

# **Identificação de causas genéticas do hipogonadismo hipogonadotrófico congénito utilizando a sequenciação de nova geração**

**Josianne Nunes Carriço**

Tese para obtenção do Grau de Doutor em  
**Biomedicina**  
(3<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Professor Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos  
Co-orientadora: Professora Doutora Catarina Inês Nunes Pires Gonçalves

Júri:  
Professor Doutor Miguel Castelo-Branco Craveiro Sousa  
Professora Doutora Silvia Cristina da Cruz Marques Socorro  
Professora Doutora Henriqueta Alexandra Mendes Brêda Lobo Coimbra Silva  
Professora Doutora Margarida Henriques da Gama Carvalho  
Professora Doutora Paula Maria Vieira Jorge

**05 de setembro de 2025**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Josianne Nunes Carriço, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição D2934 do programa de Biomedicina da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 05 / 09 / 2025





# ***Dedicatória***

*Dedico esta tese aos que se viram privados do meu tempo.*

*Ao Francisco, à Gabriela e ao Nuno*



## ***Agradecimentos***

Nenhum trabalho é mais estimulante do que aquele realizado com o apoio inestimável de pessoas igualmente estimulantes. Assim, gostaria de dedicar algumas linhas para expressar a minha gratidão a todos os que fizeram parte desta jornada.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Manuel Carlos Loureiro de Lemos, por me ter dado a oportunidade de entrar no fascinante campo da investigação em genética, pelo seu profissionalismo e disponibilidade, e por todo o conhecimento que generosamente partilhou comigo.

A minha sincera gratidão vai também para a minha co-orientadora, Doutora Catarina I. Nunes Pires Gonçalves, por se dedicar com tanto empenho a orientar-me nos inúmeros desafios que enfrentei. Sou imensamente grata pelos seus sábios conselhos, pela paciência, apoio e, acima de tudo, pela amizade.

Quando comecei a trabalhar com a Dra. Graziella Di Cristo, em 2010, jamais imaginei que um dia acabaria por desenvolver o meu próprio projeto de doutoramento. Agradeço-lhe profundamente pela semente que plantou em mim e por tudo o que me ensinou.

Gostaria de deixar um agradecimento muito especial à Leonor, com quem foi um verdadeiro prazer partilhar esta jornada. Sou extremamente grata pelo seu companheirismo, apoio e amizade, e por tornar o laboratório num espaço mais divertido e acolhedor.

A minha gratidão também se estende aos membros da equipa de apoio técnico: Sofia Duarte, Marina Posso, Margarida Carrilho e Joana Tomás, pela colaboração e ajuda ao longo do processo.

Agradeço igualmente ao Doutor Luís R. Saraiva pela sua valiosa colaboração. Não posso deixar de agradecer a todos os médicos que participaram neste projeto, enviando as amostras e os dados clínicos dos doentes: Dra. Adriana De Sousa Lages, Dra. Ana Saavedra, Dr. António Garrão, Dr. Bernardo Dias Pereira, Dra. Carla Baptista, Dra. Carla Meireles, Dra. Carolina Moreno, Dra. Catarina Limbert, Dra.

Cíntia Castro-Correia, Dra. Cláudia Amaral, Dra. Cláudia Nogueira, Dr. Davide Carvalho, Dra. Diana Martins, Dr. Duarte Pignatelli, Dra. Elisabete Rodrigues, Dr. Fernando Fonseca, Dr. Filipe Cunha, Dra. Inês Henriques Vieira, Dra. Joana Couto, Dra. Joana Saraiva, Dr. João Martin Martins, Dr. José Maria Aragiés, Dra. Luisa Barros, Dra. Luisa Ruas, Dra. Margarida Bastos, Dra. Maria João Oliveira, Dra. Mariana Martinho, Dr. Miguel Melo, Dr. Nuno Vicente, Dra. Olinda Marques, Dra. Patrícia Oliveira, Dra. Raquel Gomes Martins, Dra. Sofia Almeida Martins, Dra. Susana Gama-de-Sousa, Dra. Teresa Borges, Dra. Teresa Martins e Dra. Teresa Sabino

Por último, mas não menos importante, apesar de nunca ser de muitas palavras, devo um agradecimento especial a cada membro da minha querida família e amigos. Um agradecimento especial ao meu querido marido que esteve sempre ao meu lado. Aos meus filhos, a quem me esforço para não desiludir. Aos meus pais e à minha irmã, que estiveram sempre por perto.

## ***Financiamento***

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através da Bolsa de Doutoramento 2020.04924.BD e dos projetos PTDC/SAU-GMG/098419/2008, UIDB/00709/2020 (<https://doi.org/10.54499/UIDB/00709/2020>), CEECINST/00016/2021/CP2828/CT0002 (<https://doi.org/10.54499/CEECINST/00016/2021/CP2828/CT0002>) e pelo Sidra Medicine, um membro da Qatar Foundation, SDR400038.





## **Resumo**

O desenvolvimento pubertário é um processo fisiológico complexo que resulta da interação entre o sistema neuroendócrino, fatores genéticos e ambientais. Inicia-se com a reativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas, levando à produção de gonadotrofinas, hormonas sexuais e conseqüente desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. O Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito (HHC) é uma doença endócrina rara que, na adolescência, se manifesta clinicamente com ausência completa ou parcial do desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Na idade adulta, os sintomas incluem ausência de virilização e disfunção erétil no sexo masculino, amenorreia primária no sexo feminino, ausência de libido e infertilidade em ambos os sexos. O HHC caracteriza-se pela ausência ou diminuição da produção, secreção ou ação da hormona libertadora de gonadotrofinas. Em 50 a 60% dos casos associa-se a anosmia/hiposmia (Síndrome de Kallmann) ou a outras anomalias congénitas. O diagnóstico do HHC baseia-se na anamnese, observação de sinais clínicos, levantamento de sintomas e exames laboratoriais e imagiológicos. Contudo, desde o início do século XXI, o conhecimento sobre as causas genéticas do HHC tem avançado na mesma medida que o desenvolvimento das tecnologias de sequenciação genética. A disponibilidade das tecnologias de sequenciação de nova geração (NGS) proporcionou grandes avanços no diagnóstico molecular destes doentes. Este estudo teve como objetivo investigar as causas genéticas do HHC em doentes portugueses, utilizando a NGS, ferramentas *in silico* e técnicas de biologia molecular.

Foram estudados 81 doentes com HHC e 263 controlos portugueses. O ADN genómico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico e submetido à sequenciação do exoma completo. A partir das bases de dados OMIM® e Pubmed, identificaram-se 169 genes relacionados com o fenótipo de HHC, que foram incluídos num painel virtual. As variantes encontradas nesses genes foram filtradas com base na frequência populacional e localização no genoma, sendo classificadas conforme os critérios do *American college of medical genetics and genomics* e da *Association for molecular pathology* (ACMG-AMP) em cinco níveis, de benignas a patogénicas. Para avaliar o impacto de variantes com potencial para alterar o *splicing*, utilizou-se o método de minigene.

A análise das variantes germinativas permitiu identificar a causa genética do HHC em 24 dos 81 doentes estudados (29,6%). As variantes causais estavam distribuídas por 10 dos 169 genes presentes no painel genético virtual analisado. Os genes *GNRHR*, *FGFR1*, *ANOS1* e *CHD7* foram os mais frequentemente afetados. Notavelmente, a ampliação do painel genético não resultou num aumento considerável da taxa de diagnóstico. No entanto, é importante destacar que este estudo expandiu o espectro mutacional da doença, identificando várias variantes até então nunca descritas. A maioria das variantes encontradas foi classificada como de significado indeterminado (VUS), mas a taxa de VUS não diferiu significativamente entre doentes e controlos, com exceção do gene *EGF*, onde foram encontradas VUS exclusivamente nos doentes. Concluímos que a maioria dessas variantes raras não estão diretamente relacionadas com o fenótipo estudado, refletindo provavelmente o fundo genético da população portuguesa. Em relação à oligogenia, observou-se uma frequência de 6,2% entre os doentes (5/81), um valor estatisticamente mais elevado quando comparado com os controlos. O estudo funcional de uma variante identificada no gene *CHD7* (NM\_017780.4: c.4354G>T, p.Val1452Leu), resultou no aumento da taxa de diagnóstico para 30,9%, demonstrando a importância dos estudos funcionais na reclassificação de VUS.

Este trabalho enfatizou a complexidade genética do HHC, reforçando a importância de uma compreensão aprofundada da doença, seja para estabelecer o diagnóstico e/ou o prognóstico, para ajudar no aconselhamento genético e tratamento, seja para o esclarecimento dos processos biológicos, que potencialmente poderão contribuir para o desenvolvimento de terapias dirigidas no futuro.

## **Palavras-chave**

Endocrinologia; Fertilidade; Puberdade; Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito; Síndrome de Kallmann; Genética; Sequenciação completa do exoma; Variantes; Estudos funcionais.

## ***Abstract***

Pubertal development is a complex physiological process resulting from the interaction between the neuroendocrine system, genetic factors, and environmental influences. It begins with the reactivation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axis, leading to the production of gonadotropins, sex hormones, and the consequent development of secondary sexual characteristics. Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism (CHH) is a rare endocrine disorder that manifests during adolescence with a complete or partial absence of secondary sexual characteristic development. In adulthood, symptoms include lack of virilization and erectile dysfunction in males, primary amenorrhea in females, decreased libido, and infertility in both sexes. CHH is characterized by the absence or reduction in the production, secretion, or action of gonadotropin-releasing hormone. In 50 to 60% of cases, it is associated with anosmia/hyposmia (Kallmann Syndrome) or other congenital anomalies. The diagnosis of CHH is based on medical history, clinical signs, symptom assessment, and laboratory and imaging tests. However, since the early 21st century, the knowledge about the genetic causes of CHH has advanced alongside with the development of the genetic sequencing technologies. The availability of next-generation sequencing (NGS) has significantly improved the molecular diagnosis of these patients. This study aimed to investigate the genetic causes of CHH in Portuguese patients using NGS, *in silico* tools, and molecular biology techniques.

A total of 81 patients with CHH and 263 Portuguese controls were studied. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and subjected to whole-exome sequencing. From the OMIM® and PubMed databases, 169 genes related to the CHH phenotype were identified and included in a virtual gene panel. Variants in these genes were filtered based on population frequency and genomic location and classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP) criteria into five levels, ranging from benign to pathogenic. The minigene method was used to assess the impact of variants with potential to interfere in the splicing mechanism.

The analysis of germline variants identified the genetic cause of CHH in 24 out of the 81 patients (29.6%). Causal variants were distributed across 10 of the 169 genes

belonging to the virtual genetic panel, with *GNRHR*, *FGFR1*, *ANOS1*, and *CHD7* being the most frequently affected genes. Notably, the expansion of the genetic panel did not significantly increase the diagnostic rate; however, this study broadened the mutational spectrum of the disease by identifying several previously undescribed variants. Most of the identified variants were classified as variants of uncertain significance (VUS), but the VUS rate did not significantly differ between patients and controls, except for the *EGF* gene, where VUS were found exclusively in patients. These findings suggest that most of these rare variants are not directly related to the studied phenotype, but rather reflect the genetic background of the Portuguese population. Regarding the oligogenic inheritance, a frequency of 6.2% was observed among patients (5/81), a statistically higher value compared to controls. The functional study of a variant identified in the *CHD7* gene (NM\_017780.4: c.4354G>T, p.Val1452Leu), increased the diagnostic rate to 30.9%, highlighting the importance of functional studies in reclassifying VUS.

This work emphasized the genetic complexity of CHH, reinforcing the need for an in-depth understanding of the disease to improve diagnosis, prognosis, genetic counseling, and treatment, as well as to clarify the biological processes that may contribute to the development of targeted therapies in the future.

## Keywords

Endocrinology; Fertility; Puberty; Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism; Kallmann syndrome; Genetics; Whole-exome sequencing; Variants; Functional studies.

# *Índice*

Dedicatória	v
Agradecimentos	vii
Financiamento	ix
Resumo	xi
Abstract	xiii
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Anexos	xxiii
Lista de Abreviaturas	xxv
1. Introdução	1
1.1. Mecanismos de desenvolvimento pubertário	1
1.2. Hipogonadismo hipogonadotrófico congénito (HHC)	3
1.2.1. Definição e epidemiologia	3
1.2.2. Apresentação clínica	3
1.2.3. Etiopatogenia	4
1.2.3.1. Causas adquiridas	4
1.2.3.2. Causas genéticas	5
1.2.3.3. Digenia/oligogenia	17
1.2.3.4. Causas epigenéticas	18
1.2.4. Diagnóstico	20
1.2.5. Tratamento	22
1.3. Sequenciação de nova geração (NGS) em medicina	24
1.3.1. Painéis personalizados de genes	27
1.3.2. Sequenciação completa do exoma (WES)	27
1.3.3. Sequenciação completa do genoma (WGS)	29
1.3.4. Classificação das variantes	30
1.3.5. Estudos funcionais	34
1.4. Objetivos	38
2. Materiais e Métodos	39
2.1. Seleção dos doentes e controlos	39

2.2.	Análise genética	40
2.2.1.	Extração do ADN	40
2.2.2.	Quantificação do ADN	41
2.2.3.	Sequenciação completa do exoma (WES)	42
2.2.4.	Seleção do painel virtual de genes	43
2.2.5.	Seleção das variantes	54
2.2.6.	Classificação das variantes	54
2.2.7.	Confirmação das variantes patogénicas (P) e provavelmente patogénicas (LP) por sequenciação de Sanger	54
2.2.7.1.	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	54
2.2.7.2.	Eletroforese em gel de agarose	55
2.2.7.3.	Purificação enzimática dos produtos de PCR	55
2.2.7.4.	Sequenciação de Sanger	56
2.2.8.	Análise estatística	56
2.2.9.	Estudo funcional do mecanismo de <i>splicing</i>	56
2.2.9.1.	Seleção das variantes	56
2.2.9.2.	Clonagem das variantes no vetor pcAT7Glo1	57
2.2.9.3.	Cultura celular	60
2.2.9.4.	Transfeção	60
2.2.9.5.	Extração do ARN	60
2.2.9.6.	Quantificação do ARN	60
2.2.9.7.	Transcrição reversa	60
2.2.9.8.	Análise densitométrica	61
2.2.10.	Recursos bioinformáticos	61
2.2.10.1.	Franklin Genoox - Classificação de variantes	61
2.2.10.2.	Ensembl	61
2.2.10.3.	gnomAD e 1000 Genomes project	62
2.2.10.4.	Human Gene Mutation Database (HGMD®)	62
2.2.10.5.	Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®)	62
2.2.10.6.	FexSplice	63
2.2.10.7.	SWISS-MODEL	63
3.	Resultados	65
3.1.	Análise genética	65
3.1.1.	Variantes raras	65
3.1.2.	Variantes patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP)	65

3.1.3.	Variantes de significado indeterminado (VUS)	74
3.1.4.	Oligogenia	75
3.1.5.	Relação genótipo-fenótipo	76
3.2.	Estudo funcional do mecanismo de splicing	76
3.2.1.	Lista das variantes	77
3.2.2.	Variante causal no gene <i>CHD7</i>	79
3.2.3.	Outras variantes analisadas	82
4.	Discussão	83
5.	Conclusões	97
6.	Perspetivas futuras	99
7.	Referências bibliográficas	101
8.	Anexos	127



## ***Lista de Figuras***

<b>Figura 1:</b> Papel no eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas dos genes descritos no OMIM® relacionados com o fenótipo de Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. ....	6
<b>Figura 2:</b> Tendência histórica na identificação de genes causais ou associados ao Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. ....	25
<b>Figura 3:</b> Representação das sequências consenso próximas ou nas extremidades dos intrões.....	36
<b>Figura 4:</b> Representação do vetor pcAT7Glo1, utilizado para o estudo <i>in vitro</i> do mecanismo de <i>splicing</i> .....	59
<b>Figura 5:</b> Proporção de doentes (n=81) e controlos (n=263) com variantes patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP) nos genes analisados. ....	66
<b>Figura 6:</b> Contribuição relativa de cada gene com variantes patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP) em doentes e controlos.....	67
<b>Figura 7:</b> Fluxograma dos resultados encontrados após sequenciação do exoma (WES) dos 81 doentes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. . ....	73
<b>Figura 8:</b> Contribuição relativa de cada gene com variantes de significado indeterminado (VUS) em doentes e controlos.. ....	75
<b>Figura 9:</b> Análise funcional da variante <i>missense</i> no exão 19 do gene <i>CHD7</i> . ....	81



## ***Lista de Tabelas***

<b>Tabela 1:</b> Genes que constam no <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i> (OMIM®) como estando associados ao Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito com ou sem anosmia. ....	7
<b>Tabela 2:</b> Critérios para classificar variantes patogénicas e benignas. ....	31
<b>Tabela 3:</b> Lista dos 169 genes incluídos no painel virtual investigado, relacionados com o Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. ....	44
<b>Tabela 4:</b> Características dos doentes com causa genética identificada. ....	68
<b>Tabela 5:</b> Lista de variantes filtradas para investigar alterações no mecanismo de <i>splicing</i> . ....	78
<b>Tabela 6:</b> Variantes clonadas no plasmídeo pcAT7Glo1 para investigar alterações no mecanismo de <i>splicing</i> que não mostraram diferença na expressão do exão em estudo, na presença do alelo mutado. ....	82
<b>Tabela 7:</b> Variantes clonadas no plasmídeo pcAT7Glo1 para investigar alterações no mecanismo de <i>splicing</i> que não expressaram o exão em estudo. ....	82
<b>Tabela 8:</b> Variantes que não tiveram sucesso na clonagem no plasmídeo pcAT7Glo1. ....	82



## ***Lista de Anexos***

<b>Anexo 1:</b> Licença para reprodução da Figura 2. ....	129
<b>Anexo 2:</b> Regras para classificar as variantes genéticas de acordo com os critérios ACMG-AMP. ....	133
<b>Anexo 3:</b> Licença para reprodução da Figura 3. ....	135
<b>Anexo 4:</b> Oligonucleótidos utilizados para amplificar os exões onde as variantes patogénicas (P) e provavelmente patogénicas (LP) foram encontradas. ....	143
<b>Anexo 5:</b> Oligonucleótidos utilizados para clonar os exões estudados pelo método de minigene. ....	145
<b>Anexo 6:</b> Variantes raras identificadas nos 81 doentes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. ....	147
<b>Anexo 7:</b> Características dos doentes com variantes patogénicas (P), provavelmente patogénicas (LP) ou de significado indeterminado (VUS). ....	159
<b>Anexo 8:</b> Variantes raras identificadas nos 263 controlos. ....	171
<b>Anexo 9:</b> Características dos controlos com variantes patogénicas (P), variantes provavelmente patogénicas (LP) e variantes de significado indeterminado (VUS). ....	219
<b>Anexo 10:</b> Resultados do estudo do mecanismo de <i>splicing</i> , por minigene, das variantes que não mostram diferença na expressão do alelo mutado. ....	243
<b>Anexo 11:</b> Resultados do estudo do mecanismo de <i>splicing</i> , por minigene, das variantes que não expressaram o exão em estudo. ....	253
<b>Anexo 12:</b> Síntese curricular. ....	257



## ***Lista de Abreviaturas***

ACMG-AMP	<i>American College of Medical Genetics and Genomics - Association for Molecular Pathology</i> (Colégio Americano da Genética e Genómica Médicas - Associação de Patologia Molecular)
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> (Hormona Adrenocorticotrófica)
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADNc	Ácido Desoxirribonucleico complementar
ANOS1	<i>Anosmin-1</i> (Anosmina-1)
ARC	<i>Hypothalamic Arcuate nucleus</i> (núcleo arqueado do hipotálamo)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
B	<i>Benign</i> (Benigna)
BGI	<i>Beijing Genomics Institute</i> (Instituto de Genómica de Pequim)
BPS	<i>Branch Point Sequence</i>

BWA-MEM	<i>Burrows–Wheeler Aligner-MEM</i>
CHARGE	<i>Coloboma, Heart disease, Atresia of the choanae, Retarded growth and mental development, Genital anomalies, and Ear malformations and hearing loss</i> (Coloboma, defeitos Cardíacos, Atresia das coanas, Atraso do crescimento e desenvolvimento, problemas Genitourinários e anomalias do Pavilhão auricular)
CHD7	<i>Chromodomain Helicase DNA binding protein 7</i> (Proteína 7 de ligação ao ADN pelo Cromodomínio Helicase)
CNVs	<i>Copy Number Variants</i> (Variantes do Número de Cópias)
COS-7	<i>CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material-7</i> (CV-1 (símio) na Origem, e contendo o material genético SV40-7)
COST Action	<i>European Cooperation in Science and Technology Action</i> (Cooperação Europeia em Ciência e Tecnologia)
ddNTP	<i>Dideoxynucleotides triphosphate</i> (Didesoxinucleótido trifosfato)
dNTP	<i>Deoxynucleotides triphosphate</i> (Desoxinucleótido trifosfato)
ERa	<i>Estrogen Receptor alfa</i> (Recetores de Estrogénio alfa)
ERb	<i>Estrogen Receptor beta</i> (Recetores de Estrogénio beta)

ESHG	<i>European Society of Human Genetics</i> (Sociedade Europeia de Genética Humana)
EXO-SAP	<i>Exonuclease I – Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
FGF8	<i>Fibroblast Growth Factor 8</i> (Factor de Crescimento do Fibroblasto 8)
FGFR1	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i> (Recetor do Factor de Crescimento do Fibroblasto 1)
FGFs	<i>Fibroblast Growth-factors</i> (Fatores de Crescimento do Fibroblasto)
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormona Foliculo-Estimulante)
GAP	GTPase-activating protein (Proteína ativadora de GTPase)
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i> (Base de dados de agregação do genoma)
GnRH	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone</i> (Hormona Libertadora de Gonadotrofinas)
GnRH3	<i>Gonadotropin-Releasing Hormone 3</i> (Hormona Libertadora de Gonadotrofinas 3)
GPR54	<i>G-Protein-Coupled Receptor 54</i> (Recetor ligado às proteínas G 54)

GRCh37/hg19	<i>Genome Reference Consortium human 37/human genome19</i> (Consórcio de Referência do Genoma Humano 37/genoma humano 19)
hCG	<i>Human Chorionic Gonadotropin Hormone</i> (Hormona Gonadotrofina Coriônica humana)
HGMD	<i>Human Gene Mutation Database</i> (Base de Dados de Mutações de Genes Humanos)
HHC	Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito
HHCn	Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito normósmico
HHG	Hipotálamo-Hipófise-Gónadas
KNDy	<i>Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin neurons</i> (neurónios Kisspeptina, Neurocinina B e Dinorfina)
LB	<i>Luria-Broth</i>
LB	<i>Likely Benign</i> (Provavelmente Benigna)
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> (Hormona Luteinizante)
LHRH	<i>Luteinizing Hormone-Releasing Hormone</i> (Hormona Libertadora da Hormona Luteinizante)
LoF	<i>Loss-of-Function</i> (Perda de função)

LP	<i>Likely Pathogenic</i> (Provavelmente Patogénicas)
MANE	<i>Matched Annotation from NCBI and EMBL-EBI</i> (Anotação correspondente no NCBI e EMBL-EBI)
miR	MicroRNA
NCBI	<i>National Center for Biotechnology and Information</i> (Centro Nacional de Biotecnologia e Informação)
NELF	<i>Nasal Embryonic LHRH Factor</i> (Fator LHRH Nasal Embrionário)
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i> (Sequenciação de Nova Geração)
NKA	<i>Neurokinin A</i> (Neurocinina A)
NKB	<i>Neurokinin B</i> (Neurocinina B)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
P	<i>Pathogenic</i> (Patogénica)
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação de polimerização em cadeia)
POA	<i>Hypothalamic preoptic área</i> (área pré-ótica do hipotálamo)

PPT	<i>Polypyrimidine Tract</i> (Trato de Polipirimidinas)
PRL	<i>Prolactin</i> (Prolactina)
RBC	<i>Red Blood Cell</i> (Glóbulos vermelhos / Eritrócitos)
RM	Ressonância Magnética
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	<i>Reverse Transcription-Polymerase chain reaction</i> (Reação de polimerização em cadeia com Transcrição Reversa)
SBS	<i>Sequencing-By-Synthesis</i> (Sequenciação Por Síntese)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil Sulfato de Sódio)
SE	<i>Secondary Extraction</i> (Extração Secundária)
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SIRT1	<i>Sirtuin 1</i> (Sirtuína 1)
SK	Síndrome de Kallmann
sn-RNPs	<i>Small nuclear Ribonucleoproteins</i> (pequenas Ribonucleoproteínas nucleares)
SNV	<i>Single Nucleotide Variation</i> (Variante de um único nucleótido)

SP	<i>Substance P</i> (Substância P)
ss	<i>Splice site</i> (local de <i>splicing</i> )
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TE	TRIS-EDTA
TRIS-EDTA	<i>Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra-acético de Tris)
TSH	<i>Thyroid stimulating hormone</i> (Hormona tireoestimulante)
UCSC	<i>University of California Santa Cruz</i>
VUS	<i>Variants of Uncertain Significance</i> (Variante de significado indeterminado)
WDR11	<i>WD Repeat-Containing Protein 11</i> (Proteína Contendo Repetições de WD 11)
WES	<i>Whole-Exome Sequencing</i> (Sequenciação Completa do Exoma)
WGS	<i>Whole-Genome Sequencing</i> (Sequenciação Completa do Genoma)



## **1. Introdução**

### **1.1. Mecanismos de desenvolvimento pubertário**

Durante a adolescência dá-se uma das transições mais fascinantes e complexas da vida dos humanos, a puberdade. Este processo tem como objetivo a aquisição da capacidade reprodutiva. A puberdade compreende diversas manifestações psiconeuroendócrinas que acontecem na fase final da infância e se prolongam até que a maturação sexual esteja completa. O resultado será o dimorfismo sexual e a produção ativa de gâmetas. A idade de início deste processo varia entre indivíduos, sendo influenciada pela etnia (1), pelo género (2), pelo estado nutricional (3, 4), mas maioritariamente, pela constituição genética (4-7).

Na prática clínica, é considerado dentro do padrão, que o início da puberdade aconteça até aos 14 anos no sexo masculino, com o aumento do volume testicular para além dos 4 ml e até aos 13 anos no sexo feminino, com o início do desenvolvimento mamário (8-12). Assim, a puberdade inicia-se mais precocemente, em média, no sexo feminino, quando comparado com o sexo masculino, tendo o sexo feminino maior predisposição para a puberdade idiopática precoce (13) e o sexo masculino maior predisposição para o atraso constitucional do crescimento e da puberdade e para o Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito (HHC) (4, 14).

À luz do conhecimento atual, ainda não foram esclarecidos todos os processos moleculares que conduzem à puberdade, mas sabe-se que envolvem a complexa interação de diversas vias de sinalização que controlam o desenvolvimento, ativação e funcionamento do eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas (HHG). De facto, tanto nos humanos como nos outros vertebrados é imperativa a ativação deste eixo para que o processo de puberdade seja bem-sucedido (15-19). A ativação do eixo HHG requer uma coordenação primorosa de diferentes tipos celulares, neurotransmissores estimuladores e inibidores, e hormonas com ação central e periférica (20).

O hipotálamo, que tem a sua origem no prosencéfalo, é uma estrutura localizada na região ventral do cérebro, acima da hipófise e abaixo do terceiro ventrículo. Atua como o centro de controlo do sistema endócrino tendo como função a regulação da

homeostasia fisiológica e do comportamento, incluindo o controlo metabólico e o consumo energético, desde a alimentação até à digestão. Controla também o equilíbrio hídrico e eletrolítico, desde a ingestão até à absorção e excreção de líquidos, a termorregulação, desde a produção e conservação de calor até à resposta à febre. Controla ainda, os ciclos de vigília-sono e as respostas de emergência ao stress ambiental e está também implicado na reprodução, através do controlo das hormonas reprodutivas, da libido, da gravidez, do nascimento e da amamentação (21-24).

O hipotálamo é composto por diversas áreas com composição neuronal e função distintas. A função reprodutiva é controlada pelos neurónios secretores da hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH). Estes, ao contrário da grande maioria dos neurónios que compõem o hipotálamo, têm origem no placódio nasal e a sua migração em direção ao próencefalo observa-se no 48º dia de gestação humana (25-27). Os neurónios secretores de GnRH são encontrados, na idade adulta, na área pré-ótica (POA) e no núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (28), aí produzem a GnRH, e secretam-na, de modo pulsátil, na eminência mediana para a circulação portal hipofisária (29). Casoni et al. (25) estudaram até à 12ª semana gestacional a distribuição e localização destes neurónios, tendo sido os primeiros a contabilizá-los em humanos. Identificaram uma média de 10 000 neurónios entre a 6ª e a 12ª semanas gestacionais e determinaram que a diferenciação neuronal completa dos neurónios secretores de GnRH ocorre entre o 39º e o 44º dias de gestação. Pelo estudo da distribuição destes neurónios, encontraram que apenas cerca de 20% deles irão colonizar o hipotálamo, encontrando-se o resto distribuído em diversas áreas extra-hipotalâmicas, tais como o bulbo olfativo, o córtex cerebral, o hipocampo, o córtex piriforme, a amígdala e a habénula.

A regulação do eixo reprodutivo inicia-se no hipotálamo, onde as células neurosecretoras sintetizam e libertam, de forma pulsátil, a GnRH para o sistema porta hipofisário (30). A GnRH é um decapeptídeo, descrito primeiramente no hipotálamo suíno, cuja descoberta granjeou o prémio Nobel da Fisiologia e Medicina ao Dr. Andrew V. Schally em 1977 (31). Por sua vez, localizados na hipófise anterior, os gonadotrofos, que correspondem a 10 a 15% das células dessa estrutura, vão responder à GnRH sintetizando e libertando a hormona folículo-estimulante (FSH) e a hormona luteinizante (LH). Estas últimas irão ser transportadas pela circulação sanguínea para exercer a sua função no controlo da maturação das gónadas e durante a fase adulta, na fisiologia da reprodução. Nos indivíduos do sexo feminino, a FSH irá

contribuir para a estimulação dos folículos ovários e a LH para a estimulação da ovulação e a formação do corpo lúteo. Nos indivíduos do sexo masculino, a FSH irá estimular a proliferação das células de Sertoli e, em sinergia com a testosterona, manter a espermatogénese, enquanto a LH estimulará as células intersticiais de Leydig a sintetizar a testosterona (32).

## ***1.2. Hipogonadismo hipogonadotrófico congénito (HHC)***

### **1.2.1. Definição e epidemiologia**

O Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito (HHC) é uma doença endócrina que se caracteriza pela ausência ou diminuição da produção, secreção ou ação da GnRH, presente desde o nascimento. Consequentemente, verificam-se níveis séricos baixos de esteróides sexuais e níveis baixos ou inadequadamente normais de gonadotrofinas (LH e FSH) (33). Este pode ser designado de Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito normósmico (HHCn), quando o sentido do olfato não se encontra afetado ou Síndrome de Kallmann (SK) quando, ao hipogonadismo hipogonadotrófico, se associa a anosmia ou hiposmia (34, 35).

Cerca de 50 a 60% dos casos de HHC correspondem à SK (36). A incidência da SK na população finlandesa foi estimada em 1:30 000 no sexo masculino e 1:125 000 no sexo feminino (37). A prevalência de HHC foi calculada em 1:4 000 a 1:10 000 no sexo masculino e relatada como sendo 2 a 5 vezes menos frequente no feminino (38).

### **1.2.2. Apresentação clínica**

A apresentação clínica dependerá da idade. No momento do nascimento é possível suspeitar de hipogonadismo pela aparência da genitália externa no sexo masculino (p. ex. micropénis e/ou criptorquidia uni ou bilateral). A incidência de HHC na presença de criptorquidia pode ir até 70% (2). No sexo feminino não há sinais específicos que se possam observar à nascença. Na adolescência suspeita-se de HHC quando se observa, no exame físico, os sinais de ausência completa ou parcial do

desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários. Na idade adulta, os sintomas relatados incluem a ausência de virilização e disfunção erétil no sexo masculino, amenorreia primária no sexo feminino e ausência de libido e infertilidade em ambos (14).

A presença de sinais e sintomas adicionais podem sugerir formas sindrômicas. A anosmia ou hiposmia, pode sugerir a forma sindrômica de Kallmann. Outros fenótipos tais como a fenda labial e/ou palatina, deficiência auditiva congénita, agenesia renal, sincinesia bimanual, anomalias esqueléticas, agenesia dentária, podem sugerir outras formas sindrômicas de hipogonadismo hipogonadotrófico (14, 39).

### 1.2.3. Etiopatogenia

O HHC pode resultar de causas adquiridas permanentes ou transitórias ou de causas genéticas que afetam a função do hipotálamo ou hipófise. As causas epigenéticas desempenham um papel emergente na compreensão do HHC.

#### *1.2.3.1. Causas adquiridas*

O hipopituitarismo designa a diminuição ou a total ausência de secreção de uma ou mais hormonas hipofisárias, nas quais se incluem a LH e a FSH. Em geral, a perda adquirida da função da hipófise anterior segue a seguinte sequência GH, LH/FSH, TSH, ACTH e PRL, contudo pode haver perda de função de apenas um tipo de neurónio secretor de hormonas (40). O hipopituitarismo é primário, caso seja causado pelo comprometimento da hipófise anterior ou secundário, caso resulte da deficiência das hormonas estimuladoras hipotalâmicas que normalmente atuam na hipófise (p. ex. GnRH).

As considerações etiológicas no hipopituitarismo são diversas e muitas delas podem causar hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (40). A invasão da glândula hipofisária, dos núcleos hipotalâmicos ou do sistema porta hipotálamo-hipófise por lesões que ocupam espaço, como por exemplo tumores, é uma delas. O enfarte isquémico ou hemorrágico da hipófise, mais comum durante a gravidez ou na presença de tumores hipofisários, resultam com frequência em insuficiência hipofisária parcial ou total. Doenças infiltrativas, tais como a sarcoidose, a

hemocromatose ou a histiocitose das células de Langerhans são causa de hipopituitarismo por infiltração da hipófise e/ou do hipotálamo de células inflamatórias, de ferro ou de células de Langerhans, respetivamente. O traumatismo crânio-encefálico grave pode causar lesão da hipófise anterior, da haste hipofisária ou do hipotálamo, conduzindo a insuficiência hipofisária anterior e a diabetes insípida. A hipofisite linfocítica é uma doença autoimune que também pode resultar em hipopituitarismo anterior, mais frequente em mulheres durante o período da gravidez ou pós-parto. A radioterapia e a cirurgia da glândula hipofisária podem causar hipopituitarismo de modo iatrogénico. As doenças infecciosas como a tuberculose, a sífilis e as infeções micóticas também foram implicadas como agentes causadores da hipofunção da hipófise (40).

Outras possíveis causas adquiridas são as doenças agudas graves, doenças crónicas inflamatórias (p. ex. doença de Crohn, doença celíaca, fibrose quística, artrite juvenile idiopática), o stress, a malnutrição, o excesso de exercício físico ou o abuso de esteróides anabolizantes (2).

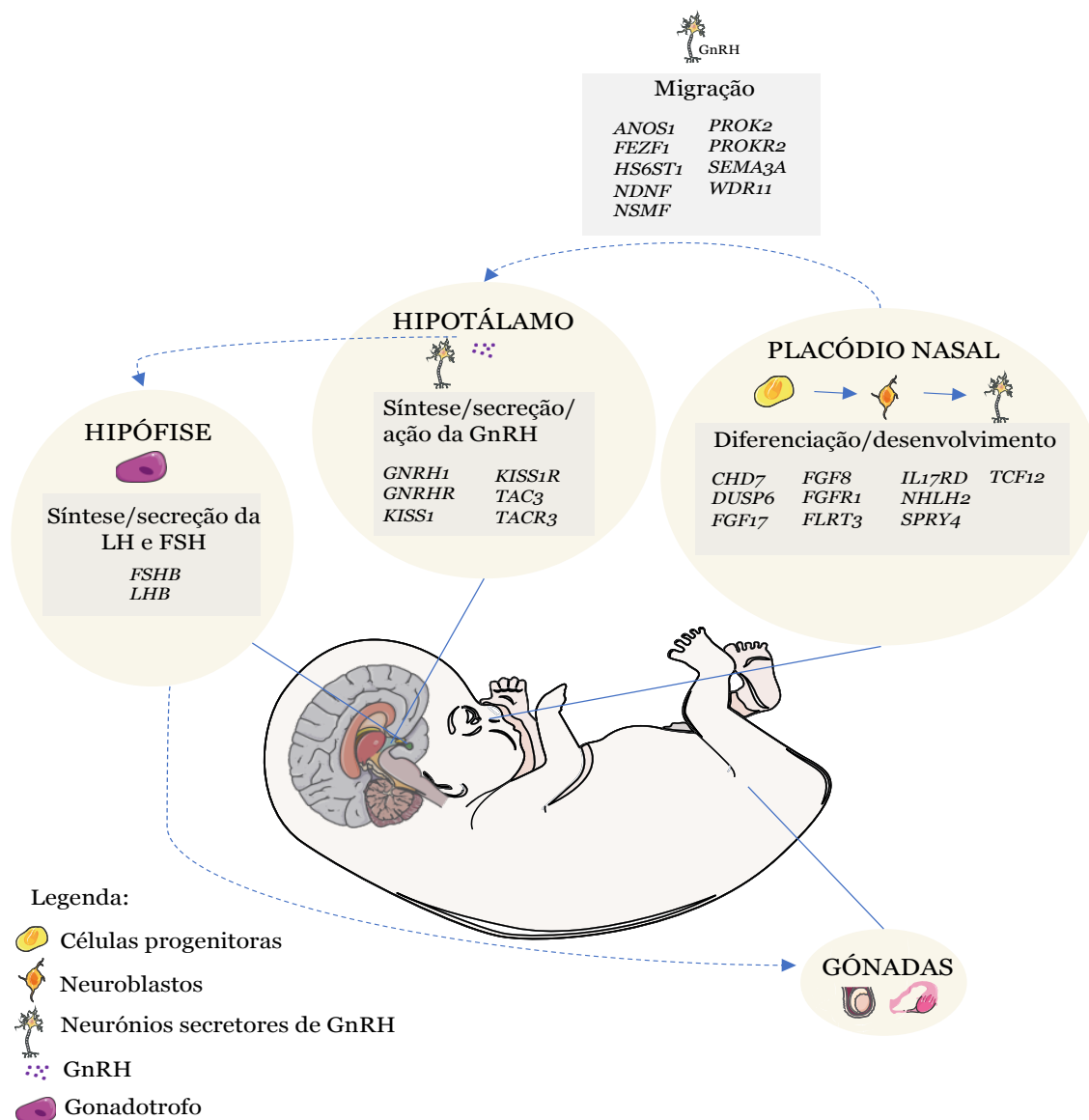
#### *1.2.3.2. Causas genéticas*

Estabelecer a causa genética precisa do HHC é útil para determinar o tratamento e o prognóstico, pois estes dependem da extensão da hipofunção, da causa subjacente e da localização da lesão no eixo hipotálamo-hipófise.

A evolução recente da genética humana, combinada com estudos anatomopatológicos e investigações experimentais, possibilitaram a melhor compreensão das causas da deficiência congénita de gonadotrofinas. A genética desempenha um papel fundamental na etiopatogenia do HHC. As variantes patogénicas afetam genes que intervêm nos seguintes mecanismos: ao nível do placódio nasal, intervêm na diferenciação, desenvolvimento ou migração dos neurónios secretores de GnRH; ao nível do hipotálamo e da hipófise anterior, intervêm na síntese, secreção ou ação da GnRH e das gonadotrofinas, respetivamente (**Figura 1**).

No compêndio Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®) (<https://www.omim.org>), a série fenotípica PS147950 para “Hypogonadotropic hypogonadism with or without anosmia”, descreve a relação entre 27 genes e o HHC com ou sem anosmia (**Tabela 1**). O envolvimento de cada gene que está envolvido num dos mecanismos supracitados será descrita a seguir.

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito



**Figura 1:** Papel no eixo Hipotálamo-Hipófise-Gónadas dos genes descritos no OMIM® relacionados com o fenótipo de Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. A figura foi criada adaptando figuras disponíveis no Servier Medical Art (Servier; <https://smart.servier.com/>), licenciado por Creative Commons Attribution 4.0 Unported License.

**Tabela 1:** Genes que constam no *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM®) como estando associados ao Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito com ou sem anosmia.

