4 en los que no es visible, se refleja algún tipo de evento perinatal relevante (presentación de nalgas: 9; hipoxemia/cianosis: 3; fórceps: 3; y/o cesárea: 5). Si bien en los últimos años ha cobrado fuerza la idea de una etiología genética del síndrome del tallo hipofisario interrumpido, como ya se ha discutido, algunos de estos eventos perinatales pueden tener también un papel en su etiología. En nuestro caso, 3 de los 4 probandos con mutación truncadora tuvieron un embarazo y parto normales, y sólo uno (el probando 2, el único en el que la neurohipófisis no es visible) tuvo un parto con fórceps, con un test de Apgar 5/7 a los 1 y 5 minutos, si bien su complejo cuadro sindrómico no se justifica por tales antecedentes perinatales. Carecemos de información sobre el parto en el caso del probando 51, único con neurohipófisis ectópica y mutación no truncadora.

Las grandes revisiones de Bear *et al.* (100) y Arnhold *et al.* (263) sugieren la relevancia del fenotipo de neurohipófisis ectópica en las alteraciones de *GLI2*, pero sólo analizan pacientes con alteraciones en *GLI2*, sin compararlos con pacientes similares sin este tipo de hallazgos. França *et al.* (99) sugirieron igualmente la importancia de *GLI2* en el fenotipo de neurohipófisis ectópica, tras observar variantes relevantes en *GLI2* en el 14% de pacientes de su cohorte de HIC que presentaban dicha ectopia del lóbulo posterior. Pero en el mismo trabajo se indica que se encuentran igualmente variantes relevantes en *GLI2* en el 13% de los pacientes con HIC sin neurohipófisis ectópica. Revisando en detalle dichos

datos, observamos que, en dicha cohorte de França *et al.* (99), los pacientes con HIC sin alteración en *GLI2* presentan neurohipófisis ectópica en el 59,4% de los casos, frente al 66% de aquellos con alguna variante relevante en *GLI2*, porcentajes muy parecidos ( $p=1$ ). Dichos resultados, en realidad, parecen apoyar los obtenidos en el presente estudio. Un muy reciente estudio italiano realizado en una cohorte de 145 pacientes con DCHH (de los que el 45% presentaba hipoplasia hipofisaria y sólo el 29% anomalías de la neurohipófisis), muestra 4 pacientes portadores de mutaciones con pérdida de función en *GLI2* (91). 3 de los 4 pacientes (75%) presentaban hipoplasia hipofisaria, pero únicamente uno de los 4 (25%) mostraba anomalías de la neurohipófisis (síndrome del tallo hipofisario interrumpido), y la comparación de estos datos con los de la cohorte completa sugieren de nuevo un papel más relevante de las anomalías en *GLI2* en la hipoplasia hipofisaria que en las anomalías de neurohipófisis. Este planteamiento es también compatible con los hallazgos en modelos murinos con regulación a la baja de *Gli2*, que reflejan una variable disminución del volumen hipofisario, aparentemente dependiente de una menor proliferación de células progenitoras durante el desarrollo embrionario de la bolsa de Rathke (168,267).

En un trabajo reciente centrado en el estudio de pacientes con síndrome del tallo interrumpido se encontró al menos alguna variante relevante en *GLI2* en 6 de los 20 pacientes incluidos (30%), en un contexto de herencia oligogénica (39). Si bien en principio esta elevada frecuencia de alteraciones en *GLI2* asociada a síndrome del tallo interrumpido contradice en parte nuestros resultados, sin embargo, la ausencia de variantes truncadoras en todos los casos, el sesgo introducido en la selección de los pacientes (todos con síndrome del tallo interrumpido) y la presencia también en todos los pacientes de alteraciones en otros genes que podrían influir en este fenotipo, no permiten determinar con exactitud cuál es el grado de asociación real entre el síndrome de tallo interrumpido y la presencia de variantes en *GLI2*.

Por todo ello, parece razonable concluir que, si bien es frecuente objetivar hipoplasia hipofisaria y alteraciones de la neurohipófisis en pacientes con HIC con variantes relevantes en *GLI2*, estos hallazgos en RMN son también frecuentes en el global de pacientes con HIC. Nuestros resultados y los de otros

estudios recientes (91) sugieren la implicación de las variantes relevantes en *GLI2* en el fenotipo de hipoplasia hipofisaria. Sin embargo, estos mismos datos contradicen la idea planteada en algunos estudios previos de que las alteraciones de neurohipófisis son características o específicas de este tipo de variantes (aunque, como se ha discutido, al analizar los propios datos publicados en alguno de dichos estudios, se obtiene una conclusión similar a la aquí planteada). Por tanto, la evidencia actual tiende a respaldar el papel de las alteraciones en *GLI2* en la expresión de hipoplasia hipofisaria, pero la relación con las anomalías de la neurohipófisis resulta incierta, y su expresión en algunos de estos pacientes probablemente se deba a la concurrencia de otros factores, sin una relación de causalidad exclusiva con las alteraciones en *GLI2*.

#### **C.2.1.2. Deficiencias hormonales hipofisarias asociadas a alteraciones de *GLI2***

Se ha descrito que, entre los portadores de alteraciones con pérdida de función en *GLI2*, la disfunción hormonal hipofisaria suele expresarse en forma de DCHH o de DAGH (100,263,268). En nuestro estudio, los 4/4 probandos con variantes truncadoras presentan al menos deficiencia de GH y TSH. El eje gonadotropo sólo ha podido ser evaluado por la reducida edad de los pacientes en 2/4, existiendo deficiencia de LH y FSH en 1/2. No ha podido ser confirmada analíticamente por la edad prepuberal en los probandos 38 y 32, precisamente los 2/4 probandos que presentan igualmente deficiencia de ACTH. Entre los probandos con variantes no truncadoras, 6/7 presentan deficiencia de GH, 6/7 de TSH y 5/7 de ACTH. Por la reducida edad, sólo ha sido posible evaluar de momento el eje gonadotropo en 3/8, y de ellos presentan deficiencia de LH y FSH 2/3. Algún grado de fenotipo patológico hipofisario está presente en el 100% de los probandos. Sobre los familiares, sólo hay constancia de estudio hormonal en el padre del probando 38 (38.II.4), y no presenta alteraciones significativas, aun siendo portador de una variante truncadora. Aun así, no se refieren datos clínicos que hayan conducido a analizar una eventual presencia de deficiencias hormonales tampoco en el resto de familiares portadores de variantes en *GLI2*, salvo en el feto aborto de la familia 38 (38.III.4), en el cual lógicamente no pudo llegar a analizarse este extremo.

Ninguno de nuestros pacientes presenta deficiencia de ADH. Sólo en 4 casos en la literatura se ha mencionado esta alteración hormonal asociada a alteraciones de *GLI2*. Uno es un caso con HPE con la variante de *GLI2* p.(Arg226His) que asocia una mutación truncadora en *ZIC2* que parece el principal determinante del cuadro clínico, incluida la diabetes insípida (278). En los otros tres casos la neurohipófisis no era visible. En el único caso con una mutación truncadora en *GLI2* [p.(Glu380\*)] la diabetes insípida fue aparentemente transitoria entre los 18 y los 30 meses de edad (99,262,263). En los otros dos casos se trata de variantes *missense* no truncadoras (99). El primero de los dos, que presenta la variante p.(Gly947Asp), es un paciente pretérmino nacido de nalgas con HIC, que asocia otros signos como micrognatia, ptosis, hipospadias y retraso psicomotor que pueden hacer dudar de la alteración en *GLI2* como única causa de su cuadro. El otro, con la variante p.(Val1117Leu), presenta HIC sin otros hallazgos significativos. En cualquier caso, al igual que pasa en nuestro estudio, no se ha objetivado por el momento una franca y permanente diabetes insípida en ningún paciente portador de una mutación claramente patogénica en *GLI2*, lo cual hace dudar por el momento de una clara correlación entre las anomalías en *GLI2* y la deficiencia de ADH.

La deficiencia hormonal más frecuentemente descrita en la literatura en pacientes con anomalías en *GLI2* es, con diferencia, la deficiencia de GH. Hay que tener en cuenta que, en el HIC, el eje afectado con mayor frecuencia es el somatotropo. Existe incluso algún estudio que ha analizado la presencia de alteraciones en *GLI2* en concreto en pacientes con DAGH (262). Por ello, es posible que la alteración de este eje esté también sobrerrepresentada entre los pacientes descritos con alteraciones en *GLI2* por un sesgo de selección.

#### **C.2.1.3. Respuesta al tratamiento con rhGH en pacientes con alteraciones de *GLI2***

La respuesta al tratamiento con rhGH no es un dato que se haya reflejado con frecuencia en la literatura científica al describir pacientes con alteraciones en *GLI2*. Kordaß *et al.* (279) publicaron el caso de una paciente con una delección 2q14.2-q14.3 de 4.3 Mb en heterocigosis que incluía los exones 2-13 de *GLI2* y otros 6 genes más, en la que el tratamiento con rhGH no resultó eficaz, al

presentar una talla en -2,91 DE a la edad de 6 años (momento en el que inició el tratamiento con rhGH) y su talla adulta a los 25 años se situaba en -2,47 DE. En dicho trabajo no se menciona la duración del tratamiento ni a qué edad se suspendió (si es que se discontinuó en algún momento). Se menciona que, a los 13 años, momento de la menarquia, la talla se situaba en -2,11 DE (lo cual sí supone una cierta mejoría respecto a la talla al inicio del tratamiento), mejoría que disminuye evolutivamente hasta la talla adulta final. En nuestro caso sólo disponemos del dato de la respuesta al tratamiento en 4 de los probandos (3 de ellos con variantes truncadoras), con resultados variables. Los probandos 38 y 42, que presentan respectivamente las variantes p.(Arg1226\*) y p.(Ser267\*) demostraron una buena respuesta clínica y analítica al tratamiento sustitutivo con rhGH (**Figuras 17 y 24**). El probando 32, con la variante p.(Leu709Trpfs\*15), demostró buena respuesta analítica, pero mala respuesta en la velocidad de crecimiento, por lo que dicho tratamiento fue suspendido a la edad de 12 años (89) (**Figura 23**). El probando 63, con la variante sinónima c.132G>A, p.(Ala44=), de significado incierto, presentó una respuesta parcial. Observamos así una respuesta variable al tratamiento con rhGH en diversos pacientes con variantes relevantes en *GLI2*. Por ello, con los datos de los que disponemos, no podemos determinar una clara tendencia general a una respuesta positiva o negativa al tratamiento con rhGH en los pacientes con alteraciones patogénicas en *GLI2*.

#### C.2.1.4. HHC en pacientes con alteraciones en *GLI2*

Un paciente con síndrome de Kallmann, sin otras deficiencias hormonales hipofisarias y sin rasgos fenotípicos característicos de las alteraciones en *GLI2*, ha sido publicado con la variante c.2509G>A, p.(Gly837Lys), en asociación con la variante en *SIX3* p.(Gly143Asp) (185). Si bien ningún paciente de nuestro estudio ha referido anosmia o hiposmia, cabe reseñar que el feto aborto de la familia 38 (38.III.4), con la variante truncadora de *GLI2*, p.(Arg1226\*), presentaba en la necropsia ausencia de bulbos olfatorios, rasgo característico del síndrome de Kallmann. El probando 95, portador de la variante p.(Met1444\_Leu1445delinsIlePhe), presenta hipoplasia de bulbo olfatorio izquierdo dentro de su cuadro neurológico compatible con DSO. Pero debe tenerse en cuenta que la aplasia/hipoplasia de bulbos olfatorios (sobre todo de manera asimétrica) es un rasgo que se observa con cierta frecuencia en



pacientes con DSO (58), como es el caso de este paciente. Por tanto, dicha DSO sería capaz de justificar este hallazgo, no necesariamente relacionado con la alteración en *GLI2*. En cualquier caso, los bulbos olfatorios no se analizan en muchas ocasiones cuando se realizan estudios de RMN centrados en el área selar, por no estar incluidos en el área de interés que se analiza. Por otro lado, a veces no se realiza una evaluación específica de los mismos al analizar estudios de RMN cerebral, y la distancia entre los cortes realizados en dichos estudios puede dificultar la misma. Por todo ello, si bien aportamos aquí dos nuevos pacientes con anomalías de bulbos olfatorios, con los datos disponibles no podemos afirmar que las alteraciones en *GLI2* se relacionen con dicho fenotipo, aun sin olvidar que las dificultades mencionadas para poder evaluar los mismos en RMN podrían haber contribuido a que en algunos pacientes previos no se mencione este signo radiológico.

Nuestros hallazgos son compatibles con las revisiones previas en lo que se refiere al fenotipo hormonal hipofisario, si bien cabe resaltar que dos de los pacientes de nuestra cohorte presentaron variantes relevantes de *GLI2* asociadas a anomalías de bulbos olfatorios. Resulta evidente, por lo tanto, que el HIC (fundamentalmente en forma de DCHH o DAGH) forma parte del espectro fenotípico de las alteraciones con pérdida de función en *GLI2*, si bien la penetrancia es incompleta, aunque no podemos determinar la prevalencia real de este rasgo fenotípico debido al sesgo introducido en la selección de pacientes.

### **C.2.2. Polidactilia asociada a alteraciones en *GLI2***

La polidactilia, siempre postaxial, aparece en nuestro estudio exclusivamente en 3/25 individuos con variantes potencialmente patogénicas en *GLI2*, además de en otro familiar de la familia 38 que no pudo ser analizado genéticamente (**Figuras 20 y 22**). En los 3 casos se trata de variantes truncadoras de *GLI2*: p.(Arg1226\*) en el abuelo paterno (38.I.3) y la prima (38.III.1) del probando 38, y p.(Leu709Trpfs\*15) en el probando 32. Esto supone 3/11 (27%) de los individuos con este tipo de variante. Ningún portador de variantes de *GLI2* no truncadoras presenta polidactilia. Esto concuerda con revisiones previas en las que la polidactilia aparece casi exclusivamente en

portadores de mutaciones truncadoras o en deleciones que incluyen el gen (100,263,280). Sólo tres casos previamente descritos con variantes *missense* presentaban polidactilia. Uno de ellos presentaba la variante c.1547G>C, p.(Arg516Pro), que afecta al dominio de dedos de zinc, con repercusión funcional demostrada mediante estudio funcional (94). Y de los otros dos, el paciente con la variante c.4663T>C, p.(Ser1555Pro) es el único con polidactilia preaxial, y en el caso con la variante c.2261G>A, p.(Arg754Gln), no se especifica si es preaxial o postaxial (100,281). Por lo tanto, la polidactilia postaxial parece presentarse casi exclusivamente en pacientes portadores de una variante claramente patogénica de *GLI2*, si bien con penetrancia incompleta. Debe tenerse en cuenta que no hay publicados por el momento estudios sobre *GLI2* que hayan partido del estudio de pacientes con polidactilia, por lo que el hallazgo de variantes no patogénicas en *GLI2* en pacientes con polidactilia debida a otra causa apenas ha podido producirse (como sí puede haber ocurrido en pacientes con patología hipofisaria o defectos faciales de línea media).

En cuanto a la combinación de patología hipofisaria y polidactilia, la revisión de Bear *et al.* (100) encontró, entre los individuos con variantes truncadoras de los que se disponía de suficientes datos clínicos, un fenotipo con anomalías hipofisarias y polidactilia en el 62%, con polidactilia sin anomalías hipofisarias en el 33%, con anomalías hipofisarias sin polidactilia en el 24% y con anomalías hipofisarias y/o polidactilia en el 86%. En nuestro estudio encontramos dichos fenotipos, respectivamente, en el 9%, 18%, 30% y 60% de los individuos con variantes truncadoras, porcentajes algo inferiores en general a los datos previamente publicados, salvo en el caso de los pacientes con anomalías hipofisarias sin polidactilia. Hay que tener en cuenta que 8 de los 11 individuos con variantes truncadoras analizados en este estudio pertenecen a la familia 38, y es posible que alguno de los familiares del probando 38 con polidactilia pueda presentar además alguna deficiencia hormonal leve que no haya sido evaluada, y que esto pueda justificar en parte estos diferentes resultados, pero en cualquier caso se trataría de deficiencias hormonales sin una evidente repercusión clínica. Sin embargo, en la revisión de Arnhold *et al.* (263) se menciona que fueron evaluados hormonalmente hasta 11 progenitores portadores de la misma mutación en *GLI2* que los respectivos probandos con

patología hipofisaria, y sólo 2 de ellos presentaban hipopituitarismo (uno de ellos con polidactilia) y otros 3 presentaban sólo polidactilia. Así, resulta evidente que, al menos en lo que se refiere al fenotipo patológico hipofisario y digital, existe una clara penetrancia incompleta.

En cualquier caso, lo que resulta claro es que la presencia de polidactilia postaxial en un paciente con HIC (o en alguno de sus familiares), aumenta claramente la probabilidad de que exista alguna alteración en *GLI2*, lo que debería orientar a su estudio (262,263).

### **C.2.3. Patología nefrourológica asociada a alteraciones en *GLI2***

Hemos presentado aquí tres pacientes con patología malformativa nefrourológica y anomalías en *GLI2*: dos familiares del probando 38 que presentan la mutación truncadora p.(Arg1226\*), afectos de un fenotipo renal del espectro de hipoplasia/displasia renal, y el probando 51, portador en *cis* de las variantes p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val), con riñón en herradura.

Observamos en la familia 38 dos portadores de la variante p.(Arg1226\*) con patología renal congénita. Por un lado, el feto aborto de 27 semanas (38.III.4) presentaba hipoplasia renal izquierda y displasia quística renal derecha. Por otro, la primera de las dos hermanas gemelas (38.III.8) presentaba al nacimiento un riñón derecho ectópico (con sospecha ecográfica prenatal de displasia multiquística) que involucionó en los primeros meses de vida. Las agenesias renales pueden deberse a una verdadera ausencia de desarrollo del parénquima renal, o a la involución de un riñón displásico (aplasia) (282), como parece ser este caso.

La patología nefrourológica congénita (CAKUT, “*congenital anomalies of the kidney and urinary tract*”) engloba un amplio espectro de anomalías del desarrollo desde la uretra hasta el parénquima renal, en cuya etiología se considera la participación de eventos genéticos y ambientales (283). Las anomalías nefrourológicas no aparecen reflejadas de manera muy frecuente entre los pacientes descritos hasta ahora con alteraciones en *GLI2*. Recientemente, Shirakawa *et al.* (284) han publicado el caso de un paciente con

la mutación truncadora en *GLI2* p.(Met1123Ilefs\*7) *de novo* en heterocigosis que presentaba, además de un fenotipo compatible (deficiencia de GH, hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica, polidactilia postaxial, hipoplasia medifacial), un cuadro clínico genitourinario consistente en estenosis uretral, hipoplasia renal izquierda y displasia quística renal derecha, que derivó en insuficiencia renal y trasplante, fenotipo renal muy similar al del feto aborto de la familia 38 del presente estudio. El caso publicado por Kordaß *et al.* (279), una paciente portadora en heterocigosis de una delección 2q14.2-q14.3 de 4.3 Mb que incluía los exones 2-13 de *GLI2* y otros 6 genes más, precisó la resección del riñón izquierdo con un año de edad por tratarse de un riñón multiquístico y no funcional. Un paciente portador de la variante de significado incierto p.(Gly947Asp) presentaba hipospadias perineal y criptorquidia, dentro de su cuadro sindrómico con DCHH incluyendo deficiencia de ADH, micrognatia, ptosis palpebral y retraso psicomotor (99). Un paciente con una delección 2q14.2-q22.1 en heterocigosis incluyendo *GLI2* y otros 42 genes presentaba hipospadias perineal y doble uréter izquierdo (además de deficiencia de GH, polidactilia y trombosis venosa profunda) (285), pero en este caso la gran cantidad de genes deletados dificulta el establecimiento de una relación clara entre la patología urológica y *GLI2*. Finalmente, dos de los miembros de la familia recientemente reportada por Kremer-Hovinga *et al.* (90) con la variante p.(Arg1226\*), misma variante que la detectada en nuestra familia 38, presentaban estenosis uretral. Hasta donde conocemos, ningún otro paciente con patología nefrourológica y una alteración patogénica en *GLI2* ha sido publicado con anterioridad.

La vía Shh se ha demostrado necesaria para el adecuado desarrollo del riñón, los uréteres y la uretra en ratones (286–288). Existen algunos casos humanos descritos que asocian un fenotipo de HPE y agenesia o displasia quística renal (289–291). El síndrome de incisivo central único, relacionado en algunos casos con mutaciones en la vía *SHH*, presenta en ocasiones agenesia renal dentro de su espectro clínico (292). La represión de *Gli1* y *Gli2* mediada por *Gli3* altera el desarrollo renal en ratones (293). Algunos genes que participan en la vía *SHH* se han asociado a las CAKUT, como por ejemplo *GLI3*, implicado en la etiología del síndrome de Pallister-Hall, que incluye las CAKUT entre su espectro fenotípico (283,294). Todo ello apoya el probable papel de las

alteraciones en *GLI2* en la etiología de la patología malformativa nefrourológica y, por tanto, la posibilidad de que la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2* sea la causa principal de este fenotipo en los dos casos portadores de este estudio, así como la alteración p.(Met1123Ilefs\*7) en el caso reportado por Shirakawa *et al.* (284), y la delección de los exones 2-13 de *GLI2* en el caso de Kordaß *et al.* (279). Cabe resaltar que estos cuatro casos presentan una variante claramente patogénica en *GLI2* y los cuatro presentan aparentemente una patología renal englobada dentro de la displasia multiquística renal congénita.

Pero resulta especialmente interesante en nuestro caso valorar la presencia de este fenotipo patológico renal en una paciente con una gemela monocigótica no afecta, en la cual, en principio, todos los factores genéticos son idénticos. Así, en este caso, si la alteración en *GLI2* está relacionada con la anomalía renal, los factores que determinan su expresión deben ser necesariamente ambientales o al menos no directamente genéticos. Este hecho obliga a tener en cuenta de manera importante los factores ambientales y epigenéticos como posibles determinantes (al menos como cofactores contribuyentes) de la expresividad clínica de las alteraciones en *GLI2*.

Por otro lado, el probando 51, portador en *cis* de la pareja de variantes en *GLI2* p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val) presenta un riñón en herradura. Este tipo de anomalía renal, englobada también dentro del amplio grupo de las CAKUT, concretamente dentro del grupo de las malformaciones de fusión renal, no tiene a día de hoy una etiología claramente conocida, y se considera que puede ser el resultado final de diversos procesos (295). Así, se han implicado factores posicionales, de migración celular del metanefros, intrauterinos (maternos y/o teratogénicos) y genéticos (295). Apoyando la posible implicación de factores genéticos está la elevada frecuencia de riñón en herradura en anomalías cromosómicas como el síndrome de Edwards o el síndrome de Turner (296). Además, existen casos familiares y de gemelos monocigóticos afectados simultáneamente, aunque también el caso de gemelos monocigóticos con afectación exclusiva de uno de ellos (295). Cabe destacar que, en modelos murinos, se ha demostrado la implicación de los defectos de la vía SHH en las malformaciones de fusión renal (297). En nuestro caso, el probando 51 es portador de las variantes en *GLI2* en *cis* p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val), cuya

presencia implica una disminución de la actividad transcripcional de *GLI2* (94). Se trata por tanto del primer paciente descrito con una anomalía en *GLI2* y un fenotipo de riñón en herradura.

Así, en el presente trabajo, en global, describimos 3 pacientes con anomalías en *GLI2* y patología renal asociada (los cuales suponen el 12% de los 25 individuos aquí descritos). Teniendo en cuenta que previamente sólo existen 6 pacientes publicados con alguna patología nefrourológica y anomalías significativas en *GLI2*, este estudio constituye una relevante contribución al conocimiento acerca de la posible implicación de este gen en la etiología de la patología del desarrollo embrionario renal.

#### **C.2.4. Holoprosencefalia (HPE) asociada a alteraciones en *GLI2***

Aunque las alteraciones en *GLI2* se asociaran inicialmente al fenotipo de HPE, ya se ha sugerido que este fenotipo no se expresa frecuentemente. La revisión de Bear *et al.* (100) sólo encontró 3 pacientes con fenotipo *a priori* de HPE entre los 112 individuos con alguna variante potencialmente patogénica en *GLI2*. De estos 3 pacientes, uno presentaba la variante de significado incierto p.(Arg226His) asociada a una mutación patogénica en *ZIC2* (probable causa principal de dicho fenotipo) y otro con la variante p.(Arg496\*) finalmente no parecía tener alteraciones cerebrales clínicamente significativas de HPE, sino más bien sólo rasgos faciales. Existe en ocasiones una posible confusión terminológica, ya que muchos autores consideran las alteraciones faciales de línea media (como el hipotelorismo o el incisivo central único) sin anomalías cerebrales, una “microforma” de HPE. Así, algunos pacientes descritos en la literatura pueden haber sido considerados afectados de HPE, pero no presentar ninguna alteración cerebral. Por lo tanto, sólo 1 de los 112 pacientes incluidos en la revisión de Bear *et al.* tenía una HPE semilobar (además de microcefalia, hendidura labial/palatina y polidactilia postaxial bilateral) y presentaba una variante truncadora en *GLI2*, en concreto la variante p.(His289Profs\*61) (100,273). Posteriormente Dubourg *et al.* (186) comunicaron el caso de un feto aborto con aparente HPE lobar, agenesia premaxilar, polidactilia, hamartoma hipofisario y fémur corto, con la variante p.(Trp746\*) en *GLI2*, que además asociaba en mosaicismo fragilidad en el cromosoma 3 (3p24.1). Recientemente

Roessler *et al.* (67), han comunicado tres pacientes con fenotipo de HPE a nivel cerebral portadores de alguna variante no truncadora de significado incierto en *GLI2*, en un contexto oligogénico (además de otro con una variante clasificada como probablemente benigna en *GLI2* asociada a una variante patogénica en *SIX3* que justifica el fenotipo cerebral). En ese mismo estudio, realizado mediante secuenciación masiva dirigida en una gran cohorte de pacientes con HPE (en la que se incluyen muchos pacientes con anomalías faciales de línea media con RMN cerebral normal), Roessler *et al.* concluyen que las variantes patogénicas en *GLI2* no son una causa habitual de HPE, aunque cabe la posibilidad de que tengan algún papel potencial en su etiología actuando sinérgicamente con otros factores desde un punto de vista multifactorial (67).

En nuestro estudio tenemos 4 pacientes con patología neurológica grave (el feto aborto 38.III.4 de la familia 38 y los probandos 32, 95 y 69). El probando 95 presenta criterios clínicos de DSO y se engloba dentro del grupo DSO-plus, dada la presencia asociada de esquisencefalia. Si bien la DSO podría considerarse como una expresión más leve que la HPE dentro del complejo espectro fenotípico del HIC con anomalías de la línea media (64), esta relación se ha planteado de forma más evidente para la forma anatomoclínica de DSO “aislada” (54–56). Por otro lado, el probando 69, cuyos padres son primos de primer grado, presenta, además de hipopituitarismo, un cuadro sindrómico que incluye encefalopatía, convulsiones, retraso psicomotor, pie equinovaro bilateral y anomalías digitales (camptodactilia y clinodactilia), sin alteraciones evidentes de línea media ni faciales ni cerebrales. Además, en este paciente, gran parte del fenotipo extrahipofisario podría estar justificado por algunos de los hallazgos genéticos asociados (ver apartado C.5.2.5. de esta *Discusión*). Los otros dos pacientes con patología neurológica relevante presentan una variante truncadora y distintas combinaciones de los rasgos clínicos más asociados hasta ahora con las alteraciones en *GLI2* (hipotelorismo, labio leporino, fisura palatina, hipoplasia medifacial, polidactilia). En lo que se refiere a las anomalías cerebrales, el feto aborto de la familia 38 (38.III.4), con la variante p.(Arg1226\*), fue diagnosticado intraútero por RMN de una forma de HPE intermedia entre lobar y semilobar. Pero tras la interrupción de la gestación, en el informe de la necropsia se menciona que, macroscópicamente, existe una separación completa de ambos

hemisferios cerebrales con dilatación moderada de ambos ventrículos, además de ausencia de ambos bulbos olfatorios. Cabe resaltar que dicho informe menciona la dificultad del estudio macroscópico cerebral por la fragmentación parcial del cerebro durante su extracción debido a una marcada disminución de su consistencia. Y el probando 32, con la variante p.(Leu709Trpfs\*15), presenta un cuadro neurológico complejo con microcefalia no presente al nacimiento, retraso psicomotor grave, crisis mioclónicas, leve atrofia corticosubcortical, hipoplasia frontal, aberrancia de opérculo, hiperintensidad de la sustancia blanca subcortical temporoparietooccipital y de núcleos dentados cerebelosos. Pero no se observa una inadecuada división de los hemisferios cerebrales. Por tanto, no se trata en cualquier caso de una forma cerebral de HPE. Así, sólo 1 de los 25 individuos presentados en este estudio tienen un posible diagnóstico de HPE, pero incluso en él existen factores que permiten dudar del diagnóstico de una HPE franca con clara afectación de la línea media a nivel cerebral. Esto es compatible con las conclusiones expuestas en la literatura (67,100,272), acerca de la escasa presencia de un fenotipo cerebral evidente de HPE entre los pacientes con mutaciones de pérdida de función en *GLI2*.

### **C.5. Displasia septo-óptica (DSO) asociada a alteraciones en *GLI2***

La DSO asociada a alteraciones en *GLI2* sólo se muestra en el presente estudio, como se acaba de mencionar, en el probando 95. Éste presenta la variante *delins* p.(Met1444\_Leu1445delinsIlePhe) en *GLI2* (con repercusión funcional parcial *in vitro*) asociada a hipoplasia de nervios ópticos, ausencia de septo pelúcido, hipoplasia de cuerpo caloso y anomalías hipofisarias, así como esquisencefalia (DSO-plus). Un paciente con la variante truncadora c.3258del, p.(Thr1088Argfs\*42) ha sido descrito con un cuadro clínico típico de las anomalías en *GLI2* (hipopituitarismo, polidactilia, labio leporino y fisura palatina) y además hipoplasia de nervio óptico e hipófisis no visible en RMN (100,265). Otro paciente con la variante no sinónima p.(Arg1543His) presentaba hipoplasia de nervio óptico derecho, junto con DCHH, hipoplasia hipofisaria y neurohipófisis y tallo no visibles, pero el estudio funcional de la variante no demostró repercusión significativa (94). Dos miembros de una misma familia, ambos con la variante no sinónima p.(Ala268Val) mostraban un fenotipo consistente en



hipoplasia de nervio óptico y ausencia de septo pelúcido sin anomalías hipofisarias, presentando uno de ellos además esquisencefalia (100), aunque otros dos familiares de los mismos, portadores de la misma variante, no presentaban dicho fenotipo. La variante no sinónima p.(Pro932Ser) se encontró en una paciente que presentaba anoftalmía derecha y agenesia del cuerpo y rodilla del cuerpo calloso (e hipoplasia del *rostrum*), dentro de un cuadro sindrómico más complejo con anomalías de arcos branquiales, meningocele occipital, anomalías cerebelosas y anomalías de la migración neuronal, que sugieren en conjunto la participación de algún otro factor genético o ambiental que justifique total o parcialmente dicho fenotipo (274). La agenesia completa de cuerpo calloso no es frecuente entre los pacientes con alteraciones en *GLI2*, aunque sí la agenesia parcial (sobre todo de la rodilla) (100,274). Por todo ello, podemos resaltar que sólo uno de los pacientes descritos con criterios clínicos de DSO y alteraciones en *GLI2* presenta una variante truncadora claramente patogénica y concluir que, si bien en conjunto todos estos pacientes suponen un porcentaje mayor que los que presentan un fenotipo de HPE evidente a nivel cerebral, resulta también poco frecuente el fenotipo de DSO entre los pacientes con alteraciones en *GLI2*.

#### **C.2.6. Rasgos faciales asociados a alteraciones en *GLI2***

Algunos rasgos faciales de línea media, dentro del espectro fenotípico “HPE-like” se han asociado a las alteraciones en *GLI2*, tales como hipotelorismo, hipoplasia mediofacial, labio leporino y fisura palatina (186,273,274,281,298). Otros rasgos descritos con frecuencia algo menor, pero dentro del mismo espectro (y presentes igualmente en pacientes con HPE), son el incisivo central único, la atresia de coanas o la atresia de apertura nasal piriforme (186). Un rasgo sutil del que no se habla habitualmente en la literatura en las revisiones más relevantes es la nariz bulbosa. En los individuos con alguna variante truncadora en los que hemos podido valorar los rasgos faciales, este rasgo es frecuente (**Figura 18**). Igualmente, este rasgo se observa en las imágenes de varios pacientes con mutaciones truncadoras en la revisión de Bear *et al.* (100) y en otro paciente recientemente reportado (284). Si bien las anomalías en *GLI2* se han relacionado en ocasiones con hipoplasia nasal o heminasal, la mayoría

de pacientes descritos con estos rasgos presentan variantes no truncadoras. Contradiendo lo anterior se encuentra el caso del feto aborto de la familia 38 (38.III.4), en el que se describe una agenesia de nariz. De nuevo observamos así otro rasgo fenotípico de expresión variable.

La presencia de labio leporino y/o fisura palatina sólo se ha objetivado en nuestro estudio en 2 de los 25 individuos con variantes potencialmente patogénicas, además de en otro caso de la familia 38 que no pudo ser analizado genéticamente (**Figura 22**). Ambos casos presentan una variante truncadora, lo cual supone 2/11 (18%) de los individuos con alguna variante truncadora en *GLI2*. El probando 32 con la variante p.(Leu709Trpfs\*15) muestra una importante hipoplasia maxilar y el feto aborto de la familia 38 (38.III.4) con la variante p.(Arg1226\*) mostraba agenesia parcial de la porción central del hueso maxilar junto con la ausencia de nariz. Formas más leves de hipoplasia medifacial, con paladar estrecho, se observan en casi todos los miembros con la variante p.(Arg1226\*) en la familia 38 (**Figura 19**), pero no ha sido posible una adecuada evaluación de este rasgo en la mayor parte de los casos presentados en este estudio. Vieira *et al.* (281), estudiando pacientes con hendidura labial o palatina aislada (no sindrómica), encontraron variantes no sinónimas en 4 pacientes, pero ninguna truncadora o evidentemente patogénica. No parece que el fenotipo aislado de labio leporino o fisura palatina sin otras alteraciones fenotípicas asociadas sea frecuente en el caso de variantes truncadoras en *GLI2*. El hipotelorismo se discute más adelante, en el apartado “C.4.2. *Expresividad variable intrafamiliar de una misma variante*”.

### C.2.7. Otros fenotipos asociados a alteraciones en *GLI2*

2 de los 25 individuos aquí descritos presentaban pies equinovaros [el feto aborto de la familia 38 (38.III.4) con la variante p.(Arg1226\*) y el probando 69 con la pareja de variantes p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val)], precisamente los únicos 2 individuos fallecidos (aborto en el primer caso y *exitus* a los 4 meses en el segundo). Los determinantes genéticos del pie equinvaro no son bien conocidos, aunque se conoce la probable implicación de la vía de señalización PITX1-TBX4 (299), y recientemente se ha demostrado la implicación de la vía Shh en la mayor o menor expresividad fenotípica en ratones con alteraciones en

*Pitx1* (300). No hemos encontrado dicho rasgo descrito en otros estudios con anterioridad, por lo que, en principio, estos 2 pacientes serían los primeros pacientes publicados con pie equinovaro sindrómico con una alteración en la vía SHH, en concreto en *GLI2*, si bien no podemos afirmar de momento que dicha alteración genética sea el principal determinante de este rasgo fenotípico.

Entre los pacientes descritos en la literatura científica con variantes claramente patogénicas en *GLI2*, algunos presentan otros rasgos que exceden a los comentados en los apartados anteriores. Una paciente con la variante p.(Ser690Alafs\*5) presentaba atrofia cerebelosa, además de polidactilia, hipopituitarismo y atresia de coanas (186). También presentaba anomalías cerebelosas el paciente con la variante p.(Pro932Ser) mencionado previamente (274). En unos pocos pacientes, incluido este último, con la variante p.(Pro932Ser) (274) y otros con las variantes p.(Glu629Lys) y p.(Asp1520Asn) (273), la última con repercusión funcional parcial *in vitro* demostrada (94), se han descrito alteraciones congénitas relacionadas con el desarrollo de los arcos branquiales (sobre todo del primero) como hipoplasia mandibular unilateral y/o apéndices preauriculares. Aun así, la ausencia de estos rasgos en pacientes con mutaciones truncadoras puede hacer dudar de que su causa sea la propia alteración en *GLI2*. Aunque habitualmente se considera relativamente frecuente la presencia de cierto grado de retraso psicomotor, Solomon *et al.* (280) comunicaron el caso de una niña de 3 años portadora de una delección de 118 Kb en 2q14.2 que incluía el gen *GLI2* completo, que presentaba adquisición temprana de hitos del desarrollo psicomotor y un CI de 118, además de rasgos más característicos como DAGH, neurohipófisis ectópica y polidactilia postaxial. La variante p.(Ser1232Glnfs\*60) se ha encontrado en la línea germinal en un paciente con meduloblastoma (301). La variante p.(Lys583\*) figura como uno de los múltiples hallazgos en la base de datos *Simons Simplex Collection*, obtenidos a través del estudio de exomas de familias con trastornos del espectro autista (302,303). Recientemente, Larson *et al.* (304) han publicado la presencia de una duplicación en la región 2q14.2 de 29.2 kb que incluye *GLI2* en 3 de 116 pacientes con la combinación de trastorno del espectro autista y psicosis. En un estudio con 27 pacientes con enfermedad de Hirschprung grave se encontraron las variantes no sinónimas p.(Ala46Thr) y p.(Gly776Asp) en sendos pacientes,

en ambos casos en un contexto poligénico, junto con otras variantes con potencial implicación en dicha patología (305). Dos de los pacientes portadores de la variante p.(Arg1226\*) del estudio de Kremer Hovinga *et al.* (90) asociaban algún tipo de defecto septal cardiaco. Igualmente, un paciente ha sido recientemente descrito con la variante p.(Arg550Profs\*53) junto con una disomía uniparental materna del cromosoma 20, con un cuadro clínico que, asociado a un fenotipo compatible con lo aquí descrito para las anomalías patogénicas de *GLI2*, presenta también una comunicación interauricular tipo *ostium secundum* (306). Este último paciente y su padre, también con la variante p.(Arg550Profs\*53), presentan ambos sindactilia de los dedos 2º y 3º en los pies, dato referido sólo en algunos casos aislados de pacientes con anomalías en *GLI2* (93). Ambas hermanas gemelas del probando 38 de nuestro estudio presentan exactamente la misma alteración en ambos pies (**Figura 20**).

### **C.3. Penetrancia incompleta de las alteraciones en *GLI2***

En la actualidad se acepta que las alteraciones en *GLI2* tienen una penetrancia incompleta, es decir, que pueden existir portadores sanos de una mutación con pérdida de función (100,263). Esto puede deberse a varios motivos. Uno es la posible participación de otros factores (ambientales, genéticos y/o epigenéticos) que condicionen la expresión o no expresión fenotípica del genotipo patológico. Otra posibilidad es que los portadores siempre muestren al menos un rasgo fenotípico sutilmente alterado que pase desapercibido con facilidad si no se realiza una valoración exhaustiva de algunos parámetros. En este caso, sabemos que la hipoplasia mediofacial y el hipotelorismo son rasgos que se incluyen dentro del espectro fenotípico de las alteraciones de *GLI2*. Tanto la hipoplasia mediofacial como el hipotelorismo con frecuencia se evalúan de manera subjetiva, y los casos leves pueden pasar desapercibidos y considerarse sanos. Así, es posible que haya familias publicadas previamente en las que existan familiares considerados sanos a los que no se les haya podido realizar una determinación objetiva de estos parámetros biométricos faciales (tal y como ocurre incluso dentro de nuestro propio estudio). Si bien la valoración objetiva de la hipoplasia mediofacial puede

resultar compleja, la valoración de un posible hipotelorismo resulta más sencilla, utilizando una regla transparente para la medición de las distancias intercantal interna, interpupilar e intercantal externa (307). Utilizando tablas de referencia de normalidad podemos considerar hipotelorismo cuando dichas distancias sean inferiores a -2 DE respecto a la media poblacional. Para la edad pediátrica habitualmente se utilizan las tablas de referencia de Feingold *et al.* (104,307), válidas desde el nacimiento hasta los 14 años, si bien no realizan una clara distinción por sexos. Para adultos existen varios estudios, la mayoría realizados en etnias concretas diferentes a la caucásica, lo que dificulta su aplicación en nuestro medio. Hemos optado por utilizar como referencia la base de datos norteamericana ANSUR (105), que incluye los datos de distancia interpupilar de 3976 sujetos adultos de entre 18 y 50 años, incluyendo varias etnias, lo que, aun suponiendo limitaciones, resulta más útil que utilizar las referencias de una etnia diferente a la caucásica exclusivamente. En nuestro caso, en la familia 38 de este estudio, en la que ha sido posible un análisis genético y clínico familiar directo por nuestro equipo más extenso, podemos observar cómo todos los miembros que presentan la variante truncadora p.(Arg1226\*) tienen al menos alguna de dichas tres medidas por debajo de -2 DE respecto a la media (**Tabla 13** y **Figura 21**). Hasta que se realizaron estas mediciones, tanto el padre (38.II.4) como el tío (38.II.3) del probando 38 eran considerados portadores sanos, ya que no presentan hipopituitarismo, polidactilia ni hendidura labial o palatina. Dado que en la mayoría de portadores sanos previamente publicados no se especifica si se ha realizado este tipo de valoración, es posible que haya podido pasar desapercibida una situación similar. Curiosamente el probando (38.III.7) de esta familia tiene medidas normales, pero debe tenerse en cuenta que en él estas resultan poco valorables por presentar pliegues epicánticos y por haber padecido un estrabismo intervenido quirúrgicamente de manera bilateral (**Figura 21D**). Por otro lado, la madre (38.III.5), no portadora de la variante p.(Arg1226\*) en *GLI2*, pero sí de la variante en *FGF8* NM\_033163.3:c.477G>A presenta también hipotelorismo (**Figura 21E**). A su vez, el único hermano no portador de ninguna de dichas variantes (38.III.10) presenta medidas completamente normales, próximas a la media o por encima de la misma (**Tabla 13** y **Figura 21F**). Algunos miembros de las familias 42 y 45 también han podido ser evaluados en este sentido, cumpliéndose en general la consideración de que

alguna de las 3 mediciones tiende a estar disminuida en aquellos portadores de alguna de las variantes en *GLI2* (**Tabla 13**).

Y aunque la valoración de una hipoplasia mediofacial puede resultar más laboriosa, resulta útil al menos indagar sobre si existe paladar estrecho u ojival, o sobre si es o ha sido necesario instaurar un tratamiento ortodóncico para ensanchar el mismo. En la familia 38, todos los portadores de la variante p.(Arg1226\*) presentan (o han presentado previamente a tratamiento con ortodoncia) algún grado de paladar estrecho u ojival. Es especialmente llamativo este hallazgo en el padre del probando (38.II.4) aun después de tratamiento ortodóncico (**Figura 19A**), siendo inicialmente considerado portador sano de la variante. Igualmente, aunque las hermanas del probando (38.III.8 y 38.III.9), también con dicha variante, presentan sólo una distancia intercantal externa disminuida, presentan igualmente paladar estrecho pendiente de corrección mediante ortodoncia, algo más marcado en la primera gemela (**Figura 19B-C**). Ambas presentan también sindactilia de los dedos 2º y 3º en ambos pies y la primera, además, la patología renal ya mencionada. Este rasgo de paladar estrecho se refiere también en múltiples de los casos de la familia publicada por Kremer Hovinga *et al.* (90), que presenta la misma variante p.(Arg1226\*). En dicha familia también parecen presentar paladar estrecho dos miembros en principio no portadores de la variante. Si bien esto podría hacer dudar de la relación de esta variante en *GLI2* con dicho rasgo, debe tenerse en cuenta que se trata de un rasgo que, de manera aislada, es evidentemente inespecífico y con otras causas posibles.

La revisión de Bear *et al.* (100) refiere ausencia de rasgos faciales significativos en el 67% de individuos con variantes potencialmente patogénicas en *GLI2*, pero en la mayoría de casos parece tratarse de datos clínicos reportados por sus respectivos facultativos, no de datos evaluados directamente por el equipo investigador. En cambio, en el estudio de Bertolacini *et al.* (273), en el que se describen exhaustivamente los rasgos faciales de los pacientes, se objetiva al menos hipotelorismo o polidactilia en los familiares portadores, al menos en el caso de variantes claramente patogénicas. La familia más extensa descrita en la literatura con múltiples miembros presentando una alteración en *GLI2* (en este caso la variante truncadora p.(Leu788Serfs\*7) muestra

penetrancia completa del fenotipo de hipopituitarismo y/o polidactilia (261–263). Otra familia muy recientemente descrita con la variante p.(Pro1167Leufs\*52) muestra penetrancia completa de, al menos, algún tipo de alteración hipofisaria (93). La segunda familia más extensa publicada (90) muestra igualmente algún tipo de afectación en todos los miembros con la variante p.(Arg1226\*). Curiosamente se trata de la misma variante que, en la familia 38 de nuestro estudio, también parece asociada a algún grado de expresión fenotípica en todos los individuos que la presentan. Así, si bien es evidente la expresividad fenotípica variable de algunos rasgos clínicos en los individuos con mutaciones en *GLI2*, ante los hallazgos aquí mencionados, proponemos la posibilidad de que en realidad pueda no existir en sentido estricto penetrancia incompleta, sino una posible penetrancia completa con al menos expresión leve de algunos rasgos faciales de línea media, muchas veces desapercibidos, como hipotelorismo o paladar estrecho u ojival. En cualquier caso, y como ya hemos mencionado, resulta evidente que, de manera independiente, determinados rasgos fenotípicos más evidentes y significativos clínicamente como el hipopituitarismo o la polidactilia presentan de manera aislada penetrancia incompleta.

#### **C.4. Expresividad variable de las alteraciones en *GLI2***

Como ya se ha mencionado, un aspecto fundamental en relación con las variantes patogénicas en *GLI2* es la gran variabilidad de su expresividad fenotípica.

##### **C.4.1. Expresividad variable entre pacientes con distintas variables patogénicas similares**

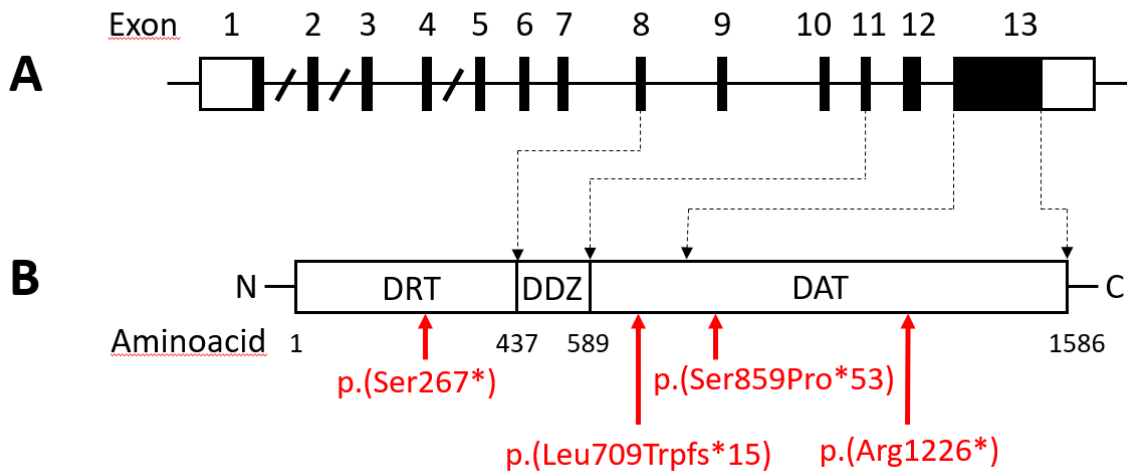
Como ya hemos desarrollado, la variabilidad fenotípica entre distintos pacientes con distintas variantes patogénicas en *GLI2* es muy significativa. En nuestro caso, considerando exclusivamente los 4 probandos con mutaciones truncadoras se observan ya diferencias importantes en cuanto a la gravedad clínica. El cuadro más severo es con diferencia el del probando 32, cuya variante p.(Leu709Trpfs\*15) presenta un truncamiento en una posición algo más temprana que las del probando 38 con la variante p.(Arg1226\*) y el probando 8

con la variante p.(Ser859Profs\*53), resultando en la pérdida de un fragmento proteico algo mayor, lo que podría hacer pensar que esto determine dicha diferente gravedad clínica. Sin embargo, el probando 42, que presenta, de las 4 variantes truncadoras aquí descritas, la situada en una posición más N-terminal y por tanto con pérdida del mayor fragmento de proteína, p.(Ser267\*), muestra el fenotipo más leve de los 4 probandos con mutaciones truncadoras. Roessler *et al.* (92) mostraron experimentalmente cómo las mutaciones truncadoras que suponen la pérdida del dominio C-terminal encargado de la activación de la transcripción, pero que conservan intactos los dominios de dedos de zinc de unión a ADN (aminoácidos 437-589), pueden tener un efecto dominante negativo, que no se presenta del mismo modo cuando el truncamiento afecta a dicho dominio de unión a ADN. Este mismo efecto dominante negativo ha sido recientemente demostrado en el estudio funcional *in vitro* de una nueva variante truncadora similar, p.(Pro1167Leufs\*52) (93). En este sentido, en nuestro estudio, la pérdida asociada del dominio de unión a ADN (que no se presenta en los probandos 8, 32 y 38) podría explicar la menor gravedad del fenotipo del probando 42 (**Figura 26**). Asimismo, resulta esperable que los truncamientos de menor extensión (situados más cerca del extremo C-terminal) se vean menos afectados por una eventual degradación de mRNA mediada por mutación terminadora (*Nonsense Mediated mRNA Decay*) y puedan ejercer por tanto con mayor probabilidad dicha función de dominancia negativa. A pesar de todo ello, curiosamente, el único paciente con HPE semilobar de la revisión de Bear *et al.* (100) era portador de la variante p.(His289Profs\*61), cuyo truncamiento es anterior al dominio de unión a ADN y, según el razonamiento previo, debería presentar un fenotipo más leve. Por lo tanto, resulta evidente que no sólo el lugar del truncamiento condiciona la gravedad del fenotipo, sino que otros factores deben de estar participando también para determinar dicha gravedad.

En la regulación de la vía SHH, según exista o no activación de la señalización, participan mecanismos postraduccionales, incluyendo la proteólisis de los extremos N-terminal o C-terminal de GLI2 y GLI3, para facilitar o reprimir la actividad transcripcional de genes diana (308,309). Si bien predomina en general la actividad facilitadora de GLI2 y represora de GLI3, ambos péptidos tienen esta potencial dualidad funcional según las modificaciones



postraduccionales. La diferente interferencia con estos procesos de modificación postraduccionales es también un potencial factor que podría influir en la expresividad variable de las distintas variantes, según la región o regiones a las que afecten.



**Figura 26.** Representación de la cadena de ADN (A) y el producto proteico (B) del gen *GLI2*. El dominio de dedos de zinc de unión a ADN (DDZ) se encuentra entre los aminoácidos 437 y 589, lo cual corresponde a un fragmento de ADN que incluye desde parte del exón 8 hasta parte del exón 11. El dominio activador de la transcripción (DAT) se presenta en el extremo C-terminal y el represor (DRT) en el extremo N-terminal. Así, las mutaciones truncadoras que no afecten al DDZ (principalmente en el exón 13, que codifica casi el 50% de la proteína, pero también en el 12 y parte del 11), además de tener un efecto deletéreo en lo que se refiere a activar la transcripción por impedir la traducción del dominio de transactivación C-terminal, podrían tener un efecto dominante negativo por mantener su capacidad de unión a ADN y un dominio represor de la transcripción intacto (92,93). Se muestra la ubicación de las 4 mutaciones truncadoras descritas en este estudio. Se puede ver cómo la variante p.(Ser267\*), presente en el probando 3, impide la transcripción del dominio DDZ, lo cual le impediría ejercer el efecto dominante negativo que sí podrían tener en principio las otras tres variantes.

#### C.4.2. Expresividad variable intrafamiliar de una misma variante en *GLI2*

Además de la variabilidad fenotípica entre pacientes con distintas mutaciones aparentemente similares, se observa también una gran variabilidad de la expresión fenotípica entre distintos familiares portadores de una misma variante patogénica. En la familia 38 del presente estudio (una de las 3 familias

con variantes patogénicas en *GLI2* más extensas descritas en la literatura científica), se muestran 8 miembros con la variante en *GLI2* p.(Arg1226\*). Si bien todos tienden a compartir algunos rasgos como el paladar estrecho o cierto grado de hipotelorismo, la expresividad es extremadamente variable: desde un feto abortado de 27 semanas con un cuadro con gran expresividad fenotípica (incluyendo, labio leporino y fisura palatina bilaterales, hipoplasia mediofacial, hipoplasia/displasia renal y una posible HPE) hasta individuos considerados sanos, en los que sólo se ha detectado paladar estrecho y/o hipotelorismo. Tres individuos presentan polidactilia, otros dos presentan anomalías renales y el probando 38 es el único miembro de la familia de momento con hipopituitarismo.

França *et al.* (262) describieron una familia con 9 portadores de la variante truncadora p.(Leu788Serfs\*7). Los 9 presentaban polidactilia postaxial, con variable afectación uni o bilateral, así como de manos y/o pies. Sólo 4 presentaban hipopituitarismo: 2 DAGH, otro con deficiencia de GH, TSH y gonadotropinas, y el caso índice con una deficiencia de todas las hormonas adenohipofisarias. El caso índice además presentaba anomalías cerebrales, retraso psicomotor y crisis epilépticas de difícil control. Ninguno presentaba en principio anomalías faciales de línea media. Con posterioridad se describieron otros dos familiares lejanos de esta familia, residentes en otra ciudad, y portadores de la misma variante en *GLI2* en heterocigosis (261,263). Ambos presentaban un fenotipo muy similar entre sí, con DAGH, hipoplasia hipofisaria y neurohipófisis ectópica, pero, a diferencia del resto de familiares, ambos presentaban anomalías faciales de línea media (ambos incisivo central único y uno de ellos además fisura palatina) y ninguno de los dos presentaba polidactilia. La familia recientemente descrita por Kremer-Hovinga *et al.* (90) incluye 10 miembros con la variante en *GLI2* p.(Arg1226\*). 4 presentan polidactilia (2 unilateral y 2 bilateral), 5 hipopituitarismo, 5 paladar estrecho, 2 hipotelorismo, 2 defectos septales cardíacos, 2 estenosis uretral y uno incisivo central único. El paciente con un fenotipo más expresivo es el caso índice, en el que se asocian hipopituitarismo, polidactilia bilateral, incisivo central único, hipotelorismo, paladar estrecho y estenosis uretral. En esta familia también se analizaron las regiones codificantes de varios genes pertenecientes a la vía de señalización

SHH (*SHH*, *SIX3*, *ZIC2*, *TGIF*, *DISP1*, *PTCH1* y *GLI3*) sin encontrar hallazgos significativos.

Con estos tres ejemplos de familias que incluyen múltiples individuos con una misma variante patogénica en *GLI2* se puede observar la gran variabilidad de la expresión fenotípica intrafamiliar. La presencia de hipopituitarismo es claramente mayor en las 2 familias descritas en la literatura (6/11 y 5/10 respectivamente) que en la del presente estudio, en la que sólo el probando lo tiene diagnosticado por el momento. En esto pueden influir varios elementos. Por un lado, la gravedad del fenotipo del feto aborto portador de la variante hace probable que hubiera presentado clínicamente hipopituitarismo en caso de que la gestación hubiera llegado a término. Sólo se ha realizado RMN al padre del probando, con hallazgos normales. Es posible que algún otro portador tenga alguna anomalía hipofisaria en RMN y/o alguna anomalía hormonal no diagnosticada, pero que en cualquier caso no sería lo suficientemente intensa como para que se haya mostrado clínicamente. Por otro lado, en el HIC las deficiencias hipofisarias pueden ir apareciendo clínicamente de forma evolutiva, y las hermanas del probando tienen actualmente sólo 7 años de edad. Y, en cualquier caso, en ninguna de las 2 primeras familias referidas en la literatura se ha estudiado de manera exhaustiva la posible presencia de otras variantes en otros genes que puedan determinar la mayor o menor probabilidad de desarrollar hipopituitarismo en los distintos portadores. En nuestra familia 38, en la que se ha analizado mediante el panel de secuenciación masiva HIPOPIT\_V3 a todos los portadores de la variante en *GLI2*, el caso índice es el que presenta un mayor número de variantes relevantes en genes relacionados con el HIC. Esto podría justificar que, en esta familia, sólo el probando presente un fenotipo hipofisario patológico. En la familia descrita inicialmente por França *et al.* (262) se muestra un hecho interesante. Todos los 9 portadores descritos en un primer momento expresan polidactilia, rasgo que no aparece en los 2 familiares lejanos residentes en otra ciudad descritos con posterioridad, que presentan la misma variante patogénica en *GLI2*. Y, al contrario, éstos 2 últimos presentan incisivo central único (uno con fisura palatina asociada) y en los 9 primeros no se refieren anomalías faciales de línea media. Este último dato puede deberse a una evaluación no lo suficientemente exhaustiva en el caso de los primeros 9

portadores (descritos en el año 2010, sin gran parte del conocimiento sobre *GLI2* que hoy tenemos), ya que, como ya hemos mencionado, es posible que rasgos como un paladar estrecho o un hipotelorismo leve pasen desapercibidos si no se buscan de manera activa. Pero la polidactilia es un rasgo más objetivo. El hecho de estas diferencias puede deberse a factores ambientales (residentes en dos ciudades distintas) (263) o a otros factores genéticos (al tratarse de familiares lejanos la carga genética compartida es menor entre los dos grupos de portadores, que entre los miembros del mismo grupo).

## **C.5. Etiología multifactorial**

Lo que queda claro a la vista de lo mostrado en los apartados anteriores acerca de la variabilidad de la expresión del fenotipo patológico de las anomalías en *GLI2*, es que necesariamente deben existir otros factores (ambientales, genéticos y/o epigenéticos) que modulen la expresión fenotípica de dichas alteraciones.

### **C.5.1. Participación de factores ambientales en la expresividad variable de las alteraciones en *GLI2***

La posible participación de factores ambientales en este sentido ha sido demostrada en algunos estudios en ratones (76,78,79). En ellos se observa cómo los ratones con alteraciones en heterocigosis en *GLI2* y sometidos a ciertos efectos teratogénicos prenatales muestran una mayor penetrancia y un fenotipo de mayor gravedad, frente a los que portan la misma alteración genética sin ser expuestos al teratógeno y frente a los que son expuestos al teratógeno sin portar la mutación. Así, la suma de efectos genéticos y ambientales condiciona el fenotipo final. En nuestro estudio, vemos también cómo fenómenos no exclusivamente genéticos deben necesariamente participar en el caso de la hermana del probando 38 (38.III.8) afecta de una anomalía importante del desarrollo renal, gemela idéntica de la 38.III.9 (y por tanto en principio con los mismos factores genéticos), quien no presenta ninguna anomalía nefrourológica. Sin olvidar la posible participación de fenómenos epigenéticos, debemos recordar la posibilidad de que determinados eventos obstétricos (hemorragias

durante la gestación, hipoxia, parto en presentación cefálica, fórceps...) puedan estar influyendo en la mayor o menor penetrancia y expresividad clínica del hipopituitarismo (discutido en el apartado “A.7.1. Factores ambientales: Correlaciones fenotipo-antecedentes obstétricos y genotipo-antecedentes obstétricos” dentro de la sección A de esta *Discusión*). Sin embargo, en todos los portadores de la variante p.(Arg1226\*) en la familia 38 (salvo en el feto aborto 38.III.4) se refieren gestaciones y partos normales, por lo que, aunque puedan existir, carecemos de datos ambientales concretos que permitan explicar en este caso la variabilidad intrafamiliar.

### **C.5.2. Participación multifactorial genética: Oligogenicidad**

Desde el punto de vista exclusivamente genético, los factores que podrían estar actuando de manera simultánea para modular un determinado fenotipo serían principalmente otras variantes genéticas presentes en otros genes implicados en el desarrollo de los mismos elementos embrionarios. Así, la presencia agrupada de distintas combinaciones de alteraciones genéticas y, en consecuencia, de sus correspondientes efectos en distintos puntos de una o varias vías de señalización o procesos del desarrollo embrionario, podría justificar la variabilidad fenotípica, e incluso la penetrancia incompleta.

Los 11 probandos aquí descritos presentan, además de una o varias variantes en *GLI2*, al menos alguna otra variante relevante en otros genes con implicación demostrada o potencial en el desarrollo embrionario de la región hipotálamico-hipofisaria, e incluidos en los paneles de genes empleados.

Tal y como se ha mencionado previamente, está plenamente aceptada la etiología oligogénica en un porcentaje significativo de casos de HHC (44) y, cada vez con mayor evidencia, existen datos (entre ellos los resultados del presente estudio en la cohorte completa) que sugieren una situación similar en el caso de otras formas de HIC, habiéndose publicado ya algunos casos con alteraciones en varios genes, especialmente en el contexto de un síndrome del tallo hipofisario interrumpido (37,39,74,75). En algunos de estos casos publicados *GLI2* es uno de los genes participantes (37,39).

Existen pocos estudios publicados en los que se describan pacientes con alguna variante en *GLI2* que hayan investigado la posibilidad de modelos de herencia digénica u oligogénica. Si bien distintos estudios recientes han planteado un modelo de herencia poligénico complejo abordado mediante técnicas de secuenciación masiva, sólo tres de ellos analizan pacientes con HIC y describen en suma 6 de estos pacientes con alguna variante en *GLI2* en un contexto oligogénico (37,39,306). Un artículo reciente centrado en el estudio de pacientes con HPE (incluyendo pacientes con anomalías faciales de línea media sin anomalías cerebrales) describe hasta 13 pacientes que presentan alguna variante en *GLI2* junto con variante(s) en otro(s) gen(es) (67). Sin embargo, algunas de las variantes identificadas en *GLI2* están clasificadas como probablemente benignas y de varios de dichos pacientes no se aportan datos fenotípicos. De los estudios restantes, uno apenas refiere datos clínicos sobre los cuatro pacientes que describe (310) y otro se centra en el estudio de pacientes con enfermedad de Hirschprung grave (305). Los otros tres describen casos puntuales con alguna otra variante asociada (185,274,278). En conjunto, menos de 30 pacientes han sido previamente publicados en la literatura con alguna alteración relevante en *GLI2* en asociación con otras variantes en otros genes (casi todos en el último año y la mayoría sin que se haya evaluado específicamente un posible HIC) (37,39,67,185,274,278,305,306,310,311), y todos ellos se resumen en el **Anexo 7**. Por lo tanto, con 11 probandos descritos (y múltiples familiares estudiados), el presente estudio representa una de las principales contribuciones hasta la fecha al estudio de la posible participación de *GLI2* en la etiología del HIC en un contexto de oligogenicidad.

#### **C.5.2.1. Agrupación de hitos genéticos procedentes de distintos progenitores**

Entre los casos en los que disponemos de estudio genético familiar (8 de 11), podemos observar cómo, en todos menos uno, el probando acumula variantes relevantes transmitidas, no heredadas exclusivamente de un solo progenitor.

El único paciente en el que todas las variantes que presenta son heredadas en bloque de uno de los progenitores es el probando 74. Este

paciente presenta tres variantes no sinónimas en *GLI2*, una delección de 5 codones sin alteración del marco de lectura en *ZIC2* y una variante no sinónima en *ALMS1*, todas ellas en heterocigosis (**Tabla 12**). Como podemos observar en la **Figura 25**, la madre presenta igualmente las 5 variantes, y en ella las 3 variantes de *GLI2* se presentan en homocigosis. En este caso carecemos de datos fenotípicos de la madre, lo que no permite confirmar ni descartar la posible implicación de esta acumulación de variantes como causa de la patología en el probando, si bien la presencia en homocigosis de las tres variantes de *GLI2* en la madre hace que disminuya, *a priori*, la probabilidad de una repercusión significativa de las mismas.

Dos de las variantes identificadas en nuestro estudio son *de novo*: la variante en *GLI2* p.(Leu709Trpfs\*15) del probando 2 y la variante en *SMAD2* p.(Gly314Val) del probando 9. Y en dos familias (familias 3 y 8) sólo ha podido ser estudiado genéticamente un progenitor (por haber fallecido el otro con anterioridad), pero en ambos casos el probando presenta variantes no heredadas del único progenitor estudiado (si bien no puede confirmarse si son todas heredadas del otro progenitor o alguna se presenta *de novo*).

En global, este patrón de acumulación en la mayoría de probandos de variantes en genes implicados o potencialmente implicados en el desarrollo embrionario de la región hipotalámico-hipofisaria, no presente en los progenitores sanos, respalda la hipótesis de la herencia oligogénica en la etiología del HIC.

Dentro de este modelo oligogénico como causa de un fenotipo patológico puede ocurrir que, en algunos casos, se sumen en un mismo paciente dos o más variantes en distintos genes con funciones no relacionadas entre sí, cada una de las cuales, de manera independiente, sea capaz de expresar un determinado fenotipo patológico. En este caso, la expresión del fenotipo del paciente será una combinación de los rasgos fenotípicos determinados por cada una de las variantes de manera independiente. Podemos observar esta situación en el paciente recientemente descrito por Sajjan *et al.* (306), en el que se presenta la variante truncadora en *GLI2* p.(Arg550Profs\*53) junto a una disomía uniparental materna del cromosoma 20. Los autores muestran cómo parte de los rasgos

fenotípicos del paciente se explican por la variante en *GLI2* y otra parte por la disomía uniparental, de manera más o menos estanca. Esta misma situación parece ser el factor predominante en el estudio de Posey *et al.* (310), si bien carecemos de datos fenotípicos concretos de los pacientes incluidos en el mismo. En nuestro caso, una situación parecida, aunque no de manera completamente estanca, ocurre en el caso del probando 69, que se discute más adelante.

En otros casos puede ocurrir que las distintas variantes que presenta un paciente no sean lo suficientemente graves como para ser capaces de manera independiente de causar un fenotipo patológico (o lo hagan de manera muy leve), pero su implicación en los mismos procesos o su interrelación o solapamiento funcional permitan que, la presencia acumulada de las mismas, suponga una anomalía que sí se exprese de manera significativa en el fenotipo (o lo haga con una mayor gravedad). La mayoría de los casos del presente estudio se ajustan mejor a este modelo de herencia oligogénica.

Dentro de este modelo, podemos encontrar casos en los que, en un paciente, se acumulen variantes en genes que participan dentro una misma vía de señalización y puedan así explicar un fenotipo patológico. También podremos tener casos en los que las variantes acumuladas afecten cada una a una vía de señalización diferente, pero en los que la interrelación de las vías finalmente permita el efecto sumatorio deletéreo de las variantes. Y finalmente, podremos tener casos en los que se presenten conjuntamente, tanto varios hitos genéticos afectando a una misma vía de señalización, como otros afectando a otras vías.

#### **C.5.2.2. Agrupación de hitos genéticos en una misma vía de señalización**

Es posible que una única anomalía en una vía de señalización, aun cuando pueda demostrarse experimentalmente que dicha anomalía implica cierto grado de repercusión funcional, no suponga una alteración suficiente en el funcionamiento de dicha vía como para dar lugar a la expresión de un fenotipo concreto. De la misma manera, resulta razonable suponer que la presencia de anomalías en varios puntos de la misma vía de señalización supondrá, con



mayor probabilidad, una repercusión sobre dicha vía y, por tanto, una mayor probabilidad de expresión de un determinado fenotipo patológico.

En nuestro estudio podemos observar cómo, en varios de los probandos, se acumulan variantes relevantes en distintos genes relacionados con una misma vía de señalización.

El probando 42 presenta variantes relevantes en 3 genes relacionados con la vía SHH (*GLI2*, *DISP3* y *PITX2*), y en dos genes relacionados con la vía NODAL, rama a su vez de la vía BMP/TGF- $\beta$  (*FOXH1* y *PITX2*). La madre, sana, sólo es portadora de las variantes en *GLI2* y *DISP3*, por lo que el probando es el único con las 3 variantes en los genes relacionados con la vía SHH (*GLI2*, *PITX2* y *DISP3*). Al no haber sido posible el estudio genético del padre, no podemos confirmar si éste presentaba de manera conjunta las dos variantes en *FOXH1* y *PITX2*, o si alguna se presenta *de novo* en el probando.

El probando 8 presenta variantes relevantes en 3 genes relacionados con la vía SHH (*GLI2*, *EYA4*, *FKBP8*), en 2 genes relacionados con la vía WNT (*EYA4*, *AXIN1*) y en 2 genes relacionados con la vía NOTCH (*RBPJ*, *DNER*). No ha sido posible el estudio familiar, por lo que desconocemos el origen parental de las mismas.

De manera similar ocurre en los siguientes probandos, en los que, además de poder presentar otras alteraciones, se acumulan varias variantes en genes relacionados con una misma vía de señalización (se muestra la procedencia paterna, materna o *de novo* de cada una de las variantes en la **Figura 18**).

Probando 45:

- Vía SHH: Variantes en los genes *GLI2* y *IFT172*
- Vía WNT: Variantes en *CHD7*, *PPHLN1*, *SYNPO2* y *KLF4*
- Vía BMP/TFG- $\beta$ : Variantes en los genes *ZFYVE9* y *TGFBR2*
- Vía NOTCH: Variantes en los genes *KLF4* y *AKT1S1*

Probando 54:

- Vía SHH: Variantes en los genes *GLI2* y *GLI3*
- Vía WNT: Variantes en los genes *SPRY4* y *DVL2*

Probando 51:

- Vía BMP/TFG- $\beta$ : Variantes en los genes *ZNF8* y *OVOL1*

Probando 69:

- Vía SHH: Variantes en los genes *GLI2* y *DISP3*
- Vía BMP/TFG- $\beta$ : Variantes en *SMAD2*, *TSPYL2* y *STAT3*.

Probando 74:

- Vía SHH: Variantes en los genes *GLI2* y *ZIC2*

### **C.5.2.3. Agrupación de hitos genéticos en la vía de señalización SHH**

Dado que esta sección de la discusión profundiza en el estudio de *GLI2*, uno de los factores de transcripción principales de la vía SHH, discutimos aquí sobre la presencia de hallazgos en varios genes relacionados con esta vía en algunos de los probandos con alteraciones en este gen. 5 de los 11 probandos presentan variantes en más de un gen relacionado con la vía SHH.

Como ejemplo, vamos a profundizar en el caso del probando 54, una niña con fenotipo de DCHH (GH y TSH) con hipoplasia hipofisaria (neurohipófisis y tallo normales), con ambos padres sanos. En este caso, además de las variantes mencionadas en *SPRY4*, *TRAPPC9* y *DVL2* (genes relacionados con otras vías de señalización diferentes a la SHH), el probando acumula la variante *delins* p.(Met1444\_Leu1445delinsllePhe) en *GLI2*, con afectación funcional parcial (94) y la variante en *GLI3* p.(Gly727Arg).

*GLI3* es otro factor de transcripción de dedos de zinc con un papel fundamental en la vía SHH, en la cual puede participar como activador o represor de la transcripción de genes según su procesamiento postraducciona, que a su vez depende de si existe o no señalización SHH (312). Esta variabilidad de efectos puede explicar que las anomalías en *GLI3* se hayan relacionado con varios fenotipos patológicos, entre los que se encuentran el síndrome de Pallister-Hall, el síndrome de cefalopolisindactilia de Greig y varias formas de polidactilia aislada (312). Recientemente se han publicado dos casos de HIC en los que, en un contexto oligogénico, aparece alguna variante no sinónima en *GLI3* (74). La variante p.(Gly727Arg) en *GLI3*, en el probando 7, se presenta en

homocigosis. Dicha variante en *GLI3* ha sido descrita en una familia con polidactilia tipo A/B (98) y se clasifica como probablemente patogénica según los criterios ACMG (80). OMIM ha reclasificado recientemente dicha variante como VUS (312) atendiendo a la frecuencia alélica poblacional de la misma, al figurar en la base de datos ExAC en 693 de 121.412 alelos y en 4 individuos en homocigosis, con una frecuencia alélica por tanto del 0,5%. Si bien estos datos poblacionales no apoyan de inicio la posible implicación de dicha variante de manera aislada en un fenotipo patológico, hay que tener en cuenta algunas otras consideraciones. La predicción de patogenicidad *in silico* es elevada en prácticamente todas las herramientas bioinformáticas utilizadas y se encuentra en una posición muy conservada (GERP\_RS score 5,82). En nuestro caso se presenta en homocigosis en el probando, siendo cada alelo heredado de cada uno de los progenitores sanos, quienes lo presentan en heterocigosis. En el probando dicha variante en *GLI3* se presenta asociada a la variante de *GLI2* con repercusión funcional *in vitro* (además de asociada a las otras 3 variantes en genes relacionados con otras vías). Si bien la madre también presenta las variantes en *GLI2* y en *GLI3*, en ella esta última se encuentra en heterocigosis. Además, dicha variante se ha descrito en una familia con polidactilia, fenotipo claramente ligado a las anomalías de la vía SHH, y en concreto a las del gen *GLI3* (98). En dicho estudio no se analizó la posible presencia simultánea de anomalías en otros genes distintos a *GLI3*. Así, si bien los datos poblacionales no permiten avalar una especial gravedad de dicha variante de manera independiente, los datos aquí mostrados permiten sugerir que dicha variante en homocigosis en *GLI3* esté participando, dentro de un modelo de herencia oligogénica, en la expresión del fenotipo patológico tanto en nuestro caso como, posiblemente también, en el caso de la familia descrita por Radhakrishna *et al.* (98).

Resulta así evidente cómo la suma de alteraciones genéticas en la vía de señalización SHH, que de manera aislada no causan la aparición de un fenotipo patológico, al presentarse conjuntamente en el mismo paciente aumentan la probabilidad de una expresión clínica por el efecto combinado de las mismas.

En cualquier caso, el probando 54 presenta además las siguientes variantes que en conjunto también pueden contribuir a la expresión del fenotipo patológico:

- Variante *missense* p.(Ser241Tyr), en *SPRY4*, considerada factor de riesgo de desarrollo de HHC, discutida previamente en el apartado “A.3.3. *Combinaciones variables de alteraciones en las vías SHH, FGF y NODAL por las variantes relevantes detectadas*”, dentro de la sección A de la *Discusión*.
- Variante *missense* p.(Arg285Trp), en *TRAPPC9* (gen de elevada expresión en hipotálamo e hipófisis y que interacciona con *PITX1*) con una muy elevada predicción de patogenicidad *in silico*, conservación y baja frecuencia alélica.
- Variante *missense* p.(Asn451Asp) en *DVL2* (gen relacionado con las vías de señalización WNT y NOTCH), prácticamente ausente en todas las bases de datos poblacionales, con alta predicción de patogenicidad e incluida dentro del dominio DEP de la proteína, el cual es imprescindible para la adecuada puesta en marcha de la señalización intracelular de la vía WNT canónica dependiente de  $\beta$ -catenina (313).