<b>Gene/Locus</b>	<b>Localização</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Modo de hereditariedade</b>	<b># MIM do fenótipo</b>	<b>#MIM do Gene</b>
<i>ANOS1, KAL1, KMS, ADMLX, HH1</i>	Xp22.31	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 1 with or without anosmia (Kallmann syndrome 1)</i>	XLR	308700	300836
<i>FGFR1, FLT2, OGD, KAL2, HH2, HRTFDS, ECCL</i>	8p11.23	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 2 with or without anosmia</i>	AD	147950	136350
<i>PROKR2, PKR2, GPR73L1, HH3</i>	20p12.3	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 3 with or without anosmia</i>	AD	244200	607123
<i>PROK2, PK2, BV8, HH4</i>	3p13	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 4 with or without anosmia</i>	AD	610628	607002
<i>CHD7, HH5</i>	8q12.2	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 5 with or without anosmia</i>	AD	612370	608892
<i>FGF8, HH6</i>	10q24.32	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 6 with or without anosmia</i>	AD	612702	600483
<i>GNRHR, LHRHR, HH7</i>	4q13.2	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 7 without anosmia</i>	AR	146110	138850
<i>KISS1R, GPR54, HH8, CPPB1</i>	19p13.3	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 8 with or without anosmia</i>	AR	614837	604161
<i>NSMF, NELF, HH9</i>	9q34.3	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 9 with or without anosmia</i>	AD	614838	608137
<i>TAC3, NKNB, HH10</i>	12q13.3	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 10 with or without anosmia</i>	AR	614839	162330
<i>TACR3, NK3R, HH11</i>	4q24	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 11 with or without anosmia</i>	AR	614840	162332

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito

Gene/Locus	Localização	Fenótipo	Modo de hereditariedade	# MIM do fenótipo	#MIM do Gene
GNRH1, LNRH, HH12	8p21.2	?Hypogonadotropic hypogonadism 12 with or without anosmia	AR	614841	152760
KISS1, HH13	1q32.1	?Hypogonadotropic hypogonadism 13 with or without anosmia	AR	614842	603286
WDR11, DR11, KIAA1351, BRWD2, HH14	10q26.12	Hypogonadotropic hypogonadism 14 with or without anosmia	AD	614858	606417
HS6ST1, HS6ST, HH15	2q14.3	{Hypogonadotropic hypogonadism 15 with or without anosmia}	AD	614880	604846
SEMA3A, SEMAD, COLL1, HH16	7q21.11	{Hypogonadotropic hypogonadism 16 with or without anosmia}	AD	614897	603961
SPRY4, HH17	5q31.3	Hypogonadotropic hypogonadism 17 with or without anosmia	AD	615266	607984
IL17RD, SEF, HH18	3p14.3	Hypogonadotropic hypogonadism 18 with or without anosmia	AD, AR, DD	615267	606807
DUSP6, MKP3, PYST1, HH19	12q21.33	Hypogonadotropic hypogonadism 19 with or without anosmia	AD	615269	602748
FGF17, HH20	8p21.3	Hypogonadotropic hypogonadism 20 with or without anosmia	AD	615270	603725
FLRT3, HH21	20p12.1	Hypogonadotropic hypogonadism 21 with anosmia	AD	615271	604808
FEZF1, FEZ, ZNF312B, HH22	7q31.32	Hypogonadotropic hypogonadism 22, with or without anosmia	AR	616030	613301
LHB, HH23	19q13.33	Hypogonadotropic hypogonadism 23 with or without anosmia	AR	228300	152780
FSHB, HH24	11p14.1	Hypogonadotropic hypogonadism 24 without anosmia	AR	229070	136530

Gene/Locus	Localização	Fenótipo	Modo de hereditariedade	# MIM do fenótipo	#MIM do Gene
<i>NDNF</i> , <i>C4orf31</i> , <i>NORD</i> , <i>HH25</i>	4q27	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 25 with anosmia</i>	AD	618841	616506
<i>TCF12</i> , <i>HTF4</i> , <i>CRS3</i> , <i>HH26</i>	15q21.3	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 26 with or without anosmia</i>	AD, AR	619718	600480
<i>NHLH2</i> , <i>HEN2</i> , <i>HH27</i>	1p13.1	<i>?Hypogonadotropic hypogonadism 27 without anosmia</i>	AR	619755	162361

Abreviaturas: DD, digénico dominante; AD, autossómico dominante; AR, autossómico recessivo; XLR, recessivo ligado ao cromossoma X; MIM, *Mendelian Inheritance in Man*.

Foi no final do século XIX que surgiu o primeiro relato clínico que apontou para uma forma congénita de hipogonadismo, pelo médico Aureliano Maestre de San Juan (41, 42). Este descreveu uma condição caracterizada por ausência de olfato (anosmia) e atraso pubertário. Mais tarde, na década de 1940, a ligação entre o hipogonadismo e a anosmia foi estabelecida pelo médico psiquiatra Franz Josef Kallmann (35). Kallmann observou esta condição em várias gerações de uma mesma família, sugerindo uma herança genética. Nas décadas seguintes, com a crescente compreensão da genética e hereditariedade, investigadores observaram padrões de hereditariedade que sugeriam uma ligação ao cromossoma X. Mas foi só na década de 1990 que o gene *KAL1* (atualmente conhecido como *ANOS1*) foi identificado como sendo responsável pelo HHC, normalmente com anosmia (OMIM #308700), com modo de hereditariedade recessivo ligado ao cromossoma X (43, 44). A partir daí, o conhecimento sobre as causas genéticas do HHC não parou de evoluir. Atualmente sabe-se que após a sua diferenciação e desenvolvimento, os neurónios secretores da GnRH, migram do placódio nasal, utilizando as terminações nervosas dos axónios, para a sua localização final no hipotálamo (27, 45). Aí enviam projeções para a eminência mediana onde a GnRH será libertada. Durante esse processo, o gene *ANOS1* (OMIM \*300836), que codifica uma glicoproteína da matriz extracelular chamada de Anosmina-1, é importante na adesão dos nervos olfativos ao longo das vias migratórias iniciais, conduzindo os neurónios secretores de GnRH a partir do placódio nasal. Os putativos papéis da Anosmina-1 incluem, ser uma matriz celular

que serve de guia para os axónios, ser um quimioatratador secretado para ajudar na orientação dos axónios olfativos ou ainda, ser uma proteína secretada para digerir a matriz e permitir que os axónios olfativos cruzem o bolbo olfativo (46-48). Por conseguinte, os efeitos das variantes patogénicas do gene *ANOS1* na migração dos neurónios secretores de GnRH são indiretos. Dodé et al. (49) sugeriram que a Anosmina-1 pode também estar envolvida na sinalização dos recetores dos fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs), também eles importantes para a diferenciação dos neurónios secretores de GnRH. Variantes patogénicas neste gene são encontradas em 10 a 20% dos indivíduos do sexo masculino com SK (50, 51). Para além do fenótipo de hipogonadismo hipogonadotrófico, os indivíduos podem apresentar sincinesia bimanual (em 75% dos casos), palato arqueado, fenda labial e/ou palatina, metacarpos curtos, deficiência auditiva, anomalias oculomotoras e agenesia renal unilateral (30% dos casos) (52, 53). O que pode explicar o facto de doentes com SK e variantes patogénicas no *ANOS1*, possuírem defeitos congénitos no rim, incluindo a agenesia, foi a descoberta de que a expressão da Anosmina-1 no rim precede o desenvolvimento dos glomérulos renais (33). Este gene tem modo de hereditariedade ligado ao cromossoma X de forma recessiva.

A sinalização pelos FGFs é importante para a diferenciação e proliferação das células progenitoras dos neurónios secretores de GnRH. O fator de crescimento do fibroblasto-8, codificado pelo gene *FGF8* (OMIM \*600483) e o seu recetor, o recetor tipo 1 do fator de crescimento do fibroblasto, (*FGFR1*; OMIM \*136350) têm uma expressão espacial e temporal precisas de modo a controlar o desenvolvimento dos neurónios secretores de GnRH, tendo sido encontrados no placódio nasal, no período do desenvolvimento em que os neurónios secretores de GnRH sofrem a diferenciação (54-56). Falardeau et al. (55), num estudo em doentes com HHC, identificaram o *FGF8* como sendo o ligando do *FGFR1*. Observaram ainda, com recurso a um modelo animal, que a perda de função completa do *FGF8* leva à ausência de neurónios secretores de GnRH no hipotálamo. A ausência parcial deste ligando leva a uma redução desses neurónios e conseqüente redução dos níveis de GnRH.

O *FGFR1* e o seu ligando *FGF8* têm modo de hereditariedade autossómico dominante e foram identificados como sendo responsáveis por HHC com ou sem anosmia (OMIM #147950 e #612702, respetivamente). Variantes patogénicas no *FGFR1* foram encontradas em aproximadamente 10% de doentes com SK e 7% com HHCn (57).

Outros fenótipos associados a variantes nestes genes são a fenda labial e/ou palatina, agenesia dentária e malformações ósseas (39).

Foram já descritos pelo menos 11 FGFs com capacidade para ativar o *FGFR1* (58). De entre eles, o *FGF13* (OMIM \*300070) e *FGF17* (OMIM \*603725) mantêm grande homologia com o *FGF8* e foram encontrados no placódio nasal no mesmo momento em que os neurónios secretores de GnRH sofrem a sua diferenciação (59, 60). Identificaram-se ainda outros genes com modos de expressão espaço-temporal semelhantes ao *FGF8* e que intervêm na modulação da via de sinalização deste (61). Desses genes, o *ILR17D* (OMIM \*606807), o *DUSP6* (OMIM \*602748), o *SPRY4* (OMIM \*607984) e o *FLRT3* (OMIM \*604808), foram identificados como tendo variantes patogénicas em indivíduos com HHC (61). O *SPRY4* é membro da família Sprouty (Spry), estes funcionam como inibidores das cascatas de sinalização dos fatores de crescimento dos fibroblastos (62).

O neuropeptídeo Procinetina 2 é um peptídeo com 81 aminoácidos, codificado pelo gene *PROK2* (OMIM \*607002). A ausência de expressão ou a presença de variantes patogénicas neste gene e no seu recetor ligado a proteínas G, *PROKR2* (OMIM \*607123) foi relacionado com a migração disfuncional dos neurónios secretores da GnRH e consequentemente com problemas do desenvolvimento pubertário. As variantes patogénicas foram encontradas em humanos e investigadas em ratinhos, sendo causa de HHC com ou sem anosmia (OMIM #610628e e #244200, respetivamente) (63-66). A deficiência de Procinetina 2 em ratinhos leva a uma redução acentuada do tamanho do bulbo olfativo e à perda da sua normal arquitetura, à acumulação dos neurónios progenitores na via migratória rostral e à redução dos neurónios secretores de GnRH na área pré-óptica medial (64, 67). O modo de ação desta proteína na migração neuronal não está totalmente esclarecido, sabe-se que ela não é expressa pelos neurónios secretores de GnRH, pelo que se pensa poder agir ao nível da sinalização, durante a migração destes para o prosencéfalo (64, 68). Variantes patogénicas foram encontradas em 9% dos doentes com SK (57). O modo de hereditariedade destes dois genes, *PROK2* e *PROKR2*, tem gerado controvérsia. Na declaração de consenso Europeu acerca do HHC, Boehm et al. (14) consideram-nos com modo de hereditariedade autossómico recessivo, no entanto, a maioria dos doentes apresenta variantes em heterozigotia (69). A questão levantou-se pela descoberta de variantes em heterozigotia, em progenitores assintomáticos, enquanto os descendentes homozigóticos se tornam sintomáticos (70). Contudo, a descoberta

de doentes com SK e variantes em heterozigotia pode ser explicada, à luz do conhecimento atual, pelos fenómenos de digenia, penetrância incompleta ou expressividade variável (39, 71, 72). De facto, quase dois terços dos casos apresentam penetrância incompleta e expressividade variável (73). Outras apresentações fenotípicas podem ser identificadas nos doentes com variantes nestes genes, tais como displasia fibrosa, sincinesia e epilepsia (57).

O *Chromodomain helicase DNA binding protein 7*, codificado pelo gene *CHD7* (OMIM \*608892) é importante para a proliferação de células neuronais estaminais olfativas (29). Recorrendo a um modelo de ratinho da Síndrome de CHARGE (*coloboma, heart disease, atresia of the choanae, retarded growth and mental development, genital anomalies, and ear malformations and hearing loss*) (OMIM #214800), foi demonstrado que a redução na expressão de *CHD7* diminui a proliferação celular que está na génese dos neurónios secretores de GnRH durante o desenvolvimento embrionário (74). Isto sugere que a *CHD7* está envolvida na proliferação de parte dos neurónios secretores de GnRH, mas que provavelmente não é a única interveniente. Alguns doentes com variantes patogénicas neste gene podem sofrer de HHC com ou sem anosmia, com modo de hereditariedade autossómico dominante (OMIM #612370), levantando-se a hipótese de que essas variantes causam uma forma mais ligeira da Síndrome de CHARGE (75).

A hormona libertadora de gonadotrofinas é codificada pelo gene *GNRH1* (OMIM \*152760). Este gene é transcrito numa pré-pro-hormona de 92 aminoácidos que contém o decapeptídeo GnRH e um outro peptídeo de 56 aminoácidos, chamado de peptídeo associado ao GnRH (GAP) (76). O decapeptídeo GnRH é uma neuro-hormona fundamental na regulação da puberdade e da reprodução, nos mamíferos. São raras as variantes disruptivas nesta neuro-hormona, porém, quando afetam os dois alelos do gene, podem ser causa do HHCn (OMIM #614841) (77).

O recetor da hormona libertadora de gonadotrofinas, codificado pelo gene *GNRHR* (OMIM \*1388508) é expresso principalmente nos gonadotrofos da hipófise mas também nos ovários, testículos, placenta e próstata (78). A ativação do recetor de GnRH aumenta a mobilização de cálcio e estimula o influxo de cálcio extracelular. Este aumento de cálcio intracelular induz a secreção de LH e FSH pela hipófise (36). O *GNRHR* tem hereditariedade autossómica recessiva (OMIM #146110). Casos excecionais, como é exemplo aquele descrito por Cioppi et al. (79) podem dever-se a

isodissomia uniparental (quando um indivíduo herda duas cópias idênticas de um cromossoma homólogo, ou parte dele, de apenas um dos progenitores), que no caso, conduziu à herança em homozigotia de uma variante patogénica neste gene.

A Kisspetina é um neuropeptídeo excitador que foi identificado inicialmente como um supressor tumoral conhecido como Metastina e o seu recetor como GPR54. Atualmente estes são conhecidos como *KISS1* (OMIM \*603286) e o seu recetor como *KISS1R* (OMIM \*604161). Ambos são considerados como tendo um papel central na regulação da secreção da GnRH e consequentemente da LH e FSH, nos mamíferos. A Kisspeptina é sintetizada por neurónios hipotalâmicos que contactam com os neurónios secretores de GnRH e estes últimos, na sua maioria, expressam o recetor da Kisspeptina. Por sua vez, os neurónios secretores de Kisspeptina expressam os recetores dos esteróides sexuais (80). De facto, estes neurónios são os principais responsáveis pelo *feedback* negativo e positivo do eixo HHG, provocado pelas hormonas esteróides (81). Pensa-se que esta proteína também esteja implicada na secreção pulsátil da GnRH. Foi ainda observado em ratinhos que o início da puberdade está correlacionado com o aumento da síntese de Kisspeptina no hipotálamo e pensa-se que este mecanismo possa estar evolutivamente conservado (82, 83). Seminara et al. (84) mostraram que variantes patogénicas no recetor são causa de HHCn recessivo, pela via da diminuição da secreção da GnRH, apesar de anatomicamente os neurónios secretores de GnRH se apresentarem normais. Variantes patogénicas nestes dois genes, *KISS1* e *KISS1R*, estão relacionadas com HHCn com hereditariedade autossómica recessiva (OMIM # 614842 #614837, respetivamente) (73).

O fator nasal embrionário LHRH (NELF), codificado pelo gene *NSMF* (OMIM \*608137) desempenha um papel na migração dos neurónios secretores de GnRH, sendo uma molécula que serve de guia para as projeções destes neurónios, assim como dos axónios olfativos (85). A relação deste gene com o HHC é atualmente controversa, pois se por um lado, experiências em modelos animais mostraram que o *knockout* em homozigotia não tem o impacto esperado no fenótipo reprodutivo, por outro lado, várias publicações mostraram a relação entre variantes patogénicas em heterozigotia e a doença, mas normalmente em digenia com outros genes (64, 86-88). No OMIM®, este gene consta como causa de HHC com ou sem anosmia, com modo de hereditariedade autossómico dominante (OMIM #614838).

A Neurocinina B (NKB), codificada pelo gene *TAC3* (OMIM \*162330), pertence a uma família de taquicininas que incluem para além da NKB, a substância P (SP), a Neurocinina A (NKA) e, mais recentemente, endocininas e hemocininas. Estas foram recentemente relacionadas com a ativação dos neurónios secretores de GnRH e a etiopatogenia do HHC (89). Nos roedores, verificou-se que os axónios dos neurónios secretores de NKB e os dos neurónios secretores de GnRH estão anatomicamente muito próximos, na eminência mediana do hipotálamo, e que os recetores da NKB foram identificados nos neurónios que exprimem a GnRH, sugerindo assim um papel dos primeiros na libertação hipotalâmica da GnRH (90). Para além disso, tanto a Neurocinina B, como o seu recetor, são co-expressos nos neurónios que exprimem a Kisspeptina e a Dinorfina (neurónios KNDy), enfatizando ainda mais o papel da Kisspeptina e da NKB na regulação do período de início da puberdade (90). Neste contexto, colocou-se a hipótese de que a NKB tenha um papel no controlo da libertação da Kisspeptina no início da puberdade. Tal hipótese foi suportada pela descoberta de variantes inativadoras nos genes *KISS1*, *KISS1R*, *TAC3* e *TACR3* (recetor da NKB; OMIM \*162332), em doentes com hipogonadismo hipogonadotrófico (89, 91). Estes genes têm modo de hereditariedade autossómico recessivo (OMIM #614839 e #614840, respetivamente). A reversão do hipogonadismo hipogonadotrófico dá-se quando o corpo começa a produzir níveis suficientes de gonadotrofinas e hormonas sexuais sem a necessidade de terapia de reposição hormonal. Curiosamente, a taxa de reversão do HHC nos doentes portadores de variantes patogénicas nestes genes apresenta-se elevada. Foi descrita por Gianetti et al. (92) em 83% dos doentes e por Topaloglu et al. (57) em 25%. Nestes portadores, a possibilidade de descontinuação da terapia de tempos em tempos para testar a reversão do HHC poderá ser contemplada.

A *WDR11*, uma proteína conservada nos vertebrados, pertence à família de proteínas que contém repetições WD, codificada pelo gene *WDR11* (OMIM \*606417). É expressa na via migratória do sistema olfativo e dos neurónios secretores de GnRH (93). Variantes patogénicas neste gene foram descritas pela primeira vez por Kim et al. (94) como sendo causa de HHC com ou sem anosmia, com modo de hereditariedade autossómico dominante (OMIM #614858). Posteriormente, outras variantes que afetam aminoácidos conservados da *WDR11* foram identificadas por sequenciação de nova geração (*Next-Generation sequencing*, NGS) em doentes com HHC e outros problemas do desenvolvimento sexual (95).

Os polissacarídeos heparan sulfato são componentes da matrix extracelular que ajudam a modular o desenvolvimento neuronal, nomeadamente a comunicação célula a célula, intervindo assim na migração. O gene *HS6ST1* (OMIM \*604846), que codifica a Heparan Sulfato 6-O-sulfotransferase 1, foi encontrado mutado em famílias com o fenótipo de HHC. Estudos no modelo animal *C. elegans* mostraram a sua interação com os genes da via de sinalização dos fatores de crescimento dos fibroblastos (p.ex. *ANOS1*, *FGF8* e *FGFR1*) (96). Variantes patogénicas são causa de HHC com ou sem anosmia, com modo de hereditariedade autossómico dominante (OMIM #614880).

Durante a migração neuronal, quando os axónios dos neurónios secretores de GnRH atingem a placa cribiforme, continuam a ser direcionados para o prosencéfalo. Para tal são essenciais moléculas sinalizadoras tais como as semaforinas. Uma das semaforinas é codificada pelo gene *SEMA3A* (OMIM \*603961). As semaforinas, agem ao nível do crescimento do cone axonal, importante para o processo de migração. Ratinhos mutantes para o *SEMA3A* e para o *SEMA7A* apresentam uma redução no número de neurónios secretores de GnRH no hipotálamo (97, 98). Contudo, ainda não é totalmente evidente que uma variante única presente num gene das semaforinas seja suficiente para o desenvolvimento da patologia. Young et al. (99) descreveram um caso familiar com uma deleção em heterozigotia em doentes com a SK, o que sugere um modo de hereditariedade autossómico dominante, mas em diversos estudos foram identificados casos de digenia (100-102). No OMIM® este gene é descrito como causa de HHC com ou sem anosmia, com modo de hereditariedade autossómico dominante (OMIM #614897).

O fator de transcrição repressivo *FEZ family zinc finger 1* (*FEZF1*; OMIM \*613301) é expresso durante o desenvolvimento embrionário no epitélio olfativo, amígdala e hipotálamo (103). Kotan et al. (104) descreveram duas famílias consanguíneas, independentes, cada uma com dois irmãos afetados, com um padrão de hereditariedade autossómico recessivo (OMIM #616030). No mesmo estudo, um caso de digenia entre os genes *FEZF1* e *CCDC141* (OMIM \*616031) foi descrito, sugerindo a importância do *CCDC141* para a migração neuronal.

A subunidade Beta da hormona luteinizante (LH), codificada pelo gene *LHB* (OMIM \*152780), é produzida na hipófise e tem um papel central na promoção da espermatogénese e da ovulação, estimulando os testículos e os ovários a sintetizar as

hormonas esteróides (105). A subunidade Beta da hormona folículo-estimulante (FSH), codificada pelo gene *FSHB* (OMIM \*136530) permite a foliculogénese nos ovários e é essencial para a proliferação das células de Sertoli e a manutenção da qualidade do esperma nos testículos. Estas duas hormonas pertencem a uma família de hormonas glicoproteicas, na qual também se incluem a hormona estimuladora da tiróide (TSH) e a hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG). Cada uma delas tem um dímero não covalente de uma subunidade alfa e uma subunidade beta. A subunidade alfa é a mesma para estas quatro hormonas, as subunidades beta são codificadas por genes diferentes e definem a função endócrina de cada um destes dímeros (105). Ambos os genes, *LHB* e *FSHB*, são expressos nos gonadotrofos, mas o *LHB* é mais dependente da ação da GnRH do que o *FSHB* (106). Variantes patogénicas identificadas nas sub-unidades beta destes dois genes foram descritas em doentes com HHCn com modo de hereditariedade autossómico recessivo (OMIM #228300 e #229070, respetivamente) (107-111).

Messina et al. (112) relataram vários doentes com SK e com variantes patogénicas no gene *NDNF* (OMIM \*616506). Este gene codifica o fator neurotrófico derivado de neurónios (NDNF), sendo esta proteína expressa ao longo das vias migratórias dos neurónios secretores de GnRH, tanto em fetos humanos como em fetos de ratinhos. O *knockout* do *NDNF* em ratinhos atrasou a migração destes neurónios e o *knockdown* do seu ortólogo no *zebrafish* também resultou na migração defeituosa dos neurónios GnRH3 (112). Tem modo de hereditariedade autossómico dominante, associado a anosmia (OMIM #618841). A sua participação na etiologia da doença parece ser rara (112, 113).

Davis et al., (114) identificaram indivíduos com a SK e variantes *Loss-of-function* (LoF) no gene *TCF12* (OMIM \*600480). Treze deles com variantes em heterozigotia, sugerindo uma hereditariedade autossómica dominante e uma variante em homozigotia, sugerindo uma herança autossómica recessiva. Recorrendo a estudos funcionais, demonstraram que a *TCF12* é um fator de transcrição relevante para o desenvolvimento do eixo HHG, nos humanos. Na base de dados OMIM®, este gene está descrito como sendo responsável pelo HHC com ou sem anosmia (OMIM #619718).

O fator de transcrição *Nescient helix loop helix 2*, codificado pelo gene *NHLH2* (OMIM \*162361) foi associado à geração dos primeiros neurónios secretores de GnRH

entre o décimo e o décimo segundo dia embrionário em ratinhos (115). Topaloglu et al. (116) identificaram um portador com uma variante patogénica em homozigotia com HHCn e obesidade, estudada funcionalmente (OMIM #619755).

As tecnologias de sequenciação de nova geração têm vindo a impulsionar a identificação de novas causas genéticas para o HHC, tendo-se verificado nos últimos anos um incremento significativo. Às tecnologias de sequenciação, soma-se a disponibilidade de novos recursos para testar e confirmar *in vitro* a implicação desses novos genes (117). Assim, para além dos 27 genes que o OMIM® associa ao HHC com ou sem anosmia, vêm-se somando outros, onde variantes consideradas patogénicas foram recentemente identificadas em doentes com HHC. São exemplo as proteínas p190 RhoGAPs, codificadas pelos genes *ARHGAP35* (#OMIM 605277) e *ARHGAP5* (#OMIM 602680), que são reguladoras negativas da função das RhoGTPase na diferenciação neuronal, orientação axonal e sinalização mediada pela adesão (118-120). Ambas são conservadas evolutivamente, intolerantes a variantes e cruciais para o desenvolvimento do cérebro (121, 122). Lippincott et al. (123) identificaram um enriquecimento de variantes truncadoras e *missense* nestes dois genes, numa coorte de 1347 doentes com HHC. Os estudos funcionais que executaram, confirmaram o envolvimento do gene *ARHGAP35* na redução da distribuição dos neurónios secretores de GnRH. Mais recentemente, em 2023 (124), uma nova função para o gene *POU6F2* (#OMIM 609062) foi descrita, relacionando-o com o hipogonadismo. Através de estudos *in vitro*, Cho et al. (124) descobriram que este é um regulador da transcrição que diminui a expressão do *GNRH1* e identificaram 12 variantes raras *missense*, em heterozigotia e homozigotia, com ocorrência de penetrância incompleta nalgumas famílias.

Conhecem-se numerosos outros genes que estão associados a síndromes específicas, nas quais o hipogonadismo hipogonadotrófico se apresenta como um dos fenótipos (p. ex. Síndrome de Bardet-Biedl, Síndrome de interrupção da haste hipofisária). A investigação desses genes num quadro de HHC isolado pode ser considerada num contexto em que se considere a possibilidade de existir expressividade variável.

### *1.2.3.3. Digenia/oligogenia*

O HHC é caracterizado por expressividade variável e penetrância incompleta, sendo que ambas as características poderão ser explicadas, em parte, pela existência de di- ou oligogenia.

Di- ou oligogenia é a presença de variantes patogénicas em dois (ou mais) genes no mesmo doente (14). Segundo Boehm et al. (14), os doentes de HHC apresentam di- ou oligogenia em pelo menos 20% dos casos investigados.

A primeira publicação que relata digenia relacionada com a SK foi publicada em 2016 por Dodé et al. (63) implicando os genes *ANOS1* e *PROKR2*, contudo as variantes não foram estudadas *in vitro*. Atualmente, dada a grande disponibilidade de dados fornecidos pela NGS, tornou-se um desafio distinguir uma di- oligogenia de um achado incidental sem relação com o fenótipo. Isto porque, confirmar a implicação de digenia na patogénese de uma doença é extremamente difícil, requerendo a disponibilidade de familiares, juntamente com modelos animais e estudos *in vitro*. Os casos de digenia reportados na literatura, com confirmação por estudos *in vitro* de ambas as variantes, envolvem os genes *FGFR1*, *GNRHR*, *NSMF*, *SEMA3A*, *PROKR2* e *WDR11* (125).

O HHC normósmico, a SK ou a anosmia isolada podem ter como causa genética variantes patogénicas no mesmo gene (43, 126-128). Exemplo disso são variantes nos genes *FGFR1*, *FGF8*, *FGF17*, *HS6ST1*, *PROK2/PROKR2*, *WDR11*, *CHD7*, *SEMA7A*, *NELF*, *IGSF10* e *AXL* estarem associados às condições enumeradas (52). A penetrância incompleta e expressividade variável observadas levantam a hipótese de que a diferença na manifestação fenotípica pode dever-se à presença de sinergia com outros genes mutados, ou seja, di- ou oligogenia, ou à interferência de fatores ambientais que irão modular epigeneticamente a sua expressão.

#### *1.2.3.4. Causas epigenéticas*

O efeito dos fatores ambientais na regulação do eixo HHG no desenvolvimento pubertário ainda não está completamente compreendido. De acordo com a literatura existente, durante a puberdade, o ambiente modula o hipotálamo através de mecanismos epigenéticos (mecanismos que afetam a expressão genética sem alterar a sequência do ácido desoxirribonucleico (ADN)) (129). São exemplos a obesidade e certos contaminantes ambientais (130). Estes têm a capacidade de modificar o ADN epigeneticamente, tendo sido implicados no hipogonadismo funcional (130), através dos mecanismos epigenéticos como a metilação de ADN que está na base do mecanismo de *imprinting* genético, a acetilação e metilação de histonas, e o mecanismo dependente de microRNAs (miR) (131, 132).

Os sinais metabólicos e nutricionais exercem efeito através do mecanismo epigenético de deacetilação, regulando assim a puberdade. Vazquez et al. (133) descobriram que a Sirtuína (*SIRT1*), uma deacetilase, restringe a puberdade feminina por meio da repressão epigenética do gene ativador da puberdade, o *KISS1*. A *SIRT1* é expressa em neurónios Kiss1 hipotalâmicos e suprime a expressão da Kiss1 interagindo com o complexo silenciador Polycomb para diminuir a atividade do promotor do *KISS1*. À medida que a puberdade se aproxima, a *SIRT1* é removida da cromatina do promotor *KISS1*, facilitando a troca, de repressão para ativação. O sobrepeso na infância acelera esta troca, aumentando a expressão do *KISS1* e acelerando o início da puberdade. Pelo contrário, a desnutrição aumenta os níveis de *SIRT1*, prolongando a repressão do *KISS1* e atrasando o início da puberdade (133).

Grande parte da programação que acontece no cérebro, relacionada com a diferenciação sexual durante a puberdade, depende da disponibilidade dos recetores hormonais. Vários estudos sugerem que o estado de metilação do ADN que codifica esses recetores pode influenciar a sua expressão. Um exemplo é a associação entre o aumento da metilação com a diminuição da expressão dos recetores de estrogénio alfa (ERa), estrogénio beta (ERb) e progesterona (134-138). O silenciamento da transcrição de proteínas do grupo Polycomb foi também descrito no momento do início da puberdade, em roedores fêmea (129).

O fenómeno de *imprinting* genético regula a expressão de certos genes, de modo que apenas um dos alelos seja ativado. Nalguns casos, os genes herdados do pai são expressos, enquanto os herdados da mãe são silenciados, ou vice-versa. Os mecanismos que controlam o *imprinting* incluem a metilação do ADN e modificações das histonas. O *imprinting* paterno dos genes *MKRN3* ou dos genes relacionados com a Síndrome de Prader-Willi, foram relacionados com a puberdade precoce e com o HHC, respetivamente (139-141).

A acetilação de histonas é outro importante mecanismo epigenético, crítico para a transcrição durante o desenvolvimento e pensa-se que também tenha um papel na maturação da puberdade (142). Ainda, mecanismos pós-transcricionais são acionados para a regulação genética. Descobertas recentes em ratinho, indicam que um mecanismo dependente de miR regula a produção da GnRH para controlar o início da puberdade. Messsina et al. (143) identificaram dois miRs que controlam a produção da GnRH entre o sétimo e o décimo-segundo dias após o nascimento (P7-P12),

período que antecede a puberdade nos ratinhos. Uma abordagem *in silico* revelou potenciais locais de ligação de miR aos promotores de genes que modulam a produção da GnRH. O mesmo grupo de investigadores identificou membros da família miR-200 (miR-200a, miR-155 e miR-429) que são distintamente expressos entre os dias P7 e P12 e que se encontram enriquecidos nos neurónios de GnRH a P12.

O gene *CHD7*, implicado na etiopatogenia da Síndrome de CHARGE e do HHC, é um modificador epigenético que codifica uma proteína remodeladora da cromatina (144).

Os estudos que relacionam a regulação do eixo HHG com mecanismos epigenéticos são recentes, mas consistentes. Novas investigações nesta área permitirão compreender melhor como estes mecanismos controlam a puberdade. Assim, fica a hipótese de que, quando nenhuma mutação é encontrada para explicar a etiopatogenia do HHC humano, seja possível que esteja subjacente a regulação epigenética.

#### 1.2.4. Diagnóstico

Na Declaração de Consenso Europeu acerca do HHC, define-se atraso pubertário na ausência de aumento testicular (volume < 4 ml), nos indivíduos do sexo masculino, aos 14 anos, e ausência de desenvolvimento mamário, nos indivíduos do sexo feminino, aos 13 anos (14).

Laboratorialmente, a determinação dos níveis séricos da GnRH é difícil porque esta está confinada ao sistema portal hipofisário e tem uma semivida de 2 a 4 minutos. Assim, normalmente, o diagnóstico laboratorial de HHC é feito na presença de baixos níveis séricos de testosterona no sexo masculino e estradiol no sexo feminino e níveis baixos ou inadequadamente normais de gonadotrofinas (LH e FSH), em ambos (14).

Com vista a ampliar a avaliação etiológica, habitualmente realiza-se uma ressonância magnética (RM) da região hipotálamo-hipófise e dos bolbos e sulcos olfativos para analisar com precisão a morfologia do eixo hipotálamo-hipófise e visualizar os bolbos olfativos (145). A agenesia ou hipoplasia dos bolbos olfativos aponta para a SK (145).

Após anamnese cuidadosa, revisão da história familiar, análise dos exames laboratoriais e dos resultados de imagiologia, se houver suspeita de HHC, o teste genético deve ser considerado.

O estabelecimento de um diagnóstico genético do HHC é importante por várias razões, tendo implicações clínicas, terapêuticas, reprodutivas e familiares. Com um diagnóstico genético, o diagnóstico diferencial poderá ser estabelecido, o tratamento poderá ser direcionado, o prognóstico reprodutivo poderá ser previsto, outras manifestações não reprodutivas poderão ser identificadas e o aconselhamento genético do doente e membros da família poderá ser prestado. Em resumo, o diagnóstico genético visa melhorar a qualidade de vida do doente.

Uma exaustiva descrição de todos os sinais e sintomas permite direcionar melhor os testes genéticos, aumentando assim a probabilidade de encontrar variantes causais (14). Nomeadamente quando a apresentação clínica aponta para síndromes específicas, pode-se estabelecer uma relação fenótipo-genótipo.

Quando, para além da anosmia/hiposmia, o doente apresenta sincinesia bimanual ou agenesia renal unilateral, podem estar presentes variantes patogénicas no *ANOS1*. Quando o HHC aparece concomitantemente com fenda labial e/ou palatina, agenesia dentária e/ou anomalias esqueléticas, podem estar presentes variantes patogénicas nos genes de sinalização do *FGF8* (*FGFR1*, *FGF8*, *HS6ST1*) (14, 39).

A deficiência auditiva está normalmente presente em doentes HHC nos quais se identificaram variantes patogénicas nos genes *CHD7*, *SOX10* ou *IL17RD* (14, 39).

No défice combinado de hormonas hipofisárias com displasia septo-ótica, os genes *FGFR1* e *HESX1* devem ser investigados (14, 146, 147).

Contudo, o desafio de identificar a causa genética do HHC é maior em doentes onde este se apresenta isoladamente e sem história familiar. Nesses casos, o recurso às tecnologias de sequenciação de nova geração poderá ser o mais recomendado.

Para estabelecer diagnóstico, importa fazer diagnóstico diferencial entre HHC, atraso constitucional do crescimento e da puberdade e outras causas adquiridas (2). De facto, a maioria dos indivíduos do sexo masculino com atraso pubertário (83%) têm atraso constitucional do crescimento e da puberdade e no sexo feminino são 30% (2).

### 1.2.5. Tratamento

O tratamento farmacológico é normalmente escolhido de acordo com os objetivos pretendidos. Esses objetivos poderão ser mitigar a ausência de virilização/estrogenização, atingir uma função sexual normal, estimular o crescimento estatural, promover a saúde óssea, promover o bem-estar psicológico e emocional ou ainda, induzir a fertilidade (14). O tratamento farmacológico não está disponível para a maioria dos fenótipos sindrômicos associados ao HHC, tais como a anosmia, a sincinesia bimanual ou a agenesia renal. Outros fenótipos, tais como a fenda labial e/ou palatina e algumas malformações músculo-esqueléticas podem ter tratamento cirúrgico (14). É aconselhada a correção cirúrgica da criptorquidia durante o primeiro ano de vida (148). O tratamento do micropénis também deve ser feito em idade pediátrica, com recursos a baixas doses de testosterona para indução do crescimento peniano (149).

Na idade da adolescência não existem regimes de tratamento padronizados para o HHC, sendo que o mais frequentemente utilizado é o tratamento com esteróides sexuais para induzir o desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários e o desenvolvimento psicossocial (testosterona no sexo masculino e estradiol no sexo feminino) (14). A testosterona pode ser administrada com uma variedade de formulações incluindo gel tópico, gel nasal, adesivos, injetável ou via oral (150). Os efeitos secundários clássicos deste tratamento incluem alterações cutâneas (p. ex. acne), ginecomastia, edema, agravamento da apneia obstrutiva do sono e eritrocitose (150).

Na idade adulta, a fertilidade poderá ser induzida por tratamento com GnRH administrado de modo pulsátil, distribuído através de uma bomba subcutânea, com pulsos de 25 ng/kg, administrados a cada 90-120 min (151). A relação da FSH/LH varia com base na dose de GnRH, portanto a dosagem da GnRH deverá ser ajustada para a resposta fisiológica desejada. Contudo, este tratamento não está disponível em muitos países e exige um elevado nível de especialização, pelo que é raramente utilizado fora dos ambientes de investigação (150). Alternativamente, a fertilidade pode ser tratada com gonadotrofina coriônica humana (hCG) isolada, administrada em injeções subcutâneas de 500-1500 IU, três vezes por semana (devendo-se ajustar a dose com base na resposta da testosterona), ou associada à FSH (152-156).

A reversão do hipogonadismo hipogonadotrófico dá-se quando o corpo começa a produzir níveis suficientes de gonadotrofinas e hormonas sexuais sem a necessidade de terapia de reposição hormonal. Relatos clínicos de doentes nos quais, após interrupção da administração de testosterona, a função reprodutora é espontaneamente recuperada, estão descritos em 10 a 20% dos casos (157, 158). No sexo masculino, um sinal de reversão é a observação de crescimento testicular ou, em ambos os sexos, a fertilidade espontânea durante a terapia hormonal de substituição (14). Os mecanismos que levam à reversão não são bem conhecidos. Levanta-se a hipótese que os esteróides sexuais possam influenciar a plasticidade da rede neuronal hipotalâmica, levando à recuperação da função dos neurónios secretores de GnRH. Outra hipótese, é a de que existe um espectro que vai do atraso constitucional do crescimento e da puberdade até ao HHC e que as pessoas que sofrem reversão, na verdade possuem um atraso constitucional. Contudo, a refutar esta última, observa-se que a reversão nem sempre é definitiva, podendo observar-se uma reincidência em 5% dos casos (159). A suportar a primeira hipótese temos o dado de que foi observado, em ratos, a génese de novos neurónios secretores de GnRH (160).

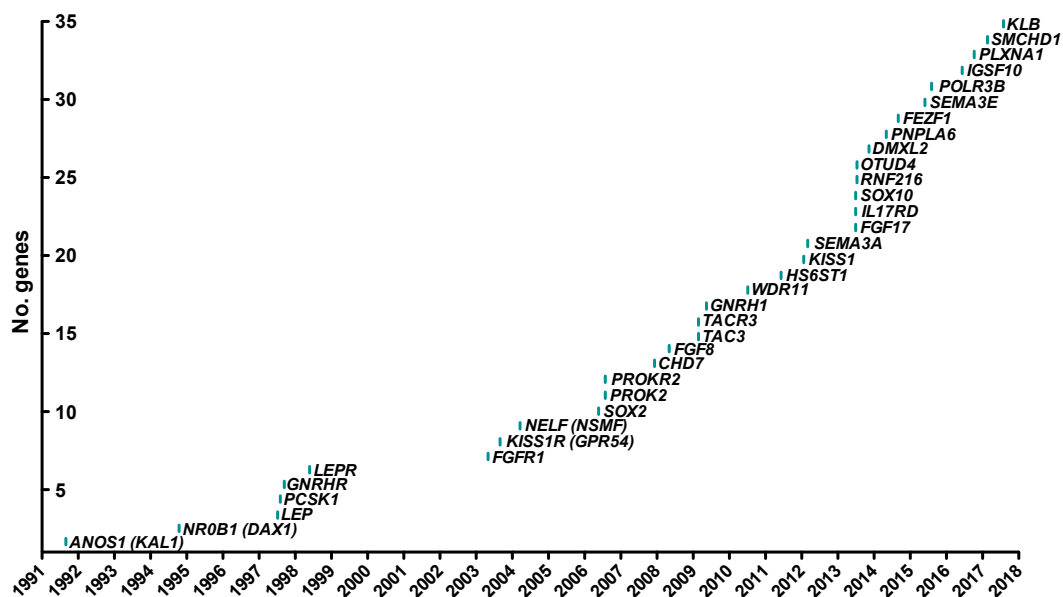
A taxa de reversão varia de estudo para estudo. Kałużna et al. (161) descrevem seis casos de reversão na sua coorte, correspondendo a uma incidência de 6%, enquanto outros estudos relatam valores entre 10 a 20% (146, 157, 159, 161). A reversão tem sido descrita em doentes com variantes patogénicas presentes em determinados genes: *ANOS1*, *CCDC141*, *FGFR1*, *CHD7*, *HS6ST1*, *PROKR2*, *NSMF*, *GNRHR*, *TAC3* e *TACR3* (14, 162) e tanto em casos de HHCn como em casos de SK. O facto de a reversão acontecer em doentes com agenesia dos bolbos olfativos sugere que estas estruturas não são essenciais para uma função reprodutiva normal. Nalguns estudos, os casos de reversão foram associados à presença de digenia, no caso do Kałużna et al. (161) entre os genes *CHD7* e *FGFR1* e *CHD7* e *GNRHR*. Em contraste, num estudo multicêntrico realizado em seis centros internacionais de referência para o HHC, localizados no Brasil, Finlândia, França, Itália, Reino Unido e EUA, Dwyer et al. (158) mostraram que entre os doentes submetidos a testes genéticos, nenhum dos que apresentaram reversão do HHC tinham uma variante patogénica rara no gene *ANOS1*.