#### **C.5.2.4. Agrupación de hitos genéticos aislados en distintas vías de señalización**

Además de la posible afectación de una única vía de señalización en varios puntos, debe tenerse en cuenta el delicado equilibrio entre las distintas vías de señalización SHH, BMP, FGF, WNT y NOTCH, imprescindible para la adecuada inducción de la formación de la bolsa de Rathke, así como para la proliferación y diferenciación de las diversas estirpes celulares adenohipofisarias (1). Dichas vías de señalización presentan una interrelación tal, que resulta razonable postular que la suma de anomalías en varias de las vías (aunque se trate de una única anomalía en cada vía) también aumente la probabilidad de una alteración del proceso de desarrollo embrionario de la región hipotálamico-hipofisaria, con la consiguiente expresión de un fenotipo patológico, o de su expresión con una mayor gravedad.

En la familia 38, el probando es el único portador de la variante en *GLI2* p.(Arg1226\*) que expresa de manera evidente un fenotipo de HIC. No presenta alteraciones en otros genes relacionados con la vía SHH, pero sí en genes relacionados con otras vías (aunque no en varios genes relacionados con una misma vía). Presenta en el gen *FGF8* la variante sinónima c.477G>A, heredada de la madre, que podría afectar al proceso normal de *splicing* por activación, predicha *in silico*, de un nuevo aceptor dentro del exón 6. El *splicing* alternativo podría suponer la pérdida de 34 pb (c.445\_478) al inicio del exón 6 y un cambio del marco de lectura a partir de la posición aminoacídica 149 con codón de parada prematuro tras 45 codones. En modelos murinos, la deficiencia de *GLI2* se traduce en una menor expresión de *FGF8* y *BMP4*, factores fundamentales en el proceso de desarrollo inicial de la bolsa de Rathke (168). Resulta interesante observar que dicha variante en *FGF8* (heredada de la madre) no aparece en ningún otro familiar portador de la variante en *GLI2*. También es interesante el hecho de que la madre, portadora de dicha variante en *FGF8*, presenta hipotelorismo sin portar la variante en *GLI2*, y que las anomalías en el gen *FGF8* se hayan relacionado en humanos, además de con el fenotipo de HHC (44), con el espectro fenotípico de las alteraciones de línea media (66,67,186) y el HIC (59). Así, si la repercusión de la variante en *FGF8* (principal ligando de la vía FGF en el desarrollo hipofisario) es lo suficientemente significativa, dicha anomalía podría colaborar conjuntamente con la variante en *GLI2* (efector de la vía SHH) en facilitar la expresión de un fenotipo hipofisario patológico, debido a la interrelación y equilibrio existente entre las distintas vías de señalización. Además, en el probando 38, también se acumulan variantes en los genes *SIM1*, *TRIP11* y *ALK*. *SIM1* participa en el proceso de desarrollo embrionario de varios núcleos hipotalámicos, y su deficiencia en modelos murinos supone la ausencia en dichos núcleos de algunos tipos de neuronas productoras de péptidos neuroendocrinos reguladores de la secreción de hormonas hipofisarias (314). El gen *TRIP11* está relacionado con la vía de señalización WNT (82). *ALK* es un gen que, si bien es principalmente conocido por participar en una proteína de fusión producida por reordenamientos cromosómicos en el contexto de linfomas, ha sido también implicado a través de modelos murinos en la etiología del HHC (95). Se trata por tanto de un nuevo ejemplo significativo de potencial

participación sumatoria de distintos hitos genéticos implicados en distintos procesos y vías de señalización.

#### **C.5.2.5. Agrupación de múltiples hitos genéticos dentro de una misma vía y en distintas vías de señalización**

La mayoría de los probandos del presente estudio presenta anomalías en varios genes relacionados con una misma vía, pero también en otros relacionados con otras vías. Un buen ejemplo a este respecto lo constituye el probando 69, cuyo cuadro clínico incluye una DCHH de diagnóstico neonatal con hipoplasia hipofisaria y neurohipófisis no visible, anomalías digitales (camptodactilia), pies equinovaros, crisis epilépticas, retraso psicomotor y una insuficiencia respiratoria congénita, dependiente de CPAP, por una de cuyas exacerbaciones falleció a los 4 meses de edad. Como se ha descrito, era portador de la pareja de variantes en *GLI2* p.(Asp1520Asn) y p.(Met1352Val) en heterocigosis y situadas en el mismo alelo. Ambos padres, consanguíneos (primos), son portadores de la misma pareja de variantes en heterocigosis, pero ninguno de ellos presenta una anomalía hipofisaria significativa que haya precisado estudio clínico ni ninguno de los rasgos patológicos mencionados. Si bien las variantes en *GLI2* podrían participar en el fenotipo de hipopituitarismo, su presencia en ambos padres sanos impide atribuirles una causalidad exclusiva. Por otro lado, la epilepsia, camptodactilia, pies equinovaros e insuficiencia respiratoria no forman parte del fenotipo habitual de pacientes con alteraciones en *GLI2*. Por todo ello, otros factores deben participar o haber participado también para determinar su fenotipo. En dicho probando 69 se acumulan múltiples variantes afectando a diversas vías, que pueden ayudar a explicar esta variabilidad fenotípica en la familia.

Por un lado, la vía SHH se puede ver afectada por las variantes en los genes *GLI2* y *DISP3*. La variante en *GLI2* p.(Asp1520Asn) supone repercusión funcional en la proteína con disminución de su actividad transcripcional *in vitro* (94). *DISP3* (también llamado *PTCHD2*) es un receptor de 12 dominios transmembrana, que se expresa de manera relevante en la hipófisis y el hipotálamo y que participa en la proliferación y diferenciación de células progenitoras neuronales (315). Presenta una región homóloga a *PTCH1*

(receptor de SHH) y un 25% de homología con DISP1 (316), proteína transmembrana con función liberadora al medio de los ligandos SHH en las células que los producen (317). La variante en *DISP3*, NM\_020780.1:c.2075T>A, p.(Val692Glu), que aparece en el probando, presenta una frecuencia alélica muy baja, un elevado grado de conservación de su posición y una elevada predicción de patogenicidad.

Por otro lado, el probando presenta varios hallazgos en genes relacionados con la vía BMP/TGF- $\beta$ : *SMAD2*, *TSPYL2* y *STAT3*.

*SMAD2* es uno de los elementos principales de la cascada intracelular de la vía TGF- $\beta$  (en concreto de la rama que depende del receptor TGFBR-1). Tras la unión del ligando correspondiente con dicho receptor (del tipo serín/treonín kinasa), éste se activa y se produce la fosforilación de *SMAD2*, que puede entonces unirse a *SMAD4* y, así unidos, pasar al núcleo para actuar como factores de transcripción en combinación con elementos coactivadores o represores (318). En el gen *SMAD2*, la variante NM\_001003652.3:c.941G>T, p.(Gly314Val) presente en el probando se sitúa dentro del dominio MH2, el cual es necesario para la interacción con *SMAD4* y para la activación de la transcripción (318). Se trata además de una nueva variante que no aparece recogida en las bases de datos gnomAD, 1000 Genomes y ESP6500 y que se presenta *de novo* en el paciente. Todo ello supone una probabilidad muy elevada de que dicha variante en *SMAD2* p.(Gly314Val) repercuta en el adecuado funcionamiento de dicha vía de señalización.

El gen *TSPYL2* es uno de los genes cuya transcripción aumenta en respuesta a la activación de la misma rama de la vía TGF- $\beta$  (319). La hipófisis es uno de los tejidos en los que más se expresa este gen (320). Se encuentra localizado en el cromosoma X y, en nuestro probando, la variante NM\_022117.3:c.1037G>A, p.(Arg346Gln) en *TSPYL2* se presenta en hemicigosis, heredada de la madre sana, portadora de la misma en heterocigosis. Su frecuencia alélica es extremadamente baja y presenta una elevada predicción de patogenicidad.

STAT3 es un factor de transcripción que participa en la cascada intracelular de algunas vías, principalmente en respuesta a la acción de citocinas como IL6, pero se ha demostrado que también interacciona, ejerciendo una regulación recíproca, con proteínas SMAD de la vía de señalización TGF- $\beta$  (321), y especialmente con SMAD3, la cual ejerce un papel alternativo similar a SMAD2 en la cascada de señalización dependiente del receptor TGFBR-1. La variante en *STAT3*, NM\_139276.2:c.373C>G, p.(Gln125Glu), presente en el probando, a pesar de no presentar una predicción de patogenicidad tan elevada como las dos variantes anteriores, tiene una frecuencia alélica baja y su posición, altamente conservada, corresponde al primer nucleótido del 5<sup>o</sup> exón, lo que podría facilitar alguna anomalía en el proceso de *splicing*.

Tenemos así en el mismo probando tres hitos relevantes que afectan a la vía TGF- $\beta$  cuya acumulación podría determinar un efecto deletéreo sobre la misma. La vía TGF- $\beta$  participa en multitud de órganos y tejidos, especialmente en procesos de desarrollo embrionario, proliferación, diferenciación celular y homeostasis. Entre otros, es imprescindible para el desarrollo embrionario pulmonar, y su disfunción en modelos murinos se asocia a anomalías del desarrollo pulmonar que en muchos casos conducen a letalidad perinatal de causa respiratoria (322). La camptodactilia y los pies equinovaros forman parte del espectro de anomalías observadas en el síndrome de Loeys-Dietz tipo 1 (MIM# 609192), el cual se debe a alteraciones monoalélicas en el gen *TGFBR1*, que codifica para el receptor TGFBR-1 de la vía TGF- $\beta$ . Y si bien aún resultan inciertos los mecanismos, también la vía TGF- $\beta$  parece tener una potencial implicación en la aparición de crisis epilépticas (323,324). Todo esto sugiere que el fenotipo patológico extrahipofisario que presenta el probando podría justificarse por la presencia de alguna de las anomalías (o la suma de todas) observadas en los genes *SMAD2*, *TSPYL2* y *STAT3*.

Sobre la posible participación de estas tres variantes en el fenotipo hipofisario del probando podemos hacer las siguientes consideraciones. Es conocido el importante papel de la vía BMP (rama de la vía BMP/TGF- $\beta$ ) en el desarrollo embrionario de la hipófisis. En concreto BMP4, como se ha desarrollado en la sección B de la *Discusión*, tiene un papel fundamental en el proceso de inducción inicial de la formación de la bolsa de Rathke (2). Pero en



la rama BMP de la vía TGF-  $\beta$  no participan SMAD2 ni SMAD3, por lo que los hallazgos descritos en el probando no participarían interfiriendo en dicho proceso. En cambio, la vía de señalización NODAL (otra rama de la vía TGF-  $\beta$ ) sí comparte y precisa de SMAD2 y SMAD3 en su cascada intracelular. Y la vía NODAL sí tiene funciones reguladoras del desarrollo embrionario de la hipófisis, regulando entre otros procesos, la vía SHH en el prosencéfalo ventral (164) y la expresión de PITX2 (325). PITX2 es un factor necesario en el proceso de expansión de la bolsa de Rathke posterior a su inducción, en el que actúa sobre el mantenimiento y proliferación de células progenitoras de la adenohipofisis (2). El posible efecto sobre la vía SHH por la disfunción de la vía NODAL se sumaría a los ya descritos debidos a las variantes en *GLI2* y *DISP3*, con las que podría colaborar así en la mayor expresividad del fenotipo hipofisario del probando.

Por otro lado, el propio gen *STAT3* ya mencionado, relacionado con la vía SHH, tiene también funciones a otros niveles relevantes para el caso. Entre dichas funciones destaca un papel regulador positivo de la expresión de *SOX2* (326), gen cuyas alteraciones pueden implicar un fenotipo de HIC (habitualmente con hipoplasia adenohipofisaria) asociado frecuentemente a otras alteraciones (principalmente a nivel ocular), si bien la expresividad es variable (29). *STAT3* también parece tener la capacidad de unirse al promotor del gen *GH1*, que codifica la GH y estimular su transcripción, al menos en células tumorales productoras de GH (327). Igualmente, *STAT3* desempeña un papel fundamental en la cascada intracelular de la vía de señalización de la leptina, proteína con múltiples funciones reguladoras (con especial relevancia del metabolismo energético) y cuyas alteraciones están implicadas en la etiología, entre otros fenotipos patológicos, de algunos casos de HHC (44).

Pero además de esta acumulación de variantes afectando a las vías SHH y BMP-TGF- $\beta$ , en el probando 69 se acumula también otro grupo de variantes relevantes en genes con participación en diversos procesos. El gen *ROR2* presenta la variante NM\_004560.3:c.2395C>T, p.(Pro799Ser). *ROR2* es un receptor sobre el que actúa el ligando WNT5A y que participa en la vía de señalización WNT no canónica (328), la cual precisa un adecuado equilibrio con la vía WNT canónica para la adecuada formación de la bolsa de Rathke (329). En el gen *IGSF10* (que participa en el proceso de migración de las neuronas

GnRH), la variante NM\_178822.4:c.4804G>T, p.(Glu1602\*) que presenta el probando ha sido descrita con anterioridad en pacientes con retraso puberal (101). Se trata de una variante truncadora que implica la pérdida del 39% de la cadena proteica, incluyendo casi todos los dominios IG-like C2. En el gen *PLEKHA5*, gen candidato a participar en la etiología del HCC (102), presenta la variante no sinónima NM\_019012.5:c.350G>A, p.(Arg117Gln), con elevada predicción de patogenicidad.

Dada la consanguinidad de los padres de este probando 69, esperaríamos *a priori*, asumiendo un modelo exclusivamente monogénico, alguna probable alteración en homocigosis. Sin embargo, ninguna de las variantes relevantes identificadas se encuentra en homocigosis, y sólo la variante en *TSPYL2* se encuentra en hemocigosis en el paciente. Es cierto en cualquier caso que el panel de genes utilizado está orientado al estudio de la patología hipofisaria y de la línea media craneofacial, por lo que no podemos descartar por completo que pueda existir alguna alteración de carácter recesivo en el probando que influya en el fenotipo. Pero en cualquier caso, por todo lo expuesto, los hallazgos de este estudio genético nos permiten proponer una explicación oligogénica para explicar la variabilidad fenotípica en esta familia. Así, podemos afirmar que el fenotipo extrahipofisario del probando 69 puede explicarse por las anomalías que afectan a la vía TGF- $\beta$ , con mayor relevancia probable de las variantes en *SMAD2* p.(Gly314Val) y *TSPYL2* p.(Arg346Gln). Y el fenotipo hipofisario, por la suma de posibles efectos del conjunto completo de variantes descritas, con probable mayor importancia relativa de las variantes que afectan a la vía SHH y la posible afectación de la vía NODAL por la variante *de novo* en el gen *SMAD2* p.(Gly314Val).

Por todo lo expuesto, los hallazgos mostrados en esta sección de la discusión respaldan la posibilidad de un modelo de herencia oligogénica en la explicación de la variabilidad fenotípica de los pacientes con alteraciones en *GLI2*.

# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

La secuenciación masiva dirigida resulta de gran utilidad en la evaluación diagnóstica de pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP, mejorando notablemente la tasa de éxito diagnóstico de la secuenciación gen a gen mediante método Sanger del grupo de genes clásicamente relacionados con estas patologías.

El abordaje diagnóstico de pacientes con DCHH, DSO o DAGH-HP, debería realizarse mediante técnicas de secuenciación masiva desde el primer momento.

La herencia oligogénica es capaz de explicar en un porcentaje importante de las familias estudiadas la penetrancia incompleta de variantes patogénicas en genes implicados en el desarrollo embrionario de la región hipotalámico-hipofisaria.

Algunos insultos ambientales (eventos obstétricos) probablemente contribuyen, junto con las alteraciones genéticas, a la expresión del fenotipo patológico, según un modelo de etiología multifactorial genético-ambiental, especialmente en determinados subgrupos como los pacientes con DSO-plus.

El fenotipo expresado en pacientes con variantes relevantes en genes de la vía de señalización SHH, varía en función de los genes concretos afectados:

- La expresión de un fenotipo de DCHH con hipoplasia hipofisaria es más frecuente en los pacientes con variantes relevantes en *GLI2*, *CDON*, *TGIF1* y *PITX2*.
- El fenotipo de DSO con adenohipófisis normal aparece asociado a alteraciones de *PTCH1*.
- Cuando los genes relacionados con la vía SHH que se encuentran afectados son *ZIC2* o *PAX2* el fenotipo es más variable.

Existen combinaciones de genes con variantes relevantes que se repiten entre distintos pacientes con DCHH, DSO y DAGH-HP.

La agrupación en un mismo paciente de variantes en *PROKR2* y en genes de la vía FGF ocurre en el 3,5% de los casos examinados y se caracteriza por la penetrancia completa de un fenotipo que incluye, al menos, deficiencia de GH, neurohipófisis ectópica y alteración del tallo hipofisario, posiblemente debido a la sinergia de efectos deletéreos durante el desarrollo embrionario del infundíbulo.

La agrupación en un mismo paciente de variantes en genes de la vía SHH y genes de la vía FGF se caracteriza por la expresión de dos posibles fenotipos: un fenotipo de DSO con adenohipófisis normal, agenesia de septo pelúcido e hipoplasia de la vía óptica (si el gen alterado de la vía SHH es *PTCH1*), o por un fenotipo de DCHH con, al menos, hipoplasia hipofisaria y deficiencia de GH, TSH y gonadotropinas (si el gen alterado de la vía SHH es *GLI2* o *CDON*).

Si bien las alteraciones de *PROP1* se asocian con mayor frecuencia con el fenotipo de DCHH, y las de genes como *PTCH1*, *OTX2* o *SOX2* lo hacen en mayor medida con el fenotipo de DSO, encontramos variantes relevantes en un grupo de genes comunes a los distintos grupos diagnósticos incluidos en el estudio, que confirman el solapamiento genético de estas patologías entre sí.

Además de los genes *PROKR2* e *FGFR1* ya sugeridos en la literatura, otros genes como *CHD7*, *SPRY4* o *SEMA3A* presentan una participación solapada en la etiología de las patologías aquí estudiadas en un contexto de contribución oligogénica.

Existe igualmente solapamiento genético de estas patologías con el HHC y la HPE.

La identificación de una variante patogénica con pérdida de función en ***BMP4*** en un paciente con DCHH confirma la implicación de dicho gen en la etiología del HIC.

La agrupación en este paciente de alteraciones relevantes en otros genes implicados en vías de señalización fundamentales para el desarrollo hipofisario, respalda la hipótesis de herencia oligogénica en la modulación de la expresividad variable de las alteraciones en *BMP4*.

**GLI2** es uno de los genes en los que con mayor frecuencia se han identificado variantes relevantes en los pacientes examinados (9,6% de los pacientes de nuestra cohorte).

Las alteraciones en *GLI2* muestran expresividad variable (distintas combinaciones de hipopituitarismo, polidactilia y anomalías craneofaciales de línea media) y penetrancia incompleta (indiscutible para la polidactilia y el hipopituitarismo, y más dudosa para las anomalías craneofaciales de línea media).

La presencia de HIC en un paciente, asociada a polidactilia postaxial (en el paciente o en algún familiar), debe orientar el estudio genético hacia *GLI2*.

El fenotipo hipofisario de pacientes con anomalías en *GLI2* se caracteriza por deficiencia de GH (como DAGH o DCHH), hipoplasia adenohipofisaria y respuesta variable al tratamiento sustitutivo con rhGH.

La HPE a nivel cerebral, la DSO y la diabetes insípida no forman parte del fenotipo habitual asociado a las alteraciones de *GLI2*.

A la vista de nuestros resultados, las anomalías del desarrollo nefrourológico deberían considerarse parte del espectro fenotípico de las alteraciones de *GLI2*.

Todos nuestros pacientes con alteraciones en *GLI2* presentan otras variantes relevantes en otros genes implicados en el desarrollo hipofisario.

La herencia oligogénica podría justificar la penetrancia incompleta y la gran variabilidad fenotípica asociadas a las alteraciones en *GLI2*, con posible contribución de factores ambientales.

# REFERENCIAS

1. Davis SW, Ellsworth BS, Peréz Millan MI, Gergics P, Schade V, Foyouzi N, et al. Pituitary gland development and disease: from stem cell to hormone production. In: Wassarman PM, editor. *Current topics in developmental biology*. First Edit. San Diego, CA: Academic Press (Elsevier); 2013. p. 1–47.
2. Kelberman D, Rizzoti K, Lovell-Badge R, Robinson ICAF, Dattani MT. Genetic regulation of pituitary gland development in human and mouse. *Endocr Rev*. 2009;30(7):790–829.
3. Castinetti F, Reynaud R, Saveanu A, Jullien N, Quentien MH, Rochette C, et al. Mechanisms in endocrinology: An update in the genetic aetiologies of combined pituitary hormone deficiency. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(6):R239–47.
4. Ericson J, Norlin S, Jessell TM, Edlund T. Integrated FGF and BMP signaling controls the progression of progenitor cell differentiation and the emergence of pattern in the embryonic anterior pituitary. *Development*. 1998 Mar;125(6):1005–15.
5. Pearson CA, Placzek M. Development of the medial hypothalamus: Forming a functional hypothalamic-neurohypophyseal interface. In: Wassarman PM, editor. *Current topics in developmental biology*. First Edit. San Diego, CA: Academic Press (Elsevier); 2013. p. 49–88.
6. McCabe MJ, Dattani MT. Genetic aspects of hypothalamic and pituitary gland development. In: Aminoff MJ, Boller F, Swaab DF, editors. *Handbook of clinical neurology*. Amsterdam: Elsevier; 2014. p. 3–15.
7. Larkin S, Ansorge O. *Development And Microscopic Anatomy Of The Pituitary Gland*. Feingold K, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, Dungan K, Grossman A, et al., editors. Endotext. South Dartmouth (MA); 2017.
8. Zhu X, Zhang J, Tollkuhn J, Ohsawa R, Bresnick EH, Guillemot F, et al. Sustained Notch signaling in progenitors is required for sequential emergence of distinct cell lineages during organogenesis. *Genes Dev*. 2006;20(19):2739–53.
9. Raetzman LT, Ross SA, Cook S, Dunwoodie SL, Camper SA, Thomas PQ. Developmental regulation of Notch signaling genes in the embryonic pituitary: Prop1 deficiency affects Notch2 expression. *Dev Biol*. 2004;265(2):329–40.
10. Youngblood JL, Coleman TF, Davis SW. Regulation of pituitary progenitor differentiation by  $\beta$ -Catenin. *Endocrinology*. 2018;159(9):3287–305.
11. Newman EA, Wu D, Taketo MM, Zhang J, Blackshaw S. Canonical Wnt signaling regulates patterning, differentiation and nucleogenesis in mouse hypothalamus and prethalamus. *Dev Biol*. 2018;442(2):236–48.
12. Webb EA, AlMutair A, Kelberman D, Bacchelli C, Chanudet E, Lescai F, et al. ARNT2 mutation causes hypopituitarism, post-natal microcephaly, visual and renal anomalies. *Brain*. 2013;136(10):3096–105.
13. Cox B, Roose H, Vennekens A, Vankelecom H. Pituitary stem cell regulation: who is pulling the strings? *J Endocrinol*. 2017;234(3):R135–58.
14. Andoniadou CL. Pituitary stem cells during normal physiology and disease. Pfaff D, Christen Y, editors. *Stem Cells in Neuroendocrinology*. Chan, CH: Springer; 2016.
15. Nantie LB, Himes AD, Getz DR, Raetzman LT. Notch signaling in postnatal pituitary expansion: proliferation, progenitors, and cell specification. *Mol Endocrinol*. The Endocrine Society; 2014;28(5):731–44.



16. Regal M, Páramo C, Sierra SM, Garcia-Mayor R V. Prevalence and incidence of hypopituitarism in an adult Caucasian population in northwestern Spain. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2001;55(6):735–40.
17. Tatsumi K, Miyai K, Notomi T, Kaibe K, Amino N, Mizuno Y, et al. Cretinism with combined hormone deficiency caused by a mutation in the PIT1 gene. *Nat Genet*. 1992;1(1):56–8.
18. Pfäffle RW, DiMattia GE, Parks JS, Brown MR, Wit JM, Jansen M, et al. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science*. 1992;257(5073):1118–21.
19. Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'Connell SM, et al. Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet*. 1998;18(2):147–9.
20. Cogan JD, Wu W, Phillips JA, Arnhold IJP, Agapito A, Fofanova O V., et al. The PROP1 2-base Pair deletion is a common cause of combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(9):3346–9.
21. Dattani MT, Martinez-Barbera JP, Thomas PQ, Brickman JM, Gupta R, Mårtensson IL, et al. Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet*. 1998;19(2):125–33.
22. Netchine I, Sobrier M-L, Krude H, Schnabel D, Maghnie M, Marcos E, et al. Mutations in LHX3 result in a new syndrome revealed by combined pituitary hormone deficiency. *Nat Genet*. 2000;25(2):182–6.
23. Machinis K, Pantel J, Netchine I, Léger J, Camand OJ, Sobrier ML, et al. Syndromic short stature in patients with a germline mutation in the LIM homeobox LHX4. *Am J Hum Genet*. 2001;69(5):961–8.
24. Ziemnicka K, Budny B, Drobnik K, Baszko-Błaszyk D, Stajgis M, Katulska K, et al. Two coexisting heterozygous frameshift mutations in PROP1 are responsible for a different phenotype of combined pituitary hormone deficiency. *J Appl Genet*. 2016;57(3):373–81.
25. Reynaud R, Barlier A, Vallette-Kasic S, Saveanu A, Guillet M-P, Simonin G, et al. An uncommon phenotype with familial central hypogonadism caused by a novel PROP1 gene mutant truncated in the transactivation domain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(8):4880–7.
26. Nogueira CR, Sabacan L, Jameson JL, Medeiros-Neto G, Kopp P. Combined pituitary hormone deficiency in an inbred Brazilian kindred associated with a mutation in the PROP-1 gene. *Mol Genet Metab*. 1999;67(1):58–61.
27. Akcay A, Ulucan K, Taskin N, Boyraz M, Akcay T, Zurita O, et al. Suprasellar mass mimicking a hypothalamic glioma in a patient with a complete PROP1 deletion. *Eur J Med Genet*. 2013;56(8):445–51.
28. Riepe FG, Partsch C-J, Blankenstein O, Mönig H, Pfäffle RW, Sippell WG. Longitudinal imaging reveals pituitary enlargement preceding hypoplasia in two brothers with combined pituitary hormone deficiency attributable to PROP1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4353–7.
29. Fang Q, George AS, Brinkmeier ML, Mortensen AH, Gergics P, Cheung LYM, et al. Genetics of combined pituitary hormone deficiency: Roadmap into the genome era. *Endocr Rev*. 2016;37(6):636–75.
30. Brue T, Saveanu A, Jullien N, Fauquier T, Castinetti F, Enjalbert A, et al. Lessons

- from monogenic causes of growth hormone deficiency. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2017;78(2):77–9.
31. Gregory LC, Humayun KN, Turton JPG, McCabe MJ, Rhodes SJ, Dattani MT. Novel Lethal Form of Congenital Hypopituitarism Associated With the First Recessive LHX4 Mutation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2158–64.
  32. McCabe MJ, Alatzoglou KS, Dattani MT. Septo-optic dysplasia and other midline defects: The role of transcription factors: HESX1 and beyond. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(1):115–24.
  33. Newbern K, Natrajan N, Kim H-G, Chorich LP, Halvorson LM, Cameron RS, et al. Identification of HESX1 mutations in Kallmann syndrome. *Fertil Steril*. 2013;99(7):1831–7.
  34. Diaczok D, Romero C, Zunich J, Marshall I, Radovick S. A novel dominant negative mutation of OTX2 associated with combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4351–9.
  35. Giri D, Vignola ML, Gualtieri A, Scagliotti V, McNamara P, Peak M, et al. Novel FOXA2 mutation causes Hyperinsulinism, Hypopituitarism with Craniofacial and Endoderm-derived organ abnormalities. *Hum Mol Genet*. 2017;26(22):4315–26.
  36. Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Moussi N, McElreavey K, Brauner R. Mutations in the Human ROBO1 Gene in Pituitary Stalk Interruption Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(7):2401–6.
  37. Simm F, Griesbeck A, Choukair D, Weiß B, Paramasivam N, Klammt J, et al. Identification of SLC20A1 and SLC15A4 among other genes as potential risk factors for combined pituitary hormone deficiency. *Genet Med*. 2017;20(7):728–36.
  38. Parsons SJH, Wright NB, Burkitt-Wright E, Skae MS, Murray PG. A heterozygous microdeletion of 20p12.2-3 encompassing *PROKR2* and *BMP2* in a patient with congenital hypopituitarism and growth hormone deficiency. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173(8):2261–7.
  39. Zwaveling-Soonawala N, Alders M, Jongejan A, Kovačič L, Duijkers FA, Maas SM, et al. Clues for polygenic inheritance of pituitary stalk interruption syndrome from exome sequencing in 20 patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(2):415–28.
  40. Otto AP, França MM, Correa FA, Costalonga EF, Leite CC, Mendonca BB, et al. Frequent development of combined pituitary hormone deficiency in patients initially diagnosed as isolated growth hormone deficiency: a long term follow-up of patients from a single center. *Pituitary*. 2015;18(4):561–7.
  41. Cerbone M, Dattani MT. Progression from isolated growth hormone deficiency to combined pituitary hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res*. 2017;37:19–25.
  42. Domené S, Domené HM. Genetic Mutations in the GH/IGF Axis. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2018;16(Suppl 1):39–62.
  43. Kruszka P, Martinez AF, Muenke M. Molecular testing in holoprosencephaly. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*. 2018;178(2):187–93.
  44. Boehm U, Bouloux P-M, Dattani MT, de Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. Expert consensus document: European Consensus Statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism--pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol*. 2015;11(9):547–64.

45. Giordano M. Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2016;30(6):679–91.
46. Reeves DL. Congenital absence of the septum pellucidum. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1941;69:61–71.
47. De Morsier G. Studies on malformation of cranio-encephalic sutures. III. Agenesis of the septum pellucidum with malformation of the optic tract. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr.* 1956;77:267–92.
48. Hoyt W, Kaplan S, Grumbach M. Septo-optic dysplasia and pituitary dwarfism. *Lancet.* 1970;1:893–4.
49. Webb E a, Dattani MT. Septo-optic dysplasia. *Eur J Hum Genet. Nature Publishing Group;* 2010;18(4):393–7.
50. Garne E, Rissmann A, Addor M-C, Barisic I, Bergman J, Braz P, et al. Epidemiology of septo-optic dysplasia with focus on prevalence and maternal age – A EUROCAT study. *Eur J Med Genet.* 2018;61(9):483–8.
51. Cemeroglu AP, Coulas T, Kleis L. Spectrum of clinical presentations and endocrinological findings of patients with septo-optic dysplasia: a retrospective study. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2015;28(9–10):1057–63.
52. Alt C, Shevell MI, Poulin C, Rosenblatt B, Saint-Martin C, Srour M. Clinical and radiologic spectrum of septo-optic dysplasia: Review of 17 Cases. *J Child Neurol.* 2017;32(9):797–803.
53. Khaper T, Bunge M, Clark I, Rafay MF, Mhanni A, Kirouac N, et al. Increasing incidence of optic nerve hypoplasia/septo-optic dysplasia spectrum: Geographic clustering in Northern Canada. *Paediatr Child Health.* 2017;22(8):445–53.
54. Barkovich AJ, Fram EK, Norman D. Septo-optic dysplasia: MR imaging. *Radiology.* 1989;171(1):189–92.
55. Miller SP, Shevell MI, Patenaude Y, Poulin C, O’Gorman AM. Septo-optic dysplasia plus: a spectrum of malformations of cortical development. *Neurology.* 2000;54(8):1701–3.
56. León-Gonzalez M, García-Peñas JJ, Puertas-Bordallo D, López-Pino MA, Argente-Oliver J, Cantarín-Extremera V. Evolución natural de la displasia septoóptica: análisis retrospectivo de 20 casos. *Rev Neurol.* 2012;54(6):321–31.
57. Polizzi A, Pavone P, Iannetti P, Manfré L, Ruggieri M. Septo-optic dysplasia complex: a heterogeneous malformation syndrome. *Pediatr Neurol.* 2006;34(1):66–71.
58. Benson JC, Nascene D, Truwit C, McKinney AM. Septo-optic dysplasia: Assessment of associated findings with special attention to the olfactory sulci and tracts. *Clin Neuroradiol.* 2018 (en prensa). doi: 10.1007/s00062-018-0687-z.
59. Raivio T, Avbelj M, McCabe MJ, Romero CJ, Dwyer A a, Tommiska J, et al. Genetic overlap in Kallmann syndrome, combined pituitary hormone deficiency, and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(4):E694-9.
60. Patel L, McNally RJQ, Harrison E, Lloyd IC, Clayton PE. Geographical distribution of optic nerve hypoplasia and septo-optic dysplasia in Northwest England. *J Pediatr.* 2006;148(1):85–8.
61. Garvin J, Sampath V, Karody V. Gastroschisis complicated by septo-optic dysplasia: Two distinct anomalies with a common origin. *Am J Perinatol Reports.*

- 2015;06(01):e15–7.
62. Lubinsky MS. Hypothesis: septo-optic dysplasia is a vascular disruption sequence. *Am J Med Genet.* 1997;69(3):235–6.
  63. Ramos Fernández JM, Martínez San Millán J, Barrio Castellano R, Yturriaga Matarranz R, Lorenzo Sanz G, Aparicio Meix JM. [Septo-optic dysplasia: report of 6 patients studied with MR and discussion on its pathogenesis]. *An Esp Pediatr.* 1996;45(6):614–8.
  64. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Gregory LC, Alatzoglou KS, Tziaferi V, Sbai O, et al. Variations in PROKR2, but not PROK2, are associated with hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3):E547–57.
  65. Streit A. The preplacodal region: an ectodermal domain with multipotential progenitors that contribute to sense organs and cranial sensory ganglia. *Int J Dev Biol.* 2007;51(6–7):447–61.
  66. McCabe MJ, Gaston-Massuet C, Tziaferi V, Gregory LC, Alatzoglou KS, Signore M, et al. Novel FGF8 mutations associated with recessive holoprosencephaly, craniofacial defects, and hypothalamo-pituitary dysfunction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(10):E1709–18.
  67. Roessler E, Hu P, Marino J, Hong S, Hart R, Berger S, et al. Common genetic causes of holoprosencephaly are limited to a small set of evolutionarily conserved driver genes of midline development coordinated by TGF- $\beta$ , hedgehog, and FGF signaling. *Hum Mutat.* 2018;39(10):1416–27.
  68. Tatsi C, Sertedaki A, Voutetakis A, Valavani E, Magiakou M-A, Kanaka-Gantenbein C, et al. Pituitary stalk interruption syndrome and isolated pituitary hypoplasia may be caused by mutations in holoprosencephaly-related genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):E779–84.
  69. De Rienzo F, Mellone S, Bellone S, Babu D, Fusco I, Prodam F, et al. Frequency of genetic defects in combined pituitary hormone deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;83(6):849–60.
  70. Fritez N, Sobrier M-L, Iraqi H, Vié-Luton M-P, Netchine I, El Annas A, et al. Molecular screening of a large cohort of Moroccan patients with congenital hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;82(6):876–84.
  71. de Graaff LCG, Argente J, Veenma DCM, Drent ML, Uitterlinden AG, Hokken-Koelega ACS. PROP1, HESX1, POU1F1, LHX3 and LHX4 mutation and deletion screening and GH1 P89L and IVS3+1/+2 mutation screening in a dutch nationwide cohort of patients with combined pituitary hormone deficiency. *Horm Res Paediatr.* 2010;73(5):363–71.
  72. McLennan K, Jeske Y, Cotterill A, Cowley D, Penfold J, Jones T, et al. Combined pituitary hormone deficiency in Australian children: clinical and genetic correlates. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003;58(6):785–94.
  73. Kim A, Savary C, Dubourg C, Carré W, Mouden C, Hamdi-Rozé H, et al. Integrated clinical and omics approach to rare diseases: novel genes and oligogenic inheritance in holoprosencephaly. *Brain.* 2019;142(1):35–49.
  74. Guo Q-H, Wang C-Z, Wu Z-Q, Qin Y, Han B-Y, Wang A-P, et al. Multi-genic pattern found in rare type of hypopituitarism: a whole-exome sequencing study of Han Chinese with pituitary stalk interruption syndrome. *J Cell Mol Med.* 2017;21(12):3626–32.

75. McCormack SE, Li D, Kim YJ, Lee JY, Kim S-H, Rapaport R, et al. Digenic inheritance of PROKR2 and WDR11 mutations in pituitary stalk interruption syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(7):2501–7.
76. Fish EW, Murdaugh LB, Sulik KK, Williams KP, Parnell SE. Genetic vulnerabilities to prenatal alcohol exposure: Limb defects in sonic hedgehog and GLI2 heterozygous mice. *Birth Defects Res.* 2017;109(11):860–5.
77. Kahn BM, Corman TS, Lovelace K, Hong M, Krauss RS, Epstein DJ. Prenatal ethanol exposure in mice phenocopies Cdon mutation by impeding Shh function in the etiology of optic nerve hypoplasia. *Dis Model Mech.* 2017;10(1):29–37.
78. Heyne GW, Everson JL, Ansen-Wilson LJ, Melberg CG, Fink DM, Parins KF, et al. Gli2 gene-environment interactions contribute to the etiological complexity of holoprosencephaly: evidence from a mouse model. *Dis Model Mech.* 2016;9(11):1307–15.
79. Kietzman HW, Everson JL, Sulik KK, Lipinski RJ. The teratogenic effects of prenatal ethanol exposure are exacerbated by Sonic Hedgehog or GLI2 haploinsufficiency in the mouse. Kanellopoulos-Langevin C, editor. *PLoS One.* 2014;9(2):e89448.
80. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405–23.
81. Gonzaga-Jauregui C, Harel T, Gambin T, Kousi M, Griffin LB, Francescato L, et al. Exome sequence analysis suggests that genetic burden contributes to phenotypic variability and complex neuropathy. *Cell Rep.* 2015;12(7):1169–83.
82. Brinkmeier ML, Davis SW, Carninci P, MacDonald JW, Kawai J, Ghosh D, et al. Discovery of transcriptional regulators and signaling pathways in the developing pituitary gland by bioinformatic and genomic approaches. *Genomics.* Elsevier Inc.; 2009;93(5):449–60.
83. Rentzsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M. CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D886–94.
84. Iacocca MA, Wang J, Dron JS, Robinson JF, McIntyre AD, Cao H, et al. Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res.* 2017;58(11):2202–9.
85. Voutetakis A, Sertedaki A, Dacou-Voutetakis C. Pituitary stalk interruption syndrome. *Curr Opin Pediatr.* 2016;28(4):545–50.
86. Carrascosa A, Fernández JM, Ferrández Á, López-Siguero JP, López D, Sánchez E. *Estudios españoles de crecimiento 2010.*
87. Marshall JD, Muller J, Collin GB, Milan G, Kingsmore SF, Dinwiddie D, et al. Alström syndrome: Mutation spectrum of ALMS1. *Hum Mutat.* 2015;36(7):660–8.
88. Quang D, Chen Y, Xie X. DANN: a deep learning approach for annotating the pathogenicity of genetic variants. *Bioinformatics.* 2015;31(5):761–3.
89. Martín-Rivada Á, Rodríguez-Contreras FJ, Muñoz-Calvo MT, Güemes M, González-Casado I, Del Pozo JS, et al. A novel GLI2 mutation responsible for congenital hypopituitarism and polymalformation syndrome. *Growth Horm IGF Res.* 2019;44:17–9.

90. Kremer Hovinga ICL, Giltay JC, van der Crabben SN, Steyls A, van der Kamp HJ, Paulussen ADC. Extreme phenotypic variability of a novel GLI2 mutation in a large family with panhypopituitarism and polydactyly: clinical implications. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018;89(3):378–80.
91. Babu D, Fanelli A, Mellone S, Muniswamy R, Wasniewska M, Prodam F, et al. Novel GLI2 mutations identified in patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency (CPHD): Evidence for a pathogenic effect by functional characterization. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019;90(3):449–56.
92. Roessler E, Ermilov AN, Grange DK, Wang A, Grachtchouk M, Dlugosz AA, et al. A previously unidentified amino-terminal domain regulates transcriptional activity of wild-type and disease-associated human GLI2. *Hum Mol Genet*. 2005;14(15):2181–8.
93. Valenza F, Cittaro D, Stupka E, Biancolini D, Patricelli MG, Bonanomi D, et al. A novel truncating variant of GLI2 associated with Culler-Jones syndrome impairs Hedgehog signalling. Xie J, editor. *PLoS One*. 2019;14(1):e0210097.
94. Flemming GMC, Klammt J, Ambler G, Bao Y, Blum WF, Cowell C, et al. Functional characterization of a heterozygous GLI2 missense mutation in patients with multiple pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):E567–75.
95. Witek B, El Wakil A, Nord C, Ahlgren U, Eriksson M, Vernersson-Lindahl E, et al. Targeted disruption of ALK reveals a potential role in hypogonadotropic hypogonadism. Lobaccaro J-MA, editor. *PLoS One*. 2015;10(5):e0123542.
96. Roessler E, Ouspenskaia M, Karkera J, Vélez J, Kantipong A, Lacbawan F, et al. Reduced NODAL signaling strength via mutation of several pathway members including FOXH1 is linked to human heart defects and holoprosencephaly. *Am J Hum Genet*. 2008;83(1):18–29.
97. Benzinou M, Creemers JWM, Choquet H, Lobbens S, Dina C, Durand E, et al. Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet*. 2008;40(8):943–5.
98. Radhakrishna U, Bornholdt D, Scott HS, Patel UC, Rossier C, Engel H, et al. The phenotypic spectrum of GLI3 morphopathies includes autosomal dominant preaxial polydactyly type-IV and postaxial polydactyly type-A/B; No phenotype prediction from the position of GLI3 mutations. *Am J Hum Genet*. 1999;65(3):645–55.
99. França MM, Jorge A a L, Carvalho LRS, Costalonga EF, Otto AP, Correa F a, et al. Relatively high frequency of non-synonymous GLI2 variants in patients with congenital hypopituitarism without holoprosencephaly. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;78(4):551–7.
100. Bear KA, Solomon BD, Antonini S, Arnhold IJP, França MM, Gerkes EH, et al. Pathogenic mutations in GLI2 cause a specific phenotype that is distinct from holoprosencephaly. *J Med Genet*. 2014;51(6):413–8.
101. Howard SR, Guasti L, Ruiz Babot G, Mancini A, David A, Storr HL, et al. IGSF10 mutations dysregulate gonadotropin releasing hormone neuronal migration resulting in delayed puberty. *EMBO Mol Med*. 2016;8(6):626–42.
102. Quaynor SD, Bosley ME, Duckworth CG, Porter KR, Kim S-H, Kim H-G, et al. Targeted next generation sequencing approach identifies eighteen new candidate genes in normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome.

- Mol Cell Endocrinol. 2016;437:86–96.
103. Cooper GM, Stone EA, Asimenos G, NISC Comparative Sequencing Program, Green ED, Batzoglou S, et al. Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence. *Genome Res.* 2005;15(7):901–13.
  104. Feingold M, Bossert WH. Normal values for selected physical parameters: an aid to syndrome delineation. *Birth Defects Orig Artic Ser.* 1974;10(13):1–16.
  105. Dodgson NA. Variation and extrema of human interpupillary distance. In: Woods AJ, Merritt JO, Benton SA, Bolas MT, editors. *Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering (Proceedings of SPIE)*. International Society for Optics and Photonics; 2004. p. 36–46. DOI: 10.1117/12.529999.
  106. Takamura N, Fofanova O V, Kinoshita E, Yamashita S. Gene analysis of PROP1 in dwarfism with combined pituitary hormone deficiency. *Growth Horm IGF Res.* 1999;9(Suppl B):12–7.
  107. Deladoëy J, Flück C, Büyükgebiz A, Kuhlmann B V., Eblé A, Hindmarsh PC, et al. “Hot spot” in the PROP1 gene responsible for combined pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(5):1645–50.
  108. Dusatkova P, Pfäffle R, Brown MR, Akulevich N, Arnhold IJP, Kalina MA, et al. Genesis of two most prevalent PROP1 gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations. *Eur J Hum Genet.* 2016;24(3):415–20.
  109. Navardauskaite R, Dusatkova P, Obermannova B, Pfaeffle RW, Blum WF, Adukauskiene D, et al. High prevalence of PROP1 defects in Lithuania: phenotypic findings in an ethnically homogenous cohort of patients with multiple pituitary hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(1):299–306.
  110. Baş F, Uyguner ZO, Darendeliler F, Ayca Z, Çetinkaya E, Berberoğlu M, et al. Molecular analysis of PROP1, POU1F1, LHX3, and HESX1 in Turkish patients with combined pituitary hormone deficiency: a multicenter study. *Endocrine.* 2015;49(2):479–91.
  111. Rainbow LA, Rees SA, Shaikh MG, Shaw NJ, Cole T, Barrett TG, et al. Mutation analysis of POUF-1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2005;62(2):163–8.
  112. Kim S-S, Kim Y, Shin Y-L, Kim G-H, Kim T-U, Yoo H-W. Clinical characteristics and molecular analysis of PIT1, PROP1, LHX3, and HESX1 in combined pituitary hormone deficiency patients with abnormal pituitary MR imaging. *Horm Res.* 2003;60(6):277–83.
  113. Choi J-H, Jung C-W, Kang E, Kim Y-M, Heo SH, Lee BH, et al. Rare frequency of mutations in pituitary transcription factor genes in combined pituitary hormone or isolated growth hormone deficiencies in Korea. *Yonsei Med J.* 2017;58(3):527.
  114. Blum WF, Klammt J, Amselem S, Pfäffle HM, Legendre M, Sobrier M-L, et al. Screening a large pediatric cohort with GH deficiency for mutations in genes regulating pituitary development and GH secretion: Frequencies, phenotypes and growth outcomes. *EBioMedicine.* 2018;36:390–400.
  115. Correa FA, Trarbach EB, Tusset C, Latronico AC, Montenegro LR, Carvalho LR, et al. FGFR1 and PROKR2 rare variants found in patients with combined pituitary hormone deficiencies. *Endocr Connect.* 2015;4(2):100–7.
  116. Prosser HM, Bradley A, Caldwell MA. Olfactory bulb hypoplasia in Prokr2 null mice

- stems from defective neuronal progenitor migration and differentiation. *Eur J Neurosci.* 2007;26(12):3339–44.
117. Matsumoto S -i., Yamazaki C, Masumoto K -h., Nagano M, Naito M, Soga T, et al. Abnormal development of the olfactory bulb and reproductive system in mice lacking prokineticin receptor PKR2. *Proc Natl Acad Sci.* 2006;103(11):4140–5.
  118. Reynaud R, Jayakody S a, Monnier C, Saveanu A, Bouligand J, Guedj A-M, et al. PROKR2 variants in multiple hypopituitarism with pituitary stalk interruption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(6):E1068-73.
  119. Asakura Y, Muroya K, Hanakawa J, Sato T, Aida N, Narumi S, et al. Combined pituitary hormone deficiency with unique pituitary dysplasia and morning glory syndrome related to a heterozygous PROKR2 mutation. *Clin Pediatr Endocrinol.* 2015;24(1):27–32.
  120. Parsons SJH, Wright NB, Burkitt-Wright E, Skae MS, Murray PG. A heterozygous microdeletion of 20p12.2-3 encompassing PROKR2 and BMP2 in a patient with congenital hypopituitarism and growth hormone deficiency. *Am J Med Genet Part A.* 2017;173(8):2261–7.
  121. Han B-Y, Zhang Q, Li L-L, Guo Q-H, Wang C-Z, Cang L, et al. Clinical features of pituitary stalk interruption syndrome in 114 cases. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2016;38(5):534–8.
  122. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin J-P, et al. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet.* 2009;18(1):75–81.
  123. Sbai O, Monnier C, Dodé C, Pin J-P, Hardelin J-P, Rondard P. Biased signaling through G-protein-coupled PROKR2 receptors harboring missense mutations. *FASEB J.* 2014;28(8):3734–44.
  124. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler M-L, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e175.
  125. Cole LW, Sidis Y, Zhang C, Quinton R, Plummer L, Pignatelli D, et al. Mutations in prokineticin 2 and prokineticin receptor 2 genes in human gonadotrophin-releasing hormone deficiency: molecular genetics and clinical spectrum. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3551–9.
  126. Cox KH, Oliveira LMB, Plummer L, Corbin B, Gardella T, Balasubramanian R, et al. Modeling mutant/wild-type interactions to ascertain pathogenicity of PROKR2 missense variants in patients with isolated GnRH deficiency. *Hum Mol Genet.* 2018;27(2):338–50.
  127. Hanchate NK, Giacobini P, Lhuillier P, Parkash J, Espy C, Fouveaut C, et al. SEMA3A, a gene involved in axonal pathfinding, is mutated in patients with Kallmann syndrome. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002896.
  128. Fukami M, Iso M, Sato N, Igarashi M, Seo M, Kazukawa I, et al. Submicroscopic deletion involving the fibroblast growth factor receptor 1 gene in a patient with combined pituitary hormone deficiency. *Endocr J.* 2013;60(8):1013–20.
  129. Trarbach EB, Costa EMF, Versiani B, de Castro M, Baptista MTM, Garmes HM, et al. Novel fibroblast growth factor receptor 1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism with and without anosmia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4006–12.



130. Hero M, Laitinen E-M, Varimo T, Vaaralahti K, Tommiska J, Raivio T. Childhood growth of females with Kallmann syndrome and FGFR1 mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(1):122–6.
131. Dodé C, Levilliers J, Dupont J-M, De Paepe A, Le Dû N, Soussi-Yanicostas N, et al. Loss-of-function mutations in FGFR1 cause autosomal dominant Kallmann syndrome. *Nat Genet*. 2003;33(4):463–5.
132. Doss CGP, Rajith B, Garwasis N, Mathew PR, Raju AS, Apoorva K, et al. Screening of mutations affecting protein stability and dynamics of FGFR1-A simulation analysis. *Appl Transl genomics*. 2012;1:37–43.
133. Pitteloud N, Acierno JS, Meysing A, Eliseenkova A V., Ma J, Ibrahim OA, et al. Mutations in fibroblast growth factor receptor 1 cause both Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci*. 2006;103(16):6281–6.
134. Tajima T, Ishizu K, Nakamura A. Molecular and clinical findings in patients with LHX4 and OTX2 mutations. *Clin Pediatr Endocrinol case reports Clin Investig Off J Japanese Soc Pediatr Endocrinol*. IPEC, Inc.; 2013;22(2):15–23.
135. Hoch R V, Lindtner S, Price JD, Rubenstein JLR. OTX2 transcription factor controls regional patterning within the medial ganglionic eminence and regional identity of the septum. *Cell Rep*. 2015;12(3):482–94.
136. Mortensen AH, Schade V, Lamonerie T, Camper SA. Deletion of OTX2 in neural ectoderm delays anterior pituitary development. *Hum Mol Genet*. Oxford University Press; 2015;24(4):939–53.
137. Hide T, Hatakeyama J, Kimura-Yoshida C, Tian E, Takeda N, Ushio Y, et al. Genetic modifiers of otocephalic phenotypes in Otx2 heterozygous mutant mice. *Development*. 2002;129(18):4347–57.
138. Gorbenko Del Blanco D, Romero CJ, Diaczok D, de Graaff LCG, Radovick S, Hokken-Koelega ACS. A novel OTX2 mutation in a patient with combined pituitary hormone deficiency, pituitary malformation, and an underdeveloped left optic nerve. *Eur J Endocrinol*. 2012;167(3):441–52.
139. Miraoui H, Dwyer A a, Sykiotis GP, Plummer L, Chung W, Feng B, et al. Mutations in FGF17, IL17RD, DUSP6, SPRY4, and FLRT3 are identified in individuals with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Am J Hum Genet*. The American Society of Human Genetics; 2013;92(5):725–43.
140. Korsensky L, Ron D. Regulation of FGF signaling: Recent insights from studying positive and negative modulators. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;53:101–14.
141. Wang W, Grimmer JF, Van De Water TR, Lufkin T. Hmx2 and Hmx3 Homeobox Genes Direct Development of the Murine Inner Ear and Hypothalamus and Can Be Functionally Replaced by Drosophila Hmx. *Dev Cell*. 2004;7(3):439–53.
142. Feng Y, Xu Q. Pivotal role of hmx2 and hmx3 in zebrafish inner ear and lateral line development. *Dev Biol*. 2010;339(2):507–18.
143. Wang W, Van De Water T, Lufkin T. Inner ear and maternal reproductive defects in mice lacking the Hmx3 homeobox gene. *Development*. 1998;125(4):621–34.
144. Miller ND, Nance MA, Wohler ES, Hoover-Fong JE, Lisi E, Thomas GH, et al. Molecular (SNP) analyses of overlapping hemizygous deletions of 10q25.3 to 10qter in four patients: evidence for HMX2 and HMX3 as candidate genes in hearing and vestibular function. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(4):669–80.

145. Murcia-Belmonte V, Astillero-López V, Esteban PF. Anosmin 1 interacts with the prokineticin receptor 2 in vitro indicating a molecular link between both proteins in the pathogenesis of Kallmann syndrome. *Protein Pept Lett*. 2016;23(7):650–5.
146. Martin C, Balasubramanian R, Dwyer AA, Au MG, Sidis Y, Kaiser UB, et al. The role of the prokineticin 2 pathway in human reproduction: evidence from the study of human and murine gene mutations. *Endocr Rev*. 2011;32(2):225–46.
147. Bluet-Pajot MT, Epelbaum J, Gourdji D, Hammond C, Kordon C. Hypothalamic and hypophyseal regulation of growth hormone secretion. *Cell Mol Neurobiol*. 1998;18(1):101–23.
148. Soga T, Matsumoto S ichiro, Oda T, Saito T, Hiyama H, Takasaki J, et al. Molecular cloning and characterization of prokineticin receptors. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1579(2–3):173–9.
149. Lin DC-H, Bullock CM, Ehlert FJ, Chen J-L, Tian H, Zhou Q-Y. Identification and molecular characterization of two closely related G protein-coupled receptors activated by prokineticins/endocrine gland vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 2002;277(22):19276–80.
150. Monnier J, Samson M. Prokineticins in angiogenesis and cancer. *Cancer Lett*. 2010;296(2):144–9.
151. Dodé C, Fouveaut C, Mortier G, Janssens S, Bertherat J, Mahoudeau J, et al. Novel FGFR1 sequence variants in Kallmann syndrome, and genetic evidence that the FGFR1c isoform is required in olfactory bulb and palate morphogenesis. *Hum Mutat*. 2007;28(1):97–8.
152. Tickotsky N, Moskovitz M. Renal agenesis in Kallmann syndrome: a network approach. *Ann Hum Genet*. 2014;78(6):424–33.
153. McCabe MJ, Hu Y, Gregory LC, Gaston-Massuet C, Alatzoglou KS, Saldanha JW, et al. Novel application of luciferase assay for the in vitro functional assessment of KAL1 variants in three females with septo-optic dysplasia (SOD). *Mol Cell Endocrinol*. 2015;417:63–72.
154. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. John Wiley & Sons, Ltd (10.1111); 2015;4(3):215–66.
155. Carreno G, Apps JR, Lodge EJ, Panousopoulos L, Haston S, Gonzalez-Meljem JM, et al. Hypothalamic sonic hedgehog is required for cell specification and proliferation of LHX3/LHX4 pituitary embryonic precursors. *Development*. 2017;144(18):3289–302.
156. Cohen M, Kicheva A, Ribeiro A, Blassberg R, Page KM, Barnes CP, et al. Ptch1 and Gli regulate Shh signalling dynamics via multiple mechanisms. *Nat Commun*. 2015;6(1):6709.
157. Ming JE, Kaupas ME, Roessler E, Brunner HG, Golabi M, Tekin M, et al. Mutations in PATCHED-1, the receptor for SONIC HEDGEHOG, are associated with holoprosencephaly. *Hum Genet*. 2002;110(4):297–301.
158. Ribeiro LA, Murray JC, Richieri-Costa A. PTCH mutations in four Brazilian patients with holoprosencephaly and in one with holoprosencephaly-like features and normal MRI. *Am J Med Genet Part A*. 2006;140A(23):2584–6.
159. Chassaing N, Davis EE, McKnight KL, Niederriter AR, Causse A, David V, et al. Targeted resequencing identifies PTCH1 as a major contributor to ocular developmental anomalies and extends the SOX2 regulatory network. *Genome*

- Res. 2016;26(4):474–85.
160. Cardozo MJ, Sánchez-Arrones L, Sandonis Á, Sánchez-Camacho C, Gestri G, Wilson SW, et al. Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle. *Nat Commun. Nature Publishing Group*; 2014;5(1):4272.
  161. Bae G-U, Domené S, Roessler E, Schachter K, Kang J-S, Muenke M, et al. Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *Am J Hum Genet*. 2011;89(2):231–40.
  162. Jones GE, Robertson L, Maniyar A, Shammass C, Phelan MM, Vasudevan PC, et al. Microform holoprosencephaly with bilateral congenital elbow dislocation; increasing the phenotypic spectrum of Steinfeld syndrome. *Am J Med Genet A*. 2016;170(3):754–9.
  163. Bashamboo A, Bignon-Topalovic J, Rouba H, McElreavey K, Brauner R. A Nonsense Mutation in the Hedgehog Receptor CDON Associated With Pituitary Stalk Interruption Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(1):12–5.
  164. Rohr KB, Barth KA, Varga ZM, Wilson SW. The Nodal pathway acts upstream of Hedgehog signaling to specify ventral telencephalic identity. *Neuron. Cell Press*; 2001;29(2):341–51.
  165. Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development. The Company of Biologists Ltd*; 2007;134(6):1023–34.
  166. Kamnasaran D, O' Brien PC, Zackai EH, Muenke M, Ferguson-Smith MA, Cox DW. Rearrangement in the PITX2 and MIPOL1 genes in a patient with a t(4;14) chromosome. *Eur J Hum Genet*. 2003;11(4):315–24.
  167. Treier M, O'Connell S, Gleiberman A, Price J, Szeto DP, Burgess R, et al. Hedgehog signaling is required for pituitary gland development. *Development*. 2001;128(3):377–86.
  168. Wang Y, Martin JF, Bai CB. Direct and indirect requirements of Shh/Gli signaling in early pituitary development. *Dev Biol. NIH Public Access*; 2010;348(2):199–209.
  169. Legendre M, Abadie V, Attié-Bitach T, Philip N, Busa T, Bonneau D, et al. Phenotype and genotype analysis of a French cohort of 119 patients with CHARGE syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2017;175(4):417–30.
  170. Shoji Y, Ida S, Etani Y, Yamada H, Kayatani F, Suzuki Y, et al. Endocrinological characteristics of 25 Japanese patients with CHARGE syndrome. *Clin Pediatr Endocrinol*. 2014;23(2):45–51.
  171. Asakura Y, Toyota Y, Muroya K, Kurosawa K, Fujita K, Aida N, et al. Endocrine and radiological studies in patients with molecularly confirmed CHARGE syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(3):920–4.
  172. Pinto G, Abadie V, Mesnage R, Blustajn J, Cabrol S, Amiel J, et al. CHARGE syndrome includes hypogonadotropic hypogonadism and abnormal olfactory bulb development. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(10):5621–6.
  173. Hale CL, Niederriter AN, Green GE, Martin DM. Atypical phenotypes associated with pathogenic CHD7 variants and a proposal for broadening CHARGE syndrome clinical diagnostic criteria. *Am J Med Genet Part A*. 2016;170(2):344–54.

174. Gregory LC, Gevers EF, Baker J, Kasia T, Chong K, Josifova DJ, et al. Structural pituitary abnormalities associated with CHARGE syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(4):E737–43.
175. Jiang X, Zhou Y, Xian L, Chen W, Wu H, Gao X. The mutation in *Chd7* causes misexpression of *Bmp4* and developmental defects in telencephalic midline. *Am J Pathol.* 2012;181(2):626–41.
176. Basson MA, van Ravenswaaij-Arts C. Functional insights into chromatin remodelling from studies on CHARGE syndrome. *Trends Genet. Elsevier Current Trends;* 2015;31(10):600–11.
177. Micucci JA, Layman WS, Hurd EA, Sperry ED, Frank SF, Durham MA, et al. CHD7 and retinoic acid signaling cooperate to regulate neural stem cell and inner ear development in mouse models of CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet. Oxford University Press;* 2014;23(2):434–48.
178. Layman WS, Hurd EA, Martin DM. Reproductive dysfunction and decreased GnRH neurogenesis in a mouse model of CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet.* 2011;20(16):3138–50.
179. Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, Martinovic J, Clément-Ziza M, Delezoide A-L, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. *J Med Genet.* 2006;43(3):211–7.
180. Bergman JEH, Janssen N, van der Sloot AM, de Walle HEK, Schoots J, Rendtorff ND, et al. A novel classification system to predict the pathogenic effects of CHD7 missense variants in CHARGE syndrome. *Hum Mutat.* 2012;33(8):1251–60.
181. Yu T, Meiners LC, Danielsen K, Wong MT, Bowler T, Reinberg D, et al. Deregulated FGF and homeotic gene expression underlies cerebellar vermis hypoplasia in CHARGE syndrome. *Elife.* 2013;2:e01305.
182. Hong M, Krauss RS. *Cdon* mutation and fetal ethanol exposure synergize to Produce midline signaling defects and holoprosencephaly spectrum disorders in mice. Hébert JM, editor. *PLoS Genet.* 2012;8(10):e1002999.
183. Janssen N, Bergman JEH, Swertz MA, Tranebjaerg L, Lodahl M, Schoots J, et al. Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Hum Mutat.* 2012;33(8):1149–60.
184. Bertko E, Klammt J, Dusatkova P, Bahceci M, Gonc N, ten Have L, et al. Combined pituitary hormone deficiency due to gross deletions in the *POU1F1* (*PIT-1*) and *PROP1* genes. *J Hum Genet.* 2017;62(8):755–62.
185. Vaaralahti K, Raivio T, Koivu R, Valanne L, Laitinen E-M, Tommiska J. Genetic overlap between holoprosencephaly and Kallmann syndrome. *Mol Syndromol.* 2012;3(1):1–5.
186. Dubourg C, Carré W, Hamdi-Rozé H, Mouden C, Roume J, Abdelmajid B, et al. Mutational spectrum in holoprosencephaly shows that FGF is a new major signaling pathway. *Hum Mutat.* 2016;37(12):1329–39.
187. Thakur M, Taha D, Misra VK. A Case of Congenital Hypopituitarism Associated With a 1p31 Microdeletion: A Possible Role for *LEPR* and *JAK1*. *J Endocr Soc.* 2017;1(4):278–82.
188. Raica M, Coculescu M, Cimpean AM, Ribatti D. Endocrine gland derived-VEGF is down-regulated in human pituitary adenoma. *Anticancer Res.*

- 2010;30(10):3981–6.
189. Guillini C, Urayama K, Turkeri G, Dedeoglu DB, Kurose H, Messaddeq N, et al. Divergent roles of prokineticin receptors in the endothelial cells: angiogenesis and fenestration. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2010;298(3):H844–52.
  190. Wang Q, Hu Y, Li G, Sun X. Pituitary stalk interruption syndrome in 59 children: the value of MRI in assessment of pituitary functions. *Eur J Pediatr*. 2014;173(5):589–95.
  191. Guo Q, Yang Y, Mu Y, Lu J, Pan C, Dou J, et al. Pituitary stalk interruption syndrome in chinese people: clinical characteristic analysis of 55 cases. Luque RM, editor. *PLoS One*. 2013;8(1):e53579.
  192. Hanew K, Tachibana K, Yokoya S, Fujieda K, Tanaka T, Igarashi Y, et al. Clinical characteristics, etiologies and pathophysiology of patients with severe short stature with severe GH deficiency: questionnaire study on the data registered with the foundation for growth science, Japan. *Endocr J*. 2006;53(2):259–65.
  193. Pham L-L, Lemaire P, Harroche A, Souberbielle J-C, Brauner R. Pituitary stalk interruption syndrome in 53 postpubertal patients: factors influencing the heterogeneity of its presentation. Lo AW, editor. *PLoS One*. 2013;8(1):e53189.
  194. Ranke MB, Lindberg A, Albertsson-Wikland K, Wilton P, Price DA, Reiter EO. Increased response, but lower responsiveness, to growth hormone (GH) in very young children (aged 0–3 years) with idiopathic GH deficiency: analysis of data from KIGS. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(4):1966–71.
  195. Pena-Almazan S, Buchlis J, Miller S, Shine B, MacGillivray M. Linear growth characteristics of congenitally GH-deficient infants from birth to one year of age. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5691–4.
  196. Pinto G, Adan L, Souberbielle JC, Thalassinos C, Brunelle F, Brauner R. Idiopathic growth hormone deficiency: presentation, diagnostic and treatment during childhood. *Ann Endocrinol (Paris)*. 1999;60(3):224–31.
  197. Nagel BH, Palmbach M, Petersen D, Ranke MB. Magnetic resonance images of 91 children with different causes of short stature: pituitary size reflects growth hormone secretion. *Eur J Pediatr*. 1997;156(10):758–63.
  198. Van den Broeck J, Vanderschueren-Lodeweyckx M, Malvaux P, Craen M, Van Vliet G, Doods L, et al. Growth hormone deficiency: a hidden obstetrical trauma? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1987;26(4):329–34.
  199. Jagtap VS, Acharya S V., Sarathi V, Lila AR, Budyal SR, Kasaliwal R, et al. Ectopic posterior pituitary and stalk abnormality predicts severity and coexisting hormone deficiencies in patients with congenital growth hormone deficiency. *Pituitary*. 2012;15(2):243–50.
  200. Arslanoğlu I, Kutlu H, Işgüven P, Tokuş F, Işık K. Diagnostic value of pituitary MRI in differentiation of children with normal growth hormone secretion, isolated growth hormone deficiency and multiple pituitary hormone deficiency. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001;14(5):517–23.
  201. Dutta P, Bhansali A, Singh P, Rajput R, Khandelwal N, Bhadada S. Congenital hypopituitarism: clinico-radiological correlation. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22(10):921–8.
  202. Kuroiwa T, Okabe Y, Hasuo K, Yasumori K, Mizushima A, Masuda K. MR imaging of pituitary dwarfism. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1991;12(1):161–4.

203. Kandemir N, Yordam N, Cila A, Besim A. Magnetic resonance imaging in growth hormone deficiency: relationship between endocrine function and morphological findings. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2000;13(2):171–8.
204. Triulzi F, Scotti G, di Natale B, Pellini C, Lukezic M, Scognamiglio M, et al. Evidence of a congenital midline brain anomaly in pituitary dwarfs: a magnetic resonance imaging study in 101 patients. *Pediatrics.* 1994;93(3):409–16.
205. Acharya S V., Gopal RA, Lila A, Sanghvi DS, Menon PS, Bandgar TR, et al. Phenotype and radiological correlation in patients with growth hormone deficiency. *Indian J Pediatr.* 2011;78(1):49–54.
206. Gács G. Perinatal factors in the aetiology of hypopituitarism. *Helv Paediatr Acta.* 1987;42(2–3):137–44.
207. Minutti CZ, Zimmerman D. Traumatic hypopituitarism due to maternal uterine leiomyomas. *J Endocrinol Invest.* 2002;25(2):158–62.
208. Lu J, Jiao Z, Yu Y, Zhang C, He X, Li Q, et al. Programming for increased expression of hippocampal GAD67 mediated the hypersensitivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male offspring rats with prenatal ethanol exposure. *Cell Death Dis.* 2018;9(6):659.
209. Weinberg J, Sliwowska JH, Lan N, Hellemans KGC. Prenatal alcohol exposure: foetal programming, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sex differences in outcome. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(4):470–88.
210. Portolés M, Sanchis R, Guerri C. Thyroid hormone levels in rats exposed to alcohol during development. *Horm Metab Res.* 1988;20(5):267–70.
211. Boronat S, Sánchez-Montañez A, Gómez-Barros N, Jacas C, Martínez-Ribot L, Vázquez E, et al. Correlation between morphological MRI findings and specific diagnostic categories in fetal alcohol spectrum disorders. *Eur J Med Genet.* 2017;60(1):65–71.
212. Lipinski RJ, Hammond P, O’Leary-Moore SK, Ament JJ, Pecevich SJ, Jiang Y, et al. Ethanol-induced face-brain dysmorphology patterns are correlative and exposure-stage dependent. Schubert M, editor. *PLoS One.* 2012;7(8):e43067.
213. Osorio MGF, Marui S, Jorge AAL, Latronico AC, Lo LSS, Leite CC, et al. Pituitary magnetic resonance imaging and function in patients with growth hormone deficiency with and without mutations in GHRH-R , GH-1 , or PROP-1 genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(11):5076–84.
214. Correa FA, Jorge A AL, Nakaguma M, Canton AP, Costa SS, Funari MF, et al. Pathogenic copy number variants in patients with congenital hypopituitarism associated with complex phenotypes. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2018;88(3):425–31.
215. Fang X, Chen C, Cai J, Xiang E, Li J, Chen P. Genome-wide methylation study of whole blood cells DNA in men with congenital hypopituitarism disease. *Int J Mol Med.* 2019;43(1):155–66.
216. Bakrania P, Efthymiou M, Klein JC, Salt A, Bunyan DJ, Wyatt A, et al. Mutations in BMP4 cause eye, brain, and digit developmental anomalies: overlap between the BMP4 and hedgehog signaling pathways. *Am J Hum Genet.* 2008;82(2):304–19.
217. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. *Science.* 2002;295(5563):2231–5.

218. Takuma N, Sheng HZ, Furuta Y, Ward JM, Sharma K, Hogan BL, et al. Formation of Rathke's pouch requires dual induction from the diencephalon. *Development*. 1998;125(23):4835–40.
219. Reis LM, Tyler RC, Schilter KF, Abdul-Rahman O, Innis JW, Kozel BA, et al. BMP4 loss-of-function mutations in developmental eye disorders including SHORT syndrome. *Hum Genet*. 2011;130(4):495–504.
220. Suzuki S, Marazita ML, Cooper ME, Miwa N, Hing A, Jugessur A, et al. Mutations in BMP4 are associated with subepithelial, microform, and overt cleft lip. *Am J Hum Genet*. 2009;84(3):406–11.
221. Weber S, Taylor JC, Winyard P, Baker KF, Sullivan-Brown J, Schild R, et al. SIX2 and BMP4 mutations associate with anomalous kidney development. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(5):891–903.
222. Tabatabaeifar M, Schlingmann K-P, Litwin M, Emre S, Bakkaloglu A, Mehls O, et al. Functional analysis of BMP4 mutations identified in pediatric CAKUT patients. *Pediatr Nephrol*. 2009;24(12):2361–8.
223. He JL, Liu JH, Liu F, Tan P, Lin T, Li XL. Mutation screening of BMP4 and Id2 genes in Chinese patients with congenital ureteropelvic junction obstruction. *Eur J Pediatr*. 2012;171(3):451–6.
224. Bennett CP, Betts DR, Seller MJ. Deletion 14q (q22q23) associated with anophthalmia, absent pituitary, and other abnormalities. *J Med Genet*. 1991;28(4):280–1.
225. Elliott J, Maltby EL, Reynolds B. A case of deletion 14(q22.1--&gt;q22.3) associated with anophthalmia and pituitary abnormalities. *J Med Genet*. 1993;30(3):251–2.
226. Lemyre E, Lemieux N, Décarie JC, Lambert M. Del(14)(q22.1q23.2) in a patient with anophthalmia and pituitary hypoplasia. *Am J Med Genet*. 1998;77(2):162–5.
227. Nolen LD, Amor D, Haywood A, St Heaps L, Willcock C, Mihelec M, et al. Deletion at 14q22-23 indicates a contiguous gene syndrome comprising anophthalmia, pituitary hypoplasia, and ear anomalies. *Am J Med Genet A*. 2006;140(16):1711–8.
228. Brisset S, Slamova Z, Dusatkova P, Briand-Suleau A, Milcent K, Metay C, et al. Anophthalmia, hearing loss, abnormal pituitary development and response to growth hormone therapy in three children with microdeletions of 14q22q23. *Mol Cytogenet*. 2014;7(1):17.
229. Schilter KF, Schneider A, Bardakjian T, Soucy J-F, Tyler RC, Reis LM, et al. OTX2 microphthalmia syndrome: four novel mutations and delineation of a phenotype. *Clin Genet*. 2011;79(2):158–68.
230. Gallardo ME, Lopez-Rios J, Fernaud-Espinosa I, Granadino B, Sanz R, Ramos C, et al. Genomic loning and characterization of the human homeobox gene SIX6 reveals a cluster of SIX genes in chromosome 14 and associates SIX6 hemizyosity with bilateral anophthalmia and pituitary anomalies. *Genomics*. 1999;61(1):82–91.
231. Ahmad ME, Dada R, Dada T, Kucheria K. 14q(22) deletion in a familial case of anophthalmia with polydactyly. *Am J Med Genet A*. 2003;120A(1):117–22.
232. Thienpont B, Mertens L, de Ravel T, Eyskens B, Boshoff D, Maas N, et al. Submicroscopic chromosomal imbalances detected by array-CGH are a frequent

- cause of congenital heart defects in selected patients. *Eur Heart J*. 2007;28(22):2778–84.
233. Pearce ZD, Droste PJ, Aaberg TM, Hassan AS. Ophthalmic and systemic findings in interstitial deletions of chromosome 14q: A case report and literature review. *Ophthalmic Genet*. 2012;33(3):161–6.
  234. Takenouchi T, Nishina S, Kosaki R, Torii C, Furukawa R, Takahashi T, et al. Concurrent deletion of BMP4 and OTX2 genes, two master genes in ophthalmogenesis. *Eur J Med Genet*. 2013;56(1):50–3.
  235. Breitfeld J, Martens S, Klammt J, Schlicke M, Pfäffle R, Krause K, et al. Genetic analyses of bone morphogenetic protein 2, 4 and 7 in congenital combined pituitary hormone deficiency. *BMC Endocr Disord*. 2013;13(1):56.
  236. Papadakis G, Cassatella D, Dwyer A, Niederlander N, Acierno J, Xu C, et al. Mutations in BMP4 gene network are associated with Kallmann syndrome. In: Program of the 4th Scientific Meeting/Training School of the European GnRH Network. Budapest (Hungary); 2016. p. 23–24 (Abstract O10;P10).
  237. Lubbe SJ, Pittman AM, Matijssen C, Twiss P, Olver B, Lloyd A, et al. Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2011;32(1):E1928-38.
  238. Lumaka A, Van Hole C, Casteels I, Ortibus E, De Wolf V, Vermeesch JR, et al. Variability in expression of a familial 2.79 Mb microdeletion in chromosome 14q22.1-22.2. *Am J Med Genet A*. 2012;158A(6):1381–7.
  239. Martínez-Fernández ML, Bermejo-Sánchez E, Fernández B, MacDonald A, Fernández-Toral J, Martínez-Frías ML. Haploinsufficiency of BMP4 gene may be the underlying cause of Frías syndrome. *Am J Med Genet A*. 2014;164A(2):338–45.
  240. Hayashi S, Okamoto N, Makita Y, Hata A, Imoto I, Inazawa J. Heterozygous deletion at 14q22.1-q22.3 including the *BMP4* gene in a patient with psychomotor retardation, congenital corneal opacity and feet polysyndactyly. *Am J Med Genet Part A*. 2008;146A(22):2905–10.
  241. Whitton A, Hyzy SL, Britt C, Williams JK, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Differential spatial regulation of BMP molecules is associated with single-suture craniosynostosis. *J Neurosurg Pediatr*. 2016;18(1):83–91.
  242. Reis GS Dos, Simões E Silva AC, Freitas IS, Heilbuth TR, Marco LA De, Oliveira EA, et al. Study of the association between the BMP4 gene and congenital anomalies of the kidney and urinary tract. *J Pediatr (Rio J)*. Sociedade Brasileira de Pediatria; 2014;90(1):58–64.
  243. Wain KE, Ellingson MS, McDonald J, Gammon A, Roberts M, Pichurin P, et al. Appreciating the broad clinical features of SMAD4 mutation carriers: a multicenter chart review. *Genet Med*. 2014;16(8):588–93.
  244. Starr LJ, Lindor NM, Lin AE. Myhre Syndrome. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle, WA: University of Washington, Seattle. 2017.
  245. Hsu J, Sage J. Novel functions for the transcription factor E2F4 in development and disease. *Cell Cycle*. Taylor & Francis; 2016;15(23):3183–90.
  246. Li H, Collado M, Villasante A, Matheu A, Lynch CJ, Cañamero M, et al. p27Kip1 directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*.