### **1.3. Sequenciação de nova geração (NGS) em medicina**

As primeiras causas genéticas estabelecidas para o HHC foram descobertas por diferentes estratégias, tais como o estudo do *linkage* genético, de famílias consanguíneas, de alterações cromossômicas estruturais e de genes candidatos (pertencentes a determinadas vias de sinalização ou alterados em modelos animais com fenótipos análogos) (163).

Desde a descoberta dos primeiros genes responsáveis pelo HHC, a análise genética tinha-se baseado principalmente na sequenciação de Sanger, um método em que os exões e as junções intrão-exão de cada gene são analisados separadamente. No ano de 1977, Frederick Sanger introduziu este método de sequenciação de ADN, inovador à época, caracterizado pela elongação do ADN por síntese enzimática da sequência polinucleotídica. Este método consiste em utilizar moléculas de trifosfato de didesoxinucleótidos (ddNTP), que à medida que são incorporados na cadeia, têm a propriedade de parar a extensão, gerando uma cadeia truncada (164). A marcação destes ddNTP com diferentes marcadores fluorescentes facilita a sua visualização e deteção.

O método de sequenciação de Sanger continua a ser o método padrão nos laboratórios clínicos para diagnóstico molecular de doenças monogénicas e para validar os resultados obtidos por NGS (165). Contudo, apesar das melhorias incrementais na instrumentação, metodologia e rendimento que permitiram reduzir constantemente o seu custo (166), a sequenciação de Sanger continua trabalhosa, lenta e muito dispendiosa quando é necessário analisar um grande número de genes, o que se tornou gradualmente a regra nesta doença (**Figura 2**). Com a sequenciação de Sanger, quando a análise de um primeiro gene não revela qualquer variante patogénica capaz de explicar o fenótipo, é necessário analisar um segundo gene, depois um terceiro, e assim sucessivamente.



**Figura 2:** Tendência histórica na identificação de genes causais ou associados ao Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito. Reproduzido com permissão de Maione et al. (73) (Anexo 1).

De acordo com Margulies et al. (167), foi a proliferação dos projetos de sequenciação de ADN em larga escala que impulsionou a busca por métodos alternativos, com o objetivo de reduzir tempo e custos. Foi assim que surgiu um novo método que permite a sequenciação em massa através da leitura dos nucleótidos à medida que estes vão sendo incorporados na cadeia de ADN em crescimento. Este método tornou-se conhecido como a sequenciação de nova geração (*Next-generation sequencing*, NGS) (167). A NGS utiliza a tecnologia de sequenciação por síntese (*sequencing-by-synthesis* – SBS) que tem como base a utilização de uma enzima polimerase (168). Esta tecnologia foi sendo desenvolvida e veio revolucionar o mercado da sequenciação.

Recentemente, numerosos estudos, impulsionados pela disponibilidade tecnológica da NGS, incrementaram significativamente as causas genéticas conhecidas do HHC. Às tecnologias de sequenciação, soma-se a disponibilidade de novos recursos para testar e confirmar *in vitro* a implicação desses novos genes (117). Esta lista crescente de genes inclui os que têm variantes patogénicas raras confirmadas por vários estudos independentes e inclui os que têm variantes classificadas como patogénicas,

encontradas com maior frequência no grupo de doentes em comparação com o grupo controlo.

O processo de NGS desenvolve-se em três passos principais: (1) preparação da biblioteca genómica; (2) sequenciação: a) análise primária feita pelos instrumentos de NGS que produzem os dados em bruto, b) análise secundária que corresponde ao alinhamento com a sequência de referência e à identificação de variantes (“*variant calling*”) e c) análise terciária que corresponde à confirmação e validação das variantes e (3) análise dos dados e interpretação das variantes (169).

Atualmente, esta tecnologia está amplamente disponível, permitindo testar até centenas de genes ao mesmo tempo, o exoma completo ou mesmo o genoma completo. Portanto, esta foi rapidamente integrada nos fluxos de trabalho do diagnóstico laboratorial para identificação de variantes germinativas causais de doenças hereditárias. Devido à celeridade com que fornece resultados e ao custo razoável, é especialmente útil nos casos em que vários genes foram identificados no contexto de uma determinada condição genética, como é o caso do HHC.

Desde que a Declaração de consenso dos especialistas em HHC foi publicada em 2015 (14), vários estudos recorreram às tecnologias de sequenciação de nova geração para aplicar painéis de genes. No entanto, não existe consenso em relação à lista de genes a incluir nesses painéis. Por exemplo, em sete estudos realizados entre 2016 e 2019, o número de genes incluídos nesses painéis variou entre 25 e 261 e a taxa de diagnóstico genético entre 33% e 56% (170-175). Ainda, num inquérito recente a 23 prestadores de cuidados de saúde pertencentes à *European Reference Network on rare endocrine conditions* (Endo-ERN; [www.endo-ern.eu](http://www.endo-ern.eu)) verificou-se que o número de genes analisados em painéis personalizados de HHC pode variar entre 14 e 360 genes (176). Outro exemplo, o painel de genes do NHS (National Health Service) do Reino Unido, para o HHC, é atualmente composto por apenas 22 genes (<https://nhsgms-panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/650/v3.0>).

Perante a disponibilidade da NGS, importa decidir qual é a abordagem mais adequada: painéis genéticos personalizados (*custom gene panels*), sequenciação completa do exoma (*Whole-exome sequencing*, WES) ou sequenciação completa do genoma (*Whole-genome sequencing*, WGS) (177).

### 1.3.1. Painéis personalizados de genes

Atualmente, as aplicações mais comuns da NGS na prática clínica são a avaliação de certos genes utilizando painéis personalizados de genes (*Custom gene panels*) (165). Recentemente, Persani et al. (176) conduziram um estudo sobre a prática atual da utilização da NGS na *European Reference Network on rare endocrine conditions* (Endo-ERN; [www.endo-ern.eu](http://www.endo-ern.eu)). Este mostrou que a maioria dos centros utiliza painéis personalizados de genes para diagnóstico do HHC.

O desenvolvimento e a disponibilidade clínica de um painel personalizado de genes representam um avanço no diagnóstico genético molecular de doentes com HHC. Tal como acontece com as outras patologias multigênicas, no HHC há um equilíbrio a ser alcançado entre a inclusão de genes com relação bem estabelecida entre o genótipo e o fenótipo, altamente curados (p. ex. descritos no OMIM® ou na Declaração Europeia de Consenso (14)) e a inclusão de um maior número de genes que têm algumas evidências de associação com a doença.

A sequenciação de painéis personalizados de genes tem a vantagem de oferecer uma boa cobertura das regiões sequenciadas (uma média de 300X, dependendo da plataforma e número de amostras analisadas) (165) e ser mais económica quando comparado com o WES e WGS. Outra vantagem é a de reduzir o número de achados incidentais e/ou o número de variantes de significado indeterminado (VUS) (165, 178, 179). Os achados incidentais são as variantes genéticas identificadas pela sequenciação, que não estão relacionadas com o fenótipo em investigação (180). Segundo as diretivas da *European Society of Human Genetics* (ESHG), os testes de diagnóstico genético devem ser focados na identificação de genes clinicamente relevantes e selecionados de modo a minimizar a probabilidade de deteção de achados incidentais. Como desvantagem, tem a sua rigidez, pois testa apenas um número restrito de genes, e como o conhecimento está em constante evolução, novos genes que possam ser associados ao fenótipo não estarão contemplados.

### 1.3.2. Sequenciação completa do exoma (WES)

A sequenciação completa do exoma (*Whole-exome sequencing*, WES) visa determinar a sequência de ADN de quase todas as regiões codificantes do genoma de um indivíduo num único momento. As regiões codificantes do genoma (exoma)

correspondem a 1 a 2% deste, contudo, é nessas regiões que se encontram ~85% das variantes patogénicas conhecidas como sendo causa de doença, sendo que o WES identifica a causa genética de doenças raras em 25 a 40% dos casos (181).

Esta metodologia é já amplamente utilizada na prática clínica para a identificação de variantes genéticas relacionadas com doenças multigénicas. Ainda, quando não há nenhum gene suspeito de causar o fenótipo clínico, a sequenciação do exoma pode fornecer uma opção de triagem mais ampla, mas nesses casos, a sequenciação de trios (sequenciação do doente e dos seus progenitores) permite um resultado mais abrangente em comparação com a sequenciação de um único indivíduo.

O estudo levado a cabo por Persani et al. (176) sobre a prática atual da utilização da NGS na Endo-ERN identificou um pequeno número de centros que já oferece uma análise de WES como teste inicial, analisando um painel virtual de genes candidatos. Mostraram que o rendimento informativo de variantes patogénicas é muito maior com tal abordagem. Painéis com mais de 150 genes, quer sejam personalizados ou virtuais, têm maior probabilidade de reportar uma variante patogénica em até 60% dos casos, enquanto os resultados positivos caem abaixo de 15% em centros que utilizam painéis menores (176).

O painel virtual de genes tem como vantagem ser flexível, permitindo a rápida revisão de relatórios anteriores de acordo com novas descobertas na área. Permite ainda explorar um grande conjunto de genes candidatos, na presença de material genético de membros da mesma família com vários indivíduos afetados, levando à descoberta de novos genes através de estudos de segregação familiar (182, 183). Permite também expandir o potencial de identificar portadores di- ou oligogénicos em indivíduos que, de outra forma, poderiam ser diagnosticados com herança monogénica (184). Tem ainda a vantagem de ter custos e tempo de execução razoáveis sobretudo quando comparado com o WGS.

Como desvantagem tem o facto ter cobertura insuficiente de algumas regiões do exoma, sendo que cerca de 10% das bases sequenciadas por WES não atingem as 20 leituras. Assim, no momento da interpretação dos resultados, importa ter em mente que este oferece uma cobertura adequada para apenas ~ 85% dos genes associados a doenças presentes na base de dados OMIM® (165). O problema de cobertura pode dever-se à ausência de sondas para uma determinada região do exoma ou à presença

de sequências repetitivas ou ricas em Guaninas e Citosinas (165). Ainda, identifica um grande número de VUS e tem maior probabilidade de achados incidentais. Acresce que requer infraestruturas bioinformáticas potentes e técnicos qualificados para conseguir gerir a enorme quantidade de dados gerados. Outra limitação inclui a ausência de resultados para as regiões reguladoras e intrónicas, assim como para rearranjos genéticos (p. ex. translocações e anomalias cromossómicas).

Apesar das limitações enumeradas, esta metodologia apresenta-se especificamente vantajosa para investigar as causas genéticas do HHC porque nesta doença é particularmente relevante a revisão periódica da lista de genes analisados. Dado que anualmente são publicados estudos novos sobre genes potencialmente ou comprovadamente causais. Esta metodologia também permite uma maior flexibilidade na aplicação de “subpainéis virtuais” adaptados às variações de fenótipo que se observam dentro da doença.

### 1.3.3. Sequenciação completa do genoma (WGS)

A sequenciação completa do genoma (*Whole-exome sequencing*, WGS), visa determinar a quase totalidade da sequência de ADN do genoma de um indivíduo num único momento.

Como a metodologia de WGS cobre todo o genoma (regiões codificantes e não codificantes) esta permite identificar variantes em regiões reguladoras e intrónicas (185). Tem ainda o poder de identificar rearranjos genéticos (p. ex. translocações) e *copy number variants* (CNVs) (185). A preparação da biblioteca genómica para o WGS é mais simples, pois não requer enriquecimento do alvo. À semelhança do WES, esta metodologia permite a rápida revisão de resultados anteriores de acordo com novas descobertas na área, podendo ser ainda mais abrangente.

Contudo, de entre as abordagens NGS, esta é a mais dispendiosa e a que proporciona menor profundidade média de cobertura (165). Além disso, do ponto de vista clínico, a interpretação das variantes não codificantes e o número elevadíssimo de variantes VUS torna a sua utilidade limitada. A probabilidade de achados incidentais também é superior com esta abordagem. Ainda, a necessidade de armazenamento e gestão dos dados genómicos requer infraestruturas bioinformáticas potentes e técnicos qualificados.

Prevê-se que no futuro, à medida que o conhecimento a respeito das regiões não codificantes do genoma aumenta, a WGS seja o próximo passo na evolução dos cuidados de saúde personalizados.

#### 1.3.4. Classificação das variantes

Enquanto num passado recente os testes genéticos tinham como objetivo a confirmação do diagnóstico, atualmente pretende-se utilizá-los como ferramenta de primeira linha para estabelecer esse diagnóstico. Contudo, a NGS tem como fator limitante a necessidade de interpretação das numerosas variantes genéticas raras identificadas. Normalmente, são identificadas 200 000 a 400 000 variantes por doente após WES e 3 900 000 variantes por doente após WGS (183, 186). Mesmo após aplicar filtros para seleção das variantes com possível significado clínico, permanecem centenas, sendo um desafio identificar entre elas as variantes causadoras de doença.

Em 2015, o *American college of medical genetics and genomics* e a *Association for molecular pathology* (ACMG-AMP) publicaram recomendações atualizadas com normas e diretrizes para a interpretação de variantes genéticas (180). A ACMG-AMP definiu uma estrutura para classificar as variantes em cinco níveis de acordo com critérios de evidência de patogenicidade, sendo elas: patogénicas (P), provavelmente patogénicas (*Likely pathogenic*, LP), de significado indeterminado (*Variant of uncertain significance*, VUS), provavelmente benignas (*Likely benign*, LB) e benignas (B). A cada critério foi atribuído um código composto por duas a três letras e um número. A primeira letra indica uma direção: patogénica (P) ou benigna (B); a(s) seguinte(s) letra(s) denota(m) o nível de força: muito forte (*very strong*, VS), forte (*strong*, S), moderado (*moderate*, M), de suporte (*supporting*, P) e independente (*stand-alone*, A); o número atua como um número de série para distinguir critérios com a mesma força. Combinações de diferentes evidências são utilizadas para determinar a classificação de variantes genéticas (**Tabela 2**) (180).

**Tabela 2:** Critérios para classificar variantes patogénicas e benignas. Adaptado de Richard et al. (180).

Evidência de patogenicidade	Categoria
Muito forte	PVS1 Variante nula ( <i>nonsense</i> , <i>frameshift</i> , local de <i>splicing</i> canónico a +/- 1 ou 2 locais de <i>splicing</i> , codão de iniciação, deleção de um ou vários exões) num gene onde a perda de função (LoF) é um mecanismo conhecido de doença.
Forte	<p>PS1 A mesma alteração de aminoácidos de uma variante já previamente estabelecida como patogénica, independentemente da alteração de nucleótidos.</p> <p>PS2 <i>De novo</i> (confirmada a maternidade e a paternidade em <u>ambos</u>) em doente com a doença e sem história familiar.</p> <p>PS3 Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos que suportam o efeito deletério no gene ou no produto do gene.</p> <p>PS4 A prevalência da variante em indivíduos afetados está significativamente aumentada comparando com a prevalência nos controlos.</p>
Moderada	<p>PM1 Localizada num <i>hotspot</i> mutacional e/ou domínio funcional crítico e bem estabelecido (p. ex. sítio ativo de uma enzima) sem variantes benignas.</p> <p>PM2 Ausente dos controlos (ou com frequência extremamente baixa se recessiva) no Projeto de Sequenciação do Exoma, 1000 Genomas ou ExAC.</p> <p>PM3 Para distúrbios recessivos, detetada em <i>trans</i> com outra variante patogénica.</p> <p>PM4 Alterações no comprimento da proteína devido a <i>in-frame deletions/insertions</i> em região não repetitiva ou variantes que causam perda do codão <i>stop</i>.</p> <p>PM5 Nova variante <i>missense</i> num aminoácido onde uma outra <i>missense</i> diferente foi previamente determinada como patogénica.</p> <p>PM6 Assumida como <i>de novo</i>, mas sem confirmação de paternidade nem maternidade.</p>
De suporte	<p>PP1 Co-segregação com doença em múltiplos membros afetados de uma mesma família num gene definitivamente conhecido por causar a doença.</p> <p>PP2 Variante <i>missense</i> num gene que tem uma baixa taxa de variantes <i>missense</i> benignas e no qual variantes <i>missense</i> são um mecanismo comum de doença.</p> <p>PP3 Múltiplas linhas de evidência computacional suportam um efeito deletério sobre o gene ou o produto genético (conservação, evolução, impacto de <i>splicing</i>, etc.).</p> <p>PP4 O fenótipo ou história familiar do doente é altamente específico para uma doença com uma única etiologia genética.</p>

	PP5 Fonte de confiança relatou recentemente a variante como patogénica, mas as evidências não estão disponíveis para o laboratório realizar uma avaliação independente.
Evidência de impacto benigno	Categoria
Independente	BA1 A frequência alélica é superior a 5% no Projeto de Sequenciação do Exoma, 1000 Genomas ou ExAC.
Forte	BS1 A frequência alélica é superior ao que é esperado para o distúrbio. BS2 Observada num indivíduo adulto saudável para um distúrbio recessivo (homozigotia), dominante (heterozigotia) ou ligado ao cromossoma X (hemizigotia), em distúrbio com penetrância completa esperada em idade precoce. BS3 Estudos funcionais <i>in vitro</i> ou <i>in vivo</i> bem estabelecidos não mostram nenhum efeito prejudicial na função proteica ou no <i>splicing</i> . BS4 Ausência de segregação nos membros afetados de uma família.
De suporte	BP1 Variante <i>missense</i> num gene para o qual se sabe que são principalmente variantes truncantes que causam a doença. BP2 Observado em <i>trans</i> com uma outra variante patogénica para um gene/distúrbio dominante totalmente penetrante; ou observado em <i>cis</i> com uma variante patogénica com qualquer padrão de hereditariedade. BP3 Inserções e deleções <i>In-frame</i> numa região repetitiva sem função conhecida. BP4 Múltiplas linhas de evidência computacional sugerem ausência de impacto no gene ou no produto genético (conservação, evolução, impacto no <i>splicing</i> , etc.). BP5 Variante encontrada num caso com causa molecular alternativa para a doença. BP6 Fonte de confiança relatou recentemente a variante como benigna, mas as evidências não estão disponíveis para o laboratório realizar uma avaliação independente. BP7 Variante sinónima (silenciosa) para a qual os algoritmos de previsão de <i>splicing</i> não preveem nenhum impacto para a sequência consenso do <i>splicing</i> nem a criação de um novo local de <i>splicing</i> <u>E</u> o nucleótido não é altamente conservado.

A interpretação e ordenação das variantes é um aspeto complicado dos testes genéticos e, portanto, ajuda seguir um protocolo pré-estabelecido. Este protocolo pode consistir em cinco secções: (a) verificação da nomenclatura das variantes; (b) avaliação dos dados populacionais; (c) pesquisa sobre o histórico das variantes; (d)

análise específica com relação ao tipo de variante e (e) previsões computacionais (187). No final é feita uma interpretação se os dados recolhidos forem suficientes para classificar a variante.

(a) verificação da nomenclatura das variantes:

Os dados da sequenciação, ainda em bruto, devem proporcionar as coordenadas das posições correspondentes às alterações genéticas encontradas, relativamente à sequência de referência humana utilizada na comparação. A nomenclatura atribuída deve ser verificada, p. ex. no *website* Mutalyzer (188). O transcrito do gene com relevância clínica deve ser identificado, p. ex. no *Human Gene Mutation Database* (HGMD®) (189).

(b) avaliação dos dados populacionais:

A pesquisa da frequência alélica populacional deve ser feita, p. ex. no gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Assume-se que as variantes patogénicas não são comuns na população em geral. Contudo, em doenças oligogénicas, variantes relativamente frequentes podem ter efeito adicional no fenótipo (73).

Na presença dos dados de frequência alélica populacional, podem-se aplicar os critérios ACMG-AMP seguintes: BA1, BS1, BS2 ou PM2.

(c) pesquisa sobre o histórico das variantes:

Deve-se pesquisar a existência de casos relatados anteriormente, para uma dada variante a ser interpretada. Tal pode ser feito recorrendo a bases de dados (p. ex. ClinVar (190), HGMD® (189)), a navegadores (p. ex. UCSC (191) ou Mastermind (192)), a motores de busca (p. ex. PubMed® ou Google Scholar) e/ou bases de dados do próprio laboratório. Na presença destas informações, podem-se aplicar os critérios ACMG-AMP seguintes: PS2, PS4, PS3, PM3, PM6, PP1, PP4, BS3, BS4, BP2, BP5.

(d) análise específica com relação ao tipo de variante:

As variantes podem ser designadas quanto ao seu tipo por: *missense* (quando há substituição de um nucleótido em região codificante, que conduz à alteração do aminoácido); *sinónima* (quando há substituição de um nucleótido em região codificante, que não altera o aminoácido); *nonsense* (quando há substituição de um nucleótido em região codificante, que passa a codificar um codão de terminação); *frameshift* (quando há inserção ou deleção de nucleótidos em região codificante, que alteram a grelha de leitura); inserção ou deleção *in-frame* (quando há inserção ou deleção de nucleótidos em região codificante, que não alteram a grelha de leitura).

São consideradas variantes nulas (variantes que provocam perda de função da proteína, LoF) as variantes *nonsense*, *frameshift* ou deleções de um ou vários exões, presentes no codão de iniciação ou nos  $\pm 1$  ou  $2$  nucleótidos localizados nos locais canónicos de *splicing*. A estas variantes pode-se aplicar o critério de patogenicidade ACMG-AMP: PVS1 (180). Para as variantes *missense*, podem-se aplicar os critérios ACMG-AMP seguintes: PS1, PM5, PP2, BP1. Para as inserções ou deleções *in-frame* podem-se aplicar os critérios ACMG-AMP: PM4 ou BP3.

(e) previsões computacionais (*in silico*):

Na presença de dados de previsão computacional (uma lista de várias ferramentas/software disponíveis pode ser consultada em Richard et al. (180)), podem aplicar-se os critérios ACMG-AMP seguintes: PM1, PP3, BP4, BP7.

A combinação dos critérios aplicados conduzirá à classificação de cada uma das variantes, de acordo com as regras de pontuação das recomendações da ACMG-AMP (**Anexo 2**) (180).

Como são constantemente publicados novos dados, são adicionados às bases de dados novos casos e são partilhadas novas descobertas científicas sobre os genes, é importante reavaliar periodicamente o significado clínico e, se necessário, reclassificar as variantes utilizando informações atualizadas. Especialmente no caso de variantes sem uma classificação definitiva.

### 1.3.5. Estudos funcionais

No campo da genética das doenças humanas, um dos principais objetivos é estabelecer a relação entre variantes genéticas e fenótipos específicos. Contudo, um dos grandes desafios da NGS prende-se com a falta de compreensão do impacto da maioria das variantes genéticas na saúde e nas doenças humanas.

As abordagens clássicas para a interpretação de variantes, como estudos de caso-controlo ou estudos de co-segregação, exigem a identificação de muitos indivíduos com a mesma variante. Como a esmagadora maioria das variantes está presente em poucos indivíduos, estas estratégias têm claras limitações. Por seu lado, a previsão do efeito clínico das variantes recorrendo a uma abordagem *in silico* não permite, para a grande maioria das variantes, um resultado com o grau de confiança exigido na clínica. Assim, os estudos funcionais são uma estratégia a considerar. Estes

investigam o impacto biológico de variantes genéticas *in vitro* e/ou *in vivo* com o objetivo de esclarecer se uma variante altera o funcionamento normal de um gene ou de uma proteína e se essa alteração está associada a uma condição clínica. Desta forma, estes ajudam na classificação de variantes genéticas, oferecendo uma ponte entre os dados genómicos e sua interpretação clínica prática.

Os tipos de estudos funcionais realizados para variantes genéticas dependem do tipo específico de variante e da maneira como ela potencialmente afeta a função do gene.

À data, as regiões do genoma humano que melhor compreendemos são as regiões codificantes de proteínas. Apesar destas constituírem apenas uma pequena parte de todo o genoma (1 a 2%), é nessas regiões que se encontram ~85% das variantes patogénicas conhecidas como sendo causa de doença (181). Os impactos das variantes noutros elementos funcionais, como locais de *splicing*, promotores ou sequências reguladoras são mais difíceis de avaliar. Em relação às variantes na região codificante do ADN, as variantes *nonsense* e *frameshift* são mais facilmente classificáveis e na maioria das vezes conduzem a perda de função de uma proteína. Por seu lado, as variantes *missense* e as variantes silenciosas também designadas por sinónimas são mais desafiadoras na sua classificação quanto à patogenicidade.

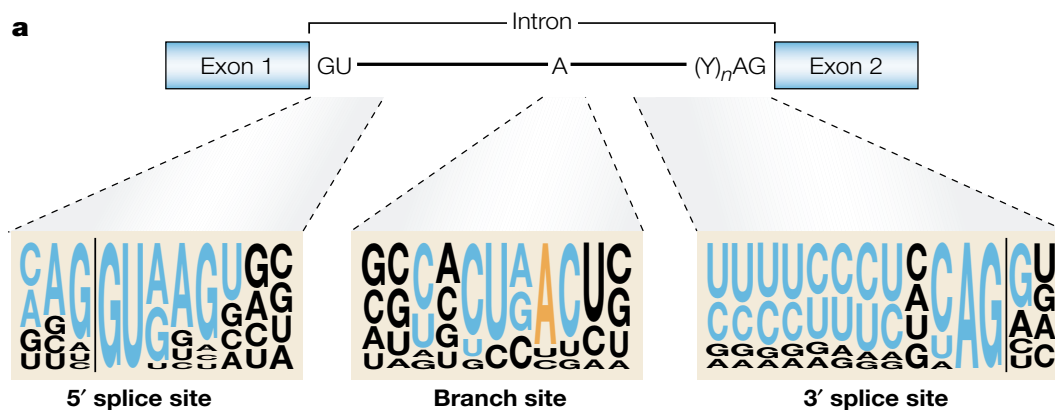
Na base de dados ClinVar (190), a maioria das variantes reportadas está classificada como VUS. Para esclarecer o potencial impacto biológico dessas variantes, os estudos funcionais podem debruçar-se sobre os seus efeitos na estabilidade e abundância da proteína, na interação proteína-proteína, na função especializada da proteína, na regulação transcricional e na regulação pós-transcricional (193).

As variantes *missense* têm o potencial de afetar a estrutura, a estabilidade, a atividade enzimática, a interação proteína-proteína ou a expressão da proteína. Por seu lado, a regulação da transcrição ou o *splicing* pode ser impactado pelas variantes intergénicas, *missense*, sinónimas e localizadas em locais de *splicing*.

A composição do ADN é idêntica em todas as células somáticas, o que as distingue é a expressão genética. A expressão genética é controlada de maneira dinâmica e regulada para permitir a expressão consistente e estável de algumas proteínas, bem como a rápida produção de outras, através da regulação da sua transcrição. De modo simplista, pode definir-se a transcrição como sendo a síntese de pré-ácido ribonucleico mensageiro (pré-ARNm) através de ARN-polimerases. Nos organismos

eucariotas, os transcritos de genes codificantes de proteínas contêm sequências intrônicas (intrões) que não estarão presentes no ARNm maduro. Será o mecanismo de *splicing* do pré-ARNm que irá remover esses intrões e unir os exões (região codificante) de modo a formar o ARNm maduro. Este processo é catalisado pelo spliceossoma que reconhece, com alto grau de precisão, sequências específicas do pré-ARNm que une eficazmente, dando origem ao transcriptoma funcional de uma célula.

O spliceossoma é composto por cinco ribonucleoproteínas nucleares (sn-RNPs), designadas U1, U2, U4, U5 e U6, e um grande número de proteínas não-snRNP (194). O spliceossoma é guiado, em parte, por sequências presentes no pré-ARNm, designadas por sequências consenso, que são específicas e conservadas. Assim sendo, a maioria dos intrões tem um local de *splicing* (ss, *splice site*) 5' (5' ss), uma sequência *branch point* (BPS) seguida por um trato de polipirimidinas (PPT, *polypyrimidine tract*) e um local de *splicing* 3' (3' ss) (**Figura 3**) (195).



**Figura 3:** Representação das sequências consenso próximas ou nas extremidades dos intrões. Os dinucleótidos GU e AG encontram-se frequentemente nas extremidades dos intrões. O A a laranja representa a Adenosina no *branch point* e (Y)<sub>n</sub> representa o trato de polipirimidinas. A sequência que ladeia as sequências consenso, encontra-se representada, sendo o tamanho do nucleótido proporcional à sua frequência nessa posição. Reproduzido com permissão de Cartegni et al. (196) (**Anexo 3**).

A imprecisão no reconhecimento destas sequências específicas, presentes nos intrões, conduz a falhas na remoção destes e gera ARNm maduros aberrantes que poderão codificar proteínas disfuncionais. Ainda, variantes pontuais, presentes nos exões, que comumente exercem os seus efeitos pela alteração dos aminoácidos das proteínas

codificadas (*missense*), ou mesmo as translacionalmente silenciosas (sinónimas), têm vindo a ser descritas como influenciando a precisão ou eficiência do *splicing* (196-200). Krawczak et al. (201) estimaram que pelo menos 1,6% das variantes *missense* responsáveis por doenças humanas, causam alterações no *splicing* do pré-ARNm. Contudo, a maioria das variantes que afetam o *splicing*, afetam diretamente as sequências específicas dos intrões (5' ss, BPS, PPT ou 3' ss) ou os dois primeiros e últimos nucleótidos dos exões, provocando normalmente o *exon skipping* (perda do exão). Com menos frequência, estas variantes podem provocar locais de *splicing* ectópicos ou ativar locais de *splicing* crípticos, alterando assim o padrão normal de *splicing* e criando um transcrito aberrante (196). Um local de *splicing* ectópico será criado quando uma variante altera a sequência de ADN de modo a gerar uma sequência que tenha as características do local de *splicing* canónico, num local outro que o original. Um local de *splicing* críptico é uma sequência que corresponde ao consenso, mas que não mostra atividade e que é ativada oportunisticamente quando o local de *splicing* canónico sofre uma alteração, podendo causar doenças nos humanos (202-204). Contudo, as variantes fora das sequências consenso podem elas também afetar o *splicing*. Estudos recentes estimaram que 27% das variantes implicadas nos distúrbios do desenvolvimento e relacionadas com alteração do *splicing* não estão nas sequências canónicas de *splicing* (205). Adicionalmente, várias mutações, que se encontram nas regiões intrónicas profundas, foram identificadas como levando à retenção de um “*pseudo-exão*” em doentes afetados por múltiplos distúrbios (p. ex. fibrose quística, mucopolissacaridose tipo II, esclerose tuberosa, distrofia muscular de Becker, etc.) (206). Na verdade, há evidências crescentes de que a frequência das variantes que afetam o *splicing* tem sido subestimada (196).

O atual paradigma do diagnóstico genético considera apenas testar o ARN para confirmar/refutar o efeito de uma potencial variante patogénica num local de *splicing*. Mas na realidade, pouca consideração é dada às variantes que se encontram fora desses locais. As variantes sinónimas ou intrónicas são normalmente descartadas num primeiro filtro na busca por variantes causais. Ainda, os algoritmos usados pelas ferramentas *in silico*, utilizadas para prever os efeitos de *splicing*, não têm o grau de confiança exigido na clínica. Portanto, não há dúvida de que uma proporção significativa de diagnósticos genéticos estão a ser perdidos. À luz destas novas evidências, o efeito que as variantes têm sobre o mecanismo de *splicing* merece ser avaliado.

## 1.4. Objetivos

Este estudo teve como objetivo investigar as causas genéticas do HHC em doentes portugueses, utilizando a NGS, ferramentas *in silico* e técnicas de biologia molecular.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1) determinar a frequência e o tipo de defeitos genéticos em doentes portugueses com HHC;
- 2) realizar estudos funcionais *in vitro*, para interpretar as consequências biológicas de variantes sinónimas e localizadas nos locais de *splicing*;
- 3) estabelecer correlações genótipo-fenótipo para prever o impacto clínico de variantes genéticas.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Seleção dos doentes e controlos**

Sendo o HHC uma doença rara, o recurso a uma rede colaborativa multicêntrica mostrou-se uma abordagem vantajosa. Assim, 18 departamentos clínicos portugueses de endocrinologia, listados a seguir, contribuíram para este trabalho:

Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Santa Maria, Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Hospital de Santa Maria, Lisboa; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Universitário de Coimbra; Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Norte; Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Serviço de Pediatria, Centro Materno Infantil do Norte, Centro Hospitalar Universitário de Santo António, Porto; Serviço de Endocrinologia e Diabetes, Hospital Garcia de Orta, Almada; Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto; Unidade de Endocrinologia e Diabetologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Centro Hospitalar Universitário de São João, Porto; Serviço de Endocrinologia, Instituto Português de Oncologia do Porto; Serviço de Endocrinologia, Instituto Português de Oncologia de Coimbra; Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Serviço de Pediatria, Hospital de Braga; Serviço de Endocrinologia, Hospital de Braga; Serviço de Pediatria, Hospital da Senhora da Oliveira Guimarães, Guimarães; Departamento de Endocrinologia, Hospital da Luz, Lisboa; Serviço de Pediatria, Centro Hospitalar do Médio Ave, Unidade de V. N. Famalicão; Serviço de Endocrinologia, Centro Hospitalar Universitário de Santo António, Porto; Serviço de Endocrinologia, Centro Hospitalar do Tâmega e Sousa, Guilhufe; Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Hospital Dona Estefânia, Centro Hospitalar Universitário de Lisboa Central.

Os médicos especialistas em endocrinologia que incluíram cada doente no estudo foram responsáveis pela partilha dos dados clínicos, assim como por assegurar o fornecimento de uma amostra de sangue de cada doente (cerca de 10 ml de sangue em tubos de hemograma), e quando necessário e possível, dos seus familiares diretos.

Os critérios de inclusão no estudo foram os seguintes: doentes com baixos níveis séricos de esteróides sexuais e níveis séricos baixos ou inadequadamente normais de FSH e LH, e que não tenham entrado espontaneamente na puberdade até aos 18 anos de idade. Doentes com histórico de causa adquirida de hipopituitarismo (p. ex. tumores intracranianos, infeções, etc.) foram excluídos, pois é improvável que o seu hipogonadismo tenha origem genética. A avaliação da função olfativa foi realizada por teste olfativo ou por autoavaliação, dependendo do centro clínico de proveniência.

Foi obtido o consentimento informado de todos os participantes e o estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Ref: CE-FCS-2012-012).

Foram incluídos no estudo 81 doentes, não relacionados familiarmente, 70 do sexo masculino e 11 do sexo feminino, dos quais 45 com HHCn (38 masculinos e 7 femininos) e 36 com SK (32 masculinos e 4 femininos). Foram ainda incluídos como população controlo, 263 indivíduos (124 masculinos e 139 femininos) dos quais 213 foram indivíduos cujo material genético foi recolhido para estudo de outras doenças não relacionadas e 50 indivíduos foram controlos saudáveis.

## **2.2. Análise genética**

### **2.2.1. Extração do ADN**

O ADN genómico foi extraído de leucócitos presentes no sangue periférico. Para tal, utilizou-se o método de *salting-out* adaptado de Miller et al. (207). Resumidamente, este método compreende quatro etapas, a lise de eritrócitos, a lise de leucócitos, a precipitação de proteínas e a precipitação de ADN. Para a lise de eritrócitos, o sangue foi transferido do tubo de colheita contendo EDTA para um tubo de centrífuga de 50 ml, ao qual foi adicionado 20 ml de tampão de lise *Red blood cell lysis* (RBC) a 4°C (RBC: 155 mM NH<sub>4</sub>Cl; 20 mM KHCO<sub>3</sub>; 0,1 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 7,4). A mistura foi então agitada no vórtex (Velp Scientifica, Milan, Italy) e incubada no gelo durante 15 minutos, realizando inversões frequentes. Precipitaram-se os leucócitos centrifugando a 1300 x g, 10 minutos, 4°C (VS 4.750, Alegra™ V15R, Beckman Coulter, Fullerton, Ca, EUA). Decantou-se o sobrenadante e repetiu-se esta etapa até

o sedimento de células se apresentar limpo de eritrócitos a olho nu. A lise dos leucócitos foi feita após ressuspender o sedimento de células por vórtex, adicionando 5 ml de tampão SE (*secondary extraction*) a 4°C (SE: 75 mM NaCl; 25 mM Na<sub>2</sub>EDTA; pH 8,0), 0,5 ml de SDS 10% (dodecilsulfato de sódio) e 12,5 µl de proteínase K (20 mg/ml). A mistura foi incubada a 55°C durante, no mínimo 6 horas. Para a precipitação de proteínas, adicionou-se 3 ml de NaCl saturado a 6M e incubou-se por 10 minutos a 55°C. A precipitação foi feita por centrifugação, 3370 x g, 30 minutos, 15°C à qual se antecedeu a agitação no vórtex. A precipitação do ADN foi feita, decantando o sobrenadante resultante do passo anterior, para um novo tubo de centrífuga, de 50 ml, e adicionando duas vezes o volume do sobrenadante de etanol 100% a -20°C. Inversões frequentes e suaves precipitaram o ADN, permitindo ver a olho nu a formação de um novelo. Para recolher o ADN, centrifugou-se a 4260 x g, 5 minutos, 4°C. Decantou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento de ADN com 10 ml de etanol 70%, a -20°C, invertendo o tubo algumas vezes. Para precipitar novamente o ADN, centrifugou-se a 4260 x g, 5 minutos, 4°C. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento de ADN antes de o transferir para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, onde se ressuspendeu com 1 ml de tampão TRIS-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético de tris) (TE). Para a completa homogeneização, o ADN foi deixado a agitar lenta e permanentemente, durante a noite, à temperatura ambiente. Fez-se uma diluição a 100 ng/µl num volume de 200 µl, em TE, armazenado a -20 °C para uso corrente e o restante foi armazenado no banco de ADN, a -80°C, ambos devidamente identificados. As amostras recebidas no laboratório foram identificadas por ordem numérica de entrada.

### 2.2.2. Quantificação do ADN

A quantidade e qualidade do ADN, concentração (ng/µl) e o grau de pureza, foram determinados através da medição da densidade ótica por espectrofotometria ultravioleta (NanoPhotometer Spectrophotometer B-80-3004-33, Impln GmbH, Munich, Germany), usando o comprimento de onda de 260 nm. A pureza da amostra foi determinada pelo rácio de absorbância a 260 nm e 280 nm. Um rácio de ~1,8 é normalmente considerado para amostras puras de ADN.

### 2.2.3. Sequenciação completa do exoma (WES)

A sequenciação completa do exoma (*Whole-exome sequencing*, WES) foi feita nos 81 doentes HHC incluídos no estudo e nos 263 indivíduos utilizados como população controlo. No decorrer deste projeto, duas plataformas de sequenciação foram utilizadas.

Sessenta e seis doentes e 50 controlos saudáveis foram sequenciados no Sidra Medicine, Doha, Qatar e os restantes 15 doentes e 213 controlos, foram sequenciados na empresa de sequenciação BGI Genomics<sup>©</sup> (*Beijing Genomics Institute*, Yantian, Shenzhen, China).

Para ambos, foi enviada uma amostra de 3 µg de ADN de cada indivíduo, extraído como descrito previamente. No Sidra Medicine, para a criação da biblioteca de captura direcionada foi utilizado o kit Agilent SureSelectXT All Exon V6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e para a sequenciação, a plataforma Illumina HiSeq 4000 platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) produzindo leituras emparelhadas com 150 pares de bases e cobertura de 100 X. As leituras foram comparadas com o genoma de referência humano GRCh37/hg19 (hs37d5) através do software Burrows–Wheeler Aligner (BWA-MEM). As variantes foram identificadas (“*variant calling*”) com SAMtools v1.6 e anotadas (“*variant annotation*”) utilizando as ferramentas SnpEff v4.3 e dbNSFP v3.0. Os ficheiros de resultados foram gerados utilizando o Genome Analysis Toolkit v3.5 (GATK).

No BGI Genomics<sup>©</sup>, para a criação da biblioteca de captura direcionada foi utilizado o kit Agilent\_V6 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) e para a sequenciação, a plataforma DNBSEQ<sup>™</sup> produzindo leituras emparelhadas com 150 pares de bases e cobertura de 100 X. As leituras foram comparadas com o genoma de referência humano GRCh37/hg19 (hs37d5) através do software Burrows–Wheeler Aligner v0.7.17 (BWA-MEM) e alinhadas com SAMtools v1.3.1. A ferramenta Genome Analysis Toolkit, GATK MarkDuplicates v4.4.0.0 foi utilizada para remover leituras duplicadas. As ferramentas GATK BaseRecalibrator v4.4.0.0 e GATK ApplyBQSR v4.4.0.0 foram utilizadas para correção do valor da qualidade base. As variantes foram identificadas (“*variant calling*”) com GATK HaplotypeCaller v4.4.0.0 e filtradas com GATK SelectVariants v4.4.0.0 e GATK VariantFiltration v4.4.0.0. A anotação das variantes foi feita com Annodb.

#### 2.2.4. Seleção do painel virtual de genes

Para o painel virtual de genes foi feita uma pesquisa de causas genéticas para o HHCn e a SK nas bases de dados Pubmed® e OMIM®. Procuraram-se genes descritos como contendo variantes genéticas patogénicas, em pelo menos um indivíduo com fenótipo de HHC normósmico ou SK (**Tabela 3**). A inclusão de genes associados a síndromes, nas quais o hipogonadismo hipogonadotrófico se apresenta como um dos fenótipos deveu-se à possibilidade de este se apresentar de forma isolada, num contexto de expressividade variável da síndrome. Tal como acontece, por exemplo, no caso de variantes patogénicas no gene *CHD7*, que podem provocar HHC ou Síndrome de CHARGE (OMIM #214800) (208) ou com o gene *FGFR1*, cujas variantes patogénicas podem aparecer associadas ao HHC ou à Síndrome de Hartsfield (OMIM #615465).

**Tabela 3:** Lista dos 169 genes incluídos no painel virtual investigado, relacionados com o Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito.