- 2012;11(6):845–52.
247. Ríos Y, Melmed S, Lin S, Liu N-A. Zebrafish *usp39* mutation leads to *rb1* mRNA splicing defect and pituitary lineage expansion. Amatruda J, editor. *PLoS Genet*. 2011;7(1):e1001271.
  248. Citton V, Maffei P, Marshall JD, Baglione A, Collin GB, Milan G, et al. Pituitary morphovolumetric changes in Alström syndrome. *J Neuroradiol*. 2016;43(3):195–9.
  249. Han JC, Reyes-Capo DP, Liu C-Y, Reynolds JC, Turkbey E, Turkbey IB, et al. Comprehensive endocrine-metabolic evaluation of patients with Alström syndrome compared to BMI-matched controls. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(7):2707–19.
  250. Romano S, Maffei P, Bettini V, Milan G, Favaretto F, Gardiman M, et al. Alström syndrome is associated with short stature and reduced GH reserve. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013;79(4):529–36.
  251. Mihai C, Catrinoiu D, Toringhibel M, Stoicescu R, Ticuta N-P, Anca H. Impaired IGF1-GH axis and new therapeutic options in Alström Syndrome patients: a case series. *Cases J*. 2009;2(1):19.
  252. Leitch CC, Lodh S, Prieto-Echagüe V, Badano JL, Zaghloul NA. Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 11):2407–19.
  253. Ragancokova D, Rocca E, Oonk AMM, Schulz H, Rohde E, Bednarsch J, et al. TSHZ1-dependent gene regulation is essential for olfactory bulb development and olfaction. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1214–27.
  254. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone Morphogenetic Proteins: A critical review. *Cell Signal*. 2011;23(4):609–20.
  255. Tilak A, Nelsen SM, Kim H-S, Donley N, McKnite A, Lee H, et al. Simultaneous rather than ordered cleavage of two sites within the BMP4 prodomain leads to loss of ligand in mice. *Development*. 2014;141(15):3062–71.
  256. Cui Y, Hackenmiller R, Berg L, Jean F, Nakayama T, Thomas G, et al. The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor. *Genes Dev*. 2001;15(21):2797–802.
  257. Neugebauer JM, Kwon S, Kim H-S, Donley N, Tilak A, Sopory S, et al. The prodomain of BMP4 is necessary and sufficient to generate stable BMP4/7 heterodimers with enhanced bioactivity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(18):E2307-16.
  258. Danesh SM, Villasenor A, Chong D, Soukup C, Cleaver O. BMP and BMP receptor expression during murine organogenesis. *Gene Expr Patterns*. 2009;9(5):255–65.
  259. Nishimatsu S, Thomsen GH. Ventral mesoderm induction and patterning by bone morphogenetic protein heterodimers in *Xenopus* embryos. *Mech Dev*. 1998;74(1–2):75–88.
  260. Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet*. 2006;14(10):1074–81.
  261. Paulo SS, Fernandes-Rosa FL, Turatti W, Coeli-Lacchini FB, Martinelli CE, Nakiri GS, et al. Sonic Hedgehog mutations are not a common cause of congenital

- hypopituitarism in the absence of complex midline cerebral defects. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(4):562–9.
262. França MM, Jorge AAL, Carvalho LRS, Costalonga EF, Vasques GA, Leite CC, et al. Novel heterozygous nonsense GLI2 mutations in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe without holoprosencephaly. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(11):E384–91.
  263. Arnhold IJP, França MM, Carvalho LR, Mendonca BB, Jorge AAL. Role of GLI2 in hypopituitarism phenotype. *J Mol Endocrinol*. 2015;54(3):R141–50.
  264. Ruiz i Altaba A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog–GLI signaling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(1):24–33.
  265. Roessler E, Du Y-Z, Mullor JL, Casas E, Allen WP, Gillessen-Kaesbach G, et al. Loss-of-function mutations in the human GLI2 gene are associated with pituitary anomalies and holoprosencephaly-like features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(23):13424–9.
  266. Karlstrom RO, Talbot WS, Schier AF. Comparative synteny cloning of zebrafish you-too: mutations in the Hedgehog target gli2 affect ventral forebrain patterning. *Genes Dev*. 1999;13(4):388–93.
  267. Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, et al. Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation. *Development*. 2000;127(8):1593–605.
  268. Gregory LC, Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Carreno G, Webb EA, Kelberman D, et al. The role of the sonic hedgehog signalling pathway in patients with midline defects and congenital hypopituitarism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;82(5):728–38.
  269. Hui CC, Slusarski D, Platt KA, Holmgren R, Joyner AL. Expression of three mouse homologs of the Drosophila segment polarity gene cubitus interruptus, Gli, Gli-2, and Gli-3, in ectoderm- and mesoderm-derived tissues suggests multiple roles during postimplantation development. *Dev Biol*. 1994;162(2):402–13.
  270. Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, et al. Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet*. 1996;14(3):353–6.
  271. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet*. 1996;14(3):357–60.
  272. Bear KA, Solomon BD. GLI2 mutations typically result in pituitary anomalies with or without postaxial polydactyly. *Am J Med Genet A*. 2015;167A(10):2491–2.
  273. Bertolacini CDP, Ribeiro-Bicudo LA, Petrin A, Richieri-Costa A, Murray JC. Clinical findings in patients with GLI2 mutations--phenotypic variability. *Clin Genet*. 2012;81(1):70–5.
  274. Rahimov F, Ribeiro LA, de Miranda E, Richieri-Costa A, Murray JC. GLI2 mutations in four Brazilian patients: how wide is the phenotypic spectrum? *Am J Med Genet A*. 2006;140(23):2571–6.
  275. Fang Q, Benedetti AFF, Ma Q, Gregory L, Li JZ, Dattani M, et al. *HESX1* mutations in patients with congenital hypopituitarism: variable phenotypes with the same genotype. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2016;85(3):408–14.

276. Cohen E, Maghnie M, Collot N, Leger J, Dastot F, Polak M, et al. Contribution of LHX4 mutations to pituitary deficits in a cohort of 417 unrelated patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(1):290–301.
277. Woods KS, Cundall M, Turton J, Rizotti K, Mehta A, Palmer R, et al. Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet.* 2005;76(5):833–49.
278. Wannasilp N, Solomon BD, Warren-Mora N, Clegg NJ, Delgado MR, Lacbawan F, et al. Holoprosencephaly in a family segregating novel variants in ZIC2 and GLI2. *Am J Med Genet A.* 2011;155A(4):860–4.
279. Kordaß U, Schröder C, Elbracht M, Soellner L, Eggermann T. A familial GLI2 deletion (2q14.2) not associated with the holoprosencephaly syndrome phenotype. *Am J Med Genet A.* 2015;167A(5):1121–4.
280. Solomon BD, Pineda-Alvarez DE, Gropman AL, Willis MJ, Hadley DW, Muenke M. High intellectual function in individuals with mutation-positive microform holoprosencephaly. *Mol Syndromol.* 2012;3(3):140–2.
281. Vieira AR, Avila JR, Daack-Hirsch S, Dragan E, Félix TM, Rahimov F, et al. Medical sequencing of candidate genes for nonsyndromic cleft lip and palate. *PLoS Genet.* 2005;1(6):e64.
282. Ozcan T. Renal agenesis: Prenatal diagnosis - UpToDate [Internet]. [cited 2018 Jul 23]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/renal-agenesis-prenatal-diagnosis>.
283. Rosenblum ND. Overview of congenital anomalies of the kidney and urinary tract (CAKUT) - UpToDate [Internet]. [cited 2018 Jul 23]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/overview-of-congenital-anomalies-of-the-kidney-and-urinary-tract-cakut>.
284. Shirakawa T, Nakashima Y, Watanabe S, Harada S, Kinoshita M, Kihara T, et al. A novel heterozygous GLI2 mutation in a patient with congenital urethral stricture and renal hypoplasia/dysplasia leading to end-stage renal failure. *CEN case reports.* 2018;7(1):94–7.
285. Gustavsson P, Schoumans J, Staaf J, Jönsson G, Carlsson F, Kristoffersson U, et al. Hemizygoty for chromosome 2q14.2-q22.1 spanning the GLI2 and PROC genes associated with growth hormone deficiency, polydactyly, deep vein thrombosis and urogenital abnormalities. *Clin Genet.* 2006;69(5):441–3.
286. Yu J, Carroll TJ, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates proliferation and differentiation of mesenchymal cells in the mouse metanephric kidney. *Development.* 2002;129(22):5301–12.
287. Bohnenpoll T, Wittern AB, Mamo TM, Weiss A-C, Rudat C, Kleppa M-J, et al. A SHH-FOXF1-BMP4 signaling axis regulating growth and differentiation of epithelial and mesenchymal tissues in ureter development. Selleri L, editor. *PLoS Genet.* 2017;13(8):e1006951.
288. Miyagawa S, Matsumaru D, Murashima A, Omori A, Satoh Y, Haraguchi R, et al. The role of sonic hedgehog-Gli2 pathway in the masculinization of external genitalia. *Endocrinology.* 2011;152(7):2894–903.
289. Pintore MD, Cantile C. Semilobar holoprosencephaly associated with multiple malformations in a foal. *Anat Histol Embryol.* 2016;45(2):148–53.
290. Koplay M, Onbas O, Alper F, Borekci B. Prenatal MRI findings of polycystic kidney

- disease associated with holoprosencephaly. *Korean J Radiol.* 2009;10(3):307.
291. Lurie IW, Ilyina HG, Podleschuk L V., Gorelik LB, Zaletajev D V. Chromosome 7 abnormalities in parents of children with holoprosencephaly and hydronephrosis. *Am J Med Genet.* 1990;35(2):286–8.
  292. Hall RK. Solitary median maxillary central incisor (SMMCI) syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2006;1(1):12.
  293. Hu MC, Mo R, Bhella S, Wilson CW, Chuang P-T, Hui C-C, et al. GLI3-dependent transcriptional repression of Gli1, Gli2 and kidney patterning genes disrupts renal morphogenesis. *Development.* 2006;133(3):569–78.
  294. Biesecker L. Orphanet: Pallister Hall syndrome [Internet]. [cited 2018 Dec 27]. Available from: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=GB&Expert=672](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=672)
  295. Taghavi K, Kirkpatrick J, Mirjalili SA. The horseshoe kidney: Surgical anatomy and embryology. *J Pediatr Urol.* 2016;12(5):275–80.
  296. Ranke MB, Saenger P. Turner's syndrome. *Lancet (London, England).* 2001 Jul 28;358(9278):309–14.
  297. Tripathi P, Guo Q, Wang Y, Coussens M, Liapis H, Jain S, et al. Midline signaling regulates kidney positioning but not nephrogenesis through Shh. *Dev Biol.* 2010;340(2):518–27.
  298. Richieri-Costa A, Ribeiro LA. Holoprosencephaly-like phenotype: Clinical and genetic perspectives. *Am J Med Genet Part A.* 2006;140A(23):2587–93.
  299. Basit S, Khoshhal KI. Genetics of clubfoot; recent progress and future perspectives. *Eur J Med Genet.* 2018;61(2):107–13.
  300. Nemeč S, Sung AH, Drouin J. Shh signaling influences the phenotype of Pitx1-/- hindlimbs. *Dev Biol.* 2018;439(2):65–8.
  301. Kool M, Jones DTW, Jäger N, Northcott PA, Pugh TJ, Hovestadt V, et al. Genome sequencing of SHH medulloblastoma predicts genotype-related response to smoothed inhibition. *Cancer Cell.* 2014;25(3):393–405.
  302. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, et al. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature.* 2014;515(7526):216–21.
  303. Wang T, Guo H, Xiong B, Stessman HAF, Wu H, Coe BP, et al. De novo genic mutations among a Chinese autism spectrum disorder cohort. *Nat Commun.* 2016;7:13316.
  304. Larson F V., Arrand JR, Tantam D, Jones PB, Holland AJ. Copy number variants in people with autism spectrum disorders and co-morbid psychosis. *Eur J Med Genet.* 2018;61(4):230–4.
  305. Tang CS, Zhuang X, Lam W-Y, Ngan ES-W, Hsu JS, Michelle Y, et al. Uncovering the genetic lesions underlying the most severe form of Hirschsprung disease by whole-genome sequencing. *Eur J Hum Genet.* 2018;26(6):818–26.
  306. Sajan SA, Powis Z, Helbig KL, Nagakura H, Immken L, Tang S, et al. Diagnostic exome sequencing identifies GLI2 haploinsufficiency and chromosome 20 uniparental disomy in a patient with developmental anomalies. *Clin Case Reports.* 2018;6(7):1208–13.

307. Dollfus H, Verloes A. Dysmorphology and the orbital region: a practical clinical approach. *Surv Ophthalmol*. 2004;49(6):547–61.
308. Briscoe J, Thérond PP. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(7):416–29.
309. Hui C-C, Angers S. Gli proteins in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011;27(1):513–37.
310. Posey JE, Harel T, Liu P, Rosenfeld JA, James RA, Coban Akdemir ZH, et al. Resolution of disease phenotypes resulting from multilocus genomic variation. *N Engl J Med*. 2017;376(1):21–31.
311. Yang Y, Muzny DM, Xia F, Niu Z, Person R, Ding Y, et al. Molecular findings among patients referred for clinical whole-exome sequencing. *JAMA*. 2014;312(18):1870.
312. GLI-Kruppel family member 3; GLI3 [Internet]. OMIM. [cited 2019 Jan 8]. Available from: <https://www.omim.org/entry/165240>
313. Gammons M V, Rutherford TJ, Steinhart Z, Angers S, Bienz M. Essential role of the Dishevelled DEP domain in a Wnt-dependent human-cell-based complementation assay. *J Cell Sci*. Company of Biologists; 2016;129(20):3892–902.
314. Michaud JL, Rosenquist T, May NR, Fan CM. Development of neuroendocrine lineages requires the bHLH-PAS transcription factor SIM1. *Genes Dev*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1998;12(20):3264–75.
315. Zíková M, Konířová J, Ditrychová K, Corlett A, Kolář M, Bartůněk P. DISP3 promotes proliferation and delays differentiation of neural progenitor cells. *FEBS Lett*. 2014;588(21):4071–7.
316. Katoh Y, Katoh M. Identification and characterization of DISP3 gene in silico. *Int J Oncol*. 2005;26(2):551–6.
317. Ma Y, Erkner A, Gong R, Yao S, Taipale J, Basler K, et al. Hedgehog-mediated patterning of the mammalian embryo requires transporter-like function of dispatched. *Cell*. 2002;111(1):63–75.
318. Serra R, Chang C. TGF-beta signaling in human skeletal and patterning disorders. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003;69(4):333–51.
319. Ozbun LL, Martínez A, Jakowlew SB. Differentially expressed nucleolar TGF-β1 target (DENTT) shows tissue-specific nuclear and cytoplasmic localization and increases TGF-β1-responsive transcription in primates. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr*. 2005;1728(3):163–80.
320. Gene: TSPYL2 [Internet]. Varsome. [cited 2018 Dec 28]. Available from: <https://varsome.com>
321. Itoh Y, Saitoh M, Miyazawa K. Smad3–STAT3 crosstalk in pathophysiological contexts. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. Oxford University Press; 2018;50(1):82–90.
322. Aschner Y, Downey GP. Transforming growth factor-β: Master regulator of the respiratory system in health and disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54(5):647–55.
323. Weissberg I, Wood L, Kamintsky L, Vazquez O, Milikovsky DZ, Alexander A, et al. Albumin induces excitatory synaptogenesis through astrocytic TGF-β/ALK5

- signaling in a model of acquired epilepsy following blood–brain barrier dysfunction. *Neurobiol Dis.* 2015;78:115–25.
324. Heinemann U, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier dysfunction, TGF $\beta$  signaling, and astrocyte dysfunction in epilepsy. *Glia.* 2012;60(8):1251–7.
325. Faucourt M, Houliston E, Besnardeau L, Kimelman D, Lepage T. The Pitx2 homeobox protein is required early for endoderm formation and nodal signaling. *Dev Biol.* 2001;229(2):287–306.
326. Foshay KM, Gallicano GI. Regulation of Sox2 by STAT3 initiates commitment to the neural precursor cell fate. *Stem Cells Dev.* 2008;17(2):269–78.
327. Zhou C, Jiao Y, Wang R, Ren S-G, Wawrowsky K, Melmed S. STAT3 upregulation in pituitary somatotroph adenomas induces growth hormone hypersecretion. *J Clin Invest.* 2015;125(4):1692–702.
328. Sethi JK, Vidal-Puig A. Wnt signalling and the control of cellular metabolism. *Biochem J.* 2010;427(1):1–17.
329. Osmundsen AM, Keisler JL, Taketo MM, Davis SW. Canonical WNT signaling regulates the pituitary organizer and pituitary gland formation. *Endocrinology.* 2017;158(10):3339–53.
330. Marcos S, Sarfati J, Leroy C, Fouveaut C, Parent P, Metz C, et al. The prevalence of CHD7 missense versus truncating mutations is higher in patients with Kallmann syndrome than in typical CHARGE patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(10):E2138-43.
331. Reynaud R, Chadli-Chaieb M, Vallette-Kasic S, Barlier A, Sarles J, Pellegrini-Bouiller I, et al. A familial form of congenital hypopituitarism due to a PROP1 mutation in a large kindred: phenotypic and in vitro functional studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5779–86.
332. Rivera B, Gayden T, Carrot-Zhang J, Nadaf J, Boshari T, Faury D, et al. Germline and somatic FGFR1 abnormalities in dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Acta Neuropathol. NIH Public Access;* 2016;131(6):847–63.
333. Domené S, Roessler E, El-Jaick KB, Snir M, Brown JL, Vélez JI, et al. Mutations in the human SIX3 gene in holoprosencephaly are loss of function. *Hum Mol Genet.* 2008;17(24):3919–28.
334. Hehr U, Pineda-Alvarez DE, Uyanik G, Hu P, Zhou N, Hehr A, et al. Heterozygous mutations in SIX3 and SHH are associated with schizencephaly and further expand the clinical spectrum of holoprosencephaly. *Hum Genet.* 2010;127(5):555–61.
335. Kimber W, Peelman F, Prieur X, Wangensteen T, O’Rahilly S, Tavernier J, et al. Functional characterization of naturally occurring pathogenic mutations in the human leptin receptor. *Endocrinology.* 2008;149(12):6043–52.
336. de Roux N, Young J, Brailly-Tabard S, Misrahi M, Milgrom E, Schaison G. The same molecular defects of the gonadotropin-releasing hormone receptor determine a variable degree of hypogonadism in affected kindred. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(2):567–72.
337. Cassatella D, Howard SR, Acierno JS, Xu C, Papadakis GE, Santoni FA, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism and constitutional delay of growth and puberty have distinct genetic architectures. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(4):377–88.

338. Errichiello E, Gorgone C, Giuliano L, Iadarola B, Cosentino E, Rossato M, et al. SOX2: Not always eye malformations. Severe genital but no major ocular anomalies in a female patient with the recurrent c.70del20 variant. *Eur J Med Genet.* 2018;61(6):335–40.
339. Ragge NK, Brown AG, Poloschek CM, Lorenz B, Henderson RA, Clarke MP, et al. Heterozygous mutations of OTX2 cause severe ocular malformations. *Am J Hum Genet.* 2005;76(6):1008–22.
340. Pfaeffle RW, Hunter CS, Savage JJ, Duran-Prado M, Mullen RD, Neeb ZP, et al. Three novel missense mutations within the LHX4 gene are associated with variable pituitary hormone deficiencies. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(3):1062–71.

**ANEXO 1:**  
**Cuestionario de recogida de datos clínicos**



**HOJA DE RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS PARA ESTUDIO MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA EN  
PACIENTES CON DEFICIENCIA COMBINADA DE HORMONAS HIPOFISARIAS, DISPLASIA SEPTO-ÓPTICA O  
DEFICIENCIA AISLADA DE GH CON ANOMALÍAS HIPOFISARIAS EN RMN**

MÉDICO:..... CENTRO: .....  
 Correo electrónico:.....Teléfono de contacto:.....

**PACIENTE:** Sexo:  Varón  Mujer  
Raza/etnia: .....

Código ID de paciente: .....

**DIAGNÓSTICO:**  **DCHH:** Déficit combinado de hormonas hipofisarias  
 **DSO:** Displasia septo-óptica  
 **DAGH-HP:** Déficit de GH con alteraciones hipofisarias  
 **Otro:**.....

**FENOTIPO:**

- **Pubertad espontánea:**  Ausente  Parcial  Completa  Iniciada normal  Sin datos  
 - **Olfato:**  Normal  Hiposmia  Anosmia  Sin datos (Modo de evaluación:  Subjetivo  Objetivo)

<u>Sí</u>	<u>No</u>	<u>Sin datos</u>	
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anomalías de la oreja
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Alteración de la audición
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Coloboma
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Microftalmía/anoftalmía
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Hipotelorismo
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Atresia de coanas
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Labio leporino o fisura palatina
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Paladar estrecho/ojival
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Úvula bífida
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Agenesia dental/incisivo único
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Polidactilia o sindactilia
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Sincinesias (movimientos en espejo)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Ataxia
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Retraso mental
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Cardiopatía
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Anomalías renales (especificar)
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Retraso del crecimiento
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Escoliosis
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Obesidad

**CARIOTIPO:** .....

**RMN:**

- **Adenohipófisis:**  Normal  Hipoplasia  Agenesia  
 - **Neurohipófisis:**  Normal  Ectópica  Ausente  
 - **Tallo:**  Normal  Ausente/interrumpido  Adelgazado  
 - **Nervios ópticos:**  Normales  Hipoplasia  Ausencia  
 - **Cuerpo caloso:**  Normal  Hipoplasia  Agenesia  
 - **Septum pellucidum:**  Normal  Hipoplasia  Agenesia  
 - **Bulbos olfatorios:**  Normales  Hipoplasia  Agenesia  
 - **Otras anomalías de la línea media en RMN:**  
 Holoprosencefalia  
 Otros: .....  
 - **Otras anomalías/Observaciones:** .....

**OTRAS PRUEBAS COMPLEMENTARIAS DE INTERÉS (estudios genéticos, estudio oftalmológico/fondo de ojo, estudios de imagen/AP de gónadas...):**.....

**Especificaciones y OTROS:**.....

**DATOS NEONATALES:** Edad Gestacional:..... Peso RN:..... Longitud RN:..... **Parto:** Tipo:.....  
 Presentación:..... Apgar:...../..... Datos de sufrimiento fetal/problemas del parto: .....

**Datos analíticos neonatales si existen, a la edad de:**

- **LH:**.....(unidades:.....) Edad.....meses  
 - **FSH:**.....(unidades:.....) Edad.....meses  
 - **Inhibina B:** :.....(unidades:.....) Edad.....meses  
 - **Testosterona:** :.....(unidades:.....) Edad.....meses  
 - **Estradiol:** :.....(unidades:.....) Edad.....meses

**Clínica en el periodo neonatal:**

**Criptorquidia:**  Unilateral  Bilateral  No  Sin datos  
**Micropene:**  Sí  No  Sin datos  
**Hipoglucemias:**  Sí  No  Sin datos  
**Colestasis:**  Sí  No  Sin datos

**Otros datos neonatales relevantes, problemas, aclaraciones.....**

**DATOS SOBRE EL DESARROLLO PUBERAL (ÚLTIMOS PREVIO AL DX DE HIPOGONADISMO, O ÚLTIMOS SI NO DX):**

Edad:		Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Braza (cm)	Pubarquia (Tanner)	Telarquia (Tanner)	Teste izq (cc)	Teste dcho (cc)
años	meses								

Otros datos relevantes, aclaraciones.....

**DÉFICITS HORMONALES (DATOS ANTES DE INICIAR EL TRATAMIENTO EN SU CASO)**

**HIPOTIROIDISMO:**  Sí  No  Sin datos. En caso de sí, indicar datos al diagnóstico, justo antes del inicio del tratamiento:

- T4 libre:.....(unidades:.....) Edad..... - TSH:.....(unidades:.....) Edad.....

**DÉFICIT DE GH:**  Sí  No  Sin datos. En caso de sí, indicar datos al diagnóstico, justo antes del inicio del tratamiento:

- IGF1:.....(unidades:.....) Edad..... - IGFBP3:.....(unidades:.....) Edad.....

- Tests de GH: Tipo de test:..... GH basal:..... GH pico:..... (unidades:.....) Edad.....

Tipo de test:..... GH basal:..... GH pico:..... (unidades:.....) Edad.....

(Si un test fue hipoglucemia insulínica, indicar: Glucemia basal: ..... Glucemia mínima: .....)

**HIPOGONADISMO:**  Sí  No  Sin datos. En caso de sí, indicar datos al diagnóstico, justo antes del inicio del tratamiento:

- LH:.....(unidades:.....) Edad..... - FSH:.....(unidades:.....) Edad.....

- Testosterona:.....(unidades:.....) Edad..... - Estradiol:.....(unidades:.....) Edad.....

- Inhibina B:.....(unidades:.....) Edad.....

- Test de LHRH:  No realizado  Sí: Resultado:..... Edad .....

Menarquia espontánea:  Sí  No  Sin datos Edad: .....años.....meses

Estirón puberal espontáneo:  Sí  No  Sin datos Edad: .....años.....meses

Última exploración física antes de iniciar tratamiento inductor de pubertad:

Edad:		Peso (Kg)	Talla (cm)	IMC (kg/m <sup>2</sup> )	Braza (cm)	Pubarquia (Tanner)	Telarquia (Tanner)	Teste izq (cc)	Teste dcho (cc)
años	meses								

**INSUFICIENCIA SUPRARRENAL CENTRAL:**  Sí  No  Sin datos. En caso de sí, indicar datos al dx, justo antes del tratamiento:

- Cortisol:.....(unidades:.....) Edad..... - ACTH:.....(unidades:.....) Edad.....

**Prolactina:**.....(unidades:.....) Edad.....

**Diabetes insípida:**  Sí  No  Sin datos

Otros datos relevantes, aclaraciones.....

**HISTORIA FAMILIAR: Consanguinidad:**  Sí  No **Modo de herencia:**  Familiar  Esporádico

(Indicar si existe alteración del olfato, algún tipo de patología gonadal (pubertad/infertilidad), algún déficit hipofisario u otros signos/síntomas de los mencionados en este protocolo en algún familiar):

MADRE .....

PADRE.....

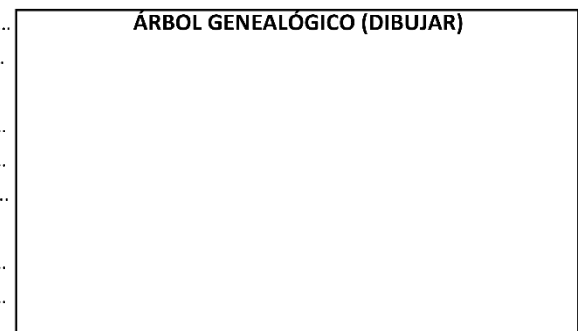
HERMANOS: 1º .....

2º .....

3º .....

HIJOS: 1º .....

2º .....



Otros datos/observaciones relevantes de la historia familiar: .....

## **ANEXO 2:**

**Listado completo de genes incluidos en el panel HIPOPIT\_V1 y  
en el panel HIPOPIT\_V3**

## **Genes incluidos en el panel HIPOPIT V1:**

(Símbolo HGNC: N° OMIM, ubicación citogenética)

<b>ANOS1 (KAL1):</b> OMIM 300836, Xp22.31	<b>NKX2-1:</b> OMIM 600635, 14q13.3
<b>ARNT2:</b> OMIM 606036, 15q25.1	<b>NR0B1:</b> OMIM 300473, Xp21.2
<b>ASCL1:</b> OMIM 100790, 12q23.2	<b>NR4A1:</b> OMIM 139139, 12q13.13
<b>BMP4:</b> OMIM 112262, 14q22.2	<b>NR5A1:</b> OMIM 184757, 9q33.3
<b>CDON:</b> OMIM 608707, 11q24.2	<b>OTP:</b> OMIM 604529, 5q14.1
<b>CHD7:</b> OMIM 608892, 8q12.2	<b>OTX2:</b> OMIM 600037, 14q22.3
<b>DUSP6:</b> OMIM 602748, 12q21.33	<b>PAX2:</b> OMIM 167409, 10q24.31
<b>EYA4:</b> OMIM 603550, 6q23.2	<b>PAX6:</b> OMIM 607108, 11p13
<b>FEZF1:</b> OMIM 613301, 7q31.32	<b>PCSK1:</b> OMIM 162150, 5q15
<b>FGF17:</b> OMIM 603725, 8p21.3	<b>PITX1:</b> OMIM 602149, 5q31.1
<b>FGF18:</b> OMIM 603726, 5q35.1	<b>PITX2:</b> OMIM 601542, 4q25
<b>FGF8:</b> OMIM 600483, 10q24.32	<b>POU1F1 (PIT1):</b> OMIM 173110, 3p11.2
<b>FGFR1:</b> OMIM 136350, 8p11.23	<b>POU3F2:</b> OMIM 600494, 6q16.1
<b>FLRT3:</b> OMIM 604808, 20p12.1	<b>PROK2:</b> OMIM 607002, 3p13
<b>FOXH1:</b> OMIM 603621, 8q24.3	<b>PROKR2:</b> OMIM 607123, 20p12.3
<b>GAS1:</b> OMIM 139185, 9q21.33	<b>PROP1:</b> OMIM 601538, 5q35.3
<b>GATA2:</b> OMIM 137295, 3q21.3	<b>PTCH1:</b> OMIM 601309, 9q22.32
<b>GLI2:</b> OMIM 165230, 2q14.2	<b>RNPC3:</b> OMIM 618016, 1p21.1
<b>GNRH1:</b> OMIM 152760, 8p21.2	<b>SEMA3A:</b> OMIM 603961, 7q21.11
<b>GNRHR:</b> OMIM 138850, 4q13.2	<b>SEMA7A:</b> OMIM 607961, 15q24.1
<b>GPR161:</b> OMIM 612250, 1q24.2	<b>SHH:</b> OMIM 600725, 7q36.3
<b>HESX1:</b> OMIM 601802, 3p14.3	<b>SIM1:</b> OMIM 603128, 6q16.3
<b>HMX2:</b> OMIM 600647, 10q26.13	<b>SIX3:</b> OMIM 603714, 2p21
<b>HMX3:</b> OMIM 613380, 10q26.13	<b>SOX2:</b> OMIM 184429, 3q26.33
<b>HS6ST1:</b> OMIM 604846, 2q14.3	<b>SOX3:</b> OMIM 313430, Xq27.1
<b>IL17RD:</b> OMIM 606807, 3p14.3	<b>SOX10:</b> OMIM 602229, 22q13.1
<b>KISS1:</b> OMIM 603286, 1q32.1	<b>SPRY2:</b> OMIM 602466, 13q31.1
<b>KISS1R:</b> OMIM 604161, 19p13.3	<b>SPRY4:</b> OMIM 607984, 5q31.3
<b>LEP:</b> OMIM 164160, 7q32.1	<b>TAC3:</b> OMIM 162330, 12q13.3
<b>LEPR:</b> OMIM 601007, 1p31.3	<b>TACR3:</b> OMIM 162332, 4q24
<b>LHX1:</b> OMIM 601999, 17q12	<b>TBX19:</b> OMIM 604614, 1q24.2
<b>LHX2:</b> OMIM 603759, 9q33.3	<b>TDGF1:</b> OMIM 187395, 3p21.31
<b>LHX3:</b> OMIM 600577, 9q34.3	<b>TGIF1:</b> OMIM 602630, 18p11.31
<b>LHX4:</b> OMIM 602146, 1q25.2	<b>TSHZ1:</b> OMIM 614427, 18q22.3
<b>LHX8:</b> OMIM 604425, 1p31.1	<b>WDR11:</b> OMIM 606417, 10q26.12
<b>NEUROG2:</b> OMIM 606624, 4q25	<b>ZIC2:</b> OMIM 603073, 13q32.3

## **Genes incluidos en el panel HIPOPIT V3**

(Símbolo HGNC: N° OMIM, ubicación citogenética)

**ACVRL1:** OMIM 601284, 12q13.13  
**AES:** OMIM 600188, 19p13.3  
**AGAP1:** OMIM 608651, 2q37.2  
**AHR:** OMIM 600253, 7p21.1  
**AKAP2:** OMIM 604582, 9q31.3  
**AKT1S1:** OMIM 610221, 19q13.33  
**ALK:** OMIM 105590, 2p23.2-p23.1  
**ALMS1:** OMIM 606844, 2p13.1  
**AMN1:** Sin n° OMIM, 12p11.21  
**ANOS1 (KAL1):** OMIM 300836, Xp22.31  
**ARNT2:** OMIM 606036, 15q25.1  
**ASCL1:** OMIM 100790, 12q23.2  
**ATF2:** OMIM 123811, 2q31.1  
**ATP13A1:** Sin n° OMIM, 19p13.11  
**AXIN1:** OMIM 603816, 16p13.3  
**AXIN2:** OMIM 604025, 17q24.1  
**AXL:** OMIM 109135, 19q13.2  
**BAMBI:** OMIM 604444, 10p12.1  
**BMP1:** OMIM 112264, 8p21.3  
**BMP4:** OMIM 112262, 14q22.2  
**BMPER:** OMIM 608699, 7p14.3  
**BMPR1A:** OMIM 601299, 10q23.2  
**BMPR1B:** OMIM 603248, 4q22.3  
**BOD1L1:** OMIM 616746, 4p15.33  
**C16ORF91:** Sin n° OMIM, 16p13.3  
**CARTPT:** OMIM 602606, 5q13.2  
**CCDC141:** OMIM 616031, 2q31.2  
**CCKBR:** OMIM 118445, 11p15.4  
**CDON:** OMIM 608707, 11q24.2  
**CEBPB:** OMIM 189965, 20q13.13  
**CGA:** OMIM 118850, 6q14.3  
**CHD7:** OMIM 608892, 8q12.2  
**CHRD:** OMIM 603475, 3q27.1  
**CPE:** OMIM 114855, 4q32.3  
**CREBBP:** OMIM 600140, 16p13.3  
**CRIM1:** OMIM 606189, 2p22.2  
**CRY1:** OMIM 601933, 12q23.3  
**CSNK1A1:** OMIM 600505, 5q32  
**CSNK1D:** OMIM 600864, 17q25.3  
**CSNK2A1:** OMIM 115440, 20p13  
**CTNNB1:** OMIM 116806, 3p22.1  
**CXCR4:** OMIM 162643, 2q22.1  
**DAAM1:** OMIM 606626, 14q23.1  
**DCAF17:** OMIM 612515, 2q31.1  
**DEK:** OMIM 125264, 6p22.3  
**DHH:** OMIM 605423, 12q13.12  
**DISP1:** OMIM 607502, 1q41  
**DKK3:** OMIM 605416, 11p15.3  
**DLK1:** OMIM 176290, 14q32.2  
**DLL1:** OMIM 606582, 6q27  
**DLL3:** OMIM 602768, 19q13.2  
**DMXL2:** OMIM 612186, 15q21.2  
**DNER:** OMIM 607299, 2q36.3  
**DR1:** OMIM 601482, 1p22.1  
**DUSP6:** OMIM 602748, 12q21.33  
**DVL1:** OMIM 601365, 1p36.33  
**DVL2:** OMIM 602151, 17p13.1  
**E2F4:** OMIM 600659, 16q22.1  
**EID1:** OMIM 605894, 15q21.1  
**ENG:** OMIM 131195, 9q34.11  
**EYA4:** OMIM 603550, 6q23.2  
**EZH2:** OMIM 601573, 7q36.1  
**FAAH2:** OMIM 300654, Xp11.21  
**FANCB:** OMIM 300515, Xp22.2  
**FBXW2:** OMIM 609071, 9q33.2  
**FEZF1:** OMIM 613301, 7q31.32  
**FGF1:** OMIM 131220, 5q31.3  
**FGF10:** OMIM 602115, 5p12  
**FGF13:** OMIM 300070, Xq26.3-q27.1  
**FGF14:** OMIM 601515, 13q33.1  
**FGF17:** OMIM 603725, 8p21.3  
**FGF18:** OMIM 603726, 5q35.1  
**FGF4:** OMIM 164980, 11q13.3  
**FGF8:** OMIM 600483, 10q24.32  
**FGFR1:** OMIM 136350, 8p11.23  
**FGFR1OP:** OMIM 605392, 6q27  
**FGFR1OP2:** OMIM 608858, 12p11  
**FGFR2:** OMIM 176943, 10q26.13  
**FIBP:** OMIM 608296, 11q13.1  
**FKBP8:** OMIM 604840, 19p13.11  
**FLRT3:** OMIM 604808, 20p12.1  
**FOXH1:** OMIM 603621, 8q24.3

**FRAT2:** OMIM 605006, 10q24.1  
**FRS3:** OMIM 607744, 6p21.1  
**FSTL1:** OMIM 605547, 3q13.33  
**FSTL5:** Sin n° OMIM, 4q32.2  
**FUS:** OMIM 137070, 16p11.2  
**FZD2:** OMIM 600667, 17q21.31  
**FZD4:** OMIM 604579, 11q14.2  
**FZD5:** OMIM 601723, 2q33.3  
**FZD6:** OMIM 603409, 8q22.3  
**GAP43:** OMIM 162060, 3q13.31  
**GAS1:** OMIM 139185, 9q21.33  
**GATA2:** OMIM 137295, 3q21.3  
**GDNF:** OMIM 600837, 5p13.2  
**GH1:** OMIM 139250, 17q23.3  
**GHRH:** OMIM 139190, 20q11.23  
**GHRHR:** OMIM 139191, 7p14.3  
**GLG1:** OMIM 600753, 16q23.1  
**GLI1:** OMIM 165220, 12q13.3  
**GLI2:** OMIM 165230, 2q14.2  
**GLI3:** OMIM 165240, 7p14.1  
**GLIPR2:** OMIM 607141, 9p13.3  
**GNRH1:** OMIM 152760, 8p21.2  
**GNRHR:** OMIM 138850, 4q13.2  
**GPR161:** OMIM 612250, 1q24.2  
**GRK1:** OMIM 180381, 13q34  
**HES6:** OMIM 610331, 2q37.3  
**HESX1:** OMIM 601802, 3p14.3  
**HEY1:** OMIM 602953, 8q21.13  
**HHIP:** OMIM 606178, 4q31.21  
**HIF1A:** OMIM 603348, 14q23.2  
**HMGA2:** OMIM 600698, 12q14.3  
**HMX2:** OMIM 600647, 10q26.13  
**HMX3:** OMIM 613380, 10q26.13  
**HNRNPU:** OMIM 602869, 1q44  
**HS6ST1:** OMIM 604846, 2q14.3  
**ID1:** OMIM 600349, 20q11.21  
**ID2:** OMIM 600386, 2p25.1  
**ID3:** OMIM 600277, 1p36.12  
**ID4:** OMIM 600581, 6p22.3  
**IFT172:** OMIM 607386, 2p23.3  
**IGBP1:** OMIM 300139, Xq13.1  
**IGSF1:** OMIM 300137, Xq26.1  
**IGSF10:** OMIM 617351, 3q25.1  
**IL17RD:** OMIM 606807, 3p14.3  
**IL6ST:** OMIM 600694, 5q11.2  
**IRS4:** OMIM 300904, Xq22.3  
**ISL1:** OMIM 600366, 5q11.1  
**ITGA2B:** OMIM 607759, 17q21.31  
**JAG1:** OMIM 601920, 20p12.2  
**JUN:** OMIM 165160, 1p32.1  
**KISS1:** OMIM 603286, 1q32.1  
**KISS1R:** OMIM 604161, 19p13.3  
**KLF4:** OMIM 602253, 9q31.2  
**LAMB2:** OMIM 150325, 3p21.31  
**LDB1:** OMIM 603451, 10q24.32  
**LEP:** OMIM 164160, 7q32.1  
**LEPR:** OMIM 601007, 1p31.3  
**LHB:** OMIM 152780, 19q13.33  
**LHX1:** OMIM 601999, 17q12  
**LHX2:** OMIM 603759, 9q33.3  
**LHX3:** OMIM 600577, 9q34.3  
**LHX4:** OMIM 602146, 1q25.2  
**LHX8:** OMIM 604425, 1p31.1  
**LTBP3:** OMIM 602090, 11q13.1  
**LTBP4:** OMIM 604710, 19q13.2  
**MAMLD1:** OMIM 300120, Xq28  
**MASTL:** OMIM 608221, 10p12.1  
**MECP2:** OMIM 300005, Xq28  
**MED1:** OMIM 604311, 17q12  
**MIR-150:** OMIM 611114, 19q13.33  
**MIR200A:** OMIM 612090, 1p36.33  
**MIR200B:** OMIM 612091, 1p36.33  
**MIR200C:** OMIM 612092, 12p13.31  
**MIR429:** OMIM 612094, 1p36.33  
**MYO9B:** OMIM 602129, 19p13.11  
**NAALADL1:** OMIM 602640, 11q13.1  
**NBL1:** OMIM 600613, 1p36.13  
**NEUROD1:** OMIM 601724, 2q31.3  
**NEUROG2:** OMIM 606624, 4q25  
**NFKB2:** OMIM 164012, 10q24.32  
**NKX2-1:** OMIM 600635, 14q13.3  
**NLE1:** Sin n° OMIM, 17q12  
**NOBOX:** OMIM 610934, 7q35  
**NODAL:** OMIM 601265, 10q22.1  
**NOS1:** OMIM 163731, 12q24.22  
**NOTCH1:** OMIM 190198, 9q34.3  
**NOTCH2:** OMIM 600275, 1p12  
**NPC1:** OMIM 607623, 18q11.2  
**NPFFR1:** OMIM 607448, 10q22.1  
**NPVF:** OMIM 616984, 7p15.3

**NR0B1:** OMIM 300473, Xp21.2  
**NR4A1:** OMIM 139139, 12q13.13  
**NR5A1:** OMIM 184757, 9q33.3  
**NRP2:** OMIM 602070, 2q33.3  
**NSMF:** OMIM 608137, 9q34.3  
**OTP:** OMIM 604529, 5q14.1  
**OTUD4:** OMIM 611744, 4q31.21  
**OTX1:** OMIM 600036, 2p15  
**OTX2:** OMIM 600037, 14q22.3  
**OVOL1:** OMIM 602313, 11q13.1  
**PALLD:** OMIM 608092, 4q32.3  
**PAX2:** OMIM 167409, 10q24.31  
**PAX6:** OMIM 607108, 11p13  
**PCSK1:** OMIM 162150, 5q15  
**PDE3A:** OMIM 123805, 12p12.2  
**PIAS4:** OMIM 605989, 19p13.3  
**PITX1:** OMIM 602149, 5q31.1  
**PITX2:** OMIM 601542, 4q25  
**PLEKHA5:** OMIM 607770, 12p12.3  
**PLXND1:** OMIM 604282, 3q22.1  
**PNPLA6:** OMIM 603197, 19p13.2  
**POFUT1:** OMIM 607491, 20q11.21  
**POLR3A:** OMIM 614258, 10q22.3  
**POLR3B:** OMIM 614366, 12q23.3  
**POLR3D:** OMIM 187280, 8p21.3  
**POU1F1 (PIT1):** OMIM 173110, 3p11.2  
**POU3F2:** OMIM 600494, 6q16.1  
**PLPP3:** OMIM 607125, 1p32.2  
**PPHLN1:** OMIM 608150, 12q12  
**PPM1L:** OMIM 611931, 3q25.3-q26.1  
**PPRC1:** OMIM 617462, 10q24.32  
**PRKAG1:** OMIM 602742, 12q13.12  
**PROK2:** OMIM 607002, 3p13  
**PROKR2:** OMIM 607123, 20p12.3  
**PROP1:** OMIM 601538, 5q35.3  
**PTCH1:** OMIM 601309, 9q22.32  
**PTCHD2:** OMIM 611251, 1p36.22  
**PTTG1:** OMIM 604147, 5q33.3  
**RARA:** OMIM 180240, 17q21.2  
**RB1:** OMIM 614041, 13q14.2  
**RBM28:** OMIM 612074, 7q32.1  
**RBPJ:** OMIM 147183, 4p15.2  
**RD3:** OMIM 180040, 1q32.3  
**RNF216:** OMIM 609948, 7p22.1  
**RNPC3:** OMIM 618016, 1p21.1  
**ROR2:** OMIM 602337, 9q22.31  
**RORA:** OMIM 600825, 15q22.2  
**RXRA:** OMIM 180245, 9q34.2  
**SEMA3A:** OMIM 603961, 7q21.11  
**SEMA3E:** OMIM 608166, 7q21.11  
**SEMA7A:** OMIM 607961, 15q24.1  
**SEN2:** OMIM 608261, 3q27.2  
**SFRP1:** OMIM 604156, 8p11.21  
**SHH:** OMIM 600725, 7q36.3  
**SIM1:** OMIM 603128, 6q16.3  
**SIRT1:** OMIM 604479, 10q21.3  
**SIX3:** OMIM 603714, 2p21  
**SIX6:** OMIM 606326, 14q23.1  
**SLC15A4:** OMIM 615806, 12q24.33  
**SLC20A1:** OMIM 137570, 2q14.1  
**SLC9A3R1:** OMIM 604990, 17q25.1  
**SMAD1:** OMIM 601595, 4q31.21  
**SMAD2:** OMIM 601366, 18q21.1  
**SMAD3:** OMIM 603109, 15q22.33  
**SMAD4:** OMIM 600993, 18q21.2  
**SMAD6:** OMIM 602931, 15q22.31  
**SMAD7:** OMIM 602932, 18q21.1  
**SMARCA4:** OMIM 603254, 19p13.2  
**SMURF1:** OMIM 605568, 7q22.1  
**SNIP1:** OMIM 608241, 1p34.3  
**SOSTDC1:** OMIM 609675, 7p21.2  
**SOX10:** OMIM 602229, 22q13.1  
**SOX2:** OMIM 184429, 3q26.33  
**SOX3:** OMIM 313430, Xq27.1  
**SP1:** OMIM 189906, 12q13.13  
**SP3:** OMIM 601804, 2q31.1  
**SPRED2:** OMIM 609292, 2p14  
**SPRY1:** OMIM 602465, 4q28.1  
**SPRY2:** OMIM 602466, 13q31.1  
**SPRY4:** OMIM 607984, 5q31.3  
**SRA1:** OMIM 617264, 19q13.33  
**SRF:** OMIM 600589, 6p21.1  
**STAT3:** OMIM 102582, 17q21.2  
**STAT5B:** OMIM 604260, 17q21.2  
**STIL:** OMIM 181590, 1p33  
**STRAP:** OMIM 605986, 12p12.3  
**STUB1:** OMIM 607207, 16p13.3  
**SUFU:** OMIM 607035, 10q24.32  
**SYNPO2:** Sin n° OMIM, 4q26  
**TAB1:** OMIM 602615, 22q13.1

**TAC3:** OMIM 162330, 12q13.3  
**TACR3:** OMIM 162332, 4q24  
**TANC2:** OMIM 615047, 17q23.2-q23.3  
**TBX19:** OMIM 604614, 1q24.2  
**TBX3:** OMIM 601621, 12q24.21  
**TCF12:** OMIM 600480, 15q21.3  
**TCF3:** OMIM 147141, 19p13.3  
**TCF4:** OMIM 602272, 18q21.2  
**TCF7L1:** OMIM 604652, 2p11.2  
**TDGF1:** OMIM 187395, 3p21.31  
**TET2:** OMIM 612839, 4q24  
**TGFB2:** OMIM 190220, 1q41  
**TGFB1:** OMIM 601692, 5q31.1  
**TGFBR1:** OMIM 190181, 9q22.33  
**TGFBR2:** OMIM 190182, 3p24.1  
**TGIF1:** OMIM 602630, 18p11.31  
**TLE4:** OMIM 605132, 9q21.31  
**TNRC6A:** OMIM 610739, 16p12.1  
**TP53:** OMIM 191170, 17p13.1  
**TRAPPC9:** OMIM 611966, 8q24.3  
**TRIP11:** OMIM 604505, 14q32.12  
**TSHZ1:** OMIM 614427, 18q22.3  
**TSPAN11:** Sin nº OMIM, 12p11.2  
**TSPYL2:** OMIM 300564, Xp11.22  
**TUBB3:** OMIM 602661, 16q24.3  
**TWSG1:** OMIM 605049, 18p11.22  
**TXNDC5:** OMIM 616412, 6p24.3  
**VAX1:** OMIM 604294, 10q25.3  
**WDR11:** OMIM 606417, 10q26.12  
**WDR12:** OMIM 616620, 2q33.2  
**WIF1:** OMIM 605186, 12q14.3  
**WISP1:** OMIM 603398, 8q24.22  
**WNT4:** OMIM 603490, 1p36.12  
**WNT5A:** OMIM 164975, 3p14.3  
**WNT5B:** OMIM 606361, 12p13.33  
**WNT6:** OMIM 604663, 2q35  
**WNT9A:** OMIM 602863, 1q42.13  
**YBX1:** OMIM 154030, 1p34.2  
**ZBTB20:** OMIM 606025, 3q13.31  
**ZEB1:** OMIM 189909, 10p11.22  
**ZNF8:** OMIM 194532, 19q13.43  
**ZFP488:** Sin nº OMIM, 10q11.22  
**ZFYVE9:** OMIM 603755, 1p32.3  
**ZIC1:** OMIM 600470, 3q24  
**ZIC2:** OMIM 603073, 13q32.3  
**ZSWIM6:** OMIM 615951, 5q12.1

Se incluyen además 4 regiones de secuencias reguladoras no codificantes (*ASCL1* 3'UTR; *CDON* 3'UTR; *ZIC2* 3'UTR y *GH1-LCR*)



## **ANEXO 3:**

**Genes incluidos en el panel HIPOPIT\_V1 en los que se ha encontrado alguna variante relevante, agrupados según la/s vía/s de señalización, función o patología con las que se relacionan**

NOTA: Un mismo gen puede pertenecer a varios grupos si se relaciona con más de una vía de señalización, función o patología

Genes “clásicos” relacionados con el desarrollo hipofisario

*PROP1*  
*LHX3*  
*LHX4*

Genes relacionados con la vía de señalización **FGF**

*FGF8*  
*FGFR1*  
*FGF17*  
*FGF18*  
*SPRY2*  
*SPRY4*  
*OTX2*  
*ANOS1 (KAL1)*  
*IL17RD*  
*FLRT3*

Genes relacionados con la vía de señalización **SHH**

*SIX3*  
*ZIC2*  
*TGIF1*  
*GLI2*  
*PTCH1*  
*CDON*  
*EYA4*  
*GPR161*  
*PITX2*  
*PAX2*  
*SOX2*

Genes relacionados con las vías de señalización **WNT**

*PROP1*  
*SOX2*  
*OTX2*  
*PITX2*  
*SIX3*  
*EYA4*  
*NR0B1*  
*SPRY4*  
*NR5A1*  
*ZIC2*

Genes relacionados con la vía de señalización **BMP/TGF-β**

*BMP4*  
*PITX2*  
*GATA2*  
*FOXH1*  
*TDGF1*  
*TGIF1*  
*SIX3*  
*PAX2*  
*ZIC2*

Genes relacionados con la vía de señalización **NOTCH**

*PROP1*  
*PAX2*

Genes relacionados con la vía de la **Prokinetina**

*PROKR2*  
*PROK2*  
*TSHZ1*

Genes relacionados con la vía de señalización **NODAL**

*PITX2*  
*FOXH1*  
*TGIF1*  
*TDGF1*  
*ZIC2*

Genes relacionados con el desarrollo de núcleos hipotalámicos

*HMX2*  
*HMX3*  
*LHX1*  
*LHX8*  
*OTP*  
*ARNT2*  
*NKX2-1*  
*SIM1*  
*NR5A1*  
*NEUROG2*  
*POU3F2*

Genes relacionados con el procesamiento de prohormonas

*PCSK1*

Genes implicados en la etiología del **hipogonadismo hipogonadotrofo congénito (HHC)**

*ANOS1 (KAL1)*  
*FGFR1*  
*FGF8*  
*PROKR2*  
*PROK2*  
*GNRH1*  
*GNRHR*  
*LEPR*  
*TSHZ1*  
*SPRY4*  
*FLRT3*  
*CHD7*  
*NR0B1*  
*SEMA3A*  
*IL17RD*  
*TACR3*  
*SOX10*

Genes implicados en la etiología de la **holoprosencefalia (HPE)**

*GLI2*  
*SIX3*  
*EYA4*  
*PTCH1*  
*FOXH1*  
*TGIF1*  
*CDON*  
*TDGF1*  
*ZIC2*

## **ANEXO 4:**

**Tabla de datos fenotípicos de cada uno de los probandos  
incluidos en el estudio**

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
1	DCHH	Sindrómico	V	0,3	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Macrocefalia sin hidrocefalia, RPM leve, miopía y astigmatismo, obesidad.	Espátulas. Apgar 7/8	No relevantes
2	DCHH	Sindrómico	M	0	Hipotonía e hipoglucemia neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible. Hipoplasia de CC.	Hipertelorismo, platirrinia, RGE, <i>hallux valgus</i> bilateral, hiperlaxitud, CIV muscular pequeña. Megacisterna magna.	Fórceps. Apgar 7/7	Madre con poliquistosis renal
3	DCHH	Sindrómico	M	0	Colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido hiperprolactinemia	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible. Hipoplasia de CC.	Orejas de implantación baja, hipotonía, oblicuidad de hendiduras palpebrales, paladar ojival, pliegue palmar único izq, CIA sin repercusión, vómitos, incompetencia del velo del paladar.	FIV. Amenaza de aborto a los 4 meses.	No relevantes
4	DCHH	ND	V	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
5	DCHH	Sindrómico	M	0	Hipoglucemia, hiponatremia y convulsión neonatal. Colestasis.	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	Normal	Ano anterior	Apgar 9/10. Convulsiones en contexto de hipoglucemia e hiponatremia.	Tía materna labio leporino. Tía paterna abortos de repetición. Abuelo paterno ataxia cerebelosa progresiva.
6	DCHH	Sindrómico	V	0	Micropene e hipoglucemia neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Obesidad, malformación de Chiari tipo 1.	Normal. Apgar 6/10	Consanguinidad. Etnia gitana.
7	DCHH	No sindrómico	M	17	Pubertad retrasada	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Presentación podálica, parto vaginal	Origen turco
8	DCHH	No sindrómico	M	6	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH	NH ectópica, AH hipoplásica	-	Normal	Origen turco
9	DCHH	Sindrómico	M	15	Pubertad retrasada	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	NH ectópica, tallo no visible. AH normal.	Hipoplasia/aplasia cerebelosa izquierda, hipoacusia derecha, parálisis facial congénita derecha, displasia dérmica frontal derecha, hipotelorismo, RPM leve.	Normal	No relevantes
10	DCHH	Sindrómico	M	4	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH desconocido	Normal	Escoliosis, hipersudoración.	Adoptada. Sin datos neonatales	Adoptada. Origen chino Madre biológica 130 cm de altura. Sin más datos familiares
11	DCHH	No sindrómico	V	4	Hipoglucemias y colestasis neonatal. Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo filiforme	-	Apgar 9/10. Hipoglucemias y colestasis neonatal	No relevantes

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
12	DCHH	No sindrómico	V	0	Hipoglucemias y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	NH ectópica, tallo no visible.	-	Cesárea por útero bicorne, 3 vueltas de cordón. Apgar 6/8. Paresia braquial derecha, tendencia a hipotonía, acidosis metabólica, hernia umbilical.	Madre con útero bicorne
13	DCHH	Sindrómico	M	ND	ND	ND	NH no visible, AH y tallo normales	Escoliosis dorsal.	Adoptada. Sin datos neonatales	Adoptada. Origen marroquí. Sin datos familiares.
14	DCHH	No sindrómico	V	12	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, ADH, LH/FSH desconocido	Normal	-	Normal	Origen turco
15	DCHH	No sindrómico	M	7	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Amenaza de aborto en las primeras semanas. Parto en presentación podálica	No relevantes
16	DCHH	Sindrómico	V	0	Micropene, criptorquidia bilateral, hipoglucemias y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible, hipoplasia de CC	Hipospadias	Fórceps, Apgar 5/7. Convulsión neonatal. Varias paradas cardiorrespiratorias en los primeros días.	Dos abortos previos, uno temprano y otro a los 6 meses de gestación.
17a	DCHH	No sindrómico	M	ND	ND	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	ND	-	ND	Hermana (#17b) con DCHH (GH, TSH, ACTH, LH/FSH), con la misma variante en PROP1 en homocigosis
17b	DCHH	No sindrómico	M	ND	ND	GH, TSH, LH/FSH	ND	-	ND	Hermana (#17a) con DCHH (GH, TSH, ACTH, LH/FSH), con la misma variante en PROP1 en homocigosis
18	DCHH	No sindrómico	V	2	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Hipoglucemias neonatales transitorias	Padre con desarrollo puberal tardío
19	DCHH	Sindrómico	V	0	Hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH, ADH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles.	Malformación de Arnold-Chiari, ventriculomegalia.	PEG, hipoglucemias neonatales.	Consanguinidad. Tallas bajas en ambas ramas familiares
20	DCHH	No sindrómico	V	9	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH, hiperprolactinemia	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Presentación podálica, sufrimiento fetal agudo, Apgar 1/5	No relevantes
21	DCHH	No sindrómico	V	ND	Retraso puberal y del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH	NH ectópica	Portador heterocigoto de la mutación C282Y del gen HFE ligado a la hemocromatosis hereditaria	ND	ND

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
22	DCHH	No sindrómico	V	0	Criptorquidia bilateral, ictericia neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles	Osteoporosis	ND	No relevantes
23	DCHH	Sindrómico	V	ND	Criptorquidia bilateral	GH, LH/FSH	AH hipoplásica, hipoplasia de cuerpo calloso	Hipotiroidismo primario subclínico. RPM. Crisis convulsivas. Atrofia corticosubcortical difusa.	ND	Hermana con hipotiroidismo subclínico
24	DCHH	Sindrómico	M	ND	ND	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica	Atrofia renal, hipertrigliceridemia familiar	ND	Hermano gemelo HTA y hemorragia cerebral a los 6 meses. Padre DM tipo 2, HTA e hipercolesterolemia. Hermana pequeña pubertad precoz con RMN hipofisaria normal.
25	DCHH	Sindrómico	M	10	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Hidrocefalia secundaria a estenosis del acueducto de Silvio (portadora de válvula de derivación)	Cesárea por no progresión del parto, sin sufrimiento fetal	Madre hipotiroidismo primario
26	DCHH	ND	V	ND	ND	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	ND	-	ND	ND
27	DCHH	Sindrómico	V	5	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Pie zambo congénito	Presentación podálica, cesárea	Padre pubertad retrasada, tía materna hipotiroidismo
28	DCHH	Sindrómico	V	0,6	Retraso del crecimiento, criptorquidia unilateral	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Malformación de Chiari tipo I	Normal	Madre hipoglucemia neonatal. Padre perforación esofágica neonatal
29	DCHH	No sindrómico	M	0	Convulsión por hipoglucemia neonatal, colestasis	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	NH ectópica, tallo no visible, AH normal	Drepanocitosis.	Parto normal. Apgar 9/10	Procedente de África subsahariana.
30	DCHH	No sindrómico	V	0	Hipoglucemias neonatales, micropene	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	TDAH	Parto normal	FIV con donación de semen. AF maternos no relevantes, paternos desconocidos
31	DCHH	No sindrómico	V	2	Retraso del crecimiento	GH, TSH	Lesión sólida sugestiva de macroadenoma que se extiende a cisterna supraselar	Rasgos faciales infantiles, nariz pequeña, obesidad troncular.	Parto normal	Consanguinidad. Padres primos hermanos. Origen turco
32	DCHH	Sindrómico	V	0	Micropene, criptorquidia, labio leporino, polidactilia	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Polidactilia postaxial en ambas manos, labio leporino, hipoplasia malar, microcefalia, RPM grave, epilepsia, escoliosis. Atrofia cortico-subcortical.	41 semanas. Fórceps. Apgar 5/7. Hipoglucemia e hiponatremia.	Padre camptodactilia en mano izquierda. Tía paterna sindactilia dedos 3-4 de la mano bilateral. Abuelo paterno polidactilia de ambos pies.
33	DCHH	No sindrómico	V	5	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH, ADH	AH hipoplásica, NH ectópica	-	ND	No relevantes

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
34	DCHH	No sindrómico	M	4	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, hiperprolactinemia, LH/FSH desconocido	Silla turca vacía parcial	Orejas de implantación baja	Parto normal	No relevantes
35	DCHH	No sindrómico	M	14	Talla baja	GH, TSH, LH/FSH desconocido	Masa que ocupa la silla turca, y se extiende hacia el suelo del tercer ventrículo.	Obesidad troncular, rasgos faciales infantiles.	ND	Origen turco
36	DCHH	No sindrómico	M	9	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH	Silla turca vacía parcial. Masa en el suelo del tercer ventrículo	-	ND	Consanguinidad. Origen turco
37	DCHH	No sindrómico	V	7	Retraso del crecimiento y poliuria-polidipsia	GH, ADH	AH hipoplásica, NH no visible, tallo adelgazado	Obesidad	Embarazo gemelar con pérdida de un feto a las 10 semanas. Cesárea urgente a las 35 semanas por <i>abruptio placentae</i> . Apgar 10/10. Hipoglucemias neonatales.	No relevantes
38	DCHH	Sindrómico	V	0	Hipoglucemia neonatal, micropene	GH; TSH; ACTH; LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Nariz bulbosa, labios gruesos, epicanto, paladar estrecho, estrabismo, obesidad.	Normal	Varios familiares con fenotipo patológico (ver <i>Resultados</i> , sección C)
39	DCHH	No sindrómico	M	2	Retraso del crecimiento y poliuria-polidipsia	GH, ADH	NH no visible, leve engrosamiento de tallo	-	ND	ND
40	DCHH	No sindrómico	M	2,5	Diabetes insípida	GH, TSH, ACTH, ADH	AH hipoplásica, NH no visible, tallo adelgazado. Tuvo un engrosamiento inicial transitorio de tallo en RMN a los 4 años, con adelgazamiento posterior.	-	Normal	ND
41	DCHH	Sindrómico	V	0	Micropene, criptorquidia bilateral, hipoglucemias (crisis) y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Pie varo adducto izquierdo	Cesárea por RBPF. Apgar 9/10. Crisis por hipoglucemia, pie varo adducto izquierdo	Tío materno con antecedentes de criptorquidia, ictericia y espasmos del sollozo en la infancia, problemas de fertilidad.
42	DCHH	Sindrómico	V	7	Retraso del crecimiento	GH, TSH	NH ectópica, tallo adelgazado, AH hipoplásica	Nariz bulbosa	Normal	Dos primas paternas recibieron GH en la infancia (con padres de talla baja). Hermanastra materna sindactilia dedos 2-3 en ambos pies (también lo tiene el padrastro, no relacionado con el probando)

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
43	DCHH	No sindrómico	V	1,3	Hipoglucemias, colestasis, micropene	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Amenaza de aborto en las primeras semanas. Cesárea por no progresión. Al nacimiento normal. Hipoglucemias neonatales.	Procedente de África subsahariana
44	DCHH	Sindrómico	V	2	Retraso del crecimiento. Criptorquidia bilateral	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Insuficiencia aórtica leve. Sobrepeso.	Normal	No relevantes
45	DCHH	No sindrómico	M	2	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, silla turca vacía parcial, NH no visible	-	ND	No relevantes
46	DCHH	ND	V	ND	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles	-	ND	ND
47	DCHH	ND	V	ND	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	ND	ND
48	DCHH	Sindrómico	M	ND	ND	GH, TSH	AH hipoplásica, tallo adelgazado	Orejas despegadas, frente triangular, punta nasal bulbosa, clinodactilia del 5º dedo	Normal	Madre con menarquia a los 9 años
49	DCHH	No sindrómico	V	ND	Micropene e hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH	ND	ND	Espátulas, ventosa. Hipoglucemias neonatales con convulsiones	Hermano con hipoplasia hipofisaria e hipotalámica
50	DCHH	Sindrómico	V	ND	Micropene e hipoglucemias neonatales	GH, TSH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ausente	Paladar ojival, turricefalia neonatal, telecanto, micrognatia	Parto inducido por registro poco reactivo. Apgar 9/9.	No relevantes
51	DCHH	Sindrómico	V	13	Micropene, criptorquidia unilateral, retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	NH ectópica, tallo normal, AH hipoplásica	Riñón en herradura	ND	No relevantes
52	DCHH	No sindrómico	V	11	Hipoglucemia neonatal y retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica	Criptorquidia derecha	Hemorragia durante el parto. Nudo de cordón. Apgar 9/10. Hipoglucemia neonatal.	No relevantes
53	DCHH	Sindrómico	V	1	Criptorquidia bilateral, retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH	AH hipoplásica, tallo filiforme, NH normal, silla turca pequeña e hipotálamo de pequeño espesor	Ageneia renal derecha. Sincinesias de las manos. Hipotonía axial. Cara triangular, leve hipoplasia mediofacial, paladar ojival, ojos prominentes, escroto hipoplásico. Hipoplasia de bulbos olfatorios.	PEG. Cesárea por presentación podálica. EG 36+5 semanas. Hipoglucemia neonatal.	No relevantes
54	DCHH	No sindrómico	M	1	Retraso del crecimiento	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo normales	-	Normal	No relevantes



#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
55	DCHH	Sindrómico	M	15	Amenorrea secundaria	GH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Hamartoma intraventricular en el tercer ventrículo. Labios finos, cuello ancho, paladar ojival, micrognatia, <i>cubitus valgus</i> , 4º metacarpiano corto, membranas interdigitales.	Normal	Prima de la madre esterilidad y menopausia precoz.
56	DCHH	No sindrómico	V	0	Micropene, criptorquidia bilateral, hipoglucemias y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH, hiperprolactinemia	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Parto normal. Apgar 9/10	Madre con un aborto previo. Una hermana con polidactilia.
57	DCHH	No sindrómico	V	0	Micropene, hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles		Parto normal	Procedente de África subsahariana
58	DCHH	No sindrómico	V	2	Micropene, hipoglucemia neonatal	GH, TSH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Fecundación in vitro. Parto normal.	ND
59	DCHH	No sindrómico	V	0	Micropene, hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Parto normal	Hermano recién nacido con "panhipopituitarismo + alteración estructural en RMN", pendiente de estudio genético
60	DCHH	No sindrómico	V	1	Hipoglucemias e ictericia neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH no visible, tallo normal	TDAH	Prematuro (28 semanas), presentación de nalgas, parto vaginal, Apgar 2/6	Madre con pubertad tardía
61	DCHH	No sindrómico	V	12	Retraso del crecimiento	GH, LH/FSH	NH ectópica, AH y tallo normales.	Obesidad	ND	No relevantes
62	DCHH	ND	M	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
63	DCHH	Sindrómico	V	1	Hipoglucemia, micropene, retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	NH no visible, tallo no visible, AH hipoplásica	Respuesta intermedia al tratamiento con GH, precisando dosis más altas de las habituales. Rasgos faciales peculiares. Realizado estudio previo de sd. Williams negativo.	ND	No relevantes
64	DCHH	ND	M	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND
65	DCHH	No sindrómico	M	1	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	Agenesia de AH, NH ectópica, tallo ausente	-	Parto normal. Apgar 9/10	No relevantes
66	DCHH	No sindrómico	V	0	Micropene, hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica.	Obesidad	Presentación podálica, parto vaginal. Apgar 7/9/10.	Un aborto en la madre.
67	DCHH	No sindrómico	V	3	Micropene y retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica. Resto normal	Quiste pineal.	Parto normal.	No relevantes
68	DCHH	ND	V	ND	ND	ND	ND	-	ND	ND

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
69	DCHH	Sindrómico	V	0	Micropene, criptorquidia unilateral, hipoglucemia y colestasis neonatales	TSH, ACTH, LH/FSH, GH desconocido	NH no visible, tallo normal, AH hipoplásica	Encefalopatía (convulsiones, RPM), pie equinovaro bilateral, anomalías digitales (camptodactilia de los dedos 2º a 4º de las manos y clinodactilia del 5º). Insuficiencia respiratoria desde el nacimiento. Fallecido a los 4 meses de edad por exacerbación de su insuficiencia respiratoria.	Parto eutócico. Apgar 6/7. Precisa soporte respiratorio con CPAP desde el nacimiento.	Consanguinidad (padres primos hermanos). Etnia gitana
70	DCHH	No sindrómico	V	0	Micropene e hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	-	Cesárea. Apgar 8/9.	Origen marroquí
71a	DCHH	Sindrómico	M	4	Retraso del crecimiento, cuadro sindrómico	GH, TSH, LH/FSH	Agenesia de AH. Resto ND	Incisivo central único, atresia de coanas, paladar ojival, orejas de implantación baja.	Presentación podálica. Cesárea por RBPF. Apgar 5/7.	Hermana (#71b) con deficiencia aislada de GH e hipoplasia de AH. Madre DM tipo 1 e hipotiroidismo.
71b	DAGH-LM	No sindrómico	M	ND	Hipoglucemia neonatal	GH	AH hipoplásica. Resto normal	-	Parto normal. Hipoglucemia neonatal.	Hermana (#71a) con DCHH, agenesia de AH e incisivo central único. Madre con DM tipo 1 e hipotiroidismo.
72	DAGH-LM	No sindrómico	M	3	ND	GH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible, silla turca pequeña	-	Normal. Apgar 8/10	Madre con DAGH, menarquia con 17 años, talla 142 cm, RMN hipofisaria normal
73	DAGH-LM	ND	V	ND	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles	ND	ND	No relevantes
74	DAGH-LM	No sindrómico	V	11	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, silla turca vacía parcial, NH y tallo normales	Hipotiroidismo primario	ND	ND
75	DAGH-LM	Sindrómico	M	1	Hipoglucemias neonatales	GH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles	Braquitturicefalia.	Prematura de 35 semanas.	No relevantes
76	DAGH-LM	Sindrómico	M	6	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Quiste pineal. Estrabismo, nistagmo horizontal congénito (familiar).	Parto inducido a la semana 43. Apgar 6/8	Familia paterna con tallas bajas. Madre y abuelo materno nistagmo.
77	DAGH-LM	Sindrómico	V	5	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo adelgazado	Microcefalia (PC en -5,2 DE), astigmatismo, mancha café con leche en tórax. Gliosis de sustancia blanca subcortical parieto-occipital izquierda.	CIR. Parto normal. Apgar 7/10.	Consanguinidad. Origen marroquí
78	DAGH-LM	Sindrómico	V	9	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible	Ptos palpebral congénita, nistagmo vertical congénito,	ND	No relevantes
79	DAGH-LM	Sindrómico	V	1,5	Retraso del crecimiento	GH	Hipoplasia hipofisaria	Macrocefalia con aumento de espacios subaracnoideos de la convexidad.	CIR disarmónico	Consanguinidad. Origen marroquí