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
AMH	464		600957	NM_000479.3	(209)	Persistent Mullerian duct syndrome, type I - AR
AMHR2	465		600956	NM_020547.3	(209)	Persistent Mullerian duct syndrome, type II - AR
AMN1	27281		-	NM_001113402.2	(172)	
ANOS1	6211	KALIG-1 KAL	300836	NM_000216.4	(43)	Hypogonadotropic hypogonadism 1 with or without anosmia (Kallmann syndrome 1) - XLR
ARHGAP35	4591		605277	NM_004491.5	(123)	
ARHGAP5	675		602680	NM_001030055.2	(123)	
ARL6	13210	BBS3	608845	NM_177976.1	(210)	Bardet-Biedl syndrome 3 - AR; Retinitis pigmentosa 55 - AR; {Bardet-Biedl syndrome 1, modifier of} - AR/DR
AXL	905		109135	NM_021913.3	(211)	
B4GAT1	15685	B3GNT1, B3GNT6	605517	NM_006876.2	(173)	Muscular dystrophy-dystroglycanopathy (congenital with brain and eye anomalies), type A, 13 - AR
B9D1	24123		614144	NM_015681.3	(212)	?Meckel syndrome 9 - AR; Joubert syndrome 27 - AR
BBIP1	28093		613605	NM_001195306.2	(213)	Bardet-Biedl syndrome 18 - AR
BBS1	966		209901	NM_024649.5	(213)	Bardet-Biedl syndrome 1 - AR, DR
BBS10	26291		610148	NM_024685.4	(214)	Bardet-Biedl syndrome 10 - AR
BBS5	970		603650	NM_152384.2	(215)	Bardet-Biedl syndrome 5 - AR
CASR	1514		601199	NM_000388.3	(173)	Hyperparathyroidism, neonatal - AD/AR; Hypocalcemia, autosomal dominant - AD; Hypocalcemia, autosomal dominant, with Bartter syndrome - AD; Hypocalcemic hypercalcemia, type I - AD
CCDC141	26821		616031	NM_173648.4	(104)	
CCDC88C	19967	KIAA1509	611204	NM_001080414.4	(62)	?Spinocerebellar ataxia 40 - AD; Hydrocephalus, congenital, 1 - AR
CCKAR	1570		118444	NM_000730.3	(173)	
CCKBR	1571		118445	NM_176875.2	(172)	

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>CDKN1C</i>	1786	<i>P57KIP2</i>	600856	NM_000076.2	(216)	<i>Beckwith-Wiedemann syndrome - AD; IMAGE syndrome - AD</i>
<i>CDON</i>	17104		608707	NM_016952.4	(62)	<i>Holoprosencephaly 11 - AD</i>
<i>CHD4</i>	1919		603277	NM_001273.3	(217)	<i>Sifrim-Hitz-Weiss syndrome - AD</i>
<i>CHD7</i>	20626		608892	NM_017780.3	(75)	<i>CHARGE syndrome - AD; Hypogonadotropic hypogonadism 5 with or without anosmia - AD</i>
<i>CHL1</i>	1939		607416	NM_006614.2	(218)	<i>?Epilepsy, myoclonic, familial adult, 5 - AR</i>
<i>CNTN2</i>	2172		190197	NM_005076.3	(173)	<i>BDV syndrome - AR</i>
<i>CPE</i>	2303		114855	NM_001873.3	(219)	<i>Delayed sleep phase disorder, susceptibility to - AD</i>
<i>CRY1</i>	2384		601933	NM_004075.5	(172)	<i>Myelokathexis, isolated - AD; WHIM syndrome 1 - AD</i>
<i>CXCR4</i>	2561		162643	NM_003467.2	(172)	<i>Aromatase excess syndrome - AD</i>
<i>CYP19A1</i>	2594		107910	NM_031226.2	(220)	<i>Woodhouse-Sakati syndrome - AR</i>
<i>DCAF17</i>	25784	<i>C20orf37</i>	612515	NM_025000.3	(221)	<i>Gaze palsy, familial horizontal, with progressive scoliosis, 2 - AR;</i>
<i>DCC</i>	2701		120470	NM_005215.3	(222)	<i>Mirror movements 1 and/or agenesis of the corpus callosum - AD</i>
<i>DLG2</i>	2901	<i>PSD-93</i>	603583	NM_001142699.1	(223)	<i>Split-hand/foot malformation 1 with sensorineural hearing loss - AR; Split-hand/foot malformation 1 - AD</i>
<i>DLX5</i>	2918		600028	NM_005221.5	(173)	<i>Deafness, autosomal dominant 71 - AD; Polyendocrine-polyneuropathy syndrome - AR; Developmental and epileptic encephalopathy 81 - AR</i>
<i>DMXL2</i>	2938		612186	NM_001174116.3	(62)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 19 with or without anosmia - AD</i>
<i>DUSP6</i>	3072		602748	NM_001946.2	(61)	
<i>EBF2</i>	19090		609934	NM_022659.2	(173)	
<i>EDNRB</i>	3180		131244	NM_000115.4	(173)	<i>ABCD syndrome - AR; Waardenburg syndrome, type 4A - AD, AR;</i>
<i>EFNA5</i>	3225		601535	NM_001962.3	(173)	<i>Hirschsprung disease, susceptibility to, 2 - AD</i>
<i>EGF</i>	3229		131530	NM_001963.5	(173)	<i>Hypomagnesemia 4, renal - AR</i>

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>EGFR</i>	3236		131550	NM_005228.3	(173)	<i>Inflammatory skin and bowel disease, neonatal, 2 - AR; Adenocarcinoma of lung, response to tyrosine kinase inhibitor in - AD, Smu (somatic mutation); Nonsmall cell lung cancer, response to tyrosine kinase inhibitor in - AD, Smu; Nonsmall cell lung cancer, susceptibility to - AD, Smu</i>
<i>EPHA5</i>	3389		600004	NM_004439.5	(173)	
<i>ERBB4</i>	3432		600543	NM_005235.2	(173)	<i>Amyotrophic lateral sclerosis 19 - AD</i>
<i>FEZ1</i>	3659		604825	NM_005103.5	(173)	
<i>FEZF1</i>	22788		613301	NM_001024613.3	(104)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 22, with or without anosmia - AR</i>
<i>FGF13</i>	3670		300070	NM_004114.5	(172)	<i>Developmental and epileptic encephalopathy 90 - XLD, XLR; Intellectual developmental disorder, X-linked 110 - XLR</i>
<i>FGF17</i>	3673		603725	NM_003867.2	(61)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 20 with or without anosmia - AD</i>
<i>FGF8</i>	3686		600483	NM_033163.3	(55)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 6 with or without anosmia - AD</i>
<i>FGFR1</i>	3688		136350	NM_023110.2	(54)	<i>Hartsfield syndrome - AD; Hypogonadotropic hypogonadism 2 with or without anosmia - AD; Jackson-Weiss syndrome - AD; Osteoglyphonic dysplasia - AD; Pfeiffer syndrome - AD; Trigonocephaly 1 - AD</i>
<i>FLRT3</i>	3762		604808	NM_198391.2	(61)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 21 with anosmia - AD</i>
<i>FSHB</i>	3964		136530	NM_000510.2	(224)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 24 without anosmia - AR</i>
<i>FSTL5</i>	21386		620128	NM_020116.5	(225)	
<i>GADL1</i>	27949		615601	NM_207359.3	(62)	
<i>GAP43</i>	4140		62060	NM_001130064.1	(172)	

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>GH1</i>	4261		139250	NM_000515.3	(173)	<i>Growth hormone deficiency, isolated, type IA - AR; Growth hormone deficiency, isolated, type II - AD; Kowarski syndrome - AR</i>
<i>GHR</i>	4263		600946	NM_000163.4	(173)	<i>Growth hormone insensitivity, partial - AD; Increased responsiveness to growth hormone - AD; Laron dwarfism - AR; Hypercholesterolemia, familial, modifier of - AD, AR</i>
<i>GJB2</i>	4284		121011	NM_004004.6	(226)	<i>Bart-Pumphrey syndrome - AD; Deafness, autosomal dominant 3A - AD; Deafness, autosomal recessive 1A - AR, DD (digenic dominant); Hystrix-like ichthyosis with deafness - AD; Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome - AD; Keratoderma, palmoplantar, with deafness - AD; Vohwinkel syndrome - AD</i>
<i>GLI2</i>	4318		165230	NM_005270.4	(227)	<i>Culler-Jones syndrome - AD; Holoprosencephaly 9 - AD</i>
<i>GLI3</i>	4319		165240	NM_000168.5	(172)	<i>Greig cephalopolysyndactyly syndrome - AD; Pallister-Hall syndrome - AD; Polydactyly, postaxial, types A1 and B - AD; Polydactyly, preaxial, type IV - AD</i>
<i>GNRH1</i>	4419		152760	NM_000825.3	(77)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 12 with or without anosmia - AR</i>
<i>GNRHR</i>	4421		138850	NM_000406.2	(126)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 7 without anosmia - AR</i>
<i>HDAC8</i>	13315		300269	NM_018486.2	(228)	<i>Cornelia de Lange syndrome 5 - XLD</i>
<i>HESX1</i>	4877		601802	NM_003865.2	(229)	<i>Growth hormone deficiency with pituitary anomalies - AD, AR; Pituitary hormone deficiency, combined, 5 - AD, AR; Septo-optic dysplasia - AD, AR</i>
<i>HFE</i>	4886		613609	NM_000410.3	(230)	<i>Hemochromatosis - AR; Alzheimer disease, susceptibility to - AD; Porphyria cutanea tarda, susceptibility to - AD, AR; Porphyria variegata, susceptibility to - AD</i>
<i>HGF</i>	4893		142409	NM_000601.4	(173)	<i>Deafness, autosomal recessive 39 - AR</i>
<i>HJV</i>		<i>HFE2</i>		NM_213653.3	(231)	<i>Hemochromatosis, type 2A - AR</i>
<i>HS6ST1</i>	5201		604846	NM_004807.2	(96)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 15 with or without anosmia - AD</i>

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>IFT172</i>	30391	<i>BBS20</i>	607386	NM_015662.2	(232)	<i>Bardet-Biedl syndrome 20 - AR; Retinitis pigmentosa 71 - AR; Short-rib thoracic dysplasia 10 with or without polydactyly - AR</i>
<i>IGF1</i>	5464		147440	NM_000618.3	(173)	<i>Growth retardation with deafness and mental retardation due to IGF1 deficiency - AR</i>
<i>IGSF1</i>	5948		300137	NM_001170961.1	(170)	<i>Hypothyroidism, central, and testicular enlargement - XLR</i>
<i>IGSF10</i>	26384		617351	NM_178822.4	(233)	
<i>IL17RD</i>	17616	<i>SEF</i>	606807	NM_017563.4	(61)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 18 with or without anosmia - AD, AR, DD</i>
<i>JAG1</i>	6188		601920	NM_000214.2	(172)	<i>Deafness, congenital heart defects, and posterior embryotoxon - AD; Alagille syndrome 1 - AD; Charcot-Marie-Tooth disease, axonal, type 2HH - AD; Tetralogy of Fallot - AD</i>
<i>KIF14</i>	19181		611279	NM_014875.2	(212)	<i>Meckel syndrome 12 - AR; Microcephaly 20, primary, autosomal recessive - AR</i>
<i>KISS1</i>	6341		603286	NM_002256.3	(234)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 13 with or without anosmia - AR</i>
<i>KISS1R</i>	4510	<i>GPR54</i>	604161	NM_032551.4	(234)	<i>Precocious puberty, central, 1 - AD; Hypogonadotropic hypogonadism 8 with or without anosmia - AR</i>
<i>KLB</i>	15527		611135	NM_175737.3	(235)	
<i>LEP</i>	15527		164160	NM_000230.2	(236)	<i>Obesity, morbid, due to leptin deficiency - AR</i>
<i>LEPR</i>	6554		601007	NM_002303.5	(237)	<i>Obesity, morbid, due to leptin receptor deficiency - AR</i>
<i>LHB</i>	6584		152780	NM_000894.2	(111)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 23 with or without anosmia - AR</i>
<i>LHX3</i>	6595		600577	NM_014564.4	(238)	<i>Pituitary hormone deficiency, combined, 3 - AR</i>
<i>LHX4</i>	21734		602146	NM_033343.3	(239)	<i>Pituitary hormone deficiency, combined, 4 - AD</i>
<i>LIF</i>	6596		159540	NM_002309.3	(173)	
<i>LZTFL1</i>	6741		606568	NM_020347.4	(213)	<i>Bardet-Biedl syndrome 17 - AR</i>
<i>MAGEL2</i>	6814		605283	NM_019066.5	(240)	<i>Schaaf-Yang syndrome - AD</i>
<i>MASTL</i>	19042		608221	NM_032844.5	(172)	
<i>MC4R</i>	6932		155541	NM_005912.2	(241)	<i>Obesity (BMIQ20) - AD, AR; Obesity, resistance to (BMIQ20) - AD, AR</i>

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>MEI1</i>	7029		164860	NM_001127500.1	(173)	<i>Arthrogruposis, distal, type 11 - AD; Deafness, autosomal recessive 97 - AR; Osteofibrous dysplasia, susceptibility to - AD</i>
<i>MKKS</i>	7108	<i>BBS6</i>	604896	NM_018848.3	(213)	<i>Bardet-Biedl syndrome 6 - AR; McKusick-Kaufman syndrome - AR</i>
<i>MTOR</i>	3942		601231	NM_004958.3	(173)	<i>Smith-Kingsmore syndrome - AD</i>
<i>NDNF</i>	26256		616506	NM_024574.3	(112)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 25 with anosmia - AD</i>
<i>NEUROG3</i>	13806	<i>NGN3, ATOH5</i>	604882	NM_020999.4	(242)	<i>Diarrhea 4, malabsorptive, congenital - AR</i>
<i>NHLH2</i>	7818		162361	NM_005599.3	(116)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 27 without anosmia - AR</i>
<i>NOS1</i>	7872		163731	NM_000620.4	(172)	
<i>NOTCH1</i>	7881		190198	NM_017617.4	(172)	<i>Adams-Oliver syndrome 5 - AD; Aortic valve disease 1 - AD</i>
<i>NROB1</i>	7960	<i>DAX-1</i>	300473	NM_000475.4	(243)	<i>46XY sex reversal 2, dosage-sensitive - XL; Adrenal hypoplasia, congenital - XLR</i>
<i>NR5A1</i>	7983		184757	NM_004959.4	(244)	<i>46XX sex reversal 4 - AD; 46XY sex reversal 3 - AD; Adrenocortical insufficiency - AD; Premature ovarian failure 7 - AD; Spermatogenic failure 8 - AD</i>
<i>NRP1</i>	8004		602069	NM_003873.7	(173)	
<i>NRP2</i>	8005		602070	NM_201266.1	(172)	
<i>NSMF</i>	29843	<i>NELF</i>	608137	NM_015537.4	(86)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 9 with or without anosmia - AD</i>
<i>NTN1</i>	8029		601614	NM_004822.2	(222)	<i>Mirror movements 4 - AD</i>
<i>OTUD4</i>	24949		611744	NM_001102653.1	(245)	<i>Gordon-Holmes syndrome (Butz, 2020)</i>
<i>OTX2</i>	8522		600037	NM_172337.1	(170)	<i>Microphthalmia, syndromic 5 - AD; Pituitary hormone deficiency, combined, 6 - AD; Retinal dystrophy, early-onset, with or without pituitary dysfunction - AD</i>
<i>PALM2</i>	15845		604582	NM_001037293.3	(172)	
<i>PAX6</i>	8620		607108	NM_000280.3	(173)	<i>Coloboma of optic nerve - AD; Coloboma, ocular - AD; Morning glory disc anomaly - AD; Aniridia - AD; Anterior segment dysgenesis 5, multiple subtypes - AD; Cataract with late-onset</i>

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>PCSK1</i>	8743	<i>PC1</i>	162150	NM_000439.4	(246)	corneal dystrophy - AD; Foveal hypoplasia 1 - AD; Keratitis - AD;
<i>PDE3A</i>	8778		123805	NM_000921.4	(172)	Optic nerve hypoplasia - AD
<i>PGM1</i>	8905		171900	NM_002633.2	(247)	Endocrinopathy due to proprotein convertase 1/3 deficiency - AR
<i>PHF6</i>	18145		300414	NM_032458.3	(248)	Hypertension and brachydactyly syndrome - AD
<i>PKNOX2</i>	16714		613066	NM_001382323.2	(225)	Congenital disorder of glycosylation, type It - AR
<i>PLEKHA5</i>	30036		607770	NM_001143821.3	(172)	Borjeson-Forssman-Lehmann syndrome - XLR
<i>PLXNA1</i>	9099		601055	NM_032242.3	(173)	Dworschak-Punetha neurodevelopmental syndrome - AR
<i>PLXNA3</i>	9101		300022	NM_017514.5	(249)	
<i>PLXNB1</i>	9103		601053	NM_002673.4	(173)	
<i>PNPLA6</i>	16268		603197	NM_006702.4	(250)	Laurence-Moon syndrome - AR; Boucher-Neuhauser syndrome - AR; Oliver-McFarlane syndrome - AR; Spastic paraplegia 39, autosomal recessive - AR
<i>POGZ</i>	18801	<i>KIAA0461</i> <i>ZNF635</i> <i>ZNF280E</i>	614787	NM_015100.4	(251)	White-Sutton syndrome - AD
<i>POLAI</i>	9173		312040	NM_016937.3	(252)	Pigmentary disorder, reticulate, with systemic manifestations, X-linked - XLR; Van Esch-O'Driscoll syndrome - XLR
<i>POLR1C</i>	20194		610060	NM_203290.2	(253)	Leukodystrophy, hypomyelinating, 11 - AR; Treacher Collins syndrome 3 - AR
<i>POLR3A</i>	30074		614258	NM_007055.3	(254)	Leukodystrophy, hypomyelinating, 7, with or without oligodontia and/or hypogonadotropic hypogonadism - AR; Wiedemann-Rautenstrauch syndrome - AR
<i>POLR3B</i>	30348		614366	NM_018082.5	(254)	Charcot-Marie-Tooth disease, demyelinating, type 1I - AD; Leukodystrophy, hypomyelinating, 8, with or without oligodontia and/or hypogonadotropic hypogonadism - AR
<i>POU6F2</i>	21694		609062	NM_007252.4	(124)	{Wilms tumor susceptibility-5} - AD, SMu

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>PRDM13</i>	13998		616741	NM_021620.4	(255)	<i>Cerebellar dysfunction, impaired intellectual development, and hypogonadotropic hypogonadism - AR; Pontocerebellar hypoplasia, type 17 - AR</i>
<i>PROK2</i>	18455		607002	NM_001126128.1	(63)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 4 with or without anosmia - AD</i>
<i>PROKR2</i>	15836		607123	NM_144773.3	(63)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 3 with or without anosmia - AD</i>
<i>PROPI</i>	9455		601538	NM_006261.4	(256)	<i>Pituitary hormone deficiency, combined, 2 - AR</i>
<i>PTCH1</i>	9585		601309	NM_000264.3	(257)	<i>Basal cell nevus syndrome 1 - AD; Holoprosencephaly 7 - AD</i>
<i>RAB18</i>	14244		602207	NM_021252.3	(258)	<i>Warburg micro syndrome 3 - AR</i>
<i>RAB3GAP1</i>	17063		602536	NM_012233.3	(259)	<i>Martsof syndrome 2 - AR; Warburg micro syndrome 1 - AR</i>
<i>RAB3GAP2</i>	17168		609275	NM_012414.3	(260)	<i>Martsof syndrome 1 - AR; Warburg micro syndrome 2 - AR</i>
<i>RBM28</i>	21863		612079	NM_018077.2	(261)	<i>Alopecia, neurologic defects, and endocrinopathy syndrome - AR</i>
<i>RD3</i>	19689		180040	NM_183059.2	(172)	<i>Leber congenital amaurosis 12 - AR</i>
<i>RELN</i>	9957		600514	NM_005045.3	(173)	<i>Lissencephaly 2 (Norman-Roberts type) - AR; Epilepsy, familial temporal lobe, 7- AD</i>
<i>RNF216</i>	21698		609948	NM_207111.4	(245)	<i>Cerebellar ataxia and hypogonadotropic hypogonadism - AR</i>
<i>ROBO3</i>	13433		608630	NM_022370.3	(173)	<i>Gaze palsy, familial horizontal, with progressive scoliosis, 1 - AR</i>
<i>SEC14L3</i>	18655		612824	NM_174975.5	(225)	<i>Hypogonadotropic hypogonadism 16 with or without anosmia - AD</i>
<i>SEMA3A</i>	10723		603961	NM_006080.2	(101)	
<i>SEMA3E</i>	10727		608166	NM_012431.2	(262)	
<i>SEMA4D</i>	10732		601866	NM_006378.3	(173)	
<i>SEMA7A</i>	10741		607961	NM_003612.3	(102)	<i>Cholestasis, progressive familial intra-hepatic, 11 - AR</i>
<i>SIN3A</i>	19353		607776	NM_001145358.2	(263)	<i>Witteveen-Kolk syndrome - AD</i>
<i>SLC29A3</i>	23096	<i>hENT3</i>	612373	NM_018344.5	(264)	<i>Histiocytosis-lymphadenopathy plus syndrome - AR</i>
<i>SLIT2</i>	11086		603746	NM_004787.3	(173)	

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>SMCHD1</i>	29090		614982	NM_015295.2	(265)	Bosma arhinia microphthalmia syndrome - AD; Fascioscapulohumeral muscular dystrophy 2, digenic - DD
<i>SOX10</i>	11190		602229	NM_006941.3	(266)	PCWH syndrome - AD; Waardenburg syndrome, type 2E, with or without neurologic involvement - AD; Waardenburg syndrome, type 4C - AD
<i>SOX11</i>	11191		600898	NM_003108.4	(267)	Intellectual developmental disorder with microcephaly and with or without ocular malformations or hypogonadotropic hypogonadism - AD
<i>SOX2</i>	11195		184429	NM_003106.3	(268)	Microphthalmia, syndromic 3 - AD; Optic nerve hypoplasia and abnormalities of the central nervous system - AD
<i>SOX3</i>	11199		313430	NM_005634.2	(269)	Panhypopituitarism, X-linked - XL
<i>SPRED3</i>	31041		609293	NM_001394336.1	(62)	
<i>SPRY4</i>	15533		607984	NM_030964.5	(61)	Hypogonadotropic hypogonadism 17 with or without anosmia - AD
<i>SRAI</i>	11281		603819	NM_001035235.2	(270)	
<i>SRS</i>	11425		300747	NM_000351.4	(271)	Ichthyosis, X-linked - XLR
<i>STUB1</i>	11427	SCAR16	607207	NM_005861.4	(272)	Spinocerebellar ataxia 48 - AD; Spinocerebellar ataxia, autosomal recessive 16 - AR
<i>TAC3</i>	11521		162330	NM_013251.3	(89)	Hypogonadotropic hypogonadism 10 with or without anosmia - AR
<i>TACR3</i>	11528		162332	NM_001059.2	(89)	Hypogonadotropic hypogonadism 11 with or without anosmia - AR
<i>TAX1BP3</i>	30684		616484	NM_014604.4	(273)	Warburg micro syndrome 4 - AR
<i>TBC1D20</i>	16133		611663	NM_144628.4	(274)	Encephalopathy, progressive, with amyotrophy and optic atrophy - AR; Hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism syndrome - AR; Kenny-Caffey syndrome, type 1 - AR
<i>TBCE</i>	11582		604934	NM_003193.3	(275)	Uthar-mammary syndrome - AD
<i>TBX3</i>	11602		601621	NM_005996.3	(276)	Craniosynostosis 3 - AD; Hypogonadotropic hypogonadism 26 with or without anosmia - AD, AR
<i>TCF12</i>	11623		600480	NM_207036.1	(114)	Hemochromatosis, type 3 - AR
<i>TFR2</i>	11762		604720	NM_003227.3	(277)	

Gene	ID HGNC	Sinónimos do nome do gene	*OMIM®	RefSeq	1ª publicação que mostra relação com HHC	Descrição de doenças no OMIM®
<i>TLE4</i>	11840	<i>GRG4</i>	605132	NM_001282748.2	(173)	
<i>TRAPPC9</i>	30832		611966	NM_031466.5	(172)	
<i>TRIM32</i>	16380	<i>BBS11</i>	602290	NM_012210.3	(278)	Intellectual developmental disorder, autosomal recessive 13 - AR Bardet-Biedl syndrome 11 - AR; Muscular dystrophy, limb-girdle, autosomal recessive 8 - AR
<i>TSPAN11</i>	30795		-	NM_001080509	(172)	
<i>TTC8</i>	20087	<i>BBS8</i>	608132	NM_198309.3	(279)	Retinitis pigmentosa 51 - AR; Bardet-Biedl syndrome 8 - AR
<i>TUBB3</i>	20772		602661	NM_006086.3	(280)	Cortical dysplasia, complex, with other brain malformations 1 - AD; Fibrosis of extraocular muscles, congenital, 3A - AD
<i>TYRO3</i>	12446		600341	NM_006293.3	(173)	
<i>WDPCP</i>	28027	<i>C2orf86</i> , <i>BBS15</i>	613580	NM_015910.7	(213)	?Bardet-Biedl syndrome 15 - AR; Congenital heart defects, hamartomas of tongue, and polysyndactyly - AR
<i>WDR11</i>	13831		606417	NM_018117.11	(94)	Hypogonadotropic hypogonadism 14 with or without anosmia - AD; Intellectual developmental disorder, autosomal recessive 78 - AR
<i>WDR4</i>	12756		605924	NM_033661.4	(281)	Galloway-Mowat syndrome 6 - AR; Microcephaly, growth deficiency, seizures, and brain malformations - AR

Abreviaturas: OMIM®, Online Mendelian Inheritance in Man; HGNC, HUGO Gene Nomenclature Committee; RefSeq, Reference Sequence; AR, autossômico recessivo; AD, autossômico dominante; XLR, recessivo ligado ao cromossoma X.

### 2.2.5. Seleção das variantes

As variantes genéticas encontradas foram filtradas através da aplicação dos seguintes critérios cumulativos: i) localização num dos 169 genes incluídos no painel virtual (**Tabela 3**); ii) localização no transcrito utilizado pelo *Human Gene Mutation Database* (HGMD®) ou, quando o gene estava ausente do HGMD®, no transcrito *Matched Annotation from NCBI and EMBL-EBI* (MANE); iii) variantes não sinónimas ou localizadas até dois nucleótidos adjacentes à região exónica; iv) variantes ausentes ou raras (frequência alélica < 0,01) na base de dados *Genome Aggregation Database* (gnomAD, v2.1.1) e *1000 Genomes Project* (122) e ausentes ou raras (frequência alélica < 0,01) na base de dados interna de 263 controlos Portugueses.

### 2.2.6. Classificação das variantes

A classificação das variantes baseou-se nas diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics* e *Association for Molecular Pathology* (ACMG-AMP) (180). A classificação das variantes encontradas foi feita utilizando a ferramenta Franklin da Genoox, baseada na web (Genoox Ltd, <https://franklin.genoox.com>, consultada em março de 2024).

### 2.2.7. Confirmação das variantes patogénicas (P) e provavelmente patogénicas (LP) por sequenciação de Sanger

#### 2.2.7.1. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A sequenciação de Sanger, tida como o método *Gold standard*, foi utilizada para confirmar a presença das variantes P e LP identificadas por WES (164). Para tal, amplificaram-se as regiões de interesse com uma reação de polimerização em cadeia (*Polymerase chain reaction*, PCR) (282). A PCR é uma técnica *in vitro* amplamente utilizada para amplificar uma sequência específica de ADN. A técnica implica o desenho de dois oligonucleótidos que se ligam de forma complementar à sequência molde de ADN desnaturado, em cada uma das extremidades da região de interesse, criando curtas sequências de cadeia dupla que atuam como iniciadores para uma nova

síntese de ADN. Pela repetição deste processo, de iniciação e síntese, a concentração da sequência de interesse é amplificada exponencial e seletivamente.

A enzima polimerase utilizada foi a Taq (*Thermus aquaticus*) polimerase Dream Taq (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Para uma reação de 25 µl foram utilizados cerca de 100 ng de ADN genómico, 0,2 mM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (Nzytech, Lisboa, Portugal), 0,25 µM de cada oligonucleótido, 1 U de enzima Taq (*Thermus aquaticus*) polimerase e o respetivo tampão (variando de acordo com a concentração de MgCl<sub>2</sub> pretendida, entre 1,0 mM e 2,5 mM). As sequências dos oligonucleótidos utilizados para amplificar os exões onde as variantes P e LP foram encontradas estão no **Anexo 4**. As reações de PCR foram feitas no termociclador T100TM (Bio RAD, Hercules, CA, EUA) com um período inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguidos de 35 ciclos, cada um com 30 segundos de desnaturação a 95°C, 30 segundos de emparelhamento com temperaturas a variar de acordo com a sequência dos oligonucleótidos (normalmente entre 55-65°C) e 30 segundos de extensão a 72°C. Após os 35 ciclos, a reação de PCR terminou com um período de extensão final a 72°C, durante 10 minutos.

#### *2.2.7.2. Eletroforese em gel de agarose*

A eletroforese em gel de agarose é um método que permite a visualização de produtos de ADN. Tem como aplicações mais comuns a verificação do tamanho, da especificidade e da quantidade de produtos produzidos por PCR, mas também pode ser utilizado para separar fragmentos de tamanhos diferentes. Os produtos resultantes de cada reação de PCR foram carregados num gel de agarose contendo GreenSafe Premium (NZYtech, Lisboa, Portugal) como marcador de ADN. Aplicou-se então uma corrente elétrica que fez o ADN migrar através da matriz do gel. Fragmentos maiores migram mais lentamente comparados com fragmentos menores. Os fragmentos foram visualizados no transiluminador ultravioleta (Uvitec, Cambridge, Reino Unido) para eletroforeses, sendo que o tamanho de cada banda foi determinado por comparação com uma escada de ADN de tamanho conhecido (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### *2.2.7.3. Purificação enzimática dos produtos de PCR*

Os produtos de PCR cujo destino foi a sequenciação pelo método de Sanger foram enzimaticamente purificados com recurso às enzimas exonuclease I e fosfatase

alcalina (EXO-SAP, Amersham Science, USB, Cleveland, Ohio, EUA), 0,5 µl e 1,0 µl, respetivamente, incubando-se durante 20 minutos a 37°C e inativando seguidamente as enzimas durante 20 minutos a 80°C.

#### 2.2.7.4. *Sequenciação de Sanger*

A sequenciação pelo método de Sanger foi realizada pela empresa Stab Vida (Caparica, Portugal) através de sequenciação bidirecional utilizando um sequenciador de ADN semiautomático (ABI 3730XL, Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A preparação das amostras foi feita de acordo com as instruções da empresa.

Os resultados da sequenciação de Sanger foram comparados com as sequências de referência encontradas no NCBI (*National Center for Biotechnology and Information*) com a ajuda do programa informático ChromasPro (Versão 2.1.6, Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Queensland, Austrália). Todas as sequenciações foram feitas em duplicado, através da sequenciação da cadeia *forward* e da cadeia *reverse*.

#### 2.2.8. *Análise estatística*

A frequência de variantes P, LP e VUS e a herança oligogénica, foi comparada entre doentes e controlos utilizando o teste exato de Fisher. A frequência de indivíduos com pelo menos uma variante VUS em cada gene foi comparada entre doentes e controlos utilizando o teste exato de Fisher e aplicada a correção de Bonferroni para comparações múltiplas. Um valor de p menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

#### 2.2.9. *Estudo funcional do mecanismo de splicing*

##### 2.2.9.1. *Seleção das variantes*

Para estudar o efeito de variantes com potencial de alterar o mecanismo de *splicing*, foi utilizado o método de minigene (283). As variantes incluídas no estudo *in vitro* de construções minigene foram selecionadas de entre todas as variantes encontradas por WES nos 81 doentes, utilizando os seguintes critérios cumulativos: i) localização num

dos 27 genes descritos no OMIM® como estando associado ao HHC (**Tabela 1**); ii) localização apenas nos transcritos utilizados pelo *Human Gene Mutation Database* (HGMD®); iii) variantes sinónimas ou localizadas nos 10 nucleótidos intrónicos que flaqueiam o exão; iv) variantes ausentes ou muito raras (frequência alélica < 0,001) na base de dados *Genome Aggregation Database* (gnomAD, v2.1.1) e *1000 Genomes Project* (122) e ausentes ou raras (frequência alélica < 0,01) na base de dados interna de 263 controlos Portugueses.

Foi ainda incluída neste estudo uma variante *missense*, encontrada no primeiro nucleótido de um exão que cumpre todos os outros critérios previamente enumerados. A razão da sua inclusão baseou-se no facto de estar classificada como VUS e de estar localizada junto a um local de *splicing*.

#### 2.2.9.2. Clonagem das variantes no vetor *pcAT7Glo1*

Recorrendo à técnica de PCR, isolou-se e amplificou-se o fragmento de ADN genómico de interesse que incluía o exão em estudo, flanqueado por parte dos intrões a montante e a jusante. Utilizou-se a iProof High-Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Incluiu-se nos oligonucleótidos da PCR, na extremidade 5', a região de restrição enzimática com a(s) enzima(s) utilizadas para digerir o plasmídeo (BglII e/ou NdeI) (a sequência dos oligonucleótidos utilizados encontra-se no **Anexo 5**).

Analisou-se o resultado das reações de PCR num gel de agarose com o objetivo de separar as bandas pelo seu peso molecular, como descrito previamente no ponto 2.2.7.2. A banda com o peso molecular desejado foi excisada do gel, com uma lâmina estéril e o ADN contido purificado com o kit PCR & Gel Band Purification (GRISP, Porto, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. Determinou-se a concentração (ng/μl) e o grau de pureza do ADN como previamente descrito no ponto 2.2.2. Digeriram-se cerca de 600 ng de ADN extraídos a partir da banda com a(s) enzima(s) de restrição selecionada(s), BglII e/ou NdeI (New England Biolabs, NEB; #R0144L / #R0111L) durante 16 horas, à temperatura ideal de cada enzima, tal como descrito pelo fabricante. Purificou-se o resultado da digestão com o kit GeneJet PCR Purification (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e determinou-se novamente a concentração como previamente descrito. Em simultâneo, preparou-se o plasmídeo *pcAT7-Glo1* (uma gentil oferta da Dr. Kristen W. Lynch, Perelman School of Medicine,

University of Pennsylvania, USA) (esquema do plasmídeo na **Figura 4**), fazendo uma miniprep com o kit NZYSpeed Miniprep (NZYtech, Lisbon Portugal), de modo a obter no mínimo 50 ng/ $\mu$ l de concentração, seguindo o protocolo do fabricante. De seguida, digeriu-se o vetor pcAT7-Glo1 com a(s) enzima(s) de restrição selecionadas (BglII e/ou NdeI) e defosforilou-se com a enzima CIP (New England Biolabs, NEB; #M0290S). Purificou-se então o vetor pcAT7-Glo1 digerido, com o kit GeneJet PCR Purification kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) e determinou-se a concentração do produto como previamente descrito. A clonagem foi então realizada, ligando os *inserts* no vetor pcAT7-Glo1, com recurso à enzima T4 Ligase (New England Biolabs, NEB; #M0202S), de acordo com os cálculos obtidos com a ajuda do NEB Biocalculator (<https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation>). O rácio selecionado é dado pela divisão do tamanho em pares de bases do vetor pelo *insert*. A ligação foi realizada durante 16 horas a 16°C, no termociclador T100™ (Bio RAD, Hercules, CA, EUA).

Em seguida, transformou-se o resultado das ligações em células NEB® 5-alpha Competent E. coli (New England Biolabs, Ipswich, MA), de acordo com o seguinte protocolo. Deixou-se descongelar uma alíquota de 50  $\mu$ l de células E. coli competentes NEB® 5-alpha, por cada clonagem, em gelo. Adicionaram-se, então, 5  $\mu$ l da reação de ligação às células, ainda no gelo e incubou-se durante 30 minutos. Fez-se depois o choque-térmico a 42°C em banho-maria, durante 45 segundos. Incubou-se durante 2 minutos no gelo e de seguida adicionaram-se 500  $\mu$ l de SOC medium (New England Biolabs, Ipswich, MA), incubou-se a mistura a 37°C, 225 rpm (Agitorb 200 ICP, Norconcessus, Ermesinde, Portugal), durante 1 hora. Espalharam-se 100  $\mu$ l do resultado numa placa de LB agar com ampicilina (100  $\mu$ g/ml) e finalmente, colocaram-se as placas a incubar durante a noite a 37°C.

A partir das colónias obtidas, fez-se *colony* PCR (PCR que utiliza como template diretamente a colónia de bactérias) de 10 a 40 colónias bem individualizadas, com os oligonucleótidos Act e ActT7R com vista a determinar a presença do *insert* na construção. A PCR foi feita utilizando a enzima Taq (Thermus aquaticus) polimerase Dream Taq (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), 0,2 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5  $\mu$ M de cada um dos oligonucleótidos: Act 5' TTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCTCTAGC 3', e ActT7R 5' CACAGTCGAGGCTGATCAGCGG 3', e o tampão a 1X fornecido pelo fabricante da



### *2.2.9.3. Cultura celular*

Cultivaram-se células COS-7 em placas de 6 poços, com o meio de cultura Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), com 4,5 g/l de glucose, L-glutamina, piruvato de sódio, 1,5 g/l NaHCO<sub>3</sub> (PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Alemanha) e suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina/estreptomicina, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### *2.2.9.4. Transfecção*

Quando atingiram uma confluência de aproximadamente 60%, as células cultivadas foram transfetadas com 5 µg de ADN do plasmídeo, em duplicado, recorrendo ao reagente de transfecção Xfect (Takara Bio USA, San Jose, CA, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Em cada ensaio, foram utilizados dois controlos, um correspondendo a células transfetadas com o plasmídeo sem insert e outro correspondendo a células transfetadas sem plasmídeo, ambos em duplicado.

### *2.2.9.5. Extração do ARN*

O ARN total foi extraído das células transfetadas, 24 h depois, utilizando colunas de centrifugação QIAshredder (QIAGEN, Hilden, Alemanha) e o kit RNeasy Mini (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo as recomendações do fabricante.

### *2.2.9.6. Quantificação do ARN*

A quantidade e qualidade de ARN, concentração (ng/µl) e o grau de pureza, foram determinados através da medição da densidade ótica por espectrofotometria ultravioleta (NanoPhotometer Spectrophotometer B-80-3004-33, Impln GmbH, Munich, Germany), usando o comprimento de onda de 260 nm. A pureza da amostra foi determinada pelo rácio de absorbância a 260 nm e 280 nm. Um rácio de ~2,0 é normalmente considerado para amostras puras de ARN.

### *2.2.9.7. Transcrição reversa*

A transcrição reversa (RT-PCR) é uma variação do método de PCR. Este método converte o ARN em ADN complementar (ADNc) com recurso à enzima transcriptase reversa. As reações de transcrição reversa foram realizadas com 600 ng do total de ARNs extraídos, utilizando o kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lituânia), seguindo o protocolo do fabricante.

Por último foram amplificados por PCR os fragmentos de ADNc gerados, utilizando os oligonucleótidos Act e ActT7R, 1,5µl de ADN complementar e a Taq polimerase Dream Taq (ThermoScientific, Waltham, MA, EUA). A eletroforese com o resultado das amplificações de PCR foi realizada num gel de agarose 2,5%, tal como descrito no ponto 2.2.7.2. Os produtos amplificados foram então excisados do gel, purificados utilizando o kit PCR & Gel Band Purification (GRISP, Porto, Portugal) seguindo o protocolo do fabricante e sequenciados por Sanger com os primers Act e ActT7R tal como descrito nos pontos 2.2.7.3. a 2.2.7.4. Os resultados obtidos com o método de minigene foram representativos da transfeção dos alelos *wild-type* e mutados, cada um em duplicado, e estes foram processados em paralelo no mesmo ensaio.

#### 2.2.9.8. *Análise densitométrica*

O software Fiji, é um processador de imagem, de código aberto, foi utilizado para quantificar a densidade de bandas obtidas por eletroforese.

#### 2.2.10. Recursos bioinformáticos

##### 2.2.10.1. *Franklin Genoox - Classificação de variantes*

O Franklin, desenvolvido pela Genoox, é uma ferramenta online de interpretação de variantes baseada em inteligência artificial (IA), que compila evidências de fontes de dados selecionadas, da literatura e de membros da comunidade Franklin. Esta sugere uma classificação baseada nas diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics* e *Association for Molecular Pathology* (ACMG-AMP) (180). Permite ainda, que os membros da comunidade discutam e cheguem a uma classificação consensual, ajudando no processo de resolução de discrepâncias, através de uma interface online (284). A classificação das variantes encontradas foi feita utilizando esta ferramenta baseada na web (Genoox Ltd, <https://franklin.genoox.com>, consultada em março de 2024).

##### 2.2.10.2. *Ensembl*

O projeto Ensembl foi iniciado em 1999, poucos anos antes do projeto de sequenciação do genoma humano ser concluído. Previu-se desde logo que a anotação manual de milhares de milhões de pares de bases seria um obstáculo para a grande maioria dos investigadores. Assim, o objetivo do Ensembl foi anotar automaticamente

o genoma, integrar essa anotação com outros dados biológicos disponíveis e disponibilizar essa informação publicamente através da web. Desde o lançamento do site, em julho de 2000, mais genomas foram adicionados ao Ensembl e a gama de dados disponíveis também se expandiu. A base de dados Ensembl, versão GRCh37 (<https://grch37.ensembl.org/index.html>) foi frequentemente consultada ao longo deste projeto.