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
80	DSO	ND	M	ND	Microftalmía	GH, TSH, ACTH, LH/FSH	ND	Microftalmía, amaurosis bilateral, trastorno del espectro autista, RPM grave, ataxia, escoliosis, osteoporosis, obesidad	Sufrimiento fetal	No relevantes
81	DSO	DSO aislada	M	8	Retraso del crecimiento	GH, TSH, ACTH	AH hipoplásica, NH no visible, tallo filiforme, hipoplasia bilateral de NO, hipoplasia de bulbos olfatorios	Déficit visual grave, hipoplasia cerebelosa (vermis y hemisferios), ataxia, tronco cerebral pequeño, complejo Dandy-Walker o Chiari tipo IV, escoliosis leve	Pretérmino de 32 semanas, PEG, presentación podálica, prolapso de cordón, parto vaginal, hipotonía axial neonatal	No relevantes
82	DSO	DSO aislada	V	4	Síndrome polimalformativo	GH, ACTH, hiperprolactinemia, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles. Hipoplasia de CC.	Síndrome polimalformativo: incisivo central único, hipoplasia de hemicara derecha, anoftalmía derecha, hipoplasia cerebelosa, craneosinostosis, RPM.	Parto con ventosa. Apgar 6/8/10	Padre con diabetes MODY 2
83	DSO	DSO aislada	M	0	Hipoglucemias y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	Hipoplasia grave de AH, NH y tallo no visibles, agenesia parcial (porción dorsal) de CC	Meningocele frontal	Parto normal. Apgar 9/10. Hipotonía y distrés neonatal inmediato.	No relevantes
84	DSO	DSO aislada	V	0	Signos oftalmológicos	Ninguna, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, tallo adelgazado, hipoplasia de NO derecho, agenesia de SP.	-	Normal	No relevantes
85	DSO	DSO-Plus	V	3	Retraso del crecimiento	GH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo normales. Hipoplasia de CC.	Esquisencefalia. Hipoplasia mediofacial.	Presentación cefálica, parto vaginal. Ingreso 5 días en UCI neonatal (motivo ND)	Consanguinidad. Origen turco
86	DSO	DSO aislada	M	0	Hallazgos ecográficos prenatales	TSH, ADH, LH/FSH desconocido.	NH no visible, tallo filiforme, AH normal. Hipoplasia bilateral de NO, agenesia de SP, hipoplasia de CC.	Amaurosis casi completa, RPM, TEA. Malformación de Chiari tipo I, disminución global de volumen de sustancia blanca, fenestraciones de la hoz cerebral.	Normal	Padre riñón único.
87	DSO	DSO-Plus	V	0	Convulsión neonatal	GH, ACTH, ADH	Hipófisis normal. Hipoplasia bilateral de NO, agenesia de SP.	Esquisencefalia. Déficit visual grave, RPM, miocardiopatía dilatada resuelta.	Parto normal. Apgar 9/10. Convulsión neonatal (36 horas de vida), hipocalcemia e hiperfosforemia, hidronefrosis bilateral grado II.	Consanguinidad. Origen marroquí.
88	DSO	ND	V	1	RPM.	LH/FSH desconocido	Agenesia de cuerpo caloso y de SP. Hipoplasia bilateral de NO.	RPM grave. Miopía elevada progresiva. Crisis convulsivas. Displasia fibrosa del esfenoides.	Normal. Apgar 9/9.	Un aborto previo en la madre. Un primo de la madre epiléptico. Origen sudamericano.
89	DSO	DSO aislada	M	0,3	Clínica oftalmológica	TSH, ACTH	AH y NH normales. Tallo adelgazado. Hipoplasia bilateral de NO, hipoplasia del área hipotalámica	Obesidad. Menarquia 5 años tras el inicio puberal, con periodos de amenorrea secundaria posteriores, tratados con progestágenos.	Normal	No relevantes

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
90	DSO	DSO-Plus	V	1	Hipoglucemias neonatales	TSH, LH/FSH desconocido	Hipófisis normal. Hipoplasia de NO derecho	RPM, grave atrofia cortical, lesiones de malacia occipitales bilaterales con predominio derecho, ventriculomegalia en astas occipitales.	Parto normal. Apgar 9/10	No relevantes
91	DSO	DSO aislada	V	0	Hallazgos ecográficos prenatales	Ninguna	Hipófisis normal, hipoplasia de NO derecho, agenesia de SP	Deficiencia visual grave en ojo derecho	Normal	Un aborto en la madre. Origen marroquí.
92	DSO	DSO-Plus	M	0	Hallazgos ecográficos prenatales	GH, TSH, ACTH, LH/FSH, hiperprolactinemia	AH hipoplásica, NH ectópica, hipoplasia de NO, Agenesia de cuerpo calloso	Fisura palatina, orejas de implantación baja, hipertelorismo, raíz nasal ancha, ceguera, sordera neurosensorial, RPM, convulsiones, hipotonía, escoliosis. Atrofia cortical infra y supratentorial.	Presentación podálica, sufrimiento fetal, Apgar 0/4, encefalopatía hipóxico-isquémica, apneas y crisis neonatales.	Un aborto en la madre
93	DSO	DSO-Plus	M	ND	ND	Ninguna	Hipoplasia bilateral de NO, hipoplasia de cuerpo calloso, agenesia parcial de SP	Polimicrogiria frontal derecha, esquisencefalia de labio abierto izquierda. Fisura palatina.	Ictericia neonatal. Amenaza de aborto a las 6 semanas de EG.	Consanguinidad (padres primos segundos)
94	DSO	DSO-Plus	V	1	Rasgos sindrómicos	TSH, ACTH, GH desconocido, LH/FSH desconocido	Hipoplasia de NO. Hipófisis normal.	Ceguera izquierda, RPM, rasgos sindrómicos (frente alta y estrecha, epicanto y ptosis bilateral, narinas antevertidas, filtrum largo, microstomía, orejas de implantación baja). Endotropía no parética de ojo derecho. Insuficiencia velopalatina. Atrofia corticosubcortical y heterotopia periventricular en asta temporal, atrio y asta occipital izquierda.	Cesárea por RPBf. Apgar 7/10.	No relevantes
95	DSO	DSO-Plus	V	0,5	Ictericia prolongada, criptorquidia bilateral	TSH, ACTH, LH/FSH desconocido	NH normal, tallo fino, AH hipoplásica. Hipoplasia de NO. Hipoplasia de CC.	RPM grave, hipotonía, aplanamiento frontal, ceguera, síndrome pierde-sal cerebral, hepatomegalia. En RMN esquisencefalia, hipoplasia de nervios ópticos, hipoplasia de cuerpo calloso, hipoplasia de bulbo olfatorio izquierdo.	Parto normal	Desconocidos (adopción). Origen sudamericano.
96	DSO	DSO aislada	M	ND	Hipoglucemias neonatales	GH, TSH, ACTH	AH hipoplásica, NH normal, tallo no visible, hipoplasia de NO izquierdo, agenesia de SP	Enfermedad de McArdle. Amaurosis en ojo izquierdo, miopía en ojo derecho.	Hipoglucemias	ND
97	DSO	DSO aislada	M	0,2	Nistagmo neonatal	GH	Agenesia de cuerpo calloso y SP. Hipoplasia de NO. Hipófisis y tallo normales.	Transexualidad (Female to Male)	Parto normal	No relevantes

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
98	DSO	ND	M	5	Retraso del crecimiento	GH, ACTH	AH hipoplásica, hipoplasia de NO izquierdo, hipoplasia de cuerpo caloso.	Paraparesia espástica	ND	No relevantes
99	DSO	DSO aislada	M	1	Anoftalmía	GH, TSH, hiperprolactinemia	NH no visible, AH y tallo normales. Agenesia de NO bilateral.	Anoftalmía bilateral, hipoplasia facial con órbitas pequeñas y globos oculares hipoplásicos. RPM. Hipotonía axial. Obesidad.	ND	No relevantes
100	DSO	DSO aislada	M	2	RPM	ND	Hipoplasia de nervios ópticos, agenesia de SP	RPM. Malformación de Chiari tipo I. Orejas de implantación baja.	Parto normal. Apgar 9/9.	Madre hipotiroidismo. Tío materno microcefalia.
101	DSO	DSO aislada	M	2	ND	GH, ACTH	AH normal. Hipoplasia de NO bilateral, agenesia de SP.	Microftalmía leve. Ceguera. Retraso motor.	Parto normal. Apgar 6/8.	Una prima del padre amaurosis unilateral congénita, y el hermano de ésta (primo del padre) CI límite.
102	DSO	DSO aislada	M	ND	ND	Ninguna	AH hipoplásica, NH normal, tallo filiforme. Hipoplasia de NO bilateral.	Deficiencia visual grave, nistagmo.	Parto normal. Apgar 9/9.	ND
103	DSO	DSO aislada	V	1	Retraso del crecimiento	GH	AH hipoplásica, NH ectópica, tallo no visible. Hipoplasia de NO bilateral.	-	Parto normal. Apgar 6/9.	Padre diagnosticado de deficiencia de GH (RMN con AH hipoplásica y NH ectópica). Madre talla baja y menarquia tardía. Tallas bajas en ambas ramas familiares.
104	DSO	DSO aislada	V	ND	ND	Ninguna. LH/FSH desconocido	Agnesia bilateral de NO, hipoplasia de CC, NH pequeña, AH y tallo normales	RPM grave, ceguera, hipotelorismo, micrognatia. Hipoplasia grave de quiasma y cintillas ópticas.	Parto normal. Apgar 9/10.	Un aborto previo en la madre.
105	DSO	DSO aislada	M	0	ND	ACTH, ADH	NH ectópica, AH y tallo normales. Agenesia de CC	RPM	Parto normal. Apgar 8/9.	No relevantes
106	DSO	DSO aislada	M	2	ND	GH	AH hipoplásica. Hipoplasia de NO	Ceguera	Parto normal	No relevantes
107	DSO	DSO aislada	V	1	Poliuria, polidipsia	GH, ACTH, ADH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH y tallo no visibles. Hipoplasia de NO bilateral, agenesia de SP	Estrabismo	Parto normal	No relevantes
108	DSO	DSO aislada	M	ND	ND	Ninguna	Hipoplasia de NO. Agenesia de SP. Hipófisis normal.	-	Parto normal	No relevantes
109	DSO	DSO aislada	V	0	Micropene, hipoglucemias y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, hiperprolactinemia, LH/FSH desconocido	NH ectópica, AH y tallo normales. Hipoplasia de NO.	Obesidad	Parto normal. Apgar 5/8/9	No relevantes

#	Grupo de DX	Subgrupo	Sexo	Edad al DX (años)	Clínica al debut	Deficiencias hipofisarias	Hallazgos de RMN hipofisaria y sobre criterios de DSO	Otros datos fenotípicos	AP perinatales y gestación	Antecedentes familiares
110	DSO	DSO aislada	V	0	Criptorquidia bilateral, micropene, hipoglucemias y colestasis neonatal	GH, TSH, ACTH, hiperprolactinemia, LH/FSH desconocido	NH ectópica, tallo no visible, AH normal. Agenesia de SP. Vía óptica normal.	Orejas de implantación baja, micrognatia, hipertelorismo.	Parto normal. Apgar 8/8.	No relevantes
111	DSO	DSO aislada	M	4	Retraso del crecimiento	GH, ACTH, LH/FSH desconocido	AH hipoplásica, NH ectópica. Hipoplasia de NO	Microftalmía, ptosis palpebral, incisivo único, ataxia, RPM, obesidad.	Parto con fórceps. Apgar 3/5.	No relevantes
112	DSO	DSO aislada	V	ND	ND	ADH, LH/FSH desconocido	AH y NH hipoplásicas. Hipoplasia de NO, hipoplasia de SP, hipoplasia de bulbos olfatorios.	Microftalmía derecha, coriorretinitis izquierda, ataxia, RPM.	Parto normal. Apgar 9/10	No relevantes

**DX:** Diagnóstico; **TTO:** Tratamiento; **RMN:** Resonancia magnética nuclear; **DCHH:** Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **DSO:** Displasia septo-óptica; **DAGH-LM:** Deficiencia de GH con anomalías de línea media; **V:** Varón; **M:** Mujer; **ND:** No disponible; **AH:** Adenohipófisis; **NH:** Neurohipófisis; **NO:** Nervio/s óptico/s; **CC:** Cuerpo caloso; **SP:** Septo pelúcido; **RGE:** Reflujo gastroesofágico; **CIV:** Comunicación interventricular; **CIA:** Comunicación interventricular; **RPM:** Retraso psicomotor; **TDH:** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad; **HPE:** Holoprosencefalia; **PC:** Perímetro cefálico; **TEA:** Trastorno del espectro autista; **FIV:** Fecundación in vitro; **PEG:** Pequeño para la edad gestacional; **EG:** Edad gestacional; **CPAP:** Presión positiva continua en la vía aérea; **CIR:** Crecimiento intrauterino restringido; **RPBF:** Riesgo de pérdida de bienestar fetal.

## **ANEXO 5:**

**Tabla de variantes relevantes presentes en cada uno de los probandos, detectadas a través del panel HIPOPIT\_V1**

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
1	<i>TSHZ1</i>	NM_005786.5:c.2264G>A, p.(Arg755His)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Prokineticina (HHC)	0,003	ND	0,008	5.26	23,2	0,9779	
	<i>BMP4</i>	NM_001202.3:c.794G>A, p.(Trp265*)	HTZ	Nonsense	De novo	Patogénica	BMP-TFGβ	ND	ND	ND	5.43	42	0,9967	Nueva variante patogénica. Codón de parada dentro del propéptido, con pérdida de todo el péptido maduro BMP4 (Ver Resultados y Discusión, sección B)
2	<i>HMX3</i>	NM_001105574.1:c.439T>G, p.(Ser147Ala)	HTZ	Missense	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,18	0,4	0,57	4,52	22,9	0,9769	Fuera de los dominios principales, pero cerca de un residuo de serina que debe ser fosforilado (aa 153)
4	<i>LHX8</i>	NM_001001933.1:c.-61A>G	HTZ	5'UTR	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,0032	ND	ND	3,12	ND	ND	5'UTR
6	<i>OTP</i>	NM_032109.2:c.284C>T, p.(Ala95Val)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,52	0,2	0,38	4,53	23	0,9983	Variante próxima al dominio de unión a ADN (aas 104-163)
	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	ND	Probablemente benigna	(HHC)	0,61	0,3	0,91	5,36	17,71	ND	Variante descrita previamente en un caso de HHC con anosmia en una familia en la que también existía fisura palatina (330). Dentro de una región rica en residuos Lys (aas 597-718).
	<i>GPR161</i>	NM_153832.2:c.-1255T>C	HTZ	5'UTR	Madre	VUS	SHH	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Nueva variante dentro de la región 5'UTR
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Dentro del dominio Peptidasa S8 (aas 162 – 451). Descrita con anterioridad con repercusión funcional, con disminución del 10,4% de actividad respecto a wild-type.
	<i>TSHZ1</i>	NM_001308210.1:c.3141G>A, p.(Ala1047=)	HMZ	Sinónima	Ambos	Probablemente benigna	Prokineticina (HHC)	0,347	0,2	0,285	-0,388	ND	ND	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un donador críptico)
7	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.1375C>T, p.(Arg459Cys)	HTZ	Missense	Padre	VUS	(HHC)	0,018	ND	ND	4,48	24,5	0,9989	Variante dentro de una región rica en residuos Pro (aas 383–568)



#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
	<i>GNRH1</i>	NM_000825.3:c.153G>C, p.(Glu51Asp)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Implicación en HHC (HHC)	0,15	0,04	0,16	5,48	27	0,9982	Variante missense, además con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).
8	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.2575del, p.(Ser859Profs*53)	HTZ	Frameshift	ND	Patogénica	SHH (HPE)	ND	ND	ND	4,48	35	ND	Nueva variante patogénica (Ver Resultados y Discusión, sección C)
	<i>EYA4</i>	NM_004100.4:c.838C>A, p.(Gln280Lys)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH, WNT, interacción con SIX3 (HPE)	0,003	0,02	0,0077	5,73	27,4	0,9964	
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	ND	Probablemente benigna	(HHC)	0,61	0,3	0,91	5,36	17,71	ND	Ver comentario en paciente 6
9	<i>GPR161</i>	NM_001267609.1:c.742G>A, p.(Val248Ile)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH	0,047	0,1	0,015	4,5	17,63	0,984	
10	<i>NROB1</i>	NM_000475.4:c.152G>A, p.(Arg51Lys)	HTZ	Missense	ND	VUS	Participa en el equilibrio NR5A1/WNT-catenina/NROB1 dependiente de GNRH a nivel hipofisario (HHC)	0,025	ND	ND	4,42	23,1	0,9753	
12	<i>SEMA3A</i>	NM_006080.2:c.1140+26T>G	HTZ	Intrónica	ND	VUS	(HHC)	ND	ND	ND	-4,25	ND	ND	Nueva variante intrónica con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).
	<i>TSHZ1</i>	NM_001308210.1:c.2506G>A, p.(Ala836Thr)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Prokineticina (HHC)	0,0097	0,02	0,0077	4,96	24,9	0,8702	
15	<i>PROKR2</i>	NM_144773.2:c.254G>T, p.(Arg85Leu)	HTZ	Missense	Madre	Probablemente patogénica	Prokineticina (HHC)	0,031	0,1	ND	4,79	28,4	0,9987	Variante ya descrita en un paciente con DCHH, y considerada patogénica (64). En la posición 85 hay varias

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
													mutaciones patogénicas descritas con repercusión funcional demostrada (126). Afecta al primer loop intracelular	
	<i>FGFR1</i>	NM_023110.2:c.128T>G, p.(Phe43Cys)	HTZ	Missense	Padre	VUS	FGF (HHC)	ND	ND	ND	4,45	25,8	0,9875	Nueva variante. Dentro del primer dominio "Ig-like C2" (aas 25-119)
16	<i>FGF8</i>	NM_033163.3:c.327C>T, p.(Gly109=)	HTZ	Sinónima	Padre	VUS	FGF (HHC)	0,0004	ND	ND	-7,62	ND	0,9453	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un donador críptico)
	<i>HMX2</i>	NM_005519.1:c.644C>T, p.(Ala215Val)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,021	0,02	0,023	5,3	34	0,9993	
17a	<i>PROP1</i>	NM_006261.4:c.217C>T, p.(Arg73Cys)	HMZ	Missense	ND	Patogénica	Gen clásico, NOTCH, WNT	0,0007	ND	ND	2,53	25,3	0,9992	Variante patogénica ya descrita. Dentro del homeodominio de unión a ADN. Repercusión funcional demostrada experimentalmente (331)
17b	<i>PROP1</i>	NM_006261.4:c.217C>T, p.(Arg73Cys)	HMZ	Missense	ND	Patogénica	Gen clásico, NOTCH, WNT	0,0007	ND	ND	2,53	25,3	0,9992	Ver paciente 17a
18	<i>OTX2</i>	NM_172337.2:c.94C>A, p.(Pro32Thr)	HTZ	Missense	Padre	VUS	FGF	ND	ND	ND	4,35	23,8	0,9945	Nueva variante. Cerca del dominio de unión a ADN (38-97). Potencial afectación de <i>splicing</i> por creación de un nuevo "branch point" y por estar situada a 4 nucleótidos del donador canónico del intrón 3.
	<i>OTP</i>	NM_032109.2:c.877C>T, p.(Leu293Phe)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	ND	ND	ND	3,3	25	0,9976	Nueva variante
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
21	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.7294G>A, p.(Val2432Met)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,0083	ND	0,008	5,1	22,5	0,9915	Variante situada en el codón posterior a una región de "coiled coil" (aas 2401-2431).

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
22	<i>FGFR1</i>	NM_023110.2:c.1982G>A, p.(Arg661Gln)	HTZ	Missense	ND	Probablemente patogénica	FGF (HHC)	ND	ND	ND	5,9	33	0,995	Afecta al dominio tirosín kinasa (aas 478-767). Variante ya descrita con estudio funcional alterado en línea germinal de casos familiares de tumores neuroepiteliales disembrioplásicos (332)
	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.8416C>G, p.(Leu2806Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,119	0,1	0,129	4,25	22,8	0,9911	
25	<i>LEPR</i>	NM_002303.5:c.3166G>A, p.(Gly1056Arg)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,001	ND	ND	4,27	23,8	0,9986	
	<i>PTCH1</i>	NM_000264.4:c.4141G>A, p.(Val1381Met)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH (HPE)	0,004	0,04	ND	5,12	25,2	0,9986	
26	<i>PITX2</i>	NM_000325.5:c.697A>G, p.(Met233Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	NODAL, BMP/TGF- $\beta$ , SHH, WNT	0,001	ND	ND	5,25	24,2	0,9775	
	<i>SPRY4</i>	NM_030964.3:c.722C>A, p.(Ser241Tyr)	HTZ	Missense	ND	Probablemente patogénica	FGF, WNT (HHC)	0,455	0,2	0,43	5,45	29,6	0,9946	Variante ya descrita como patogénica, considerada factor de riesgo de HHC (139). Dentro del dominio SPR (aas 166 – 273) y en una región rica en residuos Cys (159-283).
27	<i>SPRY2</i>	NM_005842.2:c.59A>C, p.(Asp20Ala)	HTZ	Missense	Madre	VUS	FGF	0,434	0,3	0,261	5,2	24	0,9931	Variante descrita en 2 casos de labio leporino no sindrómico, con una madre portadora no afecta (281).
29	<i>PROKR2</i>	NM_144773.2:c.743G>A, p.(Arg248Gln)	HTZ	Missense	Madre	Patogénica	Prokineticina (HHC)	0,004	ND	0,008	-1,76	13,45	0,9412	Variante ya descrita como patogénica con estudio funcional alterado (Disminución al 72% de la actividad movilizadora de calcio) (125). Situada en el último bucle intracelular.
	<i>FGFR1</i>	NM_023110.2:c.2314C>T, p.(Pro722Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	FGF (HHC)	0,419	0,9	1,386	5,53	24,2	0,9966	En el dominio tirosín kinasa. Variante descrita en pacientes con HHC con anosmia (129,131). Implica cambios en la estructura proteica (132). Un estudio demuestra pérdida de función <i>in vitro</i>

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
													conjuntamente como doble mutación con la p.(Asn724Lys) (133).	
	<i>HMX3</i>	NM_001105574.1:c.976G>A, p.(Ala326Thr)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,225	0,5	0,252	4,66	23,1	0,9961	
31	<i>PROP1</i>	NM_006261.4:c.301_302del, p.(Leu102Cysfs*8)	HMZ	Frameshift	Ambos	Patogénica	Gen clásico, NOTCH, WNT	0,018	ND	0,072	ND	23,6	ND	Variante ya descrita como patogénica, con pérdida del dominio de unión a ADN y el dominio C-terminal de transactivación (19). Se encuentra con mayor frecuencia en DCHH familiar y probablemente se debe a una mutación recurrente, más que a un efecto fundador (20)
32	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.2125del, p.(Leu709Trpfs*15)	HTZ	Frameshift	De novo	Patogénica	SHH (HPE)	ND	ND	ND	4,09	28,8	ND	Nueva variante patogénica (descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C).
	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	Padre	Probablemente benigna	(HHC)	0,609	0,3	0,906	5,36	17,71	ND	Ver comentario en paciente 6
33	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
35	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
	<i>GATA2</i>	NM_001145662.1:c.481C>G, p.(Pro161Ala)	HTZ	Missense	ND	Probablemente benigna	BMP-TFGβ Interacción con POU1F1	0,812	0,2	0,938	4,46	22,5	0,9692	
36	<i>PROP1</i>	Deleción completa del gen PROP1: arr5q35.3 (177,419,360e177,431,080)x0 de entre 9675 y 11.720 pb	HMZ	Deleción completa	Ambos	Patogénica	Gen clásico, NOTCH, WNT				ND	ND	ND	Deleción completa del gen
	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.90G>A, p.(Pro30=)	HTZ	Sinónima	Madre	VUS	(HHC)	0,016	ND	0,008	-5,84	ND	0,6685	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico y aparición de un nuevo "branch point"). El

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
													<i>splicing</i> alternativo podría suponer la pérdida de la primera parte del 2º exón (el primero que es codificante), incluyendo el codón ATG de inicio de la traducción.	
	ARNT2	NM_014862.3:c.1707G>T, p.(Gln569His)	HTZ	Missense	Madre	Probablemente benigna	Desarrollo hipotalámico	0,325	0,1	0,508	5,02	23,5	0,9942	
37	NKX2-1	NM_001079668.2:c.-14C>A	HTZ	5'UTR	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico Activa la expresión de GNRHR Activa la expresión de TSH	0,002	ND	ND	3,36	ND	0,9172	Variante rara en la región 5'UTR, con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico y creación de un nuevo "branch point").
38	GLI2	NM_005270.4:c.3676C>T, p.(Arg1226*)	HTZ	Nonsense	Padre	Patogénica	SHH (HPE)	ND	ND	ND	3,87	37	0,9967	Variante patogénica recientemente descrita (descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C).
	FGF8	NM_033163.3:c.477G>A, p.(Thr159=)	HTZ	Sinónima	Madre	VUS	FGF (HHC)	0,01	ND	0,03	-1,2	ND	0,7797	Posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor de <i>splicing</i> alternativo).
	SIM1	NM_005068.2:c.450C>G, p.(Phe150Leu)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,0004	0,02	0,008	-0,597	15,97	0,8473	Variante missense con posible afectación de <i>splicing</i> asociada (aumento de riesgo de exon skipping)
40	LHX4	NM_033343.3:c.704G>A, p.(Arg235Gln)	HTZ	Missense	ND	VUS	Gen clásico	0,007	ND	ND	5,59	23,4	0,9991	Variante ya descrita en un paciente con DCHH (276). Situada entre 2 residuos de serina que se fosforilan (aas 234 y 238). Relativamente cerca del homeodominio (aas 157 – 216).
	NKX2-1	NM_003317.3:c.715_723del, p.(Gly239_Gly241del)	HTZ	Deleción en fase	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico Activa la expresión de GNRHR Activa la expresión de TSH	0,016	ND	0,25	ND	19,25	ND	Deleción en fase de 3 residuos Gly en el exón 3, dentro de una región rica en residuos Gly (aas 234-243). Relativamente cerca del homeodominio de unión a ADN (aas 161-220).

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
	<i>SPRY4</i>	NM_030964.3:c.722C>A, p.(Ser241Tyr)	HTZ	Missense	ND	Probablemente patogénica	FGF, WNT (HHC)	0,455	0,2	0,431	5,45	29,6	0,9946	Ver comentario en paciente 26
	<i>GNRH1</i>	NM_000825.3:c.250G>C, p.(Glu84Gln)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,186	0,4	0,613	3,38	24,1	0,9954	
41	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.-1G>C	HTZ	5'UTR	ND	Probablemente benigna	SHH (HPE)	0,369	0,8	0,008	3,08	ND	0,7817	Variante en la región 5'UTR, justo en el nucleótido previo al codón de inicio.
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
42	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.800_801delinsGA, p.(Ser267*)	HTZ	Nonsense	Madre	Patogénica	SHH (HPE)	ND	ND	ND	4,91	39	ND	Nueva variante patogénica (descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C).
	<i>FOXH1</i>	NM_003923.2:c.984C>G, p.(Asp328Glu)	HTZ	Missense	Padre o de novo	Probablemente patogénica	NODAL (HPE)	0,154	0,04	0,115	-2,27	15,47	0,9819	Dentro del del dominio interacción SMAD y, dentro de éste, en el motivo SIM (aas 327 – 348). Variante ya descrita, con estudio funcional alterado, en casos de cardiopatía (96) La variante p.(Phe331Val), está descrita en HPE. Posible afectación de splicing (activación de un aceptor críptico).
	<i>PITX2</i>	NM_000325.5:c.562G>A, p.(Ala188Thr)	HTZ	Missense	Padre o de novo	Probablemente benigna	NODAL, BMP/TGF-β, SHH, WNT	0,298	0,1	0,246	3,15	21,7	0,9755	
44	<i>OTP</i>	NM_032109.2:c.284C>T, p.(Ala95Val)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,52	0,2	0,38	4,53	23	0,9983	Variante situada cerca del dominio de unión a ADN (aas 104-163).
45	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.621C>A, p.(His207Gln)	HTZ	Missense	Padre	VUS	SHH (HPE)	0,0004	ND	ND	-3,13	16,13	0,9819	Variante missense de muy baja frecuencia con posible afectación de <i>splicing</i> (activación un aceptor críptico de <i>splicing</i> )
	<i>HMX2</i>	NM_005519.1:c.555C>G, p.(Ser185Arg)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,061	0,02	0,06	4,39	31	0,9982	Variante situada dentro del homeodominio de unión a ADN (aas 149–208).

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
	ARNT2	NM_014862.3:c.84G>A, p.(Ala28=)	HTZ	Sinónima	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,0008	0,02	ND	-1,3	ND	0,8717	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico de <i>splicing</i> )
	CHD7	NM_017780.3:c.1696C>G, p.(Pro566Ala)	HTZ	Missense	Madre	VUS	(HHC)	0,001	ND	ND	4,33	22	0,9894	
	CHD7	NM_017780.3:c.3379-33A>G	HTZ	Intrónica	Padre	Probablemente benigna	(HHC)	0,42	0,2	0,5	-11,2	ND	0,2801	Variante intrónica con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico de <i>splicing</i> )
46	TGIF1	NM_170695:c.54G>A, p.(Ser18=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	BMP-TFGβ, NODAL, SHH (HPE)	0,562	0,2	0,508	0,55	ND	0,847	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un donador críptico de <i>splicing</i> )
	CDON	NM_016952.4:c.2051C>G, p.(Thr684Ser)	HTZ	Missense	ND	VUS +	SHH (HPE)	0,721	0,2	0,677	5,78	20,3	0,9857	Variante ya descrita en un caso de HPE (161)
47	SIX3	NM_005413.3:c.109G>T, p.(Gly37Cys)	HTZ	Missense	ND	VUS +	Interacción con HESX1. Interacción con SHH, PAX6, EYA4. Función represora de WNT y BMP (HPE)	0,125	0,04	0,188	-0,741	16,82	0,9172	Variante ya descrita en heterocigosis en HPE y en esquisencefalia, con repercusión funcional demostrada experimentalmente (333,334). Ubicada en una región rica en residuos Gly (aas 33-69).
48	NKX2-1	NM_001079668.2:c.442C>A, p.(Pro148Thr)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico. Activa la expresión de GNRHR. Activa la expresión de TSH.	0,002	ND	ND	3,02	22,7	0,9905	Variante situada cerca del homeodominio de unión a ADN (aas 161 – 220).
	LEPR	NM_002303.5:c.1835G>A, p.(Arg612His)	HTZ	Missense	Madre	Probablemente patogénica	(HHC)	0,035	0,1	0,008	5,28	24,3	0,9993	Variante incluida en el dominio extracelular, dentro del 2º dominio fibronectina tipo III (aas 539 – 634). Variante ya descrita, con demostración experimental de repercusión funcional (335), en pacientes con obesidad mórbida en heterocigosis compuesta.
49	PCSK1	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas:	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante	
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)					
							POMC, proGHRH, proGnRH								
50	NR5A1	NM_004959.4:c.341G>C, p.(Arg114Pro)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico. Participa en el equilibrio NR5A1/WNT-catenina/NROB1 dependiente de GNRH a nivel hipofisario	0,0004	ND	ND	2,65	23,4	0,9971	Variante situada cerca de un residuo de unión covalente a otras proteínas (aa 119), en el que existen mutaciones asociadas a fallo de espermatogénesis.	
51	LHX3	NM_014564.3: c.876G>A, p.(Ser292=)	HTZ	Sinónima	Padre	VUS	Gen clásico	ND	ND	ND	-4,38	ND	0,9029	Nueva variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación un donador críptico).	
	GLI2	NM_005270.4:c.4558G>A, p.(Asp1520Asn)	HTZ	Missense	Padre	VUS +	SHH (HPE)	0,919	0,5	1,092	4,98	31	0,9992	Combinación de 2 variantes en <i>cis</i> ya descrita en pacientes con hipopituitarismo. Menor actividad transcripcional en estudio funcional (94). Descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C.	
	GLI2	NM_005270.4:c.4054A>G, p.(Met1352Val)	HTZ	Missense	Padre	Probablemente benigna	SHH (HPE)	0,855	0,3	1,069	-5,33	11,45	0,6522		
52	OTP	NM_032109.2:c.284C>T, p.(Ala95Val)	HTZ	Missense	Padre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,519	0,2	0,384	4,53	23	0,9983	Variante situada cerca del dominio de unión a ADN (aas 104-163).	
	CHD7	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	Madre	Probablemente benigna	(HHC)	0,609	0,3	0,906	5,36	17,71	ND	Ver comentario en paciente 6	
53	ANOS1 (KAL1)	Deleción completa del gen ANOS1(KAL1). Deleción de 1,65 Mb en la región Xp22.31, incluyendo ANOS1 (KAL1) y otros 6 genes no asociados de momento a fenotipos patológicos (MIR651, VCX2, VCX3, FAM9A, FAM9B y TBL1X)		Hemigiosis	Deleción completa	Madre	Patogénica	FGF (HHC)				ND	ND	ND	Deleción completa del gen
	FOXH1	NM_003923.2:c.988c>T, p.(Leu330Phe)	HTZ	Missense	Padre	VUS	NODAL (HPE)	ND	ND	ND	4,1	22,3	0,9981	Variante nueva, situada dentro del dominio interacción SMAD y, dentro de éste, en el motivo SIM (aas 327 – 348). Variantes en los codones 328, 331, 336 y 339, dentro del motivo SIM, tienen	



#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
													repercusión funcional demostrada (96). La variante p.(Phe331Val), está descrita en HPE.	
54	GLI2	NM_005270.4:c.4332_4333delinsAT, p.(Met1444_Leu1445delinsIlePhe)	HTZ	Delección- Inserción	Madre	VUS +	SHH (HPE)	0,93	0,7	0,077	3,69	16,78	ND	Variante ya descrita en pacientes con hipopituitarismo. Menor actividad transcripcional en estudio funcional (94). Descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C.
	SPRY4	NM_030964.3:c.722C>A, p.(Ser241Tyr)	HTZ	Missense	Madre	Probablemente patogénica	FGF, WNT (HHC)	0,455	0,2	0,431	5,45	29,6	0,9946	Ver comentario en paciente 26
55	CHD7	NM_017780.3:c.7212_7214del, p.(Arg2405del)	HTZ	Delección en fase	ND	VUS	(HHC)	0,0004	ND	ND	ND	21,5	ND	Delección de un residuo Arg en el exón 34, dentro de la secuencia coiled-coil (aas 2401-2431) y dentro de una región rica en residuos Arg (aas 2398-2405)
57	CDON	NM_016952.4:c.3559C>T, p.(Arg1187Cys)	HTZ	Missense	ND	Probablemente benigna	SHH (HPE)	0,195	0,7	0,677	5,98	22,4	0,9959	
	PROKR2	NM_144773.3:c.1005G>A, p.(Thr335=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	Prokineticina (HHC)	0,062	0,3	0,246	-10,1	ND	0,7906	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico de <i>splicing</i> ).
	HMX3	NM_001105574.1:c.976G>A, p.(Ala326Thr)	HTZ	Missense	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,225	0,5	0,252	4,66	23,1	0,9961	Dentro de una cadena de poli-Ala (aas 319 – 326)
59	IL17RD	NM_017563.3:c.769A>C, p.(Ser257Arg)	HTZ	Missense	ND	VUS	FGF (HHC)	0,0004	ND	ND	5,65	24	0,9935	
60	PITX2	NM_000325.5:c.697A>G, p.(Met233Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	NODAL, BMP/TGF- $\beta$ , SHH, WNT	0,001	ND	ND	5,25	24,2	0,9775	
61	PITX1	NM_002653.4:c.613A>C, p.(Met205Leu)	HTZ	Missense	ND	VUS	Interacción directa con POU1F1  Facilita la expresión de Prolactina, GH y LH $\beta$	0,014	0,04	0,015	4,39	23,9	0,9778	Dentro de la región de interacción con POU1F1 (aas 147 – 279 ).

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
							Interacción directa con NR5A1							
	CHD7	NM_017780.3:c.6282A>G, p.(Gly2094=)	HTZ	Sinónima	ND	Probablemente benigna	(HHC)	0,419	0,2	0,477	-10,7	ND	0,5232	Posible afectación de <i>splicing</i> (aumento de riesgo de <i>exon skipping</i> y eliminación de un "branch point" predicho dentro del exón 31). Variante descrita en CHH y CHARGE.
63	GLI2	NM_005270.4:c.132G>A, p.(Ala44=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	SHH (HPE)	0,003	ND	0,023	-11,7	ND	0,5217	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (aparición de un nuevo "branch point" predicho). Descripción detallada en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C.
	CHD7	NM_017780.3:c.8366C>T, p.(Ala2789Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,008	0,02	0,008	5,32	19,89	0,9886	
65	CHD7	NM_017780.3:c.6282A>G, p.(Gly2094=)	HTZ	Sinónima	ND	Probablemente benigna	(HHC)	0,419	0,2	0,477	-10,7	ND	0,5232	Posible afectación de <i>splicing</i> (aumento de riesgo de <i>exon skipping</i> y eliminación de un "branch point" predicho dentro del exón 31). Variante descrita en CHH y CHARGE.
66	PROP1	NM_006261.4:c.471C>T, p.(Tyr157=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	Gen clásico, NOTCH, WNT	0,106	0,1	0,215	1,45	ND	0,2384	Posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico y aumento de riesgo de <i>exon skipping</i> ).
67	TDGF1	NM_003212.3:c.156G>A, p.(Trp52*)	HTZ	Nonsense	Padre	Patogénica	NODAL (HPE)	ND	ND	ND	1,24	35	0,9725	Nueva variante. Aparición de codón de parada antes de los dominios principales. Variantes con pérdida de función en TDGF1 se han descrito en HPE y en defectos cardíacos (96).
	PROP1	NM_006261.4:c.301_302del, p.(Leu102Cysfs*8)	HMZ	Frameshift	Ambos	Patogénica	Gen clásico, NOTCH, WNT	0,018	ND	0,072	ND	23,6	ND	Ver comentario en paciente 31
	LHX3	NM_014564.4:c.296A>T, p.(Gln99Leu)	HTZ	Missense	De novo	Probablemente patogénica	Gen clásico	0,005	ND	ND	4,19	23,9	0,9913	Dentro del dominio " LIM zinc-binding 2" (aas 90-144).