#### *2.2.10.3. gnomAD e 1000 Genomes project*

O *Genome Aggregation Database* (gnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org>), originalmente lançado em 2014 como *Exome Aggregation Consortium* (ExAC), é o resultado de uma colaboração de investigadores dispostos a compartilhar com a comunidade científica dados de sequenciação de exomas e de genomas de vários projetos de sequenciação em grande escala. É utilizado principalmente para estudar a frequência alélica populacional das variantes genéticas, nas diferentes populações.

O 1000 Genomes Project foi executado entre 2008 e 2015 tendo-se proposto fornecer uma descrição abrangente da variação genética humana através do WGS de diversos indivíduos de múltiplas populações (285). Ambas as bases de dados foram frequentemente consultadas ao longo deste projeto, para investigação da frequência alélica.

#### *2.2.10.4. Human Gene Mutation Database (HGMD®)*

A base de dados *Human Gene Mutation Database* (<https://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>) agrupa informação sobre variantes genéticas previamente publicadas, que são responsáveis por doenças hereditárias humanas (189). Esta base de dados é uma fonte de referências atualizadas e abrangentes sobre variantes genéticas responsáveis por fenótipos patológicos. O HGMD® foi frequentemente consultado ao longo deste projeto.

#### *2.2.10.5. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®)*

O *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM®) (<https://www.omim.org>) é um compêndio abrangente e oficial de genes humanos e fenótipos genéticos, concentrando-se na relação entre fenótipo e genótipo, que está disponível gratuitamente e que é atualizado diariamente. Este contém informações sobre todos

os distúrbios mendelianos conhecidos e de mais de 16000 genes. O OMIM® foi frequentemente consultado ao longo deste projeto.

#### *2.2.10.6. FexSplice*

A ferramenta *in silico* FexSplice (<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/neurogenetics/FexSplice>), desenvolvida pela LightGBM, prevê a consequência de uma *single nucleotide variant* (SNV) localizada no primeiro nucleótido de um exão, no mecanismo de *splicing*. Esta gera automaticamente uma pontuação de probabilidade de 0 a 1 e prevê que variantes com uma probabilidade inferior a 0,5 sejam insensíveis a alterações ao *splicing*, enquanto variantes com uma probabilidade de 0,5 ou superior são prováveis de afetar o *splicing*. O FexSplice foi utilizado para prever o efeito, no mecanismo de *splicing* celular, da variante NM\_017780.3(*CHD7*): c.4354G>T p.(Val1452Leu), localizada no primeiro nucleótido do exão 19.

#### *2.2.10.7. SWISS-MODEL*

A ferramenta *in silico* SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org>) é um servidor que faz a modelação automatizada da estrutura tridimensional de proteínas, por comparação (286, 287). Utilizou-se esta ferramenta para prever a estrutura tridimensional da proteína CHD7. Esta baseou-se no modelo de uma ADN helicase (id AoA670ZHI7).



## 3. Resultados

### 3.1. Análise genética

#### 3.1.1. Variantes raras

Foram identificadas variantes raras (frequência alélica populacional  $< 0,01$ ) em 80 (98,8%) doentes e 260 (98,9%) controlos.

Na coorte de doentes com HHC, foi identificado um total de 323 variantes raras (279 variantes únicas). Estas variantes incluem 15 patogénicas (12 únicas), 28 provavelmente patogénicas (20 únicas), 147 VUS (139 únicas), 58 provavelmente benignas (49 únicas) e 75 benignas (59 únicas), essas variantes encontram-se descritas nos **Anexo 6** e **Anexo 7**.

Na população controlo, foi identificado um total de 1028 variantes raras (790 variantes únicas). Estas variantes incluem nove variantes patogénicas (sete únicas), 11 provavelmente patogénicas (oito únicas), 544 VUS (488 únicas), 167 provavelmente benignas (119 únicas) e 297 benignas (168 únicas), descritas nos **Anexo 8** e **Anexo 9**.

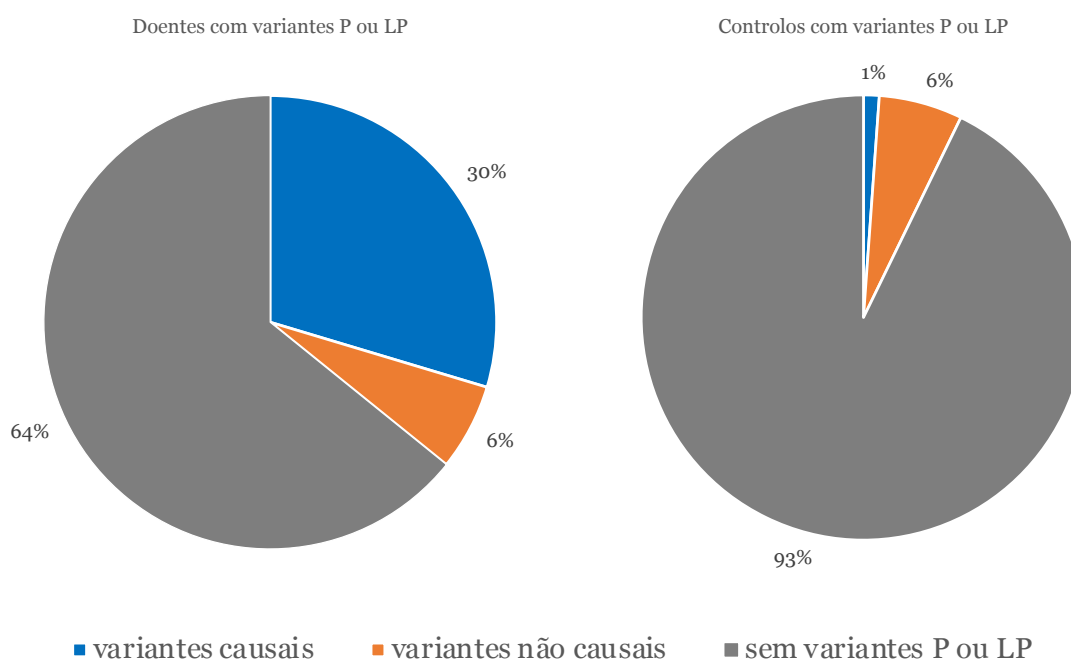
#### 3.1.2. Variantes patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP)

Variantes P ou LP, que são consideradas causais pelo seu modo de hereditariedade, foram identificadas em 24 (29,6%) dos 81 doentes (**Figura 5** e **Tabela 4**). Estas variantes foram encontradas em dez genes: *GNRHR* (seis doentes, 7,4%), *FGFR1* (cinco doentes, 6,2%), *ANOS1* e *CHD7* (três doentes, 3,7%, cada), *PROK2* (dois doentes, 2,5%), *ARHGAP5*, *DCC*, *GNRH1*, *PROKR2* e *WDR11* (um doente, 1,2%, cada) (**Figura 6**). Estas variantes causais estavam presentes em homozigotia (*GNRHR*, *PROK2* e *GNRH1*), heterozigotia composta (*GNRHR*), hemizigotia (*ANOS1*) e heterozigotia (*FGFR1*, *CHD7*, *ARHGAP5*, *DCC*, *PROKR2* e *WDR11*).

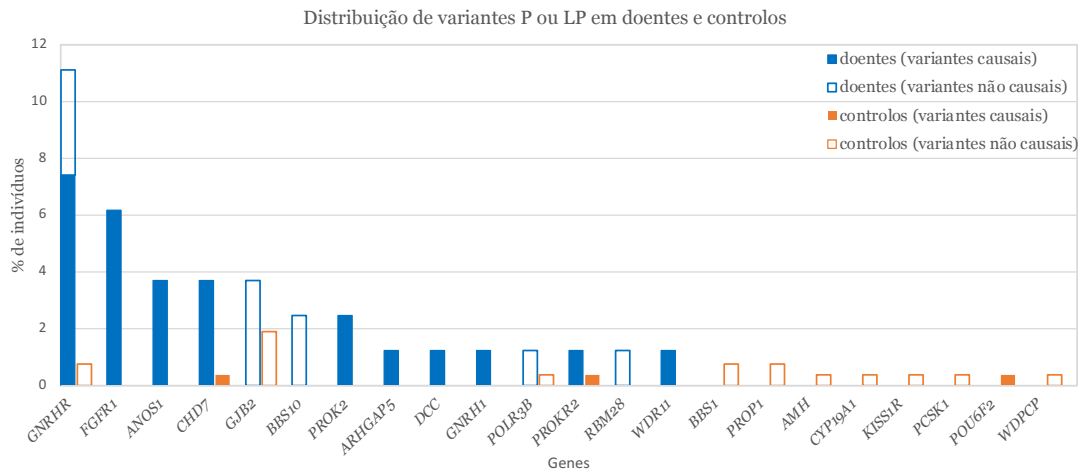
Em contraste, variantes causais, P ou LP foram identificadas em apenas três (1,1%) dos 263 controlos (teste exato de Fisher,  $p < 0,0001$ ) (**Figura 5** e **Anexo 9**). Tratam-

se de variantes em heterozigotia, localizadas nos genes *CHD7*, *POU6F2* e *PROKR2* (**Figura 6**).

Cinco (6,2%) doentes adicionais e 16 (6,1%) controlos apresentaram variantes em heterozigotia, classificadas como P ou LP, em genes autossómicos recessivos, que por si só não deveriam causar doença e, portanto, foram consideradas variantes não causais (ver **Figura 6**). O resumo dos resultados encontra-se no fluxograma apresentado na **Figura 7**.



**Figura 5:** Proporção de doentes (n=81) e controlos (n=263) com variantes patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP) nos genes analisados. Variantes causais P ou LP (que são suficientes para explicar a doença) estavam presentes em 29,6% dos doentes (painel esquerdo) e em apenas 1,1% dos controlos (painel direito) (teste exato de Fisher para diferença,  $p < 0,0001$ ). Variantes não causais P ou LP (que por si só não são suficientes para explicar a doença) estavam presentes em 6,2% e 6,1% dos doentes e controlos, respetivamente (diferença não significativa).



**Figura 6:** Contribuição relativa de cada gene com variantes patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP) em doentes e controlos. As barras representam a frequência (%) de indivíduos com variantes LP ou P em cada gene. As variantes LP ou P causais e não causais são representadas por barras sólidas e abertas, respetivamente.

Tabela 4: Características dos doentes com causa genética identificada.

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
2520	M	SK	Criptorquidia, problemas auditivos, atraso do desenvolvimento cognitivo, espinha bífida	NM_023110.2(FGFR1):c.2155A>G (p.Met719Val)	Het	-	P (PS4, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	(288) <sup>(a)</sup>
3329	M	SK	Um irmão afetado	NM_023110.2(FGFR1):c.1961dupA (p.Tyr654Ter)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	(288) <sup>(a)</sup>
5040	M	SK		NM_006941.3(SOX10):c.191A>T (p.Asp64Val)	Het	0.000021	VUS (PM2)	(174)
				NM_024685.4(BBS10):c.1837T>C (p.Tyr613His)	Het	0.000044	LP (PM1, PM2, PM5, PP3)	(289)
				NM_002673.4(PLXNB1):c.1327T>G (p.Ser443Ala)	Het	0.000203	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
				NM_018117.11(WDR11):c.797G>C (p.Arg266Pro)	Het	0.000012	LP (PM2, PP3, PP5)	-
5102	M	SK	Agnesia renal unilateral. Um irmão afetado	NM_000216.4(ANOS1):c.542-1G>C <sup>(b)</sup>	Hemi	-	LP (PVS1, PM2)	(290) <sup>(a)</sup>
5164	M	SK	Insuficiência renal crónica- Dois irmãos afetados	NM_017780.3(CHD7):c.6194G>A (p.Arg2065His)	Het	-	P (PS4, PM2, PM5, PP2, PP3)	(291) (292) <sup>(a)</sup>
5174	M	SK	Criptorquidia	NM_023110.2(FGFR1):c.287C>G (p.Ser96Cys)	Het	-	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	(288) <sup>(a)</sup>
				NM_017563.4(IL17RD):c.392A>C (p.Lys131Thr)	Het	0.000856	VUS (PM2)	(61)
				NM_017617.4(NOTCH1):c.5837G>A (p.Arg1946His)	Het	0.000024	VUS (PM2, PP2, BP6)	-
5184	M	HHCn	Criptorquidia	NM_023110.2(FGFR1):c.95dupA (Pro33Alafs*17) <sup>(b)</sup>	Het	-	LP (PVS1, PM2)	(288) <sup>(a)</sup>
6130	M	SK	Hipoplasia hipofisária	NM_005215.3(DCC):c.2708dupT (p.Ser904Lysfs*14)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	-
				NM_001174116.2(DMXL2):c.1330A>G (p.Met444Val)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	-

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>6263</b>	F	HHCn	Um irmão e uma irmã afetados	NM_014564.4(LHX3):c.38C>T (p.Ser13Leu)	Het	0.000017	VUS (PM2)	-
				NM_000115.4(EDNRRB):c.167A>C (p.Lys56Thr)	Het	0.000029	VUS (PM2)	(293)
<b>6776</b>	M	SK	Agnesia renal unilateral, atraso do desenvolvimento cognitivo, obesidade, ictiose. Um irmão afetado	NM_000406.2(GNRHR):c.847T>C (p.Tyr283His) <sup>(b)</sup>	Homo	0.000008	LP (PM1, PM2, PP1, PP2, PP3)	(294)
				NM_014875.2(KIF14):c.2648G>A (p.Arg883His)	Het	0.000064	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_005045.3(RELN):c.6170T>G (p.Leu2057Arg)	Het	0.000081	VUS (PM2, PP2)	(295)
				NM_000216.4(ANOS1):deletion ~4.8 Mb <sup>(b)</sup>	Hemi	-	P	(290) <sup>(a)</sup>
				NM_032242.3(PLXNA1):c.5627C>T (p.Alai876Val)	Het	0.000017	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_018082.5(POLR3B):c.1568T>A (p.Val523Glu)	Het	0.000290	P (PM2, PM3, PP1, PP2, PP3)	(296)
<b>6980</b>	M	HHCn	Uma irmã afetada	NM_000264.3(PTCH1):c.3487G>A (p.Gly1163Ser)	Het	0.000513	VUS (PM5, PP2, PP3, BP6)	(297)
				NM_001080414.4(CCDC88C):c.322G>A (p.Gly1088Ser)	Het	0.000225	VUS (PM2)	-
				NM_000406.2(GNRHR):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het	0.002749	LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	(126, 294) <sup>(a)</sup>
				NM_000406.2(GNRHR):c.937_947delTTTTTA AAGCC (p.Phe313Metfs*3)	Het	-	LP (PVS1, PM2, PP1)	(294) <sup>(a)</sup>
<b>7074</b>	M	SK	Hipoplasia hipofisária,	NM_012414.3(RAB3GAP2):c.745C>T (p.Pro249Ser)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP1)	-
				NM_000479.3(AMH):c.1054C>T (p.Pro352Ser)	Het	0.000476	VUS	(298)

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congênito

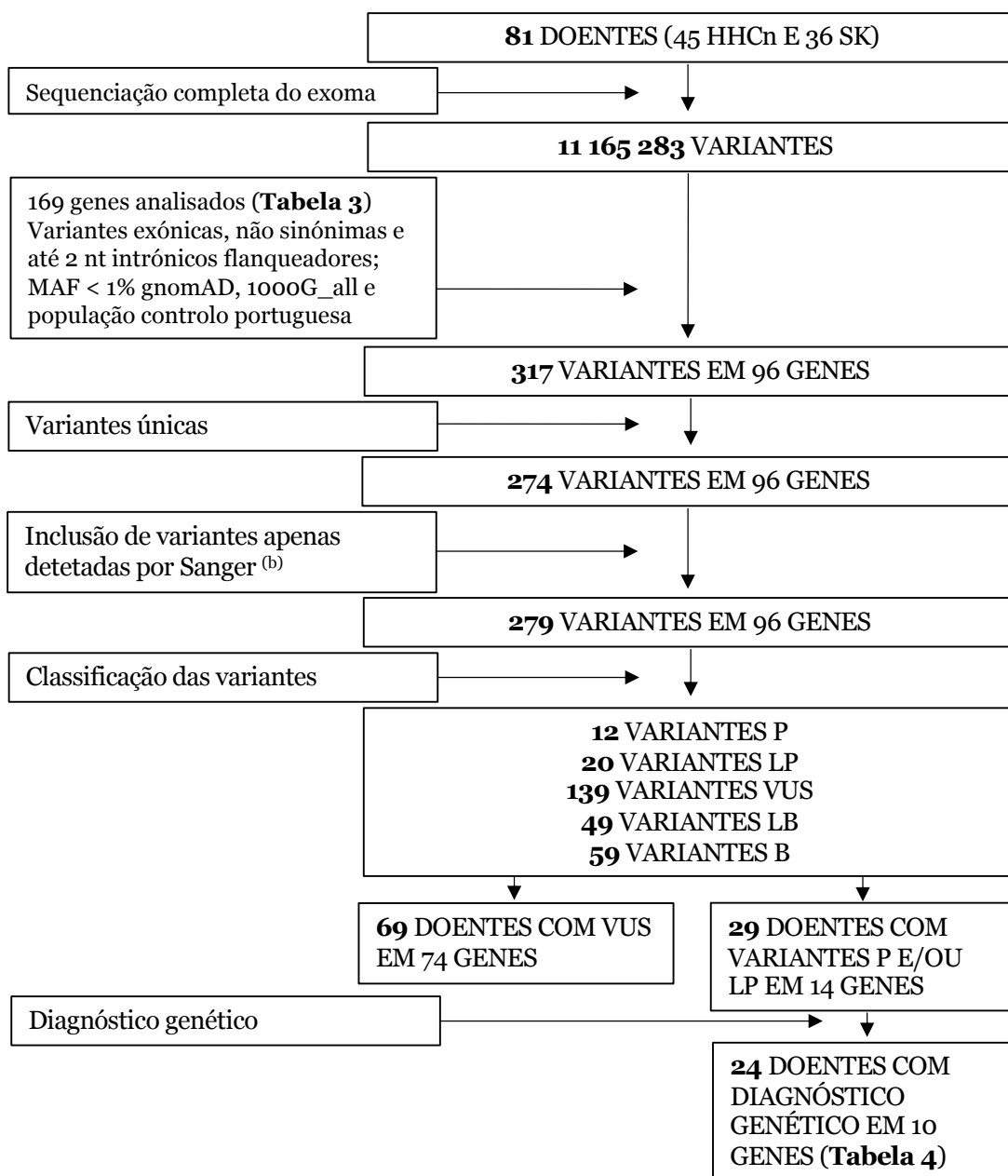
ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
			IGF1 baixa. Um irmão e dois sobrinhos afetados	NM_000216.4( <i>ANOS1</i> ):c.571C>T (p.Arg191*)	Hemi	-	P (PVS1, PM2, PM3, PP1)	(51, 290) <sup>(a)</sup>
7075	M	SK	Deficiência de ACTH	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.965G>A (p.Arg322His) NM_001126128.1( <i>PROK2</i> ):c.163delA (p.Ile55*)	Het Homo	0.000108 0.000113	VUS (PM2, PP2, BP4) P (PVS1, PS4, PM2)	- (64)
7081	M	HHCn		NM_001145357.2( <i>SIN3A</i> ):c.2252A>G (p.Asn751Ser) NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.3245C>T (p.Thr1082Ile) NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.12G>T (p.Trp4Cys) NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.2552C>T (p.Ser851Leu) NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.401T>G (p.Val134Gly) NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.415C>T (p.Arg139Cys) NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.4187C>T (p.Ser1396Phe) NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.841A>C (p.Lys281Gln) NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.1808_1811delACAA (p.Asn603Thrfs*4)	Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het	- - 0.000056 0.000028 0.000012 0.000200 - -	VUS (PM2, PP2) LP (PM2, PM5, PP2, PP3) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, BP4) P (PS3, PM1, PM2, PM3, PP2, PP3) P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2) P (PVS1, PS4, PM2)	- (292) <sup>(a)</sup> (288) <sup>(a)</sup> - (294, 299) <sup>(a)</sup> (294, 300) <sup>(a)</sup> (301) - (302)
7381	M	SK	Problemas auditivos, atraso do desenvolvimento cognitivo	NM_144773.3( <i>PROKR2</i> ):c.253C>T (p.Arg85Cys) NM_213653.3( <i>HJV</i> ):c.904G>A (Glu302Lys) NM_000510.2( <i>FSHB</i> ):c.177C>A (p.Asp59Glu) NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.785G>A (p.Arg262Gln)	Het Het Het Het	0.000601 0.000290 - 0.001789	LP (PM1, PM2, PM5, PP5) VUS (PP2) VUS (PM2) P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3)	(63) (303) - (126, 294) <sup>(a)</sup>
7407	M	HHCn						

Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>8214</b>	M	SK	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária	NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.937_947delTTTTTA AACCC (p.Phe313Metfs*3)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	(294) <sup>(a)</sup>
				NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.1685G>A (p.Gly562Asp)	Het	0.000004	VUS (PM2)	-
				NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.655G>A (p.Val219Met)	Het	0.001526	VUS (PM2, BS2, PP2)	-
				NM_001030055.2( <i>ARHGAP5</i> ):c.2067dupA (p.Tyr690Ilefs*4)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	-
<b>8255</b>	M	HHCn	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária	NM_025000.3( <i>DCAF17</i> ):c.552_554delACA (p.Gln184del)	Het	0.000016	VUS (PM2, PM4)	-
				NM_005103.5( <i>FEZ1</i> ):c.960C>G (p.Ile320Met)	Het	0.000085	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_000230.2( <i>LEP</i> ):c.397G>A (p.Gly133Ser)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.1000C>T (p.Arg334Cys)	Het	0.001622	VUS (PM2, BS2, PP3)	(304)
<b>8276</b>	F	SK	Hipoplasia hipofisária, rotação anormal do pescoço	NM_004439.5( <i>EPHA5</i> ):c.1276G>A (p.Val426Ile)	Het	0.000804	VUS (PM2)	-
				NM_000825.3( <i>GNRH1</i> ):c.99delA (p.Leu34Cysfs*12)	Homo	-	LP (PVS1, PM2)	(77)
				NM_015100.4( <i>POGZ</i> ):c.364A>G (p.Thr122Ala)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
				NM_001126128.1( <i>PROK2</i> ):c.297dupT (p.Gly100Trpfs*22)	Homo	0.000110	LP (PVS1, PM2)	(63)
<b>8299</b>	F	HHCn	Hipoplasia hipofisária, rotação anormal do pescoço	NM_003108.4( <i>SOX11</i> ):c.650T>C (p.Val217Ala)	Het	0.000005	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_001873.3( <i>CPE</i> ):c.884C>G (p.Pro295Arg)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het	0.002749	LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	(126, 294) <sup>(a)</sup>
				NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.785G>A (p.Arg262Gln)	Het	0.001789	P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3)	(126, 294) <sup>(a)</sup>

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
				NM_032844.5(MASTL):c.1774A>G (p.Arg592Gly)	Het	0.000008	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_012233.3(RAB3GAP1):c.244G>A (p.Glu82Lys)	Het	0.000004	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_018077.2(RBM28):c.1744_1745insT (p.Arg582Leufs*5)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	-
				NM_033661.4(WDR4):c.265C>T (p.Arg89Cys)	Het	0.000014	VUS (PM2)	-
<b>8325</b>	M	SK	Hipoplasia hipofisária	NM_023110.2(FGFR1):c.677_678delGCinsAA (p.Gly226Glu)	Het	-	LP (PM1, PM2, PM5, PP2)	-
				NM_017617.4(NOTCH1):c.6119A>G (p.Asn2040Ser)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)	(305)
<b>8500</b>	M	HHCn		NM_000406.2(GNRHR):c.410T>C (p.Leu137Pro)	Homo	-	LP (PM1, PM2, PM3, PP2)	-

Abreviaturas: ID, identificação; M, masculino; F, feminino; HHCn, Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito normósico; SK, Síndrome de Kallmann; Het, heterozigotia; Homo, homozigotia; Hemi, hemizigotia; gnomAD, Genome Aggregation Database; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics. As variantes foram classificadas como Patogénicas (P), Possivelmente patogénicas (LP), Variantes de significado indeterminado (VUS), de acordo com a evidência de patogenicidade (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (PP1-5)) ou *benign impact* (*stand-alone* (BA), *strong* (BS1-4), ou *supporting* (BP1-7)). <sup>(a)</sup> trata-se do mesmo doente da publicação. <sup>(b)</sup> variantes identificadas apenas por Sanger.



**Figura 7:** Fluxograma dos resultados encontrados após sequenciação do exoma (WES) dos 81 doentes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito. <sup>(b)</sup> identifica as variantes detetadas apenas por Sanger.

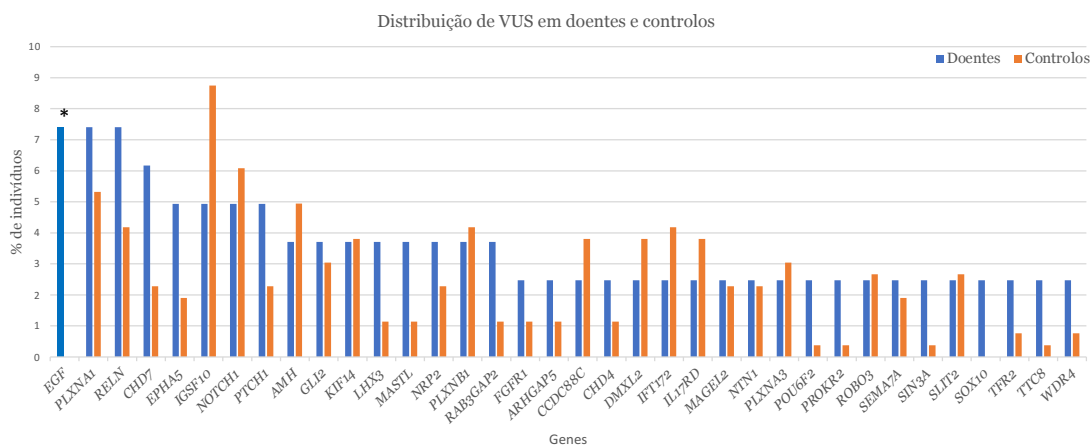
Abreviaturas: HHCn, Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito normósmico; SK, Síndrome de Kallmann; MAF, *minor allele frequency*; nt, nucleótidos; P, variantes patogénicas; LP, variantes provavelmente patogénicas; VUS, variantes de significado indeterminado; LB, variantes provavelmente benignas; B, variantes benignas.

### 3.1.3. Variantes de significado indeterminado (VUS)

Variantes de significado indeterminado (VUS) foram identificadas em 69 (85,2%) doentes e em 239 (90,9%) controlos (diferença estatisticamente não significativa). Os genes mais frequentemente afetados em doentes foram o *EGF*, *PLXNA1* e *RELN* (7,4% dos doentes, cada), *CHD7* (6,2%), *EPHA5*, *IGSF10*, *NOTCH1* e *PTCH1* (4,9%, cada), *AMH*, *GLI2*, *KIF14*, *LHX3*, *MASTL*, *NRP2*, *PLXNB1* e *RAB3GAP2* (3,7%, cada) (**Figura 8**).

Quando comparados os doentes com os controlos, ambos apresentaram frequências de VUS semelhantes para estes genes, com exceção do gene *EGF*. No *EGF*, os doentes apresentaram maior frequência de VUS quando comparados com os controlos (7,4% vs 0%, teste exato de Fisher,  $p = 0,0001$ ; correção de Bonferroni  $p = 0,0169$ ) (**Figura 8**).

Cinco doentes (6,2%) tinham variantes VUS em heterozigotia composta (genes *CCDC141*, *EGF*, *IGSF10*, *MTOR*, *IFT172* e *RELN*, os dois últimos no mesmo doente), e três doentes (3,7%) tinham hemizigotia (um com variante no gene *ANOS1*, um com variante no gene *PHF6* e outro com variante no gene *PLXNA3*). As restantes VUS encontradas nos doentes foram identificadas em heterozigotia (**Anexo 7**). Nos controlos, um indivíduo (0,4%), tinha uma variante VUS em homozigotia (gene *RELN*), oito (3,0%) tinham variantes em heterozigotia composta (genes *CCDC141*, *CHD7*, *HESX1*, *NOS1*, *NOTCH1*, *PLXNB1*, *SEMA7A* e *WDR4*) e três (1,1%) tinham variantes em hemizigotia (genes *PLXNA3* e *POLA1*). As restantes variantes VUS foram identificadas nos controlos em heterozigotia (**Anexo 9**).



**Figura 8:** Contribuição relativa de cada gene com variantes de significado indeterminado (VUS) em doentes e controlos. As barras representam a frequência (%) de indivíduos com variantes VUS em cada gene. Apenas os genes mais frequentemente afetados estão representados (lista completa de variantes VUS nos **Anexo 7** e **Anexo 9**). Os doentes apresentaram maior frequência de VUS no gene EGF (teste exato de Fisher,  $p = 0,0001$ ; com correção de Bonferroni  $p = 0,0169$ ) quando comparados aos controlos (asterisco).

### 3.1.4. Oligogenia

Considerando todas as variantes P ou LP, quer sejam causais ou não causais, em cinco doentes (6,2%) foram identificadas variantes em dois genes (dois doentes com variantes nos genes *GNRHR* e *GJB2*, um doente com variantes nos genes *GNRHR* e *RBM28*, um doente com variantes nos genes *ANOS1* e *POLR3B* e um doente com variantes nos genes *BBS10* e *WDR11*). Em contraste, apenas num controlo (0,4%) foram identificadas variantes LP em dois genes (*AMH* e *PROKR2*) (teste exato de Fisher,  $p = 0,0032$ ). Para as variantes VUS, a frequência de variantes encontradas em oligogenia foi de 54,3% nos doentes e 61,6% nos controlos (diferença estatisticamente não significativa). Entre os doentes, 25 (30,9%) apresentaram variantes VUS em dois genes, dez (12,3%) apresentaram variantes em três genes e nove (11,1%) apresentaram variantes em quatro genes. Entre os controlos, 85 (32,3%) tinham variantes VUS em dois genes, 45 (17,1%) tinham variantes em três genes, 20 (7,6%) tinham variantes em quatro genes, cinco (1,9%) tinham variantes em cinco genes, cinco (1,9%) tinham variantes em seis genes e dois (0,8%) tinham variantes em sete genes (diferença estatisticamente não significativa).

### 3.1.5. Relação genótipo-fenótipo

A frequência de variantes causais, classificadas como P ou LP em doentes com HHCn e SK, foi de 22,2% (10 em 45) e 38,9% (14 em 36), respetivamente. A frequência de variantes VUS em doentes com SK e HHCn foi de 80,6% (29 em 36) e 88,9% (40 em 45), respetivamente. Estas diferenças não são estatisticamente significativas.

De entre os genes mais frequentemente implicados, as variantes causais P ou LP encontradas nos genes *GNRH1* e *GNRHR* foram exclusivamente associadas ao HHCn e as aquelas encontradas no gene *ANOS1* foram exclusivamente associadas à SK (**Anexo 7**).

Variantes causais P ou LP foram identificadas em cinco dos 13 doentes com história de criptorquidia (três no *FGFR1*, uma no *ARHGAP5* e uma no *GNRH1*), em dois dos oito doentes com deficiência auditiva (nos genes *CHD7* e *FGFR1*), e nos dois doentes com agenesia renal (no gene *ANOS1*) (**Anexo 7**). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as frequências de variantes causais em doentes com e sem estes fenótipos.

Variantes causais, P ou LP, foram identificadas em sete dos oito doentes com história familiar de HHC (87,5%) (**Anexo 7**).

Todas as variantes P ou LP identificadas por WES confirmaram-se pelo método de sequenciação de Sanger.

## **3.2. Estudo funcional do mecanismo de splicing**

Neste projeto foram clonados minigenes com vista a expressar os diferentes exões onde as variantes em estudo foram identificadas, flanqueados pelos exões intrínsecos do vetor pcAT7Glo1. Cada um desses minigenes foi transitoriamente transfetado na linha celular COS-7.

### 3.2.1. Lista das variantes

Foram identificadas dezoito variantes (**Tabela 5**), que cumprem os critérios descritos na metodologia, no ponto 2.2.9.1. Dezassete dessas variantes são sinónimas ou localizadas num local de *splicing* e uma delas é *missense*.

Tabela 5: Lista de variantes filtradas para investigar alterações no mecanismo de *splicing*.

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população de controlo portuguesa	Zigotia	ID doentes	Previamente descrita
<i>CHD7</i>	NM_017780.4	c.1677G>A (p.Ser559Ser)	Sinónima	0,000042	-	Het	5943	(292) <sup>(a)</sup>
	NM_017780.4	c.2067G>A (p.Thr689Thr)	Sinónima	0,000750	0,002	Het	5915	(292) <sup>(a)</sup>
	NM_017780.4	c.2451T>G (p.Ser817Ser)	Sinónima	-	-	Het	7075	-
	NM_017780.4	c.2613+4C>T	<i>Splice site</i>	0,000024	-	Het	5102	(292) <sup>(a)</sup>
	NM_017780.4	c.6216C>G (p.Pro2072Pro)	Sinónima	0,000378	0,002	Het	5185	(306),(292) <sup>(a)</sup>
	NM_017780.4	c.8355C>T (p.Ala2785Ala)	Sinónima	0,000037	-	Het	5070	(292) <sup>(a)</sup>
	NM_017780.4	c.4354G>T (Val1452Leu) <sup>(b)</sup>	<i>Missense</i>	-	-	Het	5186	(292) <sup>(a)</sup>
	NM_001946.4	c.612T>A (p.Pro204Pro)	Sinónima	-	-	Het	5404	-
	NM_023110.2	c.177C>T (p.Asp59Asp)	Sinónima	0,000295	-	Het	5136	(292) <sup>(a)</sup>
	NM_023110.2	c.359-4A>G	<i>Splice site</i>	0,000311	-	Het	7381	-
<i>KISS1R</i>	NM_032551.4	c.951G>A (p.Ala317Ala)	Sinónima	0,000004	-	Het	7355	-
	NM_015537.4	c.720C>T (p.Tyr240Tyr)	Sinónima	-	-	Het	8325	-
<i>NSMF</i>	NM_015537.4	c.1080C>A (p.Pro360Pro)	Sinónima	0,000335	0,002	Het	7039	-
	NM_015537.4	c.1324C>T (p.Leu442Leu)	Sinónima	0,000355	0,002	Het	7039	-
<i>PROK2</i>	NM_001126128.1	c.243G>A (p.Arg81Arg)	Sinónima	0,000091	-	Het	7039	-
<i>SPRY4</i>	NM_030964.3	c.507G>A (p.Pro169Pro)	Sinónima	0,000124	0,004	Het	7030	-
<i>WDR11</i>	NM_030964.3	c.675G>A (p.Leu225Leu)	Sinónima	0,000011	-	Het	5196	-
	NM_018117.1	c.471T>C (p.Tyr157Tyr)	Sinónima	0,000301	-	Het	5190	-

Legenda: ID, identificação; Het, modo de hereditariedade em heterozigotia; gnomAD, *Genome Aggregation Database*; <sup>(a)</sup> trata-se do mesmo doente da publicação. <sup>(b)</sup> variante identificada apenas por Sanger.

### 3.2.2. Variante causal no gene *CHD7*

A variante *missense* encontrada em heterozogotia, no primeiro nucleótido do exão 19 do gene *CHD7*, NM\_017780.3(*CHD7*):c.4354G>T (**Figura 9 A**), está ausente da base de dados gnomAD e da base de dados interna de 263 indivíduos. A variante foi classificada com recurso à plataforma Franklin, Genoox, que reporta esta variante como sendo VUS (PM2, PP2, PP3).

As ferramentas de previsão computacional SIFT (307), PolyPhen (308) e AlphaMissense (309) indicam um efeito neutro da alteração de aminoácidos no *CHD7*. Dado que a variante se encontra localizada no primeiro nucleótido do exão (E+1), e que se trata de uma substituição de uma guanina (G) por uma timina (T), utilizou-se também a ferramenta *in silico* FexSplice para prever o efeito no mecanismo de *splicing* (310). As probabilidades do FexSplice variam de 0 (nenhum efeito no *splicing*) a 1 (impacto no *splicing* do exão a jusante). O FexSplice previu esta variante como sendo patogénica, com uma pontuação de probabilidade de 0,995.

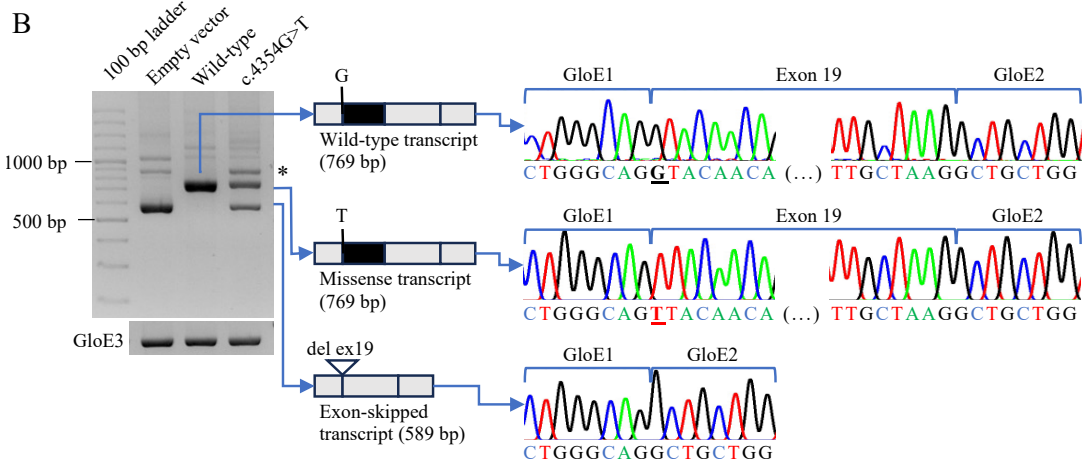
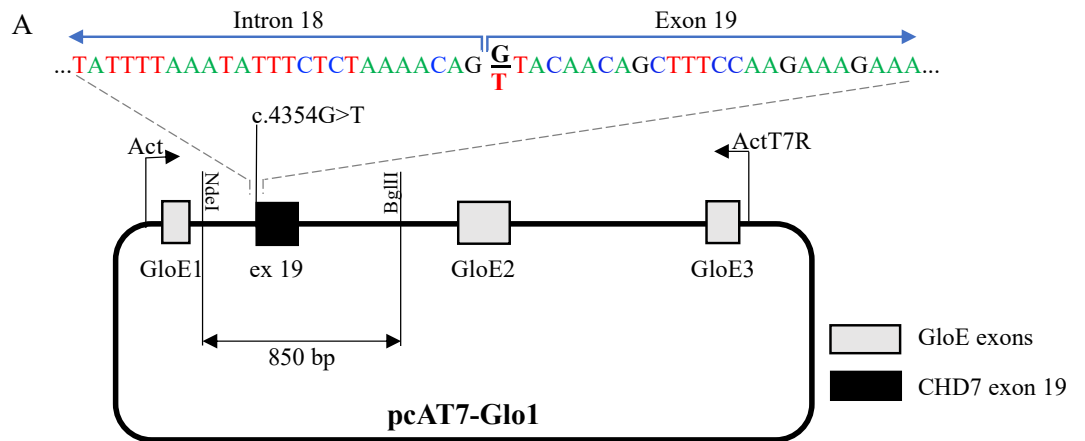
A análise *in vitro* com o minigene mostrou que a expressão do alelo *wild-type* resultou num transcrito com 769 pb (pares de bases) (exão GLOE1 - exão 19 do *CHD7* - exão GLOE2 - exão GLOE3) enquanto a expressão do alelo mutado resultou em dois transcritos distintos: um com os esperados 769 pb, contendo a variante *missense* (p.Val1452Leu), e outro com 589 pb com *skipping* do exão 19 do gene *CHD7* (**Figura 9 B**).

A análise densitométrica mostrou que 59% dos transcritos mutados retiveram a variante *missense*, enquanto 41% exibiram o *skipping* do exão 19 (**Figura 9 C**).

Como o exão 19 tem 180 pb, prevê-se que a sua exclusão do transcrito de ARNm conduza a uma deleção *in-frame* de 60 aminoácidos (p.Val1452\_Lys1511del), afetando o domínio helicase C-terminal da proteína *CHD7* (**Figura 9 D**).

Com base nestas descobertas, a variante foi reclassificada como LP de acordo com os critérios do ACMG-AMP: PS3 (estudos funcionais *in vitro*, que apoiam um efeito prejudicial no ARN), PM2 (ausente nos controlos em bases de dados populacionais) e PM4 (alteração no comprimento da proteína devido à deleção *in-frame*) (180).

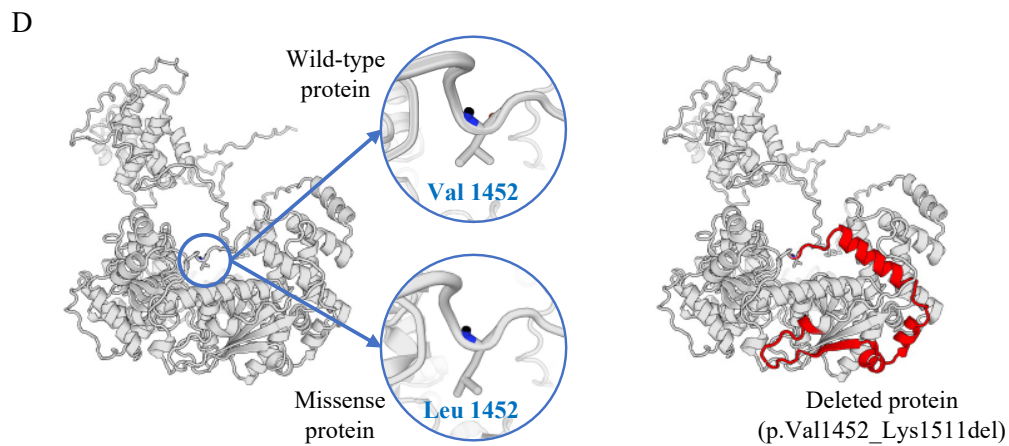
Causas genéticas do Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito



**C**

Relative contribution of each transcript

Empty vector (%)	Wild-type (%)	c.4354G>T (%)
0	100	59
100	0	41



**Figura 9:** Análise funcional da variante *missense* no exão 19 do gene *CHD7*. (A) O doente apresenta uma variante *missense* em heterozigotia no gene *CHD7* (c.4354G>T), localizada no primeiro nucleótido do exão 19 (destacado a negrito). Um fragmento genómico de 850 pares de bases (pb) do doente, abrangendo o exão 19 (com e sem a variante) e sequências intrónicas flanqueadoras, foi clonado no vetor pcAT7-Glo1 (contendo uma versão modificada do gene da  $\beta$ -globina humano) nos locais de restrição NdeI e BglII, entre os exões 1 (GloE1) e 2 (GloE2) da  $\beta$ -globina. O plasmídeo de minigene construído foi transfetado em células COS-7, e o ácido ribonucléico (ARN) resultante foi analisado utilizando a reação de polimerização em cadeia com transcriptase reversa (RT-PCR) com os primers Act e ActT7R. (B) A eletroforese e a sequenciação dos fragmentos de ácido desoxirribonucléico complementar amplificados (ADNc) mostraram que o alelo do *wild-type* (WT) gerou um único transcrito normalmente processado (769 pb). Em contraste, o alelo mutado produziu dois transcritos distintos: um correspondente ao transcrito com *splicing* normal, contendo a variante *missense* (769 pb) e outro transcrito resultante de *splicing* aberrante, com uma deleção (del) do exão 19 (589 pb). A amplificação por PCR do exão GloE3 serviu como controlo interno. O asterisco indica fragmentos de heteroduplex. (C) A análise de densitometria do ADNc amplificado demonstrou que o alelo WT gerou exclusivamente transcritos com *splicing* normal (100%), enquanto o alelo mutado expressou os transcritos *missense* e com *exon-skipping* em proporções de 59% e 41%, respetivamente. (D) Representação tridimensional gerada pelo SWISS-MODEL da proteína CHD7 mostrando a proteína WT (normal) contendo uma valina na posição 1452, a proteína *missense* contendo uma leucina nesta posição e a proteína deletada que não possui uma sequência de 60 aminoácidos (a vermelho).

### 3.2.3. Outras variantes analisadas

Das dezoito variantes estudadas, as nove variantes (**Tabela 6**) não mostraram diferença na expressão do exão em estudo, na presença do alelo mutado (resultados apresentados no **Anexo 10**).

**Tabela 6:** Variantes clonadas no plasmídeo pcAT7Glo1 para investigar alterações no mecanismo de *splicing* que não mostraram diferença na expressão do exão em estudo, na presença do alelo mutado.

NM_017780.4( <i>CHD7</i> ):c.1677G>A (p.Ser559Ser)
NM_017780.4( <i>CHD7</i> ):c.6216C>G (p.Pro2072Pro)
NM_001946.4( <i>DUSP6</i> ):c.612T>A (p.Pro204Pro)
NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.177C>T (p.Asp59Asp)
NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.359-4A>G
NM_015537.4( <i>NSMF</i> ):c.1080C>A (p.Pro360Pro)
NM_015537.4( <i>NSMF</i> ):c.1324C>T (p.Leu442Leu)
NM_001126128.1( <i>PROK2</i> ):c.243G>A (p.Arg81Arg)
NM_018117.1( <i>WDR11</i> ):c.471T>C (p.Tyr157Tyr).

As três variantes (**Tabela 7**) não expressaram o exão em estudo (resultados apresentados no **Anexo 11**).

**Tabela 7:** Variantes clonadas no plasmídeo pcAT7Glo1 para investigar alterações no mecanismo de *splicing* que não expressaram o exão em estudo.

NM_017780.4( <i>CHD7</i> ):c.8355C>T (p.Ala2785Ala)
NM_015537.4( <i>NSMF</i> ):c.720C>T (p.Tyr240Tyr)
NM_030964.3( <i>SPRY4</i> ):c.675G>A (p.Leu225Leu).

As cinco variantes (**Tabela 8**) não foram testadas por não ter conseguido realizar a clonagem dos exões pretendidos no vetor pcAT7Glo1.

**Tabela 8:** Variantes que não tiveram sucesso na clonagem no plasmídeo pcAT7Glo1.

NM_017780.4( <i>CHD7</i> ):c.2067G>A (p.Thr689Thr)
NM_017780.4( <i>CHD7</i> ):c.2451T>G (p.Ser817Ser)
NM_017780.4( <i>CHD7</i> ):c.2613+4C>T,
NM_032551.4( <i>KISS1R</i> ):c.951G>A (p.Ala317Ala)
NM_030964.3( <i>SPRY4</i> ):c.507G>A (p.Pro169Pro).

## **4. Discussão**

Foi em meados do século XX que o HHC foi reconhecido clinicamente como sendo causa da falha no desenvolvimento pubertário. O seu diagnóstico baseia-se desde então na anamnese, observação de sinais, levantamento de sintomas, e exames laboratoriais e imagiológicos. Desde o início do século XXI que o conhecimento sobre as causas genéticas do HHC tem avançado na mesma medida que o desenvolvimento das tecnologias de sequenciação. À medida que o conhecimento sobre as causas genéticas do HHC foi aumentando, o recurso ao diagnóstico genético também se foi estabelecendo. Atualmente, a disponibilidade da tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) proporcionou um grande avanço no diagnóstico genético destes doentes.

Para identificar a causa genética do HHC, os testes moleculares normalmente utilizados, recorrem a diferentes painéis genéticos, sejam eles personalizados ou virtuais, que normalmente incluem os genes clássicos: *ANOS1*, *GNRHR*, *GNRH1*, *FGFR1*, *FGF8*, *PROKR2*, *PROK2*, *TACR3*, *TAC3*, *KISS1R* e *KISS1*. Um inquérito recente a 23 prestadores de cuidados de saúde pertencentes à *European Reference Network on rare endocrine conditions* (Endo-ERN; [www.endo-ern.eu](http://www.endo-ern.eu)) mostrou que o número de genes analisados em painéis personalizados de HHC pode variar entre 14 e 360 genes (176). Outro exemplo, o painel de genes do NHS do Reino Unido para o HHC é atualmente composto por apenas 22 genes (<https://nhsgms-panelapp.genomicsengland.co.uk/panels/650/v3.0>). De acordo com as recomendações da *European Society of Human Genetics* (ESHG), devem-se incluir apenas os genes com uma relação bem estabelecida entre genótipo e fenótipo (311). As taxas de diagnóstico genético, são também elas muito variáveis. Revisões sistemáticas anteriores estimaram a prevalência mundial de variantes genéticas causais em aproximadamente 31% na SK (312) e 23% no HHCn (313). No entanto, existe uma variabilidade considerável nos dados de prevalência entre estudos que podem estar relacionados com fatores como diferenças no perfil genético ligado a geografia/etnia, proporção de casos familiares, gravidade do fenótipo reprodutivo e viés no recrutamento.

Contudo, o recurso a uma abordagem que utiliza o WES mostrou ser vantajosa quanto à taxa de diagnóstico genético (62, 170, 172, 173, 176, 314, 315). Esta abordagem tem a vantagem de ser flexível, pois permite a rápida inclusão de novos genes, mantendo sempre a possibilidade de rever e atualizar os resultados anteriores de acordo com as novas descobertas na área. Como desvantagem, tem a menor sensibilidade da sequenciação NGS. Aliado às tecnologias de sequenciação de nova geração, a disponibilidade de novos recursos para testar e confirmar *in vitro* a implicação de novos genes tem sido um contributo para alargar as causas genéticas conhecidas do HHC (117).

Neste projeto levantámos a hipótese de que a utilização do WES, aliado ao alargamento do painel virtual de genes, poderia aumentar a taxa de diagnóstico genético na nossa coorte.

O nosso painel virtual foi formado por 169 genes, todos eles encontrados após pesquisa de causas genéticas para o HHCn e a SK nas bases de dados Pubmed® e OMIM®.

Como resultado do estudo genético, identificámos variantes genéticas patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP), causais, em 29,6% dos doentes incluídos na coorte portuguesa de HHC, o que é consistente com a prevalência relatada noutras coortes de HHC (37, 170, 269, 316, 317). Notavelmente, verificou-se que não é tanto o tamanho do painel de genes analisado em cada estudo que se correlaciona significativamente com a taxa de diagnóstico genético, mas sim, os critérios utilizados para a inclusão das variantes. Como exemplo, a inclusão de VUS raras e não sinónimas aumenta de forma significativa o rendimento da taxa de diagnóstico genético (173, 176). Assim, é importante distinguir as verdadeiras variantes causais das variantes VUS que podem ser erroneamente categorizadas como causadoras de doença. O uso generalizado da NGS e o número crescente de genes candidatos para o HHC levaram à identificação de numerosas VUS para as quais não há evidências suficientes do seu envolvimento na doença. Muitas vezes, as VUS representam achados incidentais e, com o tempo, muitas são reclassificadas como variantes benignas (318). No entanto, vários estudos de HHC incluíram VUS como variantes causais, sobrestimando assim a taxa de diagnóstico genético desses doentes (312, 313).

No caso deste estudo, a utilização de um painel virtual de genes que incluísse apenas os genes clássicos não teria permitido o diagnóstico de dois doentes com variantes causais nos genes *ARHGAP5* e *DCC*.

Outro critério importante é o da frequência alélica populacional. Caso tivéssemos sido demasiado conservadores e nos tivéssemos cingido à inclusão de variantes muito raras (frequência alélica populacional  $< 0,001$ ), teríamos deixado de fazer o diagnóstico genético de três doentes, baixando assim a taxa de diagnóstico genético para 25,9%. Esses três doentes foram diagnosticados com variantes em heterozigotia composta no gene *GNRHR*. Estabelecer um valor de corte para a frequência alélica populacional é crucial para distinguir entre variantes patogénicas e variantes benignas. O valor de corte da frequência alélica populacional é o limite máximo da frequência de uma variante genética numa população, além do qual é improvável que essa variante seja considerada causal para uma doença rara. Para estabelecer esse valor, deve-se ter em conta a prevalência da doença e os seus modos de hereditariedade. Ora, o HHC, apesar de ser uma doença rara, tem uma apresentação heterogénea, com modos de hereditariedade distintos (ligados ao cromossoma X, recessivo ou dominante), com herança oligogénica e variantes com penetrância incompleta/expressividade variável. Em doenças com estas características, variantes relativamente frequentes podem ter efeito adicional no fenótipo (68). Deste modo, o valor de corte de 0,01 para a frequência alélica populacional pareceu ser o mais adequado.

No presente estudo, aplicámos os critérios da ACMG-AMP (180) para classificar as variantes, procurando garantir um alto nível de confiança no estabelecimento da ligação entre a variante genética e a doença. Identificámos, na coorte de HHC, variantes P ou LP causais em 10 dos 169 genes analisados. Os genes mais frequentemente envolvidos foram o *GNRHR*, *FGFR1*, *ANOS1* e *CHD7*, consistente com o conhecimento atual sobre as principais causas genéticas do HHC (125, 319). Outros genes, menos frequentemente envolvidos, onde foram identificadas variantes P ou LP foram o *ARHGAP5*, *DCC*, *GNRH1*, *PROK2*, *PROKR2* e *WDR11*.

O gene *GNRHR* tem modo de hereditariedade autossómico recessivo e está bem estabelecido como sendo causa genética do HHC sem anosmia (OMIM #146110). Neste gene, foram identificadas variantes causais em seis doentes normósmicos da nossa coorte. Dois desses doentes eram homozigotos para duas variantes nunca antes

descritas, a variante c.847T>C (p.Tyr283His) e a variante c.410T>C (p.Leu137Pro). Nos quatro outros doentes foram identificadas variantes em heterozigotia composta. As variantes c.317A>G (p.Gln106Arg) / c.937\_947delTTTTTAAACCC (p.Phe313Metfs\*3), as variantes c.401T>G (p.Val134Gly) / c.415C>T (p.Arg139Cys), as variantes: c.785G>A (p.Arg262Gln) / c.937\_947delTTTTTAAACCC (p.Phe313Metfs\*3) e as variantes c.317A>G (p.Gln106Arg) / c.785G>A (p.Arg262Gln). Para nenhum destes seis doentes foi descrito outro fenótipo para além do hipogonadismo.

O gene *FGFR1* tem modo de hereditariedade autossómico dominante e está bem estabelecido como sendo causa genética do HHC com ou sem anosmia (OMIM #147950). Neste gene foram identificadas variantes causais, nunca antes descritas, em heterozigotia, em cinco doentes da nossa coorte. A variante c.2155A>G (p.Met719Val) foi identificada num doente com SK que também apresenta criptorquidia, deficiência auditiva, atraso no desenvolvimento e espinha bífida. A variante c.1961dupA (p.Tyr654Ter) num doente com SK e história familiar. A variante c.287C>G (p.Ser96Cys) num doente com SK e criptorquidia. A variante c.95dupA (Pro33Alafs\*17) num doente normósmico, e a variante c.677\_678delGCinsAA (p.Gly226Glu) num doente com SK e hipoplasia hipofisária.

O gene *ANOS1* tem modo de hereditariedade recessivo ligado ao cromossoma X e foi o primeiro gene a ser relacionado com o HHC, com ou sem anosmia (OMIM #308700). Neste gene foram identificadas variantes causais, em hemizigotia, em três doentes da nossa coorte. A variante num local de *splicing*, nunca antes descrita c.542-1G>C, identificada num doente com SK, agenesia renal unilateral e história familiar. Para esta variante, o ARN foi estudado funcionalmente por RT-PCR, e foi confirmado o *skipping* do exão 5 do gene (290). A deleção de ~4.8 Mb, confirmada por MLPA (290) num doente com SK, agenesia renal unilateral, atraso no desenvolvimento, obesidade, ictiose e história familiar. Ainda a variante *nonsense* c.571C>T (p.Arg191\*) num doente com SK e deficiência das hormonas GH e ACTH.

O gene *CHD7* tem modo de hereditariedade autossómico dominante e apesar de variantes patogénicas neste gene estarem maioritariamente associadas à Síndrome de CHARGE (*coloboma, heart disease, atresia of the choanae, retarded growth and mental development, genital anomalies, and ear malformations and hearing loss*), variantes *missense* foram encontradas em formas de HHCn e SK com poucas ou

nenhuma outra manifestação sindrómica (OMIM #612370) (75, 208, 292, 320-322). Cerca de 5% dos doentes com SK têm uma variante identificada no gene *CHD7* (75, 312). A variabilidade fenotípica encontrada entre doentes com variantes no *CHD7* pode ser explicada pela heterogeneidade alélica. Kim et al. (75) levantaram a hipótese de que nos casos de SK ou HHCn, estamos na presença de variantes com efeito menos deletério. Suportando esta ideia, a maioria das variantes relatadas no gene *CHD7* em doentes com Síndrome de CHARGE são truncadoras, isto é, levam à produção de uma proteína mais curta do que a versão normal (208). A exceção foi identificada num doente com SK que sofreu reversão do seu hipogonadismo, e no qual foi encontrada uma variante *nonsense* no *CHD7* (321). Neste gene foram identificadas variantes causais, em heterozigotia, em três doentes da nossa coorte. A variante c.6194G>A (p.Arg2065His), num doente com SK, insuficiência renal crónica e história familiar. A variante c.3245C>T (p.Thr1082Ile), num doente normósico e a variante c.1808\_1811delACAA (p.Asn603Thrfs\*4) num doente com SK, deficiência auditiva e atraso no desenvolvimento.

O gene *PROK2* tem uma ligação bem estabelecida como sendo causa genética do HHC com ou sem anosmia (OMIM #610628). O OMIM® considera este gene como tendo um modo de hereditariedade autossómico dominante, enquanto o Consórcio Europeu para estudo da biologia do GnRH (COST Action BM1105, <http://www.gnrhnetwork.eu/>), considera que este gene tem um modo de hereditariedade autossómico recessivo, apesar de a maioria dos doentes serem portadores de variantes em heterozigotia (14). São muitas vezes relatados fenómenos de penetrância incompleta ou expressividade variável (69). Na nossa coorte, foram identificadas variantes causais *frameshift*, em homozigotia, em dois doentes. A variante c.163delA (p.Ile55\*), num doente com anosmia e deficiência das hormonas GH e ACTH e a variante c.297dupT (p.Gly100Trpfs\*22) num doente com anosmia, hipoplasia hipofisária e rotação anormal do pescoço.

O gene *GNRH1* encontra-se implicado na etiologia do HHC (OMIM #614841), apesar de achados de variantes causais neste gene serem muito raros (323). Este gene tem um modo de hereditariedade autossómico recessivo. A variante *frameshift* NM\_c.99delA (p.Leu34Cysfs\*12) foi descoberta em homozigotia num doente normósico. Esta variante fica no sétimo aminoácido do decapeptídeo GnRH, que é altamente conservado.

O gene *PROKR2* tem ligação bem estabelecida como causa genética do HHC com e sem anosmia (OMIM #244200). Tal como acontece para o seu ligando *PROK2*, o OMIM® considera este gene como tendo um modo de hereditariedade autossómico dominante, enquanto o Consórcio Europeu para estudo da biologia do GnRH (COST Action BM1105, <http://www.gnrhnetwork.eu/>) considera que este gene tem um modo de hereditariedade autossómico recessivo, apesar de a maioria dos doentes serem portadores de variantes em heterozigotia (324). São muitas vezes relatados fenómenos de penetrância incompleta ou oligogenia (324). Foi identificada a variante *missense* c.253C>T (p.Arg85Cys), considerada causal, em heterozigotia, num doente normósmico.

O gene *WDR11* tem uma ligação bem estabelecida como causa genética do HHC com ou sem anosmia (OMIM #614858). Tem um modo de hereditariedade autossómico dominante. A variante *missense* c.797G>C (p.Arg266Pro) foi identificada em heterozigotia num doente com SK.

O gene *ARHGAP5* (codifica a *RHO GTPase-activating protein 5*) tem uma ligação recentemente estabelecida com o HHC por Lippincott et al. (123) que descreveram um enriquecimento de variantes raras truncantes, em heterozigotia, numa coorte de doentes. Este gene é evolutivamente conservado, intolerante a alterações genéticas e tem um papel crítico no desenvolvimento do cérebro (118-120). A variante *frameshift* c.2067dupA (p.Tyr690Ilefs\*4) foi identificada em heterozigotia num doente com SK, criptorquidia e hipoplasia hipofisária.

O gene *DCC* (*Netrin 1 receptor*) foi implicado na patofisiologia do HHC por Bouilly et al. em 2018 (222), com modo de hereditariedade autossómico dominante. Este gene codifica, à semelhança da anosmia, uma proteína extracelular de adesão, contendo domínios de fibronectina, que está envolvida na orientação dos axónios e cujos estudos *in vitro* demonstraram estar implicada na migração neuronal. A variante *frameshift* c.2708dupT (p.Ser904Lysfs\*14), foi identificada em heterozigotia num doente com SK e hipoplasia hipofisária.

Adicionalmente, identificámos variantes P ou LP nos genes *BBS10* (Síndrome de Bardet-Biedl-10), *GJB2* (proteína *gap-junction, beta-2*), *GNRHR*, *POLR3B* (polimerase III, RNA, subunidade B) e *RBM28* (proteína *RNA-binding motif-28*). No entanto, estes genes têm herança autossómica recessiva e os doentes com variantes nestes genes eram todos heterozigotos. Portanto, estas foram consideradas variantes

não causais e que provavelmente refletem a prevalência de portadores saudáveis na população, conforme sugerido pela semelhança entre a frequência de variantes não causais P ou LP em doentes e controlos (6,2% e 6,1%, respetivamente).

Apesar do grande número de genes analisados, variantes causais P ou LP foram identificadas apenas num pequeno grupo de genes (10 de 169 genes). A aparente falta de variantes causais nos restantes 159 genes pode ter várias explicações. Primeiramente, a seleção dos genes para o painel virtual foi baseada na sua associação prévia, na literatura científica, a pelo menos um indivíduo com HHC. Isto significa que incluímos genes que foram implicados em casos únicos, sem estudos confirmatórios. É possível que tais associações relatadas sejam espúrias e que estes genes não contribuam verdadeiramente para o HHC. Portanto, este painel de 169 genes pode ser uma representação exagerada do número de genes envolvidos neste distúrbio. Em segundo lugar, incluímos genes associados a síndromes nas quais o HHC ocorre no contexto de características clínicas mais complexas, que não estavam presentes nos nossos doentes. Esses genes foram analisados devido à possibilidade do HHC isolado ocorrer no contexto de expressividade variável da síndrome, como no caso de variantes no *CHD7*, consideradas de impacto ligeiro, que causam HHC na ausência de outras características da Síndrome de CHARGE (208). No entanto, também é possível que variantes nalguns desses genes não causem HHC como único fenótipo. Em terceiro lugar, é possível que, devido ao recente estabelecimento da relação entre o gene e a doença, as variantes encontradas nesses genes sejam erradamente classificadas como VUS, pela ausência de estudos confirmatórios. Por último, a contribuição de alguns genes para o HHC poderá ser tão rara que seria necessário alargar a coorte de doentes para encontrar variantes causais nesses genes.

Apesar da extensa análise levada a cabo neste estudo, aproximadamente dois terços dos nossos doentes permaneceram sem diagnóstico genético. Tal pode ser atribuído a vários fatores, tais como a inclusão de fenocópias no estudo, onde fatores ambientais ou epigenéticos desempenharam um papel (325), a existência de genes causadores não identificados, que não foram incluídos no painel de genes, ou a existência de alterações genéticas mais complexas que não são facilmente detetadas através do WES, tais como *copy number variants* (CNVs) ou variantes localizadas fora das regiões codificantes do genoma. Contudo, torna-se importante ressaltar que, embora continuem a ser relatados novos genes relacionados ao HHC, a sua contribuição para a carga genética global desta doença é, segundo os dados publicados, ainda marginal.

Para além disso, em relação às CNVs, apesar de algumas já terem sido relatadas, estas representam menos de 2% dos casos de HHC (269, 326).

Outro fator a ter em conta são as limitações técnicas da NGS. Num subgrupo de doentes, os genes *ANOS1*, *FGFR1*, *CHD7* e *GNRHR* foram estudados previamente por sequenciação de Sanger (288, 290, 292, 294). Quando comparados os resultados da sequenciação de Sanger com os do WES, verificou-se que cinco variantes não foram detetadas por WES. Levanta-se a hipótese que o sucedido se deveu a constrangimentos relacionados com a técnica. Outra limitação prende-se com a falta de estudos funcionais e de estudos de segregação familiar mais abrangentes, necessários para interpretar e classificar as variantes que caem na categoria de VUS.

Variantes P ou LP também foram identificadas na coorte de controlos. No entanto, estas foram principalmente variantes em heterozigotia, em genes com modo de hereditariedade autossómico recessivo ou para os quais o modo de hereditariedade ainda não foi claramente elucidado. Portanto, esses achados provavelmente refletem a frequência normal de portadores saudáveis na população. Como exceção ao anteriormente descrito, observámos variantes LP nos genes autossómicos dominantes *CHD7*, *POU6F2* e *PROKR2* em três controlos, sugerindo que a classificação dessas variantes possa estar sobrestimada, ou que haja penetrância incompleta dessas variantes nos indivíduos não afetados. Aliás, tanto para o gene *PROKR2* como para a variante do gene *POU6F2*, c.1885A>C (p.Asn629His), o fenómeno de penetrância incompleta foi já descrito (124).

O presente trabalho identificou um grande número de VUS, para as quais não temos evidências suficientes de modo a conseguirmos estabelecer o seu papel no distúrbio. A frequência de VUS nos doentes (85,2%) foi semelhante à frequência encontrada nos controlos (90,9%). Isto sugere que as VUS identificadas nos doentes provavelmente não estão relacionadas com a doença e refletem o contexto genético da população em geral. A exceção aconteceu com o gene *EGF*, onde seis doentes apresentaram variantes VUS (7,4%) e em nenhum controlo se identificou uma variante VUS (0%). O significado deste achado merece atenção, mas ainda não foi elucidado.

A oligogenia foi já amplamente documentada no HHC e é definida pela presença de variantes em dois ou mais genes, cada uma delas insuficiente para causar o distúrbio, mas que em conjunto têm um efeito cumulativo e sinérgico. A oligogenia também pode explicar porque variantes em heterozigotia, presentes em genes autossómicos

recessivos podem contribuir para a carga genética geral do HHC. Estudos anteriores relataram que a existência de oligogenia pode estar presente em até 20% dos doentes com HHC (316, 327). Porém, revisões sistemáticas recentes, após eliminação das variantes VUS, mostraram uma frequência de oligogenia muito inferior (menos de 5%) (312, 313). Tais resultados fazem crer que é possível que a oligogenia no HHC tenha sido sobrestimada no passado, devido à inclusão de variantes VUS. Este estudo identificou apenas cinco doentes (6,2%) com oligogenia envolvendo variantes patogénicas, e a frequência de oligogenia para variantes VUS foi semelhante entre doentes e controlos (54,3% e 61,6%, respetivamente). Estes achados sugerem que, na nossa coorte, seja improvável que a oligogenia tenha uma contribuição significativa na explicação do distúrbio.

Encontrou-se uma prevalência semelhante de variantes causais P ou LP nos doentes com SK e com HHCn. Este resultado contrasta com alguns estudos anteriores que relataram uma prevalência superior de variantes na SK (312, 313). Para além disso, não encontramos maior prevalência de variantes em formas mais graves de HHC, como por exemplo, quando associado a criptorquidia. Consistente com o conhecimento prévio, variantes causais P ou LP no *ANOS1* foram exclusivamente associadas à SK, enquanto variantes nos genes *GNRH1* e *GNRHR* foram exclusivamente associadas ao HHCn. No entanto, o número limitado de doentes com variantes em cada gene impediu quaisquer correlações genótipo-fenótipo adicionais.

Verificou-se que para a grande maioria dos doentes com história familiar (87,5%) foi possível estabelecer um diagnóstico genético, à semelhança do que acontece com outras doenças com causa genética.

A reversão do HHC corresponde à recuperação espontânea da função do eixo HHG. Levanta-se a hipótese que os esteróides sexuais, administrados como tratamento, possam influenciar a plasticidade da rede neuronal hipotalâmica, levando à recuperação da função dos neurónios produtores de GnRH ou que o HHC e o atraso constitucional do desenvolvimento e da puberdade sejam condições pertencentes a um espectro e a severidade das alterações genéticas influenciará em que posição do espectro o doente se situa (328). Este fenómeno vem sendo reportado na literatura com frequências que vão desde os 5% (329) até aos 10 a 20% (157, 159). Na nossa coorte quatro doentes (4,9%) experienciaram uma reversão do hipogonadismo, após interrupção da terapêutica hormonal. Em nenhum dos quatro doentes foi identificada

uma variante P ou LP, contudo todos têm variantes VUS em heterozigotia, nos genes *AMH*, *CCDC141* (em heterozigotia composta), *GLI2*, *CHD7*, *DMXL2*, *POLR3A*, *PDE3A*, *RELN* e *SEMA7A*. A variante no gene *CHD7* foi estudada funcionalmente e reclassificada como LP.

O presente estudo tem algumas limitações. O uso de critérios exigentes da ACMG-AMP para a classificação das variantes pode ter levado a uma subestimação da frequência de doentes com causa genética. Além disso, a identificação de um grande número de VUS apresenta desafios de interpretação e estas podem exigir reclassificação à medida que mais evidências vão estando disponíveis. Ainda, as CNVs não foram analisadas. Embora sabendo que estas variantes possam ter sido perdidas pela análise do WES, a sua contribuição para o diagnóstico molecular desta patologia é geralmente limitada (269, 326). Por último, não foram realizados estudos funcionais para elucidar as consequências de todas as variantes VUS identificadas.

Os estudos funcionais são uma ferramenta essencial na genética moderna, permitindo que a informação genética seja interpretada de forma mais precisa, promovendo melhores cuidados ao doente e conduzindo ao desenvolvimento do conhecimento científico. Estes são cruciais para investigar a consequência de VUS, e assim ajudar a determinar se essas variantes são patogénicas ou benignas.

As variantes sinónimas ou localizadas a mais de dois nucleótidos da região codificante, são de difícil classificação, contudo, têm o potencial de alterar o mecanismo de *splicing*. Recorreu-se então a estudos *in vitro*, com vista a investigar variantes muito raras, sinónimas ou localizadas até 10 nucleótidos dos exões.

O mecanismo de *splicing* é fundamental para o correto funcionamento das proteínas e para a regulação genética. Este é o processo pelo qual os intrões, que são sequências não codificantes de ARN, são removidos do transcrito primário, e os exões, que são as sequências codificantes, são unidos para formar o ARNm maduro. Por sua vez, esse ARNm maduro será traduzido numa proteína funcional. O *splicing* alternativo de exões permite aumentar a diversidade proteica, através da produção de múltiplas proteínas a partir de um único gene, e também atua como um mecanismo de regulação da expressão genética. Dependendo das condições celulares ou dos sinais externos, a célula pode adaptar o *splicing*, influenciando qual a isoforma da proteína a ser produzida e em que quantidade. Isto é crucial para a adaptação celular e a resposta a diferentes estímulos. As alterações nas sequências consenso de *splicing* (5' ss, BPS,

PPT ou 3' ss), o aparecimento de locais de *splicing* ectópicos ou a ativação de locais de *splicing* cripticos, podem resultar em proteínas defeituosas ou disfuncionais e são frequentemente associados a doenças (202-204, 330, 331). Estas alterações podem ser causadas por variantes *missense* (201, 332), assim como por variantes sinónimas (196). Aliás, a convicção de que as variantes sinónimas são neutras foi sendo abandonada à medida que foi aumentando o conhecimento sobre a síntese e conformação proteica. A consequência poderá ser a retenção de parte ou totalidade da sequência intrónica no ARNm ou a exclusão de parte ou da totalidade da sequência exónica do ARNm (*skipping* do exão) resultando em *splicing* incorreto e consequentemente em proteínas truncadas ou disfuncionais (196, 199).

As construções “minigenes” são versões simplificadas de um gene, construídas artificialmente, nos quais a maioria das sequências não essenciais não estão presentes. Eles são tradicionalmente utilizados para estudos de *splicing* (283). Os minigenes são significativamente menores do que os seus homólogos completos, tornando-os mais fáceis de manipular em estudos de mutagénesis e permitindo a transfeção e estudo em modelos celulares *in vitro*. Neste projeto, minigenes foram criados com vista a expressar os diferentes exões onde as variantes em estudo foram identificadas, flanqueados pelos exões intrínsecos do vetor pcAT7Glo1. Cada um desses minigenes foi transitoriamente transfetado na linha celular COS-7.

A variante *missense* c.4354G>T p.(Val1452Leu), no gene *CHD7*, identificada pela primeira vez num doente afetado pela SK, cujo hipogonadismo foi revertido após interrupção da terapêutica com testosterona, encontra-se localizada no primeiro nucleótido do exão 19 e foi classificada como VUS.

Fu et al. (333) relataram que variantes que afetam o primeiro nucleótido de um exão (E+1) podem causar doença, mas que raramente são estudadas. Afirmaram que na presença de uma variante no primeiro nucleótido, a existência de 15 ou mais pirimidinas no intrão a montante do exão, no trato de polipirimidinas (PPT), garante um *splicing* normal, enquanto 10 ou menos pirimidinas predispõem ao *splicing* aberrante (333). O trato de polipirimidinas, que precede o exão 19 do *CHD7*, tem apenas sete pirimidinas consecutivas, ...5' TATTTTAAATATTTCTCTAAAACAG 3'..., (o sublinhado identifica as pirimidinas), predispondo este exão a um padrão de *splicing* aberrante na presença de uma variante no primeiro nucleótido.

Com base no conhecimento sobre como a composição do PPT afeta o *splicing*, Joudaki et al. (310), desenvolveram uma ferramenta *in silico* baseada na web que utiliza um modelo para prever as consequências de SNVs que afetam o E+1 G de um exão, denominada FexSplice. Esta ferramenta previu que a variante c.4354G>Tp.(Val1452Leu), no *CHD7* é patogénica, com uma pontuação de probabilidade de 0,995.

O nosso estudo *in vitro* por minigene demonstrou que a variante *missense* teve um efeito disruptivo no *splicing*. No entanto, este efeito foi apenas parcial, resultando em dois transcritos, um que inclui o exão 19 do *CHD7* e o outro com *exon-skipping*, numa proporção de 59% e 41%, respetivamente. Isto indica que a variante reduz a eficiência do *splicing* do exão 19, sem o abolir completamente. Prevê-se que a sua transcrição completa produza uma proteína *CHD7* com uma alteração *missense* no resíduo 1452 (p.Val1452Leu). No entanto, é improvável que esta alteração de aminoácido seja patogénica por si só, já que a valina e a leucina são aminoácidos apolares, semelhantes, e que ferramentas de previsão computacional indicam um efeito neutro da alteração deste aminoácido (307-309). Além disso, não houve relatos publicados de outras alterações de aminoácidos neste local. Isto sugere que o efeito patogénico da variante não se deve à alteração do aminoácido, mas sim ao efeito disruptivo no *splicing* do ARN. O efeito disruptivo da variante pode ser parcialmente mitigado pela produção de uma proteína *missense* funcional, levando a um impacto global mais suave em comparação com mutações típicas nos locais de *splicing*. Isso pode explicar por que o nosso doente apresentava apenas hipogonadismo, sem o fenótipo mais complexo da Síndrome de CHARGE, que geralmente está associada a variantes mais deletérias do *CHD7* (208). Para mais, o nosso doente mostrou reversão do hipogonadismo aos 33 anos, sugerindo um impacto menos grave da variante, no fenótipo reprodutivo. A reversão do hipogonadismo hipogonadotrófico, após a descontinuação do tratamento, está frequentemente associada a um fenótipo reprodutivo mais leve (157, 334). Quando a reversão acontece, o corpo começa a produzir níveis suficientes de gonadotrofinas e hormonas sexuais sem a necessidade de terapia de reposição hormonal. A causa exata desta reversão não é totalmente compreendida, mas acredita-se que fatores genéticos, influências ambientais e até mesmo aspetos específicos do tratamento possam contribuir para a reativação do eixo HHG nalguns doentes (157, 334). Assim, o nosso estudo funcional sugere uma possível explicação para a associação entre a variante no *CHD7* e o fenótipo do doente. Contudo, não foram realizadas avaliações funcionais ao nível da proteína, deixando

alguma incerteza sobre os efeitos, tanto da variante *missense*, como da deleção *in-frame*, para a função da proteína CHD7.

As VUS são frequentemente identificadas nos testes genéticos, mas muitas vezes permanecem sem interpretação, na ausência de validação experimental (318). A reclassificação desta variante, de VUS para LP, evidencia a importância dos estudos funcionais para o apuramento do significado clínico das variantes genéticas, de forma a aumentar a compreensão sobre o seu papel nas doenças humanas e a melhorar o diagnóstico genético.

Relativamente às restantes variantes testadas por minigene, observámos que as variantes descritas na **Tabela 6** não mostraram ter impacto no mecanismo de *splicing*, no modelo utilizado. Os resultados podem ser consultados no **Anexo 10**. Quanto às variantes que não expressaram o exão em estudo, estas estão descritas na **Tabela 7** e os resultados podem ser consultados no **Anexo 11**. Especula-se que a falha no reconhecimento do exão clonado possa dever-se à ausência de elementos reguladores intrónicos, importantes na interação com a maquinaria de *splicing*, à competição com locais de *splicing* mais fortes ou a diferenças nas condições celulares do sistema experimental, quando comparado com a célula nativa. Torna-se, portanto, importante ressaltar que os minigenes são simplificações do contexto genético completo, não replicando com exatidão todos os elementos regulatórios e o ambiente genómico original.

As limitações do método de minigene estão muito ligadas à dependência de ensaios *in vitro*, que podem não replicar completamente a expressão natural e as condições originais de *splicing* nos tecidos humanos. Neste ambiente simplificado, falta o contexto específico do tecido, temos artefactos derivados da sobreexpressão do exão de interesse, ausência de regulação temporal do gene e uma possível diferença de expressão entre espécies.



## 5. Conclusões

Esta tese começou com o estudo das variantes germinativas encontradas por WES numa coorte de 81 doentes com HHC. Utilizou-se como abordagem, um painel virtual composto por 169 genes previamente implicados na etiologia da doença. Encontraram-se variantes causais, patogénicas (P) ou provavelmente patogénicas (LP), em 24 (29,6%) dos 81 doentes.

Estas variantes encontraram-se distribuídas em dez dos 169 genes analisados: *GNRHR* (7,4%), *FGFR1* (6,2%), *ANOS1* e *CHD7* (3,7%, cada), *PROK2* (2,5%), *ARHGAP5*, *DCC*, *GNRH1*, *PROKR2* e *WDR11* (1,2%, cada).

Verificou-se que, para a grande maioria dos doentes com história familiar (87,5%), foi possível estabelecer um diagnóstico genético. Porém, a convicção de que aumentando o painel virtual de genes resultaria no aumento da taxa de diagnóstico genético, não foi confirmada. Contudo, é de destacar que neste estudo, o espectro mutacional do distúrbio foi expandido após identificação de várias variantes novas.

A maioria das variantes identificadas nas coortes de doentes e controlos foram variantes VUS, contudo, a sua frequência nos doentes não diferiu significativamente da dos controlos. Concluímos assim, que a maioria destas variantes raras não estão relacionadas com o fenótipo estudado, refletindo provavelmente o fundo genético da população portuguesa. A exceção identificou-se no gene *EGF* que apresenta um valor significativamente superior de doentes com variantes, comparativamente com a coorte controlo, onde não foi encontrada nenhuma variante VUS neste gene.

Neste estudo, o número de doentes com variantes P ou LP em dois genes diferentes (oligogenia) representou apenas 6,2%.

A frequência de variantes causais identificadas nos doentes com HHCn comparativamente com os doentes com SK não foi significativamente diferente.

A caracterização funcional de variantes VUS na estrutura, função e expressão proteica é essencial para a classificação destas. Os ensaios para testar o mecanismo de *splicing* continuam a ser uma ferramenta valiosa para um rastreio inicial. O estudo *in vitro* da

variante VUS c.4354G>T p.(Val1452Leu), no gene *CHD7*, aumentou a taxa de diagnóstico genético para 30,9%, demonstrando a pertinência dos estudos funcionais com variantes VUS, para a sua reclassificação.

O desenvolvimento pubertário permanece pouco compreendido, com grandes e óbvias lacunas na literatura. Isto deve-se em grande parte, à enorme complexidade da anatomia do eixo HHG e à expressão genética complexa durante o seu desenvolvimento e funcionamento. No entanto, o estudo de patologias, identifica muitas vezes os componentes cruciais de um mecanismo fisiológico, ajuda a compreender como diferentes sistemas do corpo interagem e facilita a descoberta de mecanismos de redundância ou compensatórios. Portanto, a pertinência deste estudo prendeu-se com a vontade de conhecer a arquitetura genética dos doentes portugueses com esta condição, mas também com a vontade de descobrir novos dados sobre o processo fisiológico da puberdade. A complexidade e heterogeneidade da arquitetura genética foram confirmados neste estudo e destacam os desafios na compreensão desse processo.

À luz do conhecimento atual, pode afirmar-se que o início da puberdade não pode ser atribuído à ativação de um único gene, via de sinalização ou circuito neuronal. No entanto, há variantes raras num único gene que resultam em falha, atraso ou aceleração do início da puberdade. Assim para melhor compreendermos este mecanismo, é fundamental compreendermos a função de cada um dos intervenientes.

Concluindo, é valiosa a compreensão da base genética do HHC, seja para estabelecer o diagnóstico e/ou o prognóstico, para ajudar no aconselhamento genético e tratamento, seja para o esclarecimento de processos biológicos, seja potencialmente, para o desenvolvimento de terapias dirigidas no futuro.

## **6. Perspetivas futuras**

No futuro ambiciona-se aumentar a taxa de diagnóstico genético dos doentes com HHC, de modo a proporcionar um adequado tratamento e aconselhamento genético a mais doentes.

As áreas do conhecimento relacionadas com a genética aplicada à medicina, com a regulação da expressão genética e com a análise computacional de dados estão a passar por um crescimento sem precedentes. Este é impulsionado, em grande parte, pela revolução da NGS. Com a evolução, vêm desafios associados.

No diagnóstico genético, um dos principais desafios está na interpretação do grande número de variantes genéticas identificadas. Ainda mais, no futuro, prevê-se que se deixem de aplicar painéis genéticos, para passar à sequenciação completa do genoma (WGS). Assim, será avultada a quantidade de variantes identificadas, sendo que estas têm relevância clínica pelo seu potencial em explicar a doença. Para melhor caracterizar cada uma dessas variantes, antevê-se que a ciência da computação de dados terá o desafio de conseguir extrair significado de cada uma delas. Os estudos funcionais, por seu lado, terão o desafio de clarificar qual o papel das diferentes sequências de ADN, sejam elas codificantes ou não codificantes. Cada um desses desafios traz novas oportunidades de investigação.

Considerando que regularmente são publicados diversos estudos sobre novos genes com potencial ou evidência de serem causais do HHC, será especialmente importante realizar uma revisão regular da análise genética, incluindo a revisão da lista de genes utilizada.