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
	<i>GNRHR</i>	NM_000406.2:c.317A>G, p.(Gln106Arg)	HTZ	Missense	Padre	Probablemente patogénica	(HHC)	0,271	0,1	0,254	6,17	24,3	0,9958	Variante ya descrita como patogénica, con estudio funcional alterado (336)
	<i>LHX3</i>	NM_014564.4:c.324G>T, p.(Val108=)	HTZ	Sinónima	De novo	VUS	Gen clásico	0,005	ND	ND	2,28	ND	0,9262	Posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor y un donador crípticos de <i>splicing</i> ).
68	<i>EYA4</i>	NM_001301013.1:c.1312G>A, p.(Val438Ile)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH, WNT, interacción con SIX3 (HPE)	ND	ND	ND	5,4	23,4	0,9944	Nueva variante
69	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4558G>A, p.(Asp1520Asn)	HTZ	Missense	Ambos	VUS +	SHH (HPE)	0,919	0,5	1,092	4,98	31	0,9992	Ver comentario en el paciente 51. Descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C
	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4054A>G, p.(Met1352Val)	HTZ	Missense	Ambos	Probablemente benigna	SHH (HPE)	0,855	0,3	1,069	-5,33	11,45	0,6522	
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221AAsp)	HTZ	Missense	padre	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
70	<i>LHX3</i>	NM_014564.4:c.214G>A, p.(Glu72Lys)	HTZ	Missense	Madre	VUS +	Gen clásico	0,002	ND	ND	4,65	23,8	0,9989	Dentro del primero de los 2 dominios "LIM zinc-binding" (aas 31 – 81) y justo al lado de un residuo Ser que fosforila (aa 71).
	<i>FGFR1</i>	NM_001174067.1:c.1191G>A, p.(Pro397=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	FGF (HHC)	0,044	0,1	0,057	-7,32	ND	0,7886	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un donador críptico).
71a	<i>TACR3</i>	NM_001059.2:c.1186C>A, p.(Arg396=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	(HHC)	0,005	0,02	0,008	4,06	ND	0,8352	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221AAsp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
	<i>PITX2</i>	NM_153426.2:c.46+8delinsGTT	HTZ	Intrónica	ND	VUS	NODAL, BMP/TGF- $\beta$ , SHH, WNT	ND	ND	ND	-2,35	ND	ND	Nueva variante intrónica con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).
71b	<i>TACR3</i>	NM_001059.2:c.1186C>A, p.(Arg396=)	HTZ	Sinónima	ND	VUS	(HHC)	0,005	0,02	0,008	4,06	ND	0,8352	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
	PCSK1	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
	PITX2	NM_153426.2:c.46+8delinsGTT	HTZ	Intrónica	ND	VUS	NODAL, BMP/TGF-β, SHH, WNT	ND	ND	ND	-2,35	ND	ND	Nueva variante intrónica con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).
72	PCSK1	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
	PAX2	NM_003987.4:c.1211G>A, p.(Gly404Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Regulado por SHH, BMP y NOTCH. Gen candidato para HHC	ND	ND	ND	3,75	31	0,9968	Nueva variante
73	FGF18	NM_003862.2:c.146G>A, p.(Arg49His)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Sinexpresión con FGF8	0,015	0,02	0,046	4,71	31	0,9996	
74	GLI2	NM_005270.4:c.4560T>G, p.(Asp1520Glu)	HTZ	Missense	Madre	VUS +	SHH (HPE)	0,067	0,1	0,008	0,46	22,8	0,9954	Otra variante en la misma posición (Asp1520Asn) presenta estudio funcional alterado (94). Descripción en detalle en <i>Resultados y Discusión</i> , sección C.
	GLI2	NM_005270.4:c.2708C>G, p.(Thr903Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH (HPE)	0,065	0,1	ND	4,6	23,7	0,9905	
	GLI2	NM_005270.4:c.595G>A, p.(Gly199Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH (HPE)	0,035	0,04	ND	2,9	17,56	0,9969	
	ZIC2	NM_007129.4:c.1399_1413del, p.(Ala467_Val471del)	HTZ	Delección en fase	Madre	VUS +	Interacción con las vías NODAL, SHH y WNT (HPE)	0,123	ND	ND	ND	15,35	ND	Delección de 4 residuos Ala y 1 Val al final de una cadena de poli-Ala de habitualmente 15 residuos Ala.
76	SEMA3A	NM_006080.2:c.1302_1303delinsCA, p.(Val435Ile)	HTZ	Delección-Inserción	ND	Patogénica	(HHC)	1,38	0,8	1,05	4,96	22,6	ND	Variante ya descrita como patogénica, considerada factor de riesgo de HHC, con estudio funcional alterado (127). Dentro del dominio SEMA (aas 31 – 514)
	PCSK1	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas:	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
							POMC, proGHRH, proGnRH							
77	<i>PROKR2</i>	NM_144773.3:c.253C>T, p.(Arg85Cys)	HTZ	Missense	Padre	Patogénica	Prokineticina (HHC)	0,06	0,1	0,123	4,76	28,5	Variante ya descrita como patogénica, en pacientes con DCHH (115) con estudio funcional alterado (122,126). En el 1º bucle intracelular del receptor.	
	<i>HMX2</i>	NM_005519.1:c.*1C>T	HTZ	3'UTR	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,344	0,1	0,176	0,27	ND	0,9488	Variante en la región 3'UTR, en el primer nucleótido tras el codón de parada.
79	<i>BMP4</i>	NM_001202.5:c.860G>A, p.(Arg287His)	HTZ	Missense	Madre	VUS	BMP-TFGβ	0,083	0,2	0,138	1,92	18,97	0,9672	Variante ya descrita en un paciente con defecto del <i>orbicularis oris</i> (220) y en un paciente con HCC con anosmia (236). Un estudio funcional no muestra alteraciones significativas (236).
81	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.3949C>T, p.(Arg1317Cys)	HTZ	Missense	Madre	VUS +	(HHC)	0,0047	ND	0,0081	5,8	34	0,9993	Variante ya descrita en un paciente con CHARGE (180). Dentro del dominio helicasa C-terminal.
	<i>CDON</i>	NM_016952.4:c.2462G>A, p.(Arg821His)	HTZ	Missense	Padre	VUS	SHH (HPE)	0,062	0,1	0,13	4,2	21,5	0,9978	Dentro de 2º dominio Fibronectina tipo III (aas 723 – 821)
82	<i>NEUROG2</i>	NM_024019.3:c.452T>C, p.(Ile151Thr)	HTZ	Missense	ND	VUS +	Desarrollo hipotalámico	ND	ND	ND	3,76	28,7	0,9974	Nueva variante. Dentro del dominio bHLH (aas 112 – 164).
	<i>SPRY4</i>	NM_030964.3:c.698G>T, p.(Cys233Phe)	HTZ	Missense	ND	VUS +	FGF, WNT (HHC)	0,0004	ND	ND	5,59	29,4	0,9936	Dentro del dominio SPR (aas 166 – 273) y de una región rica en residuos Cys (aas 159 – 283).
85	<i>PROKR2</i>	NM_144773.2:c.548T>C, p.(Leu183Pro)	HTZ	Missense	Ambos	Probablemente patogénica	Prokineticina (HHC)	ND	ND	ND	5,31	26,7	0,9991	Nueva variante. En el 4º dominio transmembrana. Cerca de otros residuos (aas 178 y 188) con mutaciones en pacientes con HHC (124,125).
	<i>TGIF1</i>	NM_170695.3:c.-2G>A	HTZ	5'UTR	Padre	VUS	BMP-TFGβ, NODAL, SHH (HPE)	0,00046	ND	ND	-5,07	ND	0,9017	Variante rara dentro de la región 5'UTR a 2 nucleótidos del codón de inicio.

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
86	<i>FGFR1</i>	NM_023110.2:c.2464C>T, p.(Arg822Cys)	HTZ	Missense	Padre	VUS +	FGF (HHC)	0,026	ND	0,032	5,65	33	0,9993	Variante ya descrita en HHC con y sin anosmia (151,337).
	<i>PTCH1</i>	NM_000264.4:c.3220A>G, p.(Ile1074Val)	HTZ	Missense	Madre	VUS	SHH (HPE)	0,0008	ND	ND	5,32	22,3	0,9965	En el 9º dominio transmembrana (receptor de 12 dominios transmembrana).
	<i>GNRH1</i>	NM_000825.3:c.153G>C, p.(Glu51Asp)	HTZ	Missense	Padre	VUS	(HHC)	0,15	0,04	0,16	5,48	27	0,9982	
87	<i>ZIC2</i>	NM_007129.3:c.1397_1411del, p.(Ala466_Ala470del)	HMZ	Delección en fase	Ambos	VUS	Interacción con las vías NODAL, SHH y WNT (HPE)	0,011	ND	ND	ND	15,39	ND	Delección de 5 residuos Ala en una cadena de poli-Ala de habitualmente 15 residuos Ala.
	<i>SEMA3A</i>	NM_006080.2:c.1302_1303delinsCA, p.(Val435Ile)	HTZ	Delección-Inserción	Ambos	Patogénica	(HHC)	1,38	0,8	1,05	4,96	22,6	ND	Ver comentario en el paciente 76
88	<i>CHD7</i>	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	ND	Probablemente benigna	(HHC)	0,61	0,3	0,91	5,36	17,71	ND	Ver comentario en el paciente 6
91	<i>PTCH1</i>	NM_000264.4:c.3947A>G, p.(Tyr1316Cys)	HTZ	Missense	Padre	Probablemente patogénica	SHH (HPE)	0,055	ND	0,072	4,92	24,1	0,9973	Variante ya descrita, con estudio funcional alterado (159).
	<i>PTCH1</i>	NM_000264.4:c.4324C>T, p.(Arg1442Trp)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH (HPE)	0,12	0,1	0,015	3,01	23	0,9975	
	<i>OTX2</i>	NM_172337.2:c.420G>C, p.(Pro140=)	HTZ	Sinónima	Madre	VUS	FGF, WNT	0,043	0,1	0,123	-11,6	ND	0,3583	Variante sinónima con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico de <i>splicing</i> ).
93	<i>PAX2</i>	NM_003987.4:c.244G>T, p.(Val82Leu)	HTZ	Missense	ND	Probablemente patogénica	Regulado por SHH, BMP y NOTCH. Gen candidato para HHC	ND	ND	ND	5,93	29	0,9982	Nueva variante dentro del "paired domain" (aas 16–142).
94	<i>RNPC3</i>	NM_017619.3:c.859G>A, p.(Asp287Asn)	HTZ	Missense	ND	VUS	Spliceosoma	0,035	0,02	ND	4,76	28,4	0,9993	Variante dentro de la región "Necessary for binding to m(7)G-capped U12 snRNA" (aas 211–380)
95	<i>NR4A1</i>	NM_001202233.1:c.1292G>A, p.(Arg431His)	HTZ	Missense	ND	VUS	Regulación de POMC. Relación con la regulación del eje tiroideo.	0,51	0,4	0,008	4,95	33	0,9995	Variante dentro de la región de unión al ligando (aas 409 – 459).
	<i>GLI2</i>	NM_005270.4:c.4332_4333delinsAT, p.(Met1444_Leu1445delinsIlePhe)	HTZ	Delección-Inserción	ND	VUS +	SHH (HPE)	0,93	0,7	0,077	3,69	16,78	ND	Ver comentario en paciente 54. Descripción en detalle en

#	Gen	Variante	Zigodidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
													Resultados y Discusión, sección C.	
96	CHD7	NM_017780.3:c.2053_2058dup, p.(Ala685_Lys686dup)	HTZ	Inserción en fase	ND	Probablemente benigna	(HHC)	0,609	0,3	0,906	5,36	17,71	ND	Ver comentario en paciente 6
97	LHX1	NM_005568.4:c.974G>A, p.(Gly325Asp)	HTZ	Missense	Madre	VUS	Desarrollo hipotalámico Interacción con OTX2 Activa la expresión de HESX1	0,0005	ND	ND	4,56	32	0,9974	
98	SOX2	NM_003106.3:c.70_89del, p.(Asn24Argfs*65)	HTZ	Frameshift	ND	Patogénica	WNT-Bcatenina, SHH	ND	ND	ND	ND	25,2	ND	Variante patogénica ya descrita (338)
	WDR11	NM_018117.11:c.3040G>A, p.(Val1014Met)	HTZ	Missense	Madre	VUS	(HHC)	0,003	ND	ND	5,97	32	0,9989	
99	ZIC2	NM_007129.3:c.273_284del, p.(Ala94_Ala97del)	HTZ	Delección en fase	ND	VUS	Interacción con las vías NODAL, SHH y WNT (HPE)	0,003	ND	ND	ND	18,23	ND	Delección de 4 residuos Ala en una cadena de poli-Ala de habitualmente 9 residuos Ala, y próxima a una región "Necessary for interaction with MDFIC and transcriptional activation or repression" (aas 100-255).
100	PCSK1	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
101	PTCH1	NM_000264.4:c.896C>T, p.(Pro299Leu)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH (HPE)	0,01	ND	0,008	5,88	27,4	0,9989	En el primer dominio extracelular (receptor de 12 dominios transmembrana).
102	CHD7	NM_017780.3:c.8416C>G, p.(Leu2806Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,119	0,1	0,129	4,25	22,8	0,9911	
	POU3F2	NM_005604.3:c.1154C>G, p.(Thr385Ser)	HTZ	Missense	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico	ND	ND	ND	4,66	22,3	0,8604	Nueva variante. Dentro del homeodominio de unión a ADN (aas 354 – 413).
104	CHD7	NM_017780.3:c.3299G>A, p.(Arg1100His)	HTZ	Missense	ND	VUS	(HHC)	0,006	ND	ND	5,73	33	0,9994	Dentro del dominio helicasa ATP-binding (aas 980-1154).

#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
	<i>PCSK1</i>	NM_000439.4:c.661A>G, p.(Asn221Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	Procesamiento de prohormonas: POMC, proGHRH, proGnRH	3,846	2,1	3,65	6,06	22,7	0,9955	Ver comentario en paciente 6
105	<i>OTP</i>	NM_032109.2:c.284C>T, p.(Ala95Val)	HTZ	Missense	ND	VUS	Desarrollo hipotalámico	0,519	0,2	0,384	4,53	23	0,9983	Variante próxima al dominio de unión a ADN (aas 104-163)
106	<i>FLRT3</i>	NM_198391.2:c.1433G>A, p.(Cys478Tyr)	HTZ	Missense	ND	VUS	FGF (HHC)	ND	ND	ND	6,16	31	0,9945	Nueva variante. Dentro del dominio Fibronectina tipo III (aas 409 – 504).
	<i>PROK2</i>	NM_001126128.1:c.389A>T, p.(*130Leuext*9)	HTZ	Extensión (Stoploss)	ND	VUS	Prokineticina (HHC)	0,002	ND	ND	0,865	ND	0,5474	Pérdida del codón de parada y extensión de 9 residuos.
107	<i>SEMA3A</i>	NM_006080.2:c.1302_1303delinsCA, p.(Val435Ile)	HTZ	Delección-Inserción	ND	Patogénica	Implicación en HHC (HHC)	1,38	0,8	1,05	4,96	22,6	ND	Ver comentario en paciente 76
108	<i>PTCH1</i>	NM_000264.4:c.4199G>A, p.(Gly1400Asp)	HTZ	Missense	ND	VUS	SHH (HPE)	0,001	ND	ND	3,13	22,8	0,9928	En el último dominio intracelular (proteína de 12 dominios transmembrana).
110	<i>IL17RD</i>	NM_017563.3:c.1371T>G, p.(Ile457Met)	HTZ	Missense	ND	VUS	FGF (HHC)	0,006	ND	ND	-2,07	16,68	0,9904	Dentro del dominio SEFIR (aas 355-509).
	<i>OTX2</i>	NM_172337.2:c.401C>G, p.(Pro134Arg)	HTZ	Missense	ND	Probablemente patogénica	FGF, WNT	0,02	0,02	0,015	4,93	25,2	0,9956	Variante ya descrita en DSO, con estudio funcional alterado (138). La variante p.(Pro134Ala) en la misma posición que está descrita en un paciente con anoftalmía unilateral (339)
	<i>PROKR2</i>	NM_144773.2:c.518T>G, p.(Leu173Arg)	HTZ	Missense	ND	Patogénica	PROKR2 (HHC)	0,219	0,1	0,261	5,21	26,3	0,9976	Variante ya descrita como patogénica, con estudio funcional alterado (122,126). En el 4º dominio transmembrana.
	<i>SEMA7A</i>	NM_003612.4:c.1775A>C, p.(Gln592Pro)	HTZ	Missense	ND	VUS	Posible implicación en HHC	ND	ND	ND	3,38	19,73	0,9258	Nueva variante missense con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un aceptor críptico).



#	Gen	Variante	Zigotidad	Tipo de variante	Herencia	Clasificación ACMG (*)	Vías o función del gen (y relación con HHC o HPE)	Frecuencia alélica			GERP_RS Score (**)	CADD Score (***)	DANN Score (****)	Comentarios sobre la variante
								gnomAD (%)	1000G (%)	ESP6500 (%)				
111	LHX4	NM_033343.3:c.256G>A, p.(Gly86Ser)	HTZ	Missense	Madre	VUS +	Gen clásico	0,002	ND	ND	5,26	28,4	0,9988	Dentro del primer dominio LIM de unión a zinc. La mutación p.(Arg84Cys), a sólo 2 residuos y en el mismo dominio, es patogénica con estudio funcional alterado publicado (340)
112	SOX10	NM_006941.3:c.246C>G, p.(Gly82=)	HTZ	Sinónima	Madre	VUS	(HHC)	0,009	ND	ND	4,39	ND	0,9469	Variante con posible afectación de <i>splicing</i> (activación de un donador críptico).

**HTZ:** Heterocigosis; **HMZ:** Homocigosis; **ND:** No disponible; **VUS:** Variante de significado incierto; **VUS+:** Variante de significado incierto de especial relevancia por alguna de sus características; **HHC:** Hipogonadismo hipogonadotropo congénito; **HPE:** Holoprosencefalia; **aas:** aminoácidos.  
 (\*): Ref. (80); (\*\*): Ref. (103); (\*\*\*): Ref. (83); (\*\*\*\*): Ref. (88).

## **ANEXO 6:**

**TABLA S6.1: Pacientes publicados con mutaciones con pérdida de función en *BMP4*: nonsense y frameshift**

**TABLA S6.2.: Pacientes publicados con mutaciones con pérdida de función en *BMP4*: Grandes deleciones sin incluir OTX2 ni SIX6**

**TABLA S6.3.: Pacientes publicados con alteración en *BMP4* y patología hipofisaria asociada.**

Tabla S6.1: Pacientes publicados con mutaciones con pérdida de función en <i>BMP4</i> : nonsense y frameshift											
Referencia	Mutación	Herencia	Fenotipo ocular	Fenotipo digital	Fenotipo craneofacial	Hipófisis	RC	Cerebro	RPM	Otros	
Este estudio	Probando 1	c.794G>A p.(Trp265*)	<i>De novo</i>	Miopía y astigmatismo bilaterales (agudeza visual 0,3 bilateral)	Normal	Macrocefalia	Hipoplasia de AH, NH ectópica, tallo no visible. Deficiencia de GH y TSH.	+	Áreas de retraso de mielinización en sustancia blanca	Leve	Quiste cortical en riñón izquierdo. Narinas antevertidas, cejas elevadas, ptosis leve
Reis 2011 (219)	Paciente 3	c.592C>T p.(Arg198*)	<i>De novo</i>	AO/MO grave derecha y MO leve izquierda con esclerocórnea	ND	Macrocefalia, asimetría facial	ND	ND	Hidrocefalia (válvula de derivación subdural-peritoneal)	ND	Hernia diafragmática derecha, laringomalacia, hernias inguinales bilaterales
Suzuki 2009 (220)		c.592C>T p.(Arg198*)	No realizado estudio familiar	ND	ND	Labio leporino y fisura palatina	ND	ND	ND	ND	No especificados otros datos clínicos
Reis 2011 (219)	Paciente 4	c.171dupC p.(Glu58Argfs*17)	Familiar, AD (expresividad variable, penetrancia incompleta)	AO bilateral	Normal	Orejas pequeñas, resto normal	ND	+	ND	No	Pequeño quiste renal izquierdo
	Paciente 5 (hermanastra de paciente 4)	c.171dupC p.(Glu58Argfs*17) + p.(His121Arg) en el otro alelo		AO unilateral izquierda, blefarofimosis, telecanto	Polidactilia postaxial en ambas manos	Macrocefalia relativa, frente prominente	ND	+	ND	No	
	Madre de pacientes 4 y 5	c.171dupC p.(Glu58Argfs*17)		Asintomática, aunque sin estudio oftalmológico	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bakrania 2008 (216)	Caso 3	c.226delAG p.(Ser76Cys*29)	Familiar, AD (expresividad variable)	AO derecha, microsegmento anterior en ojo izquierdo, coloboma de iris y retiniano, distrofia retiniana	Polidactilia postaxial en ambos pies	ND	ND	ND	Ensanchamiento de surcos cerebrales, atrofia difusa, agenesia parcial de CC	Leve	
	Madre de caso 3			Miopía elevada	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Tía materna de caso 3			Miopía elevada	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	Abuela materna de caso 3			Miopía elevada	Polidactilia	ND	ND	ND	ND	Ensanchamiento de surcos cerebrales, atrofia difusa, hipoplasia de CC	ND

**RC:** Retraso del crecimiento; **RPM:** Retraso psicomotor; **AO:** Anoftalmía; **MO:** Microftalmía; **AH:** Adenohipófisis; **NH:** Neurohipófisis; **CC:** Cuerpo calloso; **AD:** Autosómica dominante; **ND:** No descrito.

Tabla S6.2. Pacientes publicados con mutaciones con pérdida de función en *BMP4*: Grandes deleciones sin incluir *OTX2* ni *SIX6*

Referencia y caso	Deleción	Herencia	Fenotipo ocular	Fenotipo digital	Fenotipo craneofacial	Hipófisis	RC	Cerebro	RPM	Otros
Hayashi 2008 (240)	14q22.1-q22.3 ≈2,7 Mb 18 genes	<i>De novo</i>	Opacidad corneal congénita bilateral con esclerocórnea	PSD postaxial en ambos pies	Micrognatia	Normal	+	Disminución de SB y dilatación ventricular bilateral	Sí	
Lumaka 2012 (238)	III-6	Familiar, AD (expresividad variable)	MO y esclerocórnea bilateral,	PD postaxial en ambas manos	Retrognatia, fisura palatina	ND	PEG	Leves lesiones bilaterales en SB	RPM leve	Ausencia de hueso nasal en eco prenatal 18 sem EG. Hiperlaxitud
	III-5 (hermana de III-6)		Hipertelorismo	Hipoplasia de 5ª uña de manos y pies	Retrognatia leve, úvula bifida	Normal	+	Dilatación de ventrículos laterales	RPM leve	Orejas pequeñas
	II-2 (madre de III-5 y III-6)		Normal	PSD postaxial en pies	Normal	ND	+	ND	Inteligencia normal	2 abortos previos de 2 parejas de gemelos
	I-1 (abuelo materno de III-5 y III-6)		Cataratas	PD postaxial en pie izquierdo	Normal	ND		ND	Inteligencia normal	
Martínez-Fernández 2014 (239)	III-1	Familiar, AD (expresividad variable)	Exoftalmia leve, ptosis palpebral bilateral	PD postaxial bilateral. 1º dedo de pies pequeño y achó.	Micrognatia, hendiduras palpebrales descendentes, hipertelorismo, alteración dental	ND	PEG y RC	Hipoplasia leve de CC y dilatación leve de ventrículos laterales	RPM leve (CI 71)	Fenotipo familiar considerado síndrome de Frías
	III-2 (hermanastra de III-1)		Exoftalmia leve, ptosis palpebral bilateral	ND	Hendiduras palpebrales descendentes, hipertelorismo	ND	ND	Normal	ND	Hernia diafragmática derecha. Fallecida con 9 días de vida
	II-2 (madre de III-1 y III-2)		Exoftalmia leve, ptosis palpebral bilateral	Manos cuadradas, cortas, con sindactilia leve	Hendiduras palpebrales descendentes, hipertelorismo, alteración dental	ND	+	ND	ND	
Reis 2011 (219)	Paciente 2	Sin estudio familiar (adoptada)	Corectopia, MO bilateral, membrana pupilar persistente, miopía elevada, estrabismo	Normal	Hipoplasia maxilar, labio superior fino, nariz ancha, telecanto, apéndice preauricular derecho	ND	No	Sin datos	RPM leve-moderado	Rasgos dismórficos
Reis 2011 (219)	Paciente 1	Madre miope no portadora, padre sano sin estudio	Anomalía de Rieger, glaucoma congénito, microcórnea, nistagmo	Manos pequeñas	Macrocefalia, frente prominente, ojos hundidos, mentón pequeño, nariz hipoplásica	ND	+	Normal	RPM leve, TDAH	Hiperlaxitud, escasa grasa subcutánea en tronco superior y cabeza, dentición retrasada

**RC:** Retraso de crecimiento; **RPM:** Retraso psicomotor; **ND:** No descrito; **AD:** Autosómica dominante; **MO:** Microftalmía; **PD:** Polidactilia; **PSD:** Polisindactilia; **PEG:** Pequeño para la edad gestacional; **CC:** Cuerpo calloso; **TDAH:** Trastorno por déficit de atención e hiperactividad; **SB:** Sustancia blanca.

Tabla S6.3. Pacientes publicados con alteración en *BMP4* y patología hipofisaria asociada.

Referencia	Variante (†) (Clasificación ACMG)	Datos disponibles sobre fenotipo hipofisario (incluyendo clínica posiblemente relacionada)	RC	Otros datos clínicos o sobre variantes genéticas	
Este estudio	c.794G>A; p.(Trp265*) <i>De novo.</i> (Patogénica)	Hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica, tallo no visible. Deficiencia de GH y TSH	Sí	Miopía, astigmatismo, retraso de mielinización de sustancia blanca, RPM leve, macrocefalia, quiste renal	
Breitfeld 2013 (Paciente 5) (235)	c.899G>C; p.(Arg300Pro). (VUS)	Hipoplasia hipofisaria. Deficiencia de GH, TSH, ACTH, LH/FSH	Sí	Platispondilia, esclerosis de metáfisis, braquimetacarpia IV (posible displasia espondiloepifisaria tarda), azoospermia	
Zwaveling-Soonawala 2018 (39)	c.804_815delCCGGCCCTCCT; p.(Arg269_Leu272del). (VUS)	Hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica, tallo no visible. Deficiencia de GH, TSH, ACTH, LH/FSH	Sí	Asocia variantes en <i>KAT6A</i> (patogénica, <i>de novo</i> ) y en <i>GLI3</i> (de significado incierto)	
Papadakis 2016 (236)	p.(Thr359Ile) (probablemente patogénica)	Síndrome de Kallmann	ND	-	
Papadakis 2016 (236)	p.(Arg287His) (VUS)	Síndrome de Kallmann	ND	-	
<b>Grandes deleciones</b>		<b>Genes</b>			
Bennett 1991 (Feto aborto de 21 semanas) (224)	14q22-q23	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i> , <i>SIX6</i>	Agenesia hipofisaria, silla turca ausente. Genitales hipoplásicos.	ND	AB, anomalías cerebrales y cerebelosas, clinodactilia, micrognatia, frente amplia y prominente, orejas bajas, alteración renal, adrenal y uterina
Elliott 1993 (225)	14q22.1-q22.3	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i>	Micropene, criptorquidia bilateral, hipotiroidismo. ND estudio de imagen	Sí	AB, retraso psicomotor, micrognatia, paladar ojival, lengua pequeña.
Lemyre 1998 (226)	14q22.1-q23.2	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i> , <i>SIX6</i>	Hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica, silla turca muy pequeña. Estudio hormonal basal (T4, TSH, cortisol e IGF-1) normal.	Sí	AB, atrofia cerebral cortical y subcortical grave, RPM grave, micrognatia, úvula bífida, HB, agenesia de CAE izquierdo, oreja izquierda rudimentaria, craneosinostosis lambdaidea.
Nolen 2006 (227)	Traslación t(3;14) (q28;q23.2), disbalanceada, con deleción 14q22.1-q23.1	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i> , <i>SIX6</i> , <i>SIX1</i> , <i>SIX4</i>	Hipoplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica, tallo ausente. Deficiencia de GH, criptorquidia bilateral, escroto hipoplásico	Sí	AB, hipoplasia de CC, disminución de sustancia blanca, dilatación de ventrículos cerebrales, RPM grave, sindactilia, braquidactilia, retrognatia, frente amplia, hipoplasia mediofacial, hipoplasia de CAEs, orejas pequeñas, HB
Bakrania 2008 (216) (Caso 1)	14q22.3-q23.2	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i> , <i>SIX6</i>	Hipotiroidismo central	ND	AB, agenesia parcial de CC, leve dilat. de ventrículos laterales, Retraso motor
Bakrania 2008 (216) (Caso 2)	14q22.2-q23.1	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i> , <i>SIX6</i>	Anomalías de hipófisis Criptorquidia bilateral	ND	AB, agenesia parcial de CC, disminución de sustancia blanca, alteración cerebelosa, RPM, HB
Brisset 2014 (228)	14q22.1-q23.1	<i>BMP4</i> , <i>OTX2</i>	Aplasia hipofisaria, neurohipófisis ectópica, tallo fino, silla turca pequeña. Deficiencia de GH	Sí	AB, frente amplia, microretrognatia, paladar ojival, orejas grandes, hipotonía, polidactilia postaxial derecha, cardiopatía (CIV)

(†) *Tránsito de referencia de BMP4: NM\_001202.5. RC: Retraso de crecimiento; ND: No descrito; AB: Anoftalmía bilateral; RPM: Retraso psicomotor; CC: Cuerpo caloso, CAE: Conducto auditivo externo; HB: Hipoacusia bilateral; VUS: Variante de significado incierto. Hay otros 5 pacientes publicados con deleciones similares sin descripción de patología hipofisaria (231–234).*

## **ANEXO 7:**

**Pacientes publicados en la literatura científica con alteraciones relevantes en *GLI2* asociadas a la presencia de otras variantes relevantes en otros genes, en un contexto de oligogenicidad**

**Tabla S7. Pacientes publicados en la literatura científica con alteraciones relevantes en *GLI2* asociadas a la presencia de otras variantes relevantes en otros genes, en un contexto de oligogenicidad**

Estudio (Referencia)	Gen	Variante	Fenotipo
Rahimov 2006 (274) Patient 1	<i>GLI2</i> <i>PTCH1</i>	c.451A>G, p.(Arg151Gly) c.2171C>T, p.(Thr328Met)	Anomalías faciales de línea media
Wannasilp 2011 (278)	<i>GLI2</i> <b>ZIC2</b>	c.677G>A, p.(Arg226His) <b>c.1206C&gt;G, p.(Tyr402*)</b>	HPE semilobar (2 familiares con las mismas variantes con RPM sin HPE)
Vaarahti 2012 (185)	<i>GLI2</i> <i>SIX3</i>	c.2509G >A, p.(Glu837Lys) c.428G> A, p.(Gly143Asp)	Síndrome de Kallmann
Zwaveling-Soonawala 2018 (39) Patient 6	<i>GLI2</i> <b>KAT6A</b> <i>GLI3</i> <i>BMP4</i>	c.1761G>A, p.(Thr587Thr) <b>c.235C&gt;T, p.(Ala79*)</b> c.539G>A, p.(Arg180Gln) c.804_815del, p.(Arg269_Leu272del)	Sd. del tallo interrumpido. Deficiencia de GH, TSH, ACTH. LH/FSH desconocido
Zwaveling-Soonawala 2018 (39) Patient 7	<i>GLI2</i> <i>DCHS1</i> <i>DCHS1</i>	c.1294G>A, p.(Val432Met) c.6395T>C, p.(Leu2132Pro) c.2338A>G, p.(Ile780Val)	Sd. del tallo interrumpido. Deficiencia de GH, TSH, ACTH. LH/FSH desconocido
Zwaveling-Soonawala 2018 (39) Patient 14	<i>GLI2</i> <i>GLI2</i> <i>GLI2</i> <i>SIX6</i>	c.4054A>G, p.(Met1352Val) c.4558G>A, p.(Asp1520Asn) c.1944C>T, p.(Thr648Thr) c.385G>A, p.(Glu129Lys)	Sd. del tallo interrumpido. Deficiencia de GH, TSH, ACTH y LH/FSH
Simm 2018 (37) Patient Raki_40	<i>GLI2</i> <i>SLC20A1</i>	p.(Arg143Cys) p.(Leu89Ser)	Sd. del tallo interrumpido. Deficiencia de GH, TSH, ACTH y LH/FSH. Deficiencia visual grave.
Simm 2018 (37) Patient Raki_50	<i>GLI2</i> <i>LHX3</i>	p.(Ala232Val) p.(Arg315Pro)	Sd. del tallo interrumpido. Deficiencia de GH, TSH, ACTH y LH/FSH. Hidrocefalia.
Sajan 2018 (306)	<b>GLI2</b> Disomía uniparental materna del Cr. 20	<b>c.1648dupC, p.(Arg550Profs*53)</b>	CIR, HMF, HT, epicanto, sindactilia, criptorquidia bilateral, CIA, RPM, hipotonía, escoliosis
Roessler 2018 (67) #29 BL9876 (Trio#6)	<b>SHH</b> <i>GLI2</i> <i>CHRD</i> <i>GLI3</i>	<b>c.525C&gt;G p.(Tyr175*) paterna</b> c.C2653A, p.(Gln885Lys) c.2222T>C, p.(Val741Ala) c.C2920G, p.(His974Asp)	RMN normal, microcefalia, incisivo central único, RPM leve
Roessler 2018 (67) #48 BL9487 (Trio#14)	<b>SIX3</b> <b>(homeo-domain)</b> <i>GLI2</i>	<b>c.743_745del</b> <b>p.(Thr248_Gln249delinsLys) materna</b> c.A3898G, p.(Arg1300Gly) paterna	HPE semilobar, microcefalia, labio leporino y fisura palatina, convulsiones, espasticidad, RPM, problemas de regulación de temperatura

**Tabla S7. Pacientes publicados en la literatura científica con alteraciones relevantes en GLI2 asociadas a la presencia de otras variantes relevantes en otros genes, en un contexto de oligogenicidad**

Estudio (Referencia)	Gen	Variante	Fenotipo
Roessler 2018 (67) #74a y 74b BL5482/5483 Gemelos idénticos	<b>GLI2</b> <b>frameshift</b> LRP5	<b>c.3258delT, p.(Thr1088Argfs*42)</b> <b>paterna</b> c.G127A, p.(Val43Ile)	DCHH en ambos gemelos. Uno fallecido a los 5 meses, con labio leporino, fisura palatina, hipotelorismo, HMF, agenesia hipofisaria y agenesia parcial de CC.
Roessler 2018 (67) BL9847 (Trio#2)	[GLI2 GLI2 LRP2 GSC2	c.649C>G, p.(Arg217Gly) materna c.A3890G, p.(Asn1297Ser) paterna] c.G4988A, p.(Arg1663His) paterna c.A551G, p.(Gln184Arg) materna	HPE semilobar, agenesia/disgenesia de CC, microcefalia, hipotelorismo, labio leporino, fisura palatina, diabetes insípida, hipopituitarismo.
Roessler 2018 (67) BL11159	GLI2 LRP6 ULK3	c.1418G>A, p.(Arg473His) materna c.4106A>G, p.(Gln1369Arg) paterna c.127A>G, p.(Ile43Val) materna	HPE alobar
Roessler 2018 (67) BL9605 (Trio#30)	[GLI2; GLI2] SCUBE2	[c.538 A>C, p.(Met180Leu) materna c.2159G>A p.(Arg720His)] materna c.1501A>G, p.(Lys501Glu) paterna	Muerte fetal, HPE semilobar, microcefalia, hipotelorismo, orejas bajas.
Roessler 2018 (67) BL6790 (hermano de BL9303)	GLI2 APC TCF3 BMP2 GSC2	c.4100G>A, p.(Gly1367Asp) c.3739G>A, p.(Ala1247Thr) c.1580G>A, p.(Arg527Gln) c.136T>A, p.(Ser46Thr) c.614G>C, p.(Cys205Ser)	HPE semilobar
Roessler 2018 (67) BL9303 (hermano de BL6790)	GLI2 APC KIF7 FZD2 BMP2	c.4100G>A, p.(Gly1367Asp) c.3739G>A, p.(Ala1247Thr) c.710G>T, p.(Arg237Leu) c.61G>C, p.(Gly21Arg) c.136T>A, p.(Ser46Thr)	Agenesia de CC y convulsiones.
Roessler 2018 (67) BL7227	GLI2 APC	c.4628G>A, p.(Arg1543His) c.28G>T, p.(Val10Phe)	Incisivo central único, HTA durante la gestación, retrognatia, paladar estrecho, HMF. Microcefalia adquirida postnatal. RMN normal.

*Se resaltan las variantes claramente patogénicas, probables contribuyentes principales del fenotipo del paciente. Se han publicado también dos pacientes con alguna variante no sinónima en GLI2 asociada a otro contexto clínico, como es la enfermedad de Hirschprung grave (305). Cuatro pacientes han sido publicados por Posey et al. (310,311) asociando una variante en GLI2 (variantes truncadoras en 3 de los 4 casos) y al menos otra en otro gen, pero no se menciona el fenotipo de dichos pacientes. De otros tres pacientes del estudio de Roessler et al. (67) no se dispone de datos sobre el fenotipo.*

**HPE:** Holoprosencefalia; **CIR:** Crecimiento intrauterino restringido; **HMF:** Hipoplasia medifacial; **HT:** Hipotelorismo; **CIA:** Comunicación interauricular; **RPM:** Retraso psicomotor; **CC:** Cuerpo calloso; **DCHH:** Deficiencia combinada de hormonas hipofisarias; **RMN:** Resonancia magnética nuclear.