## **7. Referências bibliográficas**

1. Wu T, Mendola P, Buck GM. Ethnic differences in the presence of secondary sex characteristics and menarche among US girls: the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Pediatrics*. 2002;110(4):752-7.
2. Howard SR, Dunkel L. Delayed Puberty-Phenotypic Diversity, Molecular Genetic Mechanisms, and Recent Discoveries. *Endocr Rev*. 2019;40(5):1285-317.
3. Parent AS, Teilmann G, Juul A, Skakkebaek NE, Toppari J, Bourguignon JP. The timing of normal puberty and the age limits of sexual precocity: variations around the world, secular trends, and changes after migration. *Endocr Rev*. 2003;24(5):668-93.
4. Palmert MR, Boepple PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(6):2364-8.
5. Silventoinen K, Haukka J, Dunkel L, Tynelius P, Rasmussen F. Genetics of pubertal timing and its associations with relative weight in childhood and adult height: the Swedish Young Male Twins Study. *Pediatrics*. 2008;121(4):e885-91.
6. Sørensen K, Juul A, Christensen K, Skytthe A, Scheike T, Kold Jensen T. Birth size and age at menarche: a twin perspective. *Hum Reprod*. 2013;28(10):2865-71.
7. Wehkalampi K, Silventoinen K, Kaprio J, Dick DM, Rose RJ, Pulkkinen L, et al. Genetic and environmental influences on pubertal timing assessed by height growth. *Am J Hum Biol*. 2008;20(4):417-23.
8. Largo RH, Prader A. Pubertal development in Swiss boys. *Helv Paediatr Acta*. 1983;38(3):211-28.
9. Largo RH, Prader A. Pubertal development in Swiss girls. *Helv Paediatr Acta*. 1983;38(3):229-43.
10. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child*. 1969;44(235):291-303.
11. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child*. 1970;45(239):13-23.
12. Roche AF, Wellens R, Attie KM, Siervogel RM. The timing of sexual maturation in a group of US white youths. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1995;8(1):11-8.
13. Zevin EL, Eugster EA. Central precocious puberty: a review of diagnosis, treatment, and outcomes. *Lancet Child Adolesc Health*. 2023;7(12):886-96.
14. Boehm U, Bouloux PM, 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.

15. Forni PE, Wray S. GnRH, anosmia and hypogonadotropic hypogonadism – Where are we? *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2015;36:165-77.
16. Freamat M, Sower SA. Integrative neuro-endocrine pathways in the control of reproduction in lamprey: a brief review. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4:151.
17. Roch GJ, Busby ER, Sherwood NM. GnRH receptors and peptides: Skating backward. *General and Comparative Endocrinology*. 2014;209:118-34.
18. Uchida K, Moriyama S, Chiba H, Shimotani T, Honda K, Miki M, et al. Evolutionary origin of a functional gonadotropin in the pituitary of the most primitive vertebrate, hagfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(36):15832-7.
19. Zohar Y, Muñoz-Cueto JA, Elizur A, Kah O. Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*. 2010;165(3):438-55.
20. Herting MM, Sowell ER. Puberty and structural brain development in humans. *Front Neuroendocrinol*. 2017;44:122-37.
21. Xie Y, Dorsky RI. Development of the hypothalamus: conservation, modification and innovation. *Development*. 2017;144(9):1588-99.
22. Markakis EA. Development of the neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol*. 2002;23(3):257-91.
23. Romanov RA, Alpár A, Hökfelt T, Harkany T. Unified Classification of Molecular, Network, and Endocrine Features of Hypothalamic Neurons. *Annu Rev Neurosci*. 2019;42:1-26.
24. Saper CB, Lowell BB. The hypothalamus. *Curr Biol*. 2014;24(23):R1111-6.
25. Casoni F, Malone SA, Belle M, Luzzati F, Collier F, Allet C, et al. Development of the neurons controlling fertility in humans: new insights from 3D imaging and transparent fetal brains. *Development*. 2016;143(21):3969-81.
26. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*. 1989;338(6211):161-4.
27. Wray S, Grant P, Gainer H. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA in the mouse are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(20):8132-6.
28. Constantin S. Physiology of the gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neurone: studies from embryonic GnRH neurones. *J Neuroendocrinol*. 2011;23(6):542-53.
29. Stevenson EL, Corella KM, Chung WC. Ontogenesis of gonadotropin-releasing hormone neurons: a model for hypothalamic neuroendocrine cell development. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2013;4:89.

30. Campbell HJ, Gallardo E. Gonadotrophin-releasing activity of the median eminence at different ages. *J Physiol.* 1966;186(3):689-97.
31. Schally AV, Arimura A, Kastin AJ, Matsuo H, Baba Y, Redding TW, et al. Gonadotropin-releasing hormone: one polypeptide regulates secretion of luteinizing and follicle-stimulating hormones. *Science.* 1971;173(4001):1036-8.
32. Duan C, Allard J. Gonadotropin-releasing hormone neuron development in vertebrates. *Gen Comp Endocrinol.* 2020;292:113465.
33. Balasubramanian R, Dwyer A, Seminara SB, Pitteloud N, Kaiser UB, Crowley WF, Jr. Human GnRH deficiency: a unique disease model to unravel the ontogeny of GnRH neurons. *Neuroendocrinology.* 2010;92(2):81-99.
34. de San Juan AM, Teratologia A. Falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existia una atrofia congenita de los testiculos y miembro viril. *Siglo Medico.* 1856;131:211.
35. Kallmann F. The genetic aspect of primary eunuchoidism. *Am J Ment Defic.* 1944;48:203-36.
36. Bianco SD, Kaiser UB. The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Rev Endocrinol.* 2009;5(10):569-76.
37. Laitinen EM, Vaaralahti K, Tommiska J, Eklund E, Tervaniemi M, Valanne L, et al. Incidence, phenotypic features and molecular genetics of Kallmann syndrome in Finland. *Orphanet J Rare Dis.* 2011;6:41.
38. Silveira LF, Latronico AC. Approach to the patient with hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):1781-8.
39. Costa-Barbosa FA, Balasubramanian R, Keefe KW, Shaw ND, Al-Tassan N, Plummer L, et al. Prioritizing genetic testing in patients with Kallmann syndrome using clinical phenotypes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(5):E943-53.
40. Javorsky BR, Aron DC, Findling JW, Tyrrell JB. Chapter 4. Hypothalamus and Pituitary Gland. In: Gardner DG, Shoback D, editors. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, 9e. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2011.
41. Ribeiro RS, Abucham J. [Kallmann syndrome: a historical [corrected] clinical and molecular review]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(1):8-17.
42. AM dSJ. Falta total de los nervios olfatorios con anosmia en un individuo en quien existia una atrofia congénita de los testiculos y miembro viril. *Siglo Medico.* 1856:131:211.
43. Legouis R, Hardelin JP, Leveilliers J, Claverie JM, Compain S, Wunderle V, et al. The candidate gene for the X-linked Kallmann syndrome encodes a protein related to adhesion molecules. *Cell.* 1991;67(2):423-35.
44. Meitinger T, Heye B, Petit C, Leveilliers J, Golla A, Moraine C, et al. Definitive localization of X-linked Kallman syndrome (hypogonadotropic hypogonadism and

anosmia) to Xp22.3: close linkage to the hypervariable repeat sequence CRI-S232. *Am J Hum Genet.* 1990;47(4):664-9.

45. Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW. Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature.* 1989;338(6211):161-4.

46. Cariboni A, Pimpinelli F, Colamarino S, Zaninetti R, Piccolella M, Rumio C, et al. The product of X-linked Kallmann's syndrome gene (KAL1) affects the migratory activity of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. *Hum Mol Genet.* 2004;13(22):2781-91.

47. Lutz B, Kuratani S, Rugarli EI, Wawersik S, Wong C, Bieber FR, et al. Expression of the Kallmann syndrome gene in human fetal brain and in the manipulated chick embryo. *Hum Mol Genet.* 1994;3(10):1717-23.

48. Rugarli EI. Kallmann syndrome and the link between olfactory and reproductive development. *Am J Hum Genet.* 1999;65(4):943-8.

49. Dodé C, Hardelin JP. Kallmann syndrome: fibroblast growth factor signaling insufficiency? *J Mol Med (Berl).* 2004;82(11):725-34.

50. Albuisson J, Pêcheux C, Carel JC, Lacombe D, Leheup B, Lapuzina P, et al. Kallmann syndrome: 14 novel mutations in KAL1 and FGFR1 (KAL2). *Hum Mutat.* 2005;25(1):98-9.

51. Oliveira LM, Seminara SB, Beranova M, Hayes FJ, Valkenburgh SB, Schipani E, et al. The importance of autosomal genes in Kallmann syndrome: genotype-phenotype correlations and neuroendocrine characteristics. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1532-8.

52. Lima Amato LG, Latronico AC, Gontijo Silveira LF. Molecular and Genetic Aspects of Congenital Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2017;46(2):283-303.

53. Tsai PS, Gill JC. Mechanisms of disease: Insights into X-linked and autosomal-dominant Kallmann syndrome. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2(3):160-71.

54. Dodé C, Levilliers J, Dupont JM, 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.

55. Falardeau J, Chung WC, Beenken A, Raivio T, Plummer L, Sidis Y, et al. Decreased FGF8 signaling causes deficiency of gonadotropin-releasing hormone in humans and mice. *J Clin Invest.* 2008;118(8):2822-31.

56. Chung WC, Matthews TA, Tata BK, Tsai PS. Compound deficiencies in multiple fibroblast growth factor signalling components differentially impact the murine gonadotrophin-releasing hormone system. *J Neuroendocrinol.* 2010;22(8):944-50.

57. Topaloglu AK, Kotan LD. Genetics of Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Dev.* 2016;29:36-49.

58. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem.* 2006;281(23):15694-700.
59. Tsai PS, Brooks LR, Rochester JR, Kavanaugh SI, Chung WC. Fibroblast growth factor signaling in the developing neuroendocrine hypothalamus. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(1):95-107.
60. Lund C, Yellapragada V, Vuoristo S, Balboa D, Trova S, Allet C, et al. Characterization of the human GnRH neuron developmental transcriptome using a GNRH1-TdTomato reporter line in human pluripotent stem cells. *Dis Model Mech.* 2020;13(3).
61. Miraoui H, Dwyer AA, 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.* 2013;92(5):725-43.
62. Zhang J, Tang SY, Zhu XB, Li P, Lu JQ, Cong JS, et al. Whole exome sequencing and trio analysis to broaden the variant spectrum of genes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Asian J Androl.* 2021;23(3):288-93.
63. Dodé C, Teixeira L, Levilliers J, Fouveaut C, Bouchard P, Kottler ML, et al. Kallmann syndrome: mutations in the genes encoding prokineticin-2 and prokineticin receptor-2. *PLoS Genet.* 2006;2(10):e175.
64. Pitteloud N, Zhang C, Pignatelli D, Li JD, Raivio T, Cole LW, et al. Loss-of-function mutation in the prokineticin 2 gene causes Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(44):17447-52.
65. 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.
66. Monnier C, Dodé C, Fabre L, Teixeira L, Labesse G, Pin JP, et al. PROKR2 missense mutations associated with Kallmann syndrome impair receptor signalling activity. *Hum Mol Genet.* 2009;18(1):75-81.
67. Ng KL, Li JD, Cheng MY, Leslie FM, Lee AG, Zhou QY. Dependence of olfactory bulb neurogenesis on prokineticin 2 signaling. *Science.* 2005;308(5730):1923-7.
68. Wierman ME, Kiseljak-Vassiliades K, Tobet S. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuron migration: initiation, maintenance and cessation as critical steps to ensure normal reproductive function. *Front Neuroendocrinol.* 2011;32(1):43-52.
69. 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.
70. Abreu AP, Trarbach EB, de Castro M, Frade Costa EM, Versiani B, Matias Baptista MT, et al. Loss-of-function mutations in the genes encoding prokineticin-2 or

prokineticin receptor-2 cause autosomal recessive Kallmann syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(10):4113-8.

71. Li S, Zhao Y, Nie M, Yang Y, Hao M, Mao J, et al. Comparison of Clinical Characteristics and Spermatogenesis in CHH Patients Caused by PROKR2 and FGFR1 Mutations. *Reprod Sci.* 2021;28(11):3219-27.

72. Sarfati J, Guiochon-Mantel A, Rondard P, Arnulf I, Garcia-Piñero A, Wolczynski S, et al. A comparative phenotypic study of kallmann syndrome patients carrying monoallelic and biallelic mutations in the prokineticin 2 or prokineticin receptor 2 genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(2):659-69.

73. Maione L, Dwyer AA, Francou B, Guiochon-Mantel A, Binart N, Bouligand J, et al. GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic counseling for congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome: new challenges in the era of oligogenism and next-generation sequencing. *Eur J Endocrinol.* 2018;178(3):R55-r80.

74. 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.

75. Kim HG, Kurth I, Lan F, Meliciani I, Wenzel W, Eom SH, et al. Mutations in CHD7, encoding a chromatin-remodeling protein, cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet.* 2008;83(4):511-9.

76. Bouligand J, Ghervan C, Trabado S, Brailly-Tabard S, Guiochon-Mantel A, Young J. Genetics defects in GNRH1: a paradigm of hypothalamic congenital gonadotropin deficiency. *Brain Res.* 2010;1364:3-9.

77. Chan YM, de Guillebon A, Lang-Muritano M, Plummer L, Cerrato F, Tsiaras S, et al. GNRH1 mutations in patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(28):11703-8.

78. Cheng CK, Leung PC. Molecular biology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-I, GnRH-II, and their receptors in humans. *Endocr Rev.* 2005;26(2):283-306.

79. Cioppi F, Riera-Escamilla A, Manilall A, Guarducci E, Todisco T, Corona G, et al. Genetics of nCHH: from a peculiar inheritance of a novel GNRHR mutation to a comprehensive review of the literature. *Andrology.* 2019;7(1):88-101.

80. Poling MC, Kauffman AS. Organizational and activational effects of sex steroids on kisspeptin neuron development. *Front Neuroendocrinol.* 2013;34(1):3-17.

81. Tena-Sempere M. Roles of kisspeptins in the control of hypothalamic-gonadotropic function: focus on sexual differentiation and puberty onset. *Endocr Dev.* 2010;17:52-62.

82. Navarro VM, Fernández-Fernández R, Castellano JM, Roa J, Mayen A, Barreiro ML, et al. Advanced vaginal opening and precocious activation of the reproductive axis by KiSS-1 peptide, the endogenous ligand of GPR54. *J Physiol.* 2004;561(Pt 2):379-86.

83. Plant TM, Barker-Gibb ML. Neurobiological mechanisms of puberty in higher primates. *Hum Reprod Update*. 2004;10(1):67-77.
84. Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS, Jr., Shagoury JK, et al. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *N Engl J Med*. 2003;349(17):1614-27.
85. Kramer PR, Wray S. Novel gene expressed in nasal region influences outgrowth of olfactory axons and migration of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons. *Genes Dev*. 2000;14(14):1824-34.
86. Miura K, Acierno JS, Jr., Seminara SB. Characterization of the human nasal embryonic LHRH factor gene, NELF, and a mutation screening among 65 patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism (IHH). *J Hum Genet*. 2004;49(5):265-8.
87. Pitteloud N, Quinton R, Pearce S, Raivio T, Acierno J, Dwyer A, et al. Digenic mutations account for variable phenotypes in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Invest*. 2007;117(2):457-63.
88. Xu N, Kim HG, Bhagavath B, Cho SG, Lee JH, Ha K, et al. Nasal embryonic LHRH factor (NELF) mutations in patients with normosmic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(5):1613-20.e1-7.
89. Topaloglu AK, Reimann F, Guclu M, Yalin AS, Kotan LD, Porter KM, et al. TAC3 and TACR3 mutations in familial hypogonadotropic hypogonadism reveal a key role for Neurokinin B in the central control of reproduction. *Nat Genet*. 2009;41(3):354-8.
90. Krajewski SJ, Anderson MJ, Iles-Shih L, Chen KJ, Urbanski HF, Rance NE. Morphologic evidence that neurokinin B modulates gonadotropin-releasing hormone secretion via neurokinin 3 receptors in the rat median eminence. *J Comp Neurol*. 2005;489(3):372-86.
91. de Roux N, Genin E, Carel JC, Matsuda F, Chaussain JL, Milgrom E. Hypogonadotropic hypogonadism due to loss of function of the KiSS1-derived peptide receptor GPR54. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(19):10972-6.
92. Gianetti E, Tusset C, Noel SD, Au MG, Dwyer AA, Hughes VA, et al. TAC3/TACR3 mutations reveal preferential activation of gonadotropin-releasing hormone release by neurokinin B in neonatal life followed by reversal in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(6):2857-67.
93. Valdes-Socin H, Rubio Almanza M, Tomé Fernández-Ladreda M, Debray FG, Bours V, Beckers A. Reproduction, smell, and neurodevelopmental disorders: genetic defects in different hypogonadotropic hypogonadal syndromes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:109.
94. Kim HG, Ahn JW, Kurth I, Ullmann R, Kim HT, Kulharya A, et al. WDR11, a WD protein that interacts with transcription factor EMX1, is mutated in idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*. 2010;87(4):465-79.

95. Ayers KL, Bouty A, Robevska G, van den Bergen JA, Juniarto AZ, Listyasari NA, et al. Variants in congenital hypogonadotrophic hypogonadism genes identified in an Indonesian cohort of 46,XY under-virilised boys. *Hum Genomics*. 2017;11(1):1.
96. Tornberg J, Sykiotis GP, Keefe K, Plummer L, Hoang X, Hall JE, et al. Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 1, a gene involved in extracellular sugar modifications, is mutated in patients with idiopathic hypogonadotrophic hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(28):11524-9.
97. Messina A, Ferraris N, Wray S, Cagnoni G, Donohue DE, Casoni F, et al. Dysregulation of Semaphorin7A/ $\beta$ 1-integrin signaling leads to defective GnRH-1 cell migration, abnormal gonadal development and altered fertility. *Hum Mol Genet*. 2011;20(24):4759-74.
98. Cariboni A, Davidson K, Rakic S, Maggi R, Parnavelas JG, Ruhrberg C. Defective gonadotropin-releasing hormone neuron migration in mice lacking SEMA3A signalling through NRP1 and NRP2: implications for the aetiology of hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Mol Genet*. 2011;20(2):336-44.
99. Young J, Metay C, Bouligand J, Tou B, Francou B, Maione L, et al. SEMA3A deletion in a family with Kallmann syndrome validates the role of semaphorin 3A in human puberty and olfactory system development. *Hum Reprod*. 2012;27(5):1460-5.
100. Dai W, Li JD, Zhao Y, Wu J, Jiang F, Chen DN, et al. Functional analysis of SEMA3A variants identified in Chinese patients with isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Genet*. 2020;97(5):696-703.
101. 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.
102. Käsäkoski J, Fagerholm R, Laitinen EM, Vaaralahti K, Hackman P, Pitteloud N, et al. Mutation screening of SEMA3A and SEMA7A in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Pediatr Res*. 2014;75(5):641-4.
103. Eckler MJ, McKenna WL, Taghvaei S, McConnell SK, Chen B. *Fezf1* and *Fezf2* are required for olfactory development and sensory neuron identity. *J Comp Neurol*. 2011;519(10):1829-46.
104. Kotan LD, Hutchins BI, Ozkan Y, Demirel F, Stoner H, Cheng PJ, et al. Mutations in FEZF1 cause Kallmann syndrome. *Am J Hum Genet*. 2014;95(3):326-31.
105. Talmadge K, Vamvakopoulos NC, Fiddes JC. Evolution of the genes for the beta subunits of human chorionic gonadotropin and luteinizing hormone. *Nature*. 1984;307(5946):37-40.
106. Albanese C, Colin IM, Crowley WF, Ito M, Pestell RG, Weiss J, et al. The gonadotropin genes: evolution of distinct mechanisms for hormonal control. *Recent Prog Horm Res*. 1996;51:23-58; discussion 9-61.
107. Basciani S, Watanabe M, Mariani S, Passeri M, Persichetti A, Fiore D, et al. Hypogonadism in a patient with two novel mutations of the luteinizing hormone  $\beta$ -

subunit gene expressed in a compound heterozygous form. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):3031-8.

108. Lofrano-Porto A, Barra GB, Giacomini LA, Nascimento PP, Latronico AC, Casulari LA, et al. Luteinizing hormone beta mutation and hypogonadism in men and women. *N Engl J Med.* 2007;357(9):897-904.

109. Song JW, Hwang HJ, Lee CM, Park GH, Kim CS, Lee SJ, et al. Hypogonadotropic hypogonadism due to a mutation in the luteinizing hormone  $\beta$ -subunit gene. *Korean J Intern Med.* 2018;33(3):638-41.

110. Valdes-Socin H, Salvi R, Daly AF, Gaillard RC, Quatresooz P, Tebeu PM, et al. Hypogonadism in a patient with a mutation in the luteinizing hormone beta-subunit gene. *N Engl J Med.* 2004;351(25):2619-25.

111. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW, Harris PE, Crowley WF, Jameson JL. Hypogonadism caused by a single amino acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med.* 1992;326(3):179-83.

112. Messina A, Pulli K, Santini S, Acierno J, Käsäkoski J, Cassatella D, et al. Neuron-Derived Neurotrophic Factor Is Mutated in Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2020;106(1):58-70.

113. Tamaoka S, Suzuki E, Hattori A, Ogata T, Fukami M, Katoh-Fukui Y. NDNF variants are rare in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Genome Var.* 2021;8(1):5.

114. Davis EE, Balasubramanian R, Kupchinsky ZA, Keefe DL, Plummer L, Khan K, et al. TCF12 haploinsufficiency causes autosomal dominant Kallmann syndrome and reveals network-level interactions between causal loci. *Hum Mol Genet.* 2020;29(14):2435-50.

115. Schmid T, Boehm U, Braun T. GnRH neurogenesis depends on embryonic pheromone receptor expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;518:111030.

116. Topaloglu AK, Simsek E, Kocher MA, Mammadova J, Bober E, Kotan LD, et al. Inactivating NHLH2 variants cause idiopathic hypogonadotropic hypogonadism and obesity in humans. *Hum Genet.* 2022;141(2):295-304.

117. Keen KL, Petersen AJ, Figueroa AG, Fordyce BI, Shin J, Yadav R, et al. Physiological Characterization and Transcriptomic Properties of GnRH Neurons Derived From Human Stem Cells. *Endocrinology.* 2021;162(9).

118. Brouns MR, Matheson SF, Hu KQ, Delalle I, Caviness VS, Silver J, et al. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development.* 2000;127(22):4891-903.

119. Brouns MR, Matheson SF, Settleman J. p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(4):361-7.

120. Matheson SF, Hu KQ, Brouns MR, Sordella R, VanderHeide JD, Settleman J. Distinct but overlapping functions for the closely related p190 RhoGAPs in neural development. *Dev Neurosci*. 2006;28(6):538-50.
121. Burbelo PD, Miyamoto S, Utani A, Brill S, Yamada KM, Hall A, et al. p190-B, a new member of the Rho GAP family, and Rho are induced to cluster after integrin cross-linking. *J Biol Chem*. 1995;270(52):30919-26.
122. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*. 2020;581(7809):434-43.
123. Lippincott MF, Xu W, Smith AA, Miao X, Lafont A, Shennib O, et al. The p190 RhoGAPs, ARHGAP35, and ARHGAP5 are implicated in GnRH neuronal development: Evidence from patients with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, zebrafish, and in vitro GAP activity assay. *Genet Med*. 2022;24(12):2501-15.
124. Cho HJ, Gurbuz F, Stamou M, Kotan LD, Farmer SM, Can S, et al. POU6F2 mutation in humans with pubertal failure alters GnRH transcript expression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1203542.
125. Louden ED, Poch A, Kim HG, Ben-Mahmoud A, Kim SH, Layman LC. Genetics of hypogonadotropic Hypogonadism-Human and mouse genes, inheritance, oligogenicity, and genetic counseling. *Mol Cell Endocrinol*. 2021;534:111334.
126. de Roux N, Young J, Misrahi M, Genet R, Chanson P, Schaison G, et al. A family with hypogonadotropic hypogonadism and mutations in the gonadotropin-releasing hormone receptor. *N Engl J Med*. 1997;337(22):1597-602.
127. Layman LC, Cohen DP, Jin M, Xie J, Li Z, Reindollar RH, et al. Mutations in gonadotropin-releasing hormone receptor gene cause hypogonadotropic hypogonadism. *Nat Genet*. 1998;18(1):14-5.
128. Franco B, Guioli S, Pragliola A, Incerti B, Bardoni B, Tonlorenzi R, et al. A gene deleted in Kallmann's syndrome shares homology with neural cell adhesion and axonal path-finding molecules. *Nature*. 1991;353(6344):529-36.
129. Lomniczi A, Loche A, Castellano JM, Ronnekleiv OK, Bosch M, Kaidar G, et al. Epigenetic control of female puberty. *Nat Neurosci*. 2013;16(3):281-9.
130. Crisóstomo L, Pereira SC, Monteiro MP, Raposo JF, Oliveira PF, Alves MG. Lifestyle, metabolic disorders and male hypogonadism – A one-way ticket? *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2020;516:110945.
131. Morrison KE, Rodgers AB, Morgan CP, Bale TL. Epigenetic mechanisms in pubertal brain maturation. *Neuroscience*. 2014;264:17-24.
132. Yang C, Ye J, Li X, Gao X, Zhang K, Luo L, et al. DNA Methylation Patterns in the Hypothalamus of Female Pubertal Goats. *PLoS One*. 2016;11(10):e0165327.
133. Vazquez MJ, Toro CA, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Roa J, Beiroa D, et al. SIRT1 mediates obesity- and nutrient-dependent perturbation of pubertal timing by epigenetically controlling Kiss1 expression. *Nat Commun*. 2018;9(1):4194.

134. Forbes-Lorman RM, Rautio JJ, Kurian JR, Auger AP, Auger CJ. Neonatal MeCP2 is important for the organization of sex differences in vasopressin expression. *Epigenetics*. 2012;7(3):230-8.
135. Kurian JR, Bychowski ME, Forbes-Lorman RM, Auger CJ, Auger AP. Mecp2 organizes juvenile social behavior in a sex-specific manner. *J Neurosci*. 2008;28(28):7137-42.
136. Prewitt AK, Wilson ME. Changes in estrogen receptor-alpha mRNA in the mouse cortex during development. *Brain Res*. 2007;1134(1):62-9.
137. Schwarz JM, Nugent BM, McCarthy MM. Developmental and hormone-induced epigenetic changes to estrogen and progesterone receptor genes in brain are dynamic across the life span. *Endocrinology*. 2010;151(10):4871-81.
138. Westberry JM, Trout AL, Wilson ME. Epigenetic regulation of estrogen receptor alpha gene expression in the mouse cortex during early postnatal development. *Endocrinology*. 2010;151(2):731-40.
139. Abreu AP, Dauber A, Macedo DB, Noel SD, Brito VN, Gill JC, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3. *N Engl J Med*. 2013;368(26):2467-75.
140. Dauber A, Cunha-Silva M, Macedo DB, Brito VN, Abreu AP, Roberts SA, et al. Paternally Inherited DLK1 Deletion Associated With Familial Central Precocious Puberty. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(5):1557-67.
141. Peters J. The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet*. 2014;15(8):517-30.
142. Matsuda KI, Mori H, Nugent BM, Pfaff DW, McCarthy MM, Kawata M. Histone deacetylation during brain development is essential for permanent masculinization of sexual behavior. *Endocrinology*. 2011;152(7):2760-7.
143. Messina A, Langlet F, Chachlaki K, Roa J, Rasika S, Jouy N, et al. A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty. *Nat Neurosci*. 2016;19(6):835-44.
144. Goodman JV, Bonni A. Regulation of neuronal connectivity in the mammalian brain by chromatin remodeling. *Curr Opin Neurobiol*. 2019;59:59-68.
145. Garel C, Léger J. Contribution of magnetic resonance imaging in non-tumoral hypopituitarism in children. *Horm Res*. 2007;67(4):194-202.
146. Stamou MI, Georgopoulos NA. Kallmann syndrome: phenotype and genotype of hypogonadotropic hypogonadism. *Metabolism*. 2018;86:124-34.
147. Topaloğlu AK. Update on the Genetics of Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2017;9(Suppl 2):113-22.
148. Penson D, Krishnaswami S, Jules A, McPheeters ML. Effectiveness of hormonal and surgical therapies for cryptorchidism: a systematic review. *Pediatrics*. 2013;131(6):e1897-907.

149. Hatipoğlu N, Kurtoğlu S. Micropenis: etiology, diagnosis and treatment approaches. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013;5(4):217-23.
150. Millar AC, Faghfoury H, Bieniek JM. Genetics of hypogonadotropic hypogonadism. *Transl Androl Urol*. 2021;10(3):1401-9.
151. Young J, Xu C, Papadakis GE, Acierno JS, Maione L, Hietamaki J, et al. Clinical Management of Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism. *Endocr Rev*. 2019;40(2):669-710.
152. Barrio R, de Luis D, Alonso M, Lamas A, Moreno JC. Induction of puberty with human chorionic gonadotropin and follicle-stimulating hormone in adolescent males with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 1999;71(2):244-8.
153. Bouvattier C, Tauber M, Jouret B, Chaussain JL, Rochiccioli P. Gonadotropin treatment of hypogonadotropic hypogonadal adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 1999;12 Suppl 1:339-44.
154. Delemarre-Van de Waal HA. Induction of testicular growth and spermatogenesis by pulsatile, intravenous administration of gonadotrophin-releasing hormone in patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1993;38(5):473-80.
155. Gong C, Liu Y, Qin M, Wu D, Wang X. Pulsatile GnRH Is Superior to hCG in Therapeutic Efficacy in Adolescent Boys With Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(7):2793-9.
156. Hoffman AR, Crowley WF, Jr. Induction of puberty in men by long-term pulsatile administration of low-dose gonadotropin-releasing hormone. *N Engl J Med*. 1982;307(20):1237-41.
157. Raivio T, Falardeau J, Dwyer A, Quinton R, Hayes FJ, Hughes VA, et al. Reversal of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med*. 2007;357(9):863-73.
158. Dwyer AA, McDonald IR, Cangiano B, Giovanelli L, Maione L, Silveira LF, et al. Classes and predictors of reversal in male patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism: a cross-sectional study of six international referral centres. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2024;12(4):257-66.
159. Sidhoum VF, Chan YM, Lippincott MF, Balasubramanian R, Quinton R, Plummer L, et al. Reversal and relapse of hypogonadotropic hypogonadism: resilience and fragility of the reproductive neuroendocrine system. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(3):861-70.
160. Salvi R, Arsenijevic Y, Giacomini M, Rey JP, Voirol MJ, Gaillard RC, et al. The fetal hypothalamus has the potential to generate cells with a gonadotropin releasing hormone (GnRH) phenotype. *PLoS One*. 2009;4(2):e4392.
161. Kałużna M, Budny B, Rabijewski M, Kałużny J, Dubiel A, Trofimiuk-Müldner M, et al. Defects in GnRH Neuron Migration/Development and Hypothalamic-Pituitary Signaling Impact Clinical Variability of Kallmann Syndrome. *Genes (Basel)*. 2021;12(6).

162. Turan I, Hutchins BI, Hacıhamdioglu B, Kotan LD, Gurbuz F, Ulubay A, et al. *CCDC141 Mutations in Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism. J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(6):1816-25.
163. Stamou MI, Cox KH, Crowley WF, Jr. *Discovering Genes Essential to the Hypothalamic Regulation of Human Reproduction Using a Human Disease Model: Adjusting to Life in the "-Omics" Era. Endocr Rev.* 2015;36(6):603-21.
164. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.
165. Di Resta C, Galbiati S, Carrera P, Ferrari M. *Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. Ejifcc.* 2018;29(1):4-14.
166. Rehm HL. *Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. Nat Rev Genet.* 2013;14(4):295-300.
167. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. *Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature.* 2005;437(7057):376-80.
168. Fuller CW, Middendorf LR, Benner SA, Church GM, Harris T, Huang X, et al. *The challenges of sequencing by synthesis. Nat Biotechnol.* 2009;27(11):1013-23.
169. Oliver GR, Hart SN, Klee EW. *Bioinformatics for clinical next generation sequencing. Clin Chem.* 2015;61(1):124-35.
170. Amato LGL, Montenegro LR, Lerario AM, Jorge AAL, Guerra Junior G, Schnoll C, et al. *New genetic findings in a large cohort of congenital hypogonadotropic hypogonadism. Eur J Endocrinol.* 2019;181(2):103-19.
171. Aoyama K, Mizuno H, Tanaka T, Togawa T, Negishi Y, Ohashi K, et al. *Molecular genetic and clinical delineation of 22 patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(10):1111-8.
172. Quaynor SD, Bosley ME, Duckworth CG, Porter KR, Kim SH, Kim HG, 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.
173. Zhou C, Niu Y, Xu H, Li Z, Wang T, Yang W, et al. *Mutation profiles and clinical characteristics of Chinese males with isolated hypogonadotropic hypogonadism. Fertil Steril.* 2018;110(3):486-95.e5.
174. 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.
175. Wang Y, Gong C, Qin M, Liu Y, Tian Y. *Clinical and genetic features of 64 young male paediatric patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. Clin Endocrinol (Oxf).* 2017;87(6):757-66.

176. Persani L, Cools M, Ioakim S, Faisal Ahmed S, Andonova S, Avbelj-Stefanija M, et al. The genetic diagnosis of rare endocrine disorders of sex development and maturation: a survey among Endo-ERN centres. *Endocr Connect.* 2022;11(12).
177. Williams ES, Hegde M. Implementing genomic medicine in pathology. *Adv Anat Pathol.* 2013;20(4):238-44.
178. Graziola F, Garone G, Stregapede F, Bosco L, Vigevano F, Curatolo P, et al. Diagnostic Yield of a Targeted Next-Generation Sequencing Gene Panel for Pediatric-Onset Movement Disorders: A 3-Year Cohort Study. *Front Genet.* 2019;10:1026.
179. Wang L, Zhang J, Chen N, Wang L, Zhang F, Ma Z, et al. Application of Whole Exome and Targeted Panel Sequencing in the Clinical Molecular Diagnosis of 319 Chinese Families with Inherited Retinal Dystrophy and Comparison Study. *Genes (Basel).* 2018;9(7).
180. 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):405-24.
181. Sawyer SL, Hartley T, Dymont DA, Beaulieu CL, Schwartzentruber J, Smith A, et al. Utility of whole-exome sequencing for those near the end of the diagnostic odyssey: time to address gaps in care. *Clin Genet.* 2016;89(3):275-84.
182. Koboldt DC, Steinberg KM, Larson DE, Wilson RK, Mardis ER. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell.* 2013;155(1):27-38.
183. Yang Y, Muzny DM, Reid JG, Bainbridge MN, Willis A, Ward PA, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. *N Engl J Med.* 2013;369(16):1502-11.
184. Al Sayed Y, Howard SR. Panel testing for the molecular genetic diagnosis of congenital hypogonadotropic hypogonadism - a clinical perspective. *Eur J Hum Genet.* 2023;31(4):387-94.
185. Bagger FO, Borgwardt L, Jespersen AS, Hansen AR, Bertelsen B, Kodama M, et al. Whole genome sequencing in clinical practice. *BMC Med Genomics.* 2024;17(1):39.
186. Lionel AC, Costain G, Monfared N, Walker S, Reuter MS, Hosseini SM, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genetic test. *Genet Med.* 2018;20(4):435-43.
187. Zhang J, Yao Y, He H, Shen J. Clinical Interpretation of Sequence Variants. *Curr Protoc Hum Genet.* 2020;106(1):e98.
188. Lefter M, Vis JK, Vermaat M, den Dunnen JT, Taschner PEM, Laros JFJ. Mutalyzer 2: next generation HGVS nomenclature checker. *Bioinformatics.* 2021;37(18):2811-7.
189. Stenson PD, Mort M, Ball EV, Evans K, Hayden M, Heywood S, et al. The Human Gene Mutation Database: towards a comprehensive repository of inherited

mutation data for medical research, genetic diagnosis and next-generation sequencing studies. *Hum Genet.* 2017;136(6):665-77.

190. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(D1):D1062-d7.

191. Perez G, Barber GP, Benet-Pages A, Casper J, Clawson H, Diekhans M, et al. The UCSC Genome Browser database: 2025 update. *Nucleic Acids Res.* 2024.

192. Chunn LM, Nefcy DC, Scouten RW, Tarpey RP, Chauhan G, Lim MS, et al. Mastermind: A Comprehensive Genomic Association Search Engine for Empirical Evidence Curation and Genetic Variant Interpretation. *Frontiers in Genetics.* 2020;11.

193. Tabet D, Parikh V, Mali P, Roth FP, Claussnitzer M. Scalable Functional Assays for the Interpretation of Human Genetic Variation. *Annu Rev Genet.* 2022;56:441-65.

194. Graveley BR. Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna.* 2000;6(9):1197-211.

195. Hastings ML, Krainer AR. Pre-mRNA splicing in the new millennium. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(3):302-9.

196. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* 2002;3(4):285-98.

197. Sauna ZE, Kimchi-Sarfaty C. Understanding the contribution of synonymous mutations to human disease. *Nat Rev Genet.* 2011;12(10):683-91.

198. Gonçalves CI, Carriço JN, Omar OM, Abdalla E, Lemos MC. Hypoparathyroidism, deafness and renal dysplasia syndrome caused by a GATA3 splice site mutation leading to the activation of a cryptic splice site. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023;14:1207425.

199. Baralle D, Baralle M. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet.* 2005;42(10):737-48.

200. Carriço JN, Gonçalves CI, Aragiúes JM, Lemos MC. Kallmann Syndrome: Functional Analysis of a CHD7 Missense Variant Shows Aberrant RNA Splicing. *International Journal of Molecular Sciences.* 2024;25(22):12061.

201. Krawczak M, Thomas NS, Hundrieser B, Mort M, Wittig M, Hampe J, et al. Single base-pair substitutions in exon-intron junctions of human genes: nature, distribution, and consequences for mRNA splicing. *Hum Mutat.* 2007;28(2):150-8.

202. Anna A, Monika G. Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet.* 2018;59(3):253-68.

203. Kahles A, Lehmann KV, Toussaint NC, Hüser M, Stark SG, Sachsenberg T, et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. *Cancer Cell.* 2018;34(2):211-24.e6.

204. Roca X, Krainer AR, Eperon IC. Pick one, but be quick: 5' splice sites and the problems of too many choices. *Genes Dev.* 2013;27(2):129-44.
205. Lord J, Gallone G, Short PJ, McRae JF, Ironfield H, Wynn EH, et al. The contribution of non-canonical splicing mutations to severe dominant developmental disorders. *bioRxiv.* 2018:256636.
206. Vaz-Drago R, Custódio N, Carmo-Fonseca M. Deep intronic mutations and human disease. *Hum Genet.* 2017;136(9):1093-111.
207. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
208. 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.
209. Malone SA, Papadakis GE, Messina A, Mimouni NEH, Trova S, Imbernon M, et al. Defective AMH signaling disrupts GnRH neuron development and function and contributes to hypogonadotropic hypogonadism. *Elife.* 2019;8.
210. Chiang AP, Nishimura D, Searby C, Elbedour K, Carmi R, Ferguson AL, et al. Comparative genomic analysis identifies an ADP-ribosylation factor-like gene as the cause of Bardet-Biedl syndrome (BBS3). *Am J Hum Genet.* 2004;75(3):475-84.
211. Salian-Mehta S, Xu M, Knox AJ, Plummer L, Slavov D, Taylor M, et al. Functional consequences of AXL sequence variants in hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):1452-60.
212. Zwaveling-Soonawala N, Alders M, Jongejan A, Kovacic 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.
213. Nawaz H, Mujahid, Khan SA, Bibi F, Waqas A, Bari A, et al. Biallelic Variants in Seven Different Genes Associated with Clinically Suspected Bardet-Biedl Syndrome. *Genes (Basel).* 2023;14(5).
214. Agha Z, Iqbal Z, Azam M, Hoefsloot LH, van Bokhoven H, Qamar R. A novel homozygous 10 nucleotide deletion in BBS10 causes Bardet-Biedl syndrome in a Pakistani family. *Gene.* 2013;519(1):177-81.
215. Al-Hamed MH, van Lennep C, Hynes AM, Chrystal P, Eley L, Al-Fadhly F, et al. Functional modelling of a novel mutation in BBS5. *Cilia.* 2014;3(1):3.
216. Arboleda VA, Lee H, Parnaik R, Fleming A, Banerjee A, Ferraz-de-Souza B, et al. Mutations in the PCNA-binding domain of CDKN1C cause IMAGE syndrome. *Nat Genet.* 2012;44(7):788-92.
217. Weiss K, Lazar HP, Kurolap A, Martinez AF, Paperna T, Cohen L, et al. The CHD4-related syndrome: a comprehensive investigation of the clinical spectrum, genotype-phenotype correlations, and molecular basis. *Genet Med.* 2020;22(2):389-97.

218. Chen Y, Sun T, Niu Y, Wang D, Liu K, Wang T, et al. Cell adhesion molecule L1 like plays a role in the pathogenesis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest.* 2021;44(8):1739-51.
219. Alsters SI, Goldstone AP, Buxton JL, Zekavati A, Sosinsky A, Yiorkas AM, et al. Truncating Homozygous Mutation of Carboxypeptidase E (CPE) in a Morbidly Obese Female with Type 2 Diabetes Mellitus, Intellectual Disability and Hypogonadotropic Hypogonadism. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131417.
220. Shozu M, Sebastian S, Takayama K, Hsu WT, Schultz RA, Neely K, et al. Estrogen excess associated with novel gain-of-function mutations affecting the aromatase gene. *N Engl J Med.* 2003;348(19):1855-65.
221. Alazami AM, Schneider SA, Bonneau D, Pasquier L, Carecchio M, Kojovic M, et al. C2orf37 mutational spectrum in Woodhouse-Sakati syndrome patients. *Clin Genet.* 2010;78(6):585-90.
222. Bouilly J, Messina A, Papadakis G, Cassatella D, Xu C, Acierno JS, et al. DCC/NTN1 complex mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism impair GnRH neuron development. *Hum Mol Genet.* 2018;27(2):359-72.
223. Jee YH, Won S, Lui JC, Jennings M, Whalen P, Yue S, et al. DLG2 variants in patients with pubertal disorders. *Genet Med.* 2020;22(8):1329-37.
224. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambino G, et al. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the beta-subunit of follicle-stimulating hormone. *Nat Genet.* 1993;5(1):83-6.
225. Gach A, Pinkier I, Sałacińska K, Szarras-Czapnik M, Salachna D, Kucińska A, et al. Identification of gene variants in a cohort of hypogonadotropic hypogonadism: Diagnostic utility of custom NGS panel and WES in unravelling genetic complexity of the disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;517:110968.
226. Houang M, Gourmelen M, Moatti L, Le BY, Garabédian EN, Denoyelle F. Hypogonadotropic hypogonadism associated with prelingual deafness due to a connexin 26 gene mutation. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2002;15(2):219-23.
227. 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.
228. Harakalova M, van den Boogaard MJ, Sinke R, van Lieshout S, van Tuil MC, Duran K, et al. X-exome sequencing identifies a HDAC8 variant in a large pedigree with X-linked intellectual disability, truncal obesity, gynaecomastia, hypogonadism and unusual face. *J Med Genet.* 2012;49(8):539-43.
229. Newbern K, Natrajan N, Kim HG, Chorich LP, Halvorson LM, Cameron RS, et al. Identification of HESX1 mutations in Kallmann syndrome. *Fertil Steril.* 2013;99(7):1831-7.
230. McDermott JH, Walsh CH. Hypogonadism in hereditary hemochromatosis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2451-5.

231. Gehrke SG, Pietrangelo A, Kascák M, Braner A, Eisold M, Kulaksiz H, et al. HJV gene mutations in European patients with juvenile hemochromatosis. *Clin Genet.* 2005;67(5):425-8.
232. Schaefer E, Stoetzel C, Scheidecker S, Geoffroy V, Prasad MK, Redin C, et al. Identification of a novel mutation confirms the implication of IFT172 (BBS20) in Bardet-Biedl syndrome. *J Hum Genet.* 2016;61(5):447-50.
233. 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.
234. Topaloglu AK, Tello JA, Kotan LD, Ozbek MN, Yilmaz MB, Erdogan S, et al. Inactivating KISS1 mutation and hypogonadotropic hypogonadism. *N Engl J Med.* 2012;366(7):629-35.
235. Xu C, Messina A, Somm E, Miraoui H, Kinnunen T, Acierno J, Jr., et al. KLB, encoding  $\beta$ -Klotho, is mutated in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *EMBO Mol Med.* 2017;9(10):1379-97.
236. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet.* 1998;18(3):213-5.
237. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature.* 1998;392(6674):398-401.
238. Netchine I, Sobrier ML, 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.
239. Reynaud R, Gueydan M, Saveanu A, Vallette-Kasic S, Enjalbert A, Brue T, et al. Genetic screening of combined pituitary hormone deficiency: experience in 195 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(9):3329-36.
240. Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B, et al. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet.* 2013;45(11):1405-8.
241. Hainerová IA, Zamrazilová H, Sedláčková D, Hainer V. Hypogonadotropic hypogonadism in a homozygous MC4R mutation carrier and the effect of sibutramine treatment on body weight and obesity-related health risks. *Obes Facts.* 2011;4(4):324-8.
242. Rubio-Cabezas O, Gómez JL, Gleisner A, Hattersley AT, Codner E. Hypogonadotropic Hypogonadism and Short Stature in Patients with Diabetes Due to Neurogenin 3 Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(10):3555-8.
243. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Récan D, Meindl A, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. *Nature.* 1994;372(6507):672-6.

244. Hattori A, Zukeran H, Igarashi M, Toguchi S, Toubaru Y, Inoue T, et al. A novel C-terminal truncating NR5A1 mutation in dizygotic twins. *Hum Genome Var.* 2017;4:17008.
245. Margolin DH, Kousi M, Chan YM, Lim ET, Schmahmann JD, Hadjivassiliou M, et al. Ataxia, dementia, and hypogonadotropism caused by disordered ubiquitination. *N Engl J Med.* 2013;368(21):1992-2003.
246. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet.* 1997;16(3):303-6.
247. Tegtmeier LC, Rust S, van Scherpenzeel M, Ng BG, Losfeld ME, Timal S, et al. Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *N Engl J Med.* 2014;370(6):533-42.
248. Lower KM, Turner G, Kerr BA, Mathews KD, Shaw MA, Gedeon AK, et al. Mutations in PHF6 are associated with Börjeson-Forssman-Lehmann syndrome. *Nat Genet.* 2002;32(4):661-5.
249. van der Klaauw AA, Croizier S, Mendes de Oliveira E, Stadler LKJ, Park S, Kong Y, et al. Human Semaphorin 3 Variants Link Melanocortin Circuit Development and Energy Balance. *Cell.* 2019;176(4):729-42.e18.
250. Synofzik M, Gonzalez MA, Lourenco CM, Coutelier M, Haack TB, Rebelo A, et al. PNPLA6 mutations cause Boucher-Neuhauser and Gordon Holmes syndromes as part of a broad neurodegenerative spectrum. *Brain.* 2014;137(Pt 1):69-77.
251. Eskici N, Madhusudan S, Vaaralahti K, Yellapragada V, Gomez-Sanchez C, Kärkinen J, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism in a patient with a de novo POGZ mutation. *Eur J Endocrinol.* 2023;189(2):271-80.
252. Van Esch H, Colnaghi R, Freson K, Starokadomskyy P, Zankl A, Backx L, et al. Defective DNA Polymerase  $\alpha$ -Primase Leads to X-Linked Intellectual Disability Associated with Severe Growth Retardation, Microcephaly, and Hypogonadism. *Am J Hum Genet.* 2019;104(5):957-67.
253. Pelletier F, Perrier S, Cayami FK, Mirchi A, Saikali S, Tran LT, et al. Endocrine and Growth Abnormalities in 4H Leukodystrophy Caused by Variants in POLR3A, POLR3B, and POLR1C. *J Clin Endocrinol Metab.* 2021;106(2):e660-e74.
254. Bernard G, Chouery E, Putorti ML, Tétreault M, Takanohashi A, Carosso G, et al. Mutations of POLR3A encoding a catalytic subunit of RNA polymerase Pol III cause a recessive hypomyelinating leukodystrophy. *Am J Hum Genet.* 2011;89(3):415-23.
255. Whittaker DE, Oleari R, Gregory LC, Le Quesne-Stabej P, Williams HJ, Torpiano JG, et al. A recessive PRDM13 mutation results in congenital hypogonadotropic hypogonadism and cerebellar hypoplasia. *J Clin Invest.* 2021;131(24).
256. 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.

257. Barraud S, Delemer B, Poirsier-Violle C, Bouligand J, Merol JC, Grange F, et al. Congenital hypogonadotropic hypogonadism with anosmia and Gorlin features caused by a PTCH1 mutation reveals a new candidate gene for Kallmann syndrome. *Neuroendocrinology*. 2020.
258. Bem D, Yoshimura S, Nunes-Bastos R, Bond FC, Kurian MA, Rahman F, et al. Loss-of-function mutations in RAB18 cause Warburg micro syndrome. *Am J Hum Genet*. 2011;88(4):499-507.
259. Aligianis IA, Johnson CA, Gissen P, Chen D, Hampshire D, Hoffmann K, et al. Mutations of the catalytic subunit of RAB3GAP cause Warburg Micro syndrome. *Nat Genet*. 2005;37(3):221-3.
260. Aligianis IA, Morgan NV, Mione M, Johnson CA, Rosser E, Hennekam RC, et al. Mutation in Rab3 GTPase-activating protein (RAB3GAP) noncatalytic subunit in a kindred with Martsof syndrome. *Am J Hum Genet*. 2006;78(4):702-7.
261. Nousbeck J, Spiegel R, Ishida-Yamamoto A, Indelman M, Shani-Adir A, Adir N, et al. Alopecia, neurological defects, and endocrinopathy syndrome caused by decreased expression of RBM28, a nucleolar protein associated with ribosome biogenesis. *Am J Hum Genet*. 2008;82(5):1114-21.
262. Cariboni A, André V, Chauvet S, Cassatella D, Davidson K, Caramello A, et al. Dysfunctional SEMA3E signaling underlies gonadotropin-releasing hormone neuron deficiency in Kallmann syndrome. *J Clin Invest*. 2015;125(6):2413-28.
263. Schnöll C, Krepischi ACV, Renck AC, Amato LGL, Kulikowski LD, Dantas NCB, et al. SIN3A Defects Associated with Syndromic Congenital Hypogonadotropic Hypogonadism: An Overlap with Witteveen-Kolk Syndrome. *Neuroendocrinology*. 2023;113(8):834-43.
264. Spiegel R, Cliffe ST, Buckley MF, Crow YJ, Urquhart J, Horovitz Y, et al. Expanding the clinical spectrum of SLC29A3 gene defects. *Eur J Med Genet*. 2010;53(5):309-13.
265. Shaw ND, Brand H, Kupchinsky ZA, Bengani H, Plummer L, Jones TI, et al. Corrigendum: SMCHD1 mutations associated with a rare muscular dystrophy can also cause isolated arhinia and Bosma arhinia microphthalmia syndrome. *Nat Genet*. 2017;49(6):969.
266. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, et al. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet*. 2013;92(5):707-24.
267. Al-Jawahiri R, Foroutan A, Kerkhof J, McConkey H, Levy M, Haghshenas S, et al. SOX11 variants cause a neurodevelopmental disorder with infrequent ocular malformations and hypogonadotropic hypogonadism and with distinct DNA methylation profile. *Genet Med*. 2022;24(6):1261-73.
268. Kelberman D, Rizzoti K, Avilion A, Bitner-Glindzicz M, Cianfarani S, Collins J, et al. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest*. 2006;116(9):2442-55.

269. Izumi Y, Suzuki E, Kanzaki S, Yatsuga S, Kinjo S, Igarashi M, et al. Genome-wide copy number analysis and systematic mutation screening in 58 patients with hypogonadotropic hypogonadism. *Fertil Steril*. 2014;102(4):1130-6.e3.
270. Kotan LD, Cooper C, Darcan Ş, Carr IM, Özen S, Yan Y, et al. Idiopathic Hypogonadotropic Hypogonadism Caused by Inactivating Mutations in SRA1. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2016;8(2):125-34.
271. Xu H, Li Z, Wang T, Wang S, Liu J, Wang DW. Novel homozygous deletion of segmental KAL1 and entire STS cause Kallmann syndrome and X-linked ichthyosis in a Chinese family. *Andrologia*. 2015;47(10):1160-5.
272. Shi CH, Schisler JC, Rubel CE, Tan S, Song B, McDonough H, et al. Ataxia and hypogonadism caused by the loss of ubiquitin ligase activity of the U box protein CHIP. *Hum Mol Genet*. 2014;23(4):1013-24.
273. Reinstein E, Orvin K, Tayeb-Fligelman E, Stiebel-Kalish H, Tzur S, Pimienta AL, et al. Mutations in TAX1BP3 cause dilated cardiomyopathy with septo-optic dysplasia. *Hum Mutat*. 2015;36(4):439-42.
274. Liegel RP, Handley MT, Ronchetti A, Brown S, Langemeyer L, Linford A, et al. Loss-of-function mutations in TBC1D20 cause cataracts and male infertility in blind sterile mice and Warburg micro syndrome in humans. *Am J Hum Genet*. 2013;93(6):1001-14.
275. Padidela R, Kelberman D, Press M, Al-Khawari M, Hindmarsh PC, Dattani MT. Mutation in the TBCE gene is associated with hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism syndrome featuring pituitary hormone deficiencies and hypoplasia of the anterior pituitary and the corpus callosum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(8):2686-91.
276. Galazzi E, Duminuco P, Moro M, Guizzardi F, Marazzi N, Sartorio A, et al. Hypogonadotropic hypogonadism and pituitary hypoplasia as recurrent features in Ulnar-Mammary syndrome. *Endocr Connect*. 2018;7(12):1432-41.
277. Roetto A, Totaro A, Piperno A, Piga A, Longo F, Garozzo G, et al. New mutations inactivating transferrin receptor 2 in hemochromatosis type 3. *Blood*. 2001;97(9):2555-60.
278. Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE, et al. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(16):6287-92.
279. Sato S, Morimoto T, Hotta K, Fujikado T, Nishida K. A novel compound heterozygous mutation in TTC8 identified in a Japanese patient. *Hum Genome Var*. 2019;6:14.
280. Chew S, Balasubramanian R, Chan WM, Kang PB, Andrews C, Webb BD, et al. A novel syndrome caused by the E410K amino acid substitution in the neuronal  $\beta$ -tubulin isotype 3. *Brain*. 2013;136(Pt 2):522-35.

281. Trimouille A, Lasseaux E, Barat P, Deiller C, Drunat S, Rooryck C, et al. Further delineation of the phenotype caused by biallelic variants in the WDR4 gene. *Clin Genet*. 2018;93(2):374-7.
282. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1986;51 Pt 1:263-73.
283. Smith SA, Lynch KW. Cell-based splicing of minigenes. *Methods Mol Biol*. 2014;1126:243-55.
284. Mighton C, Smith AC, Mayers J, Tomaszewski R, Taylor S, Hume S, et al. Data sharing to improve concordance in variant interpretation across laboratories: results from the Canadian Open Genetics Repository. *J Med Genet*. 2022;59(6):571-8.
285. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015;526(7571):68-74.
286. Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3381-5.
287. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296-w303.
288. Gonçalves C, Bastos M, Pignatelli D, Borges T, Aragüés JM, Fonseca F, et al. Novel FGFR1 mutations in Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: evidence for the involvement of an alternatively spliced isoform. *Fertil Steril*. 2015;104(5):1261-7.e1.
289. Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL, et al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet*. 2006;38(5):521-4.
290. Goncalves CI, Fonseca F, Borges T, Cunha F, Lemos MC. Expanding the genetic spectrum of ANOS1 mutations in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Hum Reprod*. 2017;32(3):704-11.
291. Bartels CF, Scacheri C, White L, Scacheri PC, Bale S. Mutations in the CHD7 gene: the experience of a commercial laboratory. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2010;14(6):881-91.
292. Goncalves CI, Patriarca FM, Aragues JM, Carvalho D, Fonseca F, Martins S, et al. High frequency of CHD7 mutations in congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Sci Rep*. 2019;9(1):1597.
293. Sánchez-Mejías A, Fernández RM, López-Alonso M, Antiñolo G, Borrego S. New roles of EDNRB and EDN3 in the pathogenesis of Hirschsprung disease. *Genet Med*. 2010;12(1):39-43.
294. Goncalves CI, Aragues JM, Bastos M, Barros L, Vicente N, Carvalho D, et al. GNRHR biallelic and digenic mutations in patients with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Endocr Connect*. 2017;6(6):360-6.

295. Darbro BW, Singh R, Zimmerman MB, Mahajan VB, Bassuk AG. Autism Linked to Increased Oncogene Mutations but Decreased Cancer Rate. *PLoS One*. 2016;11(3):e0149041.
296. Tétreault M, Choquet K, Orcesi S, Tonducci D, Balottin U, Teichmann M, et al. Recessive mutations in POLR3B, encoding the second largest subunit of Pol III, cause a rare hypomyelinating leukodystrophy. *Am J Hum Genet*. 2011;89(5):652-5.
297. Bonachea EM, Zender G, White P, Corsmeier D, Newsom D, Fitzgerald-Butt S, et al. Use of a targeted, combinatorial next-generation sequencing approach for the study of bicuspid aortic valve. *BMC Med Genomics*. 2014;7:56.
298. Gorsic LK, Kosova G, Werstein B, Sisk R, Legro RS, Hayes MG, et al. Pathogenic Anti-Müllerian Hormone Variants in Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(8):2862-72.
299. Beneduzzi D, Trarbach EB, Min L, Jorge AA, Garmes HM, Renk AC, et al. Role of gonadotropin-releasing hormone receptor mutations in patients with a wide spectrum of pubertal delay. *Fertil Steril*. 2014;102(3):838-46.e2.
300. Topaloglu AK, Lu ZL, Farooqi IS, Mungan NO, Yuksel B, O'Rahilly S, et al. Molecular genetic analysis of normosmic hypogonadotropic hypogonadism in a Turkish population: identification and detailed functional characterization of a novel mutation in the gonadotropin-releasing hormone receptor gene. *Neuroendocrinology*. 2006;84(5):301-8.
301. Barroso PS, Jorge AAL, Lerario AM, Montenegro LR, Vasques GA, Lima Amato LG, et al. Clinical and Genetic Characterization of a Constitutional Delay of Growth and Puberty Cohort. *Neuroendocrinology*. 2020;110(11-12):959-66.
302. Lee YW, Kim SC, Shin YL, Kim JW, Hong HS, Lee YK, et al. Clinical and genetic analysis of the CHD7 gene in Korean patients with CHARGE syndrome. *Clin Genet*. 2009;75(3):290-3.
303. Le Gac G, Scotet V, Ka C, Gourlaouen I, Bryckaert L, Jacolot S, et al. The recently identified type 2A juvenile haemochromatosis gene (HJV), a second candidate modifier of the C282Y homozygous phenotype. *Hum Mol Genet*. 2004;13(17):1913-8.
304. Michelini S, Amato B, Ricci M, Kenanoglu S, Veselenyiova D, Kurti D, et al. Segregation Analysis of Rare NRP1 and NRP2 Variants in Families with Lymphedema. *Genes (Basel)*. 2020;11(11).
305. Hsu JSJ, So M, Tang CSM, Karim A, Porsch RM, Wong C, et al. De novo mutations in Caudal Type Homeo Box transcription Factor 2 (CDX2) in patients with persistent cloaca. *Hum Mol Genet*. 2018;27(2):351-8.
306. Corsten-Janssen N, Saitta SC, Hoefsloot LH, McDonald-McGinn DM, Driscoll DA, Derks R, et al. More Clinical Overlap between 22q11.2 Deletion Syndrome and CHARGE Syndrome than Often Anticipated. *Mol Syndromol*. 2013;4(5):235-45.
307. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812-4.

308. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.
309. Cheng J, Novati G, Pan J, Bycroft C, Žemgulytė A, Applebaum T, et al. Accurate proteome-wide missense variant effect prediction with AlphaMissense. *Science*. 2023;381(6664):eadg7492.
310. Joudaki A, Takeda JI, Masuda A, Ode R, Fujiwara K, Ohno K. FexSplice: A LightGBM-Based Model for Predicting the Splicing Effect of a Single Nucleotide Variant Affecting the First Nucleotide G of an Exon. *Genes (Basel)*. 2023;14(9).
311. Matthijs G, Souche E, Alders M, Corveleyn A, Eck S, Feenstra I, et al. Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(1):2-5.
312. Patil VA, Lila AR, Shah N, Arya S, Sarathi V, Shah R, et al. Genetic spectrum of Kallmann syndrome: Single-center experience and systematic review. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2022;97(6):804-13.
313. Patil VA, Lila AR, Shah N, Arya S, Ekbote AV, Sarathi V, et al. Regional genotypic variations in normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism: our experience and systematic review. *Pituitary*. 2022;25(3):444-53.
314. Ortiz-Cabrera NV, Gavela-Pérez T, Mejorado-Molano FJ, Santillán-Coello JM, Villacampa-Aubá JM, Trujillo-Tiebas MJ, et al. Diagnostic yield of clinical exome sequencing in congenital hypogonadotropic hypogonadism considering the degree of olfactory impairment. *An Pediatr (Engl Ed)*. 2022;97(4):247-54.
315. Samuels ME, Hasselmann C, Deal CL, Deladoey J, Vliet GV. Whole-exome sequencing: opportunities in pediatric endocrinology. *Per Med*. 2014;11(1):63-78.
316. Sykiotis GP, Plummer L, Hughes VA, Au M, Durrani S, Nayak-Young S, et al. Oligogenic basis of isolated gonadotropin-releasing hormone deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(34):15140-4.
317. Shin SJ, Sul Y, Kim JH, Cho JH, Kim GH, Kim JH, et al. Clinical, endocrinological, and molecular characterization of Kallmann syndrome and normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism: a single center experience. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*. 2015;20(1):27-33.
318. Burke W, Parens E, Chung WK, Berger SM, Appelbaum PS. The Challenge of Genetic Variants of Uncertain Clinical Significance : A Narrative Review. *Ann Intern Med*. 2022;175(7):994-1000.
319. Grinspon RP. Genetics of congenital central hypogonadism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(1):101599.
320. Balasubramanian R, Choi JH, Francescato L, Willer J, Horton ER, Asimacopoulos EP, et al. Functionally compromised CHD7 alleles in patients with isolated GnRH deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):17953-8.

321. Laitinen EM, Tommiska J, Sane T, Vaaralahti K, Toppari J, Raivio T. Reversible congenital hypogonadotropic hypogonadism in patients with CHD7, FGFR1 or GNRHR mutations. *PLoS One*. 2012;7(6):e39450.
322. Aramaki M, Udaka T, Kosaki R, Makita Y, Okamoto N, Yoshihashi H, et al. Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome with CHD7 mutations. *J Pediatr*. 2006;148(3):410-4.
323. Semple RK, Topaloglu AK. The recent genetics of hypogonadotropic hypogonadism - novel insights and new questions. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2010;72(4):427-35.
324. Martinez-Mayer J, Perez-Millan MI. Phenotypic and genotypic landscape of PROKR2 in neuroendocrine disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1132787.
325. Chung WC, Tsai PS. The initiation and maintenance of gonadotropin-releasing hormone neuron identity in congenital hypogonadotropic hypogonadism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023;14:1166132.
326. Stamou MI, Brand H, Wang M, Wong I, Lippincott MF, Plummer L, et al. Prevalence and Phenotypic Effects of Copy Number Variants in Isolated Hypogonadotropic Hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2022;107(8):2228-42.
327. Butz H, Nyíró G, Kurucz PA, Likó I, Patócs A. Molecular genetic diagnostics of hypogonadotropic hypogonadism: from panel design towards result interpretation in clinical practice. *Hum Genet*. 2021;140(1):113-34.
328. Dwyer AA, Raivio T, Pitteloud N. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Reversible hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(6):R267-74.
329. Quinton R, Cheow HK, Tymms DJ, Bouloux PM, Wu FC, Jacobs HS. Kallmann's syndrome: is it always for life? *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;50(4):481-5.
330. Abramowicz A, Gos M. Correction to: Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet*. 2019;60(2):231.
331. Wang GS, Cooper TA. Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet*. 2007;8(10):749-61.
332. Lim KH, Ferraris L, Filloux ME, Raphael BJ, Fairbrother WG. Using positional distribution to identify splicing elements and predict pre-mRNA processing defects in human genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(27):11093-8.
333. Fu Y, Masuda A, Ito M, Shinmi J, Ohno K. AG-dependent 3'-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(10):4396-404.
334. Dwyer AA, McDonald IR, Cangiano B, Giovanelli L, Maione L, Silveira LFG, et al. Classes and predictors of reversal in male patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism: a cross-sectional study of six international referral centres. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2024;12(4):257-66.



## ***8. Anexos***



## **Anexo 1:** Licença para reprodução da Figura 2.

### OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 03, 2025

---

---

This Agreement between Josianne Nunes Carriço ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number      5961340943930

License date          Feb 03, 2025

Licensed content  
publisher              Oxford University Press

Licensed content  
publication            European Journal of Endocrinology

Licensed content  
title                    GENETICS IN ENDOCRINOLOGY: Genetic counseling for  
congenital hypogonadotropic hypogonadism and Kallmann  
syndrome: new challenges in the era of oligogenism and next-  
generation sequencing

Licensed content  
author                  Maione, Luigi; Dwyer, Andrew A

Licensed content  
date                    Mar 1, 2018

Type of Use            Thesis/Dissertation

Institution name

Identificação de causas genéticas do hipogonadismo

Title of your work	hipogonadotrófico congénito utilizando a sequenciação de nova geração
Publisher of your work	Universidade da Beira Interior - Faculdade de Ciências da Saúde
Expected publication date	Dec 2025
Permissions cost	0.00 EUR
Value added tax	0.00 EUR
Total	0.00 EUR
Title of new work	Identificação de causas genéticas do hipogonadismo hipogonadotrófico congénito utilizando a sequenciação de nova geração
Institution name	Universidade da Beira Interior - Faculdade de Ciências da Saúde
Expected presentation date	Dec 2025
Portions	Figure 1
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Josianne Nunes Carriço
Requestor Location	Mrs. Josianne Carriço Av. Infante D. Henrique Covilhã, 6200-506 Portugal

Order reference number 1

Publisher Tax ID GB125506730

Billing Type Invoice

Billing Address CICS-UBI  
Av. Infante D. Henrique  
Covilhã, Portugal 6200-506

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the **English** language in the following territory: *world*. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission **must** be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.
5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society **must** be included in the credit line.
6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of

the article concerned, accessible from [www.oxfordjournals.org](http://www.oxfordjournals.org) Should there be a problem clearing these rights, please contact [journals.permissions@oup.com](mailto:journals.permissions@oup.com)

7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.

8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Unless otherwise specified, inclusion under a Creative Commons license or any other Open Access license allowing onward reuse is prohibited.

13. Where permission to translate has been agreed, the credit line and any copyright/disclaimer notices provided by OUP shall be included on the same page as the Material, translated into the language of the new work, except for trademark names:

Translated and reproduced by permission of Oxford University Press on behalf of the <Society Name>. Translation Disclaimer: OUP and the <Society Name> are not responsible or in any way liable for the accuracy of the translation. The Licensee is solely responsible for the translation in this publication/reprint.

14. Other Terms and Conditions:

v1.5

**Anexo 2:** Regras para classificar as variantes genéticas de acordo com os critérios ACMG-AMP. Adaptado de Richard et al. (180).

Patogénica (P)	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Muito forte (PVS1) <i>E</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) <math>\geq 1</math> Forte (PS1–PS4) <i>OU</i></li> <li>(b.) <math>\geq 2</math> Moderada (PM1–PM6) <i>OU</i></li> <li>(c) 1 Moderada (PM1–PM6) e 1 de suporte (PP1–PP5) <i>OU</i></li> <li>(d) <math>\geq 2</math> De suporte (PP1–PP5)</li> </ul> </li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Forte (PS1–PS4) <i>OU</i></li> <li>(iii) 1 Forte (PS1–PS4) <i>E</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>(a) <math>\geq 3</math> Moderada (PM1–PM6) <i>OU</i></li> <li>(b) 2 Moderada (PM1–PM6) <i>E</i> <math>\geq 2</math> De suporte (PP1–PP5) <i>OU</i></li> <li>(c) 1 Moderada (PM1–PM6) <i>E</i> <math>\geq 4</math> De suporte (PP1–PP5).</li> </ul> </li> </ul>
Provavelmente patogénica (LP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Muito forte (PVS1) <i>E</i> 1 Moderada (PM1–PM6) <i>OU</i></li> <li>(ii) 1 Forte (PS1–PS4) <i>E</i> 1–2 Moderadas (PM1–PM6) <i>OU</i></li> <li>(iii) 1 Forte (PS1–PS4) <i>E</i> <math>\geq 2</math> De suporte (PP1–PP5) <i>OU</i></li> <li>(iv) <math>\geq 3</math> Moderadas (PM1–PM6) <i>OU</i></li> <li>(v) 2 Moderadas (PM1–PM6) <i>E</i> <math>\geq 2</math> De suporte (PP1–PP5) <i>OU</i></li> <li>(vi) 1 Moderada (PM1–PM6) <i>E</i> <math>\geq 4</math> De suporte (PP1–PP5)</li> </ul>
Benigna (B)	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Independente (BA1) <i>OU</i></li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> Fortes (BS1–BS4)</li> </ul>
Provavelmente Benigna (LB)	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) 1 Forte (BS1–BS4) e 1 de suporte (BP1–BP7) <i>OU</i></li> <li>(ii) <math>\geq 2</math> de suporte (BP1–BP7)</li> </ul>
De significado incerto (VUS)	<ul style="list-style-type: none"> <li>(i) Quando os critérios descritos acima não estão contemplados <i>OU</i></li> <li>(ii) Os critérios para benigna e patogénica são contraditórios.</li> </ul>



### **Anexo 3:** Licença para reprodução da Figura 3.

#### SPRINGER NATURE LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Nov 13, 2024

---

This Agreement between Josianne Nunes Carriço ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	5907100803353
License date	Nov 13, 2024
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Genetics
Licensed Content Title	Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing
Licensed Content Author	Luca Cartegni et al
Licensed Content Date	Apr 1, 2002
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of	

figures/tables/illustrations	1
Would you like a high resolution image with your order?	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title of new work	Identificação de causas genéticas do hipogonadismo hipogonadotrófico congénito utilizando a sequenciação de nova geração
Institution name	Universidade da Beira Interior - Faculdade de Ciências da Saúde
Expected presentation date	Dec 2024
Portions	Figura 1 a
The Requesting Person / Organization to Appear on the License	Josianne Nunes Carriço
Requestor Location	Mrs. Josianne Carriço Av. Infante D. Henrique  Covilhã, 6200-506 Portugal
Order reference number	1
Billing Type	Invoice

CICS-UBI  
Av. Infante D. Henrique  
Billing Address  
Covilhã, Portugal 6200-506  
Total 0.00 USD

Terms and Conditions

### **Springer Nature Customer Service Centre GmbH Terms and Conditions**

The following terms and conditions ("Terms and Conditions") together with the terms specified in your [RightsLink] constitute the License ("License") between you as Licensee and Springer Nature Customer Service Centre GmbH as Licensor. By clicking 'accept' and completing the transaction for your use of the material ("Licensed Material"), you confirm your acceptance of and obligation to be bound by these Terms and Conditions.

#### **1. Grant and Scope of License**

1. 1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, non-sublicensable, revocable, world-wide License to reproduce, distribute, communicate to the public, make available, broadcast, electronically transmit or create derivative works using the Licensed Material for the purpose(s) specified in your RightsLink Licence Details only. Licenses are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to these Terms and Conditions. You acknowledge and agree that the rights granted to you under this License do not include the right to modify, edit, translate, include in collective works, or create derivative works of the Licensed Material in whole or in part unless expressly stated in your RightsLink Licence Details. You may use the Licensed Material only as permitted under this Agreement and will not reproduce, distribute, display, perform, or otherwise use or exploit any Licensed Material in any way, in whole or in part, except as expressly permitted by this License.

1. 2. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Terms and Conditions, by your RightsLink Licence Details and by any applicable laws.

1. 3. A separate license may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a license has been purchased for print use only, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a License is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the License.

1. 4. Any content within the Licensed Material that is owned by third parties is

expressly excluded from the License.

1. 5. Rights for additional reuses such as custom editions, computer/mobile applications, film or TV reuses and/or any other derivative rights requests require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to [journalpermissions@springernature.com](mailto:journalpermissions@springernature.com) or [bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.

## **2. Reservation of Rights**

Licensors reserves all rights not expressly granted to you under this License. You acknowledge and agree that nothing in this License limits or restricts Licensor's rights in or use of the Licensed Material in any way. Neither this License, nor any act, omission, or statement by Licensor or you, conveys any ownership right to you in any Licensed Material, or to any element or portion thereof. As between Licensor and you, Licensor owns and retains all right, title, and interest in and to the Licensed Material subject to the license granted in Section 1.1. Your permission to use the Licensed Material is expressly conditioned on you not impairing Licensor's or the applicable copyright owner's rights in the Licensed Material in any way.

## **3. Restrictions on use**

3. 1. Minor editing privileges are allowed for adaptations for stylistic purposes or formatting purposes provided such alterations do not alter the original meaning or intention of the Licensed Material and the new figure(s) are still accurate and representative of the Licensed Material. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, and/or omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author(s) are strictly prohibited.

3. 2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.

3. 3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP), but any such reuse must include a clear acknowledgment of this permission visible at the same time as the figures/tables/illustration or abstract and which must indicate that the Licensed Material is not part of the governing OA license but has been reproduced with permission. This may be indicated according to any standard referencing system but must include at a minimum 'Book/Journal title, Author, Journal Name (if applicable), Volume (if applicable), Publisher, Year, reproduced with permission from SNCSC'.

## **4. STM Permission Guidelines**

4. 1. An alternative scope of license may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines ("STM PG") as amended from time to time and made available at <https://www.stm-assoc.org/intellectual-property/permissions/permissions-guidelines/>.

4. 2. For content reuse requests that qualify for permission under the STM PG, and which may be updated from time to time, the STM PG supersedes the terms and conditions contained in this License.

4. 3. If a License has been granted under the STM PG, but the STM PG no longer apply at the time of publication, further permission must be sought from the Rightsholder. Contact [journalpermissions@springernature.com](mailto:journalpermissions@springernature.com) or [bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.

## 5. Duration of License

5. 1. Unless otherwise indicated on your License, a License is valid from the date of purchase ("License Date") until the end of the relevant period in the below table:

Reuse in a medical communications project	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in a dissertation/thesis	Lifetime of thesis
Reuse in a journal/magazine	Lifetime of journal/magazine
Reuse in a book/textbook	Lifetime of edition
Reuse on a website	1 year unless otherwise specified in the License
Reuse in a presentation/slide kit/poster	Lifetime of presentation/slide kit/poster. Note: publication whether electronic or in print of presentation/slide kit/poster may require further permission.
Reuse in conference proceedings	Lifetime of conference proceedings
Reuse in an annual report	Lifetime of annual report
Reuse in training/CME materials	Reuse up to distribution or time period indicated in License
Reuse in newsmidia	Lifetime of newsmidia
Reuse in coursepack/classroom materials	Reuse up to distribution and/or time period indicated in license

## 6. Acknowledgement

6. 1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licensed Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract and must be hyperlinked to the journal/book's homepage.

6. 2. Acknowledgement may be provided according to any standard referencing system and at a minimum should include "Author, Article/Book Title, Journal name/Book imprint, volume, page number, year, Springer Nature".

## 7. Reuse in a dissertation or thesis

7. 1. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected, the following terms apply: Print rights of the Version of Record are provided for; electronic rights for use only on institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)) and only up to what is required by the awarding institution.

7. 2. For theses published under an ISBN or ISSN, separate permission is required. Please contact [journalpermissions@springernature.com](mailto:journalpermissions@springernature.com) or [bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.

7. 3. Authors must properly cite the published manuscript in their thesis according to current citation standards and include the following acknowledgement: *'Reproduced with permission from Springer Nature'*.

## 8. License Fee

You must pay the fee set forth in the License Agreement (the "License Fees"). All amounts payable by you under this License are exclusive of any sales, use, withholding, value added or similar taxes, government fees or levies or other assessments. Collection and/or remittance of such taxes to the relevant tax authority shall be the responsibility of the party who has the legal obligation to do so.

## 9. Warranty

9. 1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. **You are solely responsible for ensuring that the material you wish to license is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity or third party (as credited in the published version).** If the credit line on any part of the Licensed Material indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should seek additional permission from that source to reuse the material.

9. 2. EXCEPT FOR THE EXPRESS WARRANTY STATED HEREIN AND TO THE EXTENT PERMITTED BY APPLICABLE LAW, LICENSOR PROVIDES THE LICENSED MATERIAL "AS IS" AND MAKES NO OTHER REPRESENTATION OR WARRANTY. LICENSOR EXPRESSLY DISCLAIMS ANY LIABILITY FOR ANY CLAIM ARISING FROM OR OUT OF THE CONTENT, INCLUDING BUT NOT LIMITED TO ANY ERRORS, INACCURACIES, OMISSIONS, OR DEFECTS CONTAINED THEREIN, AND ANY IMPLIED OR EXPRESS WARRANTY AS TO MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE. IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, PUNITIVE, OR EXEMPLARY DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE LICENSED MATERIAL REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF

PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION APPLIES NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

## **10. Termination and Cancellation**

10. 1. The License and all rights granted hereunder will continue until the end of the applicable period shown in Clause 5.1 above. Thereafter, this license will be terminated and all rights granted hereunder will cease.

10. 2. Licensor reserves the right to terminate the License in the event that payment is not received in full or if you breach the terms of this License.

## **11. General**

11. 1. The License and the rights and obligations of the parties hereto shall be construed, interpreted and determined in accordance with the laws of the Federal Republic of Germany without reference to the stipulations of the CISG (United Nations Convention on Contracts for the International Sale of Goods) or to Germany's choice-of-law principle.

11. 2. The parties acknowledge and agree that any controversies and disputes arising out of this License shall be decided exclusively by the courts of or having jurisdiction for Heidelberg, Germany, as far as legally permissible.

11. 3. This License is solely for Licensor's and Licensee's benefit. It is not for the benefit of any other person or entity.

**Questions?** For questions on Copyright Clearance Center accounts or website issues please contact [springernaturesupport@copyright.com](mailto:springernaturesupport@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777. For questions on Springer Nature licensing please visit <https://www.springernature.com/gp/partners/rights-permissions-third-party-distribution>

### **Other Conditions:**

Version 1.4 - Dec 2022

**Questions?** [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com).



**Anexo 4:** Oligonucleótidos utilizados para amplificar os exões onde as variantes patogênicas (P) e provavelmente patogênicas (LP) foram encontradas.

<b>ID do Oligonucleótido</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>
ANOS1_ex5_Fwd	CAGATTGTTTTAATTGATACG
ANOS1_ex5_Rev	GCAGACACTACCTCCAGGATG
ARHGAP5_ex1_Fwd	TGCCAAATCGCCTTACTTTT
ARHGAP5_ex1_Rev	GCTCACCACATCCAAATTGT
BBS10_ex2_Fwd	GCCAGCCTTCTGAAAATGAG
BBS10_ex2_Rev	CCTTCCATGGGTTTGAATGT
CHD7_ex3_Fwd	ACATCAGCCACTAACTTTCAG
CHD7_ex3_Rev	AAT GCG TAA AAG CCT TAG C
CHD7_ex13_Fwd	GATGCATGTGCTCTGTTAGGA
CHD7_ex13_Rev	TCTGAGCAACGGGACTATCA
CHD7_ex31_Fwd	CAAAACAGAGGGGCAGGTAATA
CHD7_ex31_Rev	CCTCTTCTTTGCCCTCACATT
DCC_ex18_Fwd	CTCCTCTGCTGTTTGGGAGT
DCC_ex18_Rev	ATGTGCAGTCATGCTCCAAG
FGFR1_ex3_Fwd	TCTTCCTCTCTCGCCCCCTT
FGFR1_ex3_Rev	AAGCAGAGTGGGGGCAGAT
FGFR1_ex6_Fwd	GTCATGGGGCCTGCATTTT
FGFR1_ex6_Rev	AAGTGCCAATCGCTATCCTGA
FGFR1_ex14_Fwd	GCAGAGCAGTGTGGCAGAAGT
FGFR1_ex14_Rev	CCACTCCTTGCTTCTCAGAT
FGFR1_ex16/17_Fwd	TGCCCTGGGTAGAGGATTTGT
FGFR1_ex16/17_Rev	TGTGATGGGCGAGAGGAA
GJB2_ex2_Fwd	GTGTGCATTTCGTCTTTTCCA
GJB2_ex2_Rev	GGGAAATGCTAGCGACTGAG
GNRH1_ex1_Fwd	CTCTGACTTCCATCTTCTGC
GNRH1_ex1_Rev	GCCTTATCTCACCTGGAGC
GNRHR_ex1_Fwd	AACAGGACTTTAGATTCGGT
GNRHR_ex1_Rev	GTTAAGAAGTTTGCCCAAG
GNRHR_ex3_Fwd	ATTTTCTCCCATTGATTAAGTTG
GNRHR_ex3_Rev	CATTTGTGTTAATCATTCCC
POLR3B_ex15_Fwd	CTTGGCCCTTATGACACACA
POLR3B_ex15_Rev	CCTCCCCCTCTTCACAGACT
PROK2_ex2_Fwd	GATTTTCATAATCCAGGGGC
PROK2_ex2_Rev	TGTTTGTGCGAGCACGTTACC
PROK2_ex4_Fwd	TGAGCATATTGCCTAATGGG
PROK2_ex4_Rev	TTGAGGAAGCAAGAGCATTTTC
PROKR2_ex1_Fwd	GGCTCACTGACCCTGAAAGA
PROKR2_ex1_Rev	TGTCAGCCTGTCAGAGCCTA
RBM28_ex16_Fwd	AAAAAGGTGGGTTGGGGGAG

<b>RBM28_ex16_Rev</b>	AGGCTTCACACTTCTGGAGC
<b>WDR11_ex6_Fwd</b>	CCAACCCATGTTGGTCACTT
<b>WDR11_ex6_Rev</b>	TGCAAGATTATGGCCTTCTTTT

Abreviaturas: ID, identificação; fwd, *forward*; rev, *reverse*.

**Anexo 5:** Oligonucleótidos utilizados para clonar os exões estudados pelo método de minigene.

<b>ID do Oligonucleótido</b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>
CHD7_A2785A_Fwd	CTGACTGACATATGTGGATGCAGCTAACTTGACA
CHD7_A2785A_Rev	TCAGTAGAGATCTGTGTATGCACGAGTGTGGGA
CHD7_c.2613+4C>T_Fwd	CTGACTGACATATGTTAAGGCCTCCCTGTAGTGC
CHD7_c.2613+4C>T_Rev	TCAGTAGCATATGACCATCACCCTATTTCAC
CHD7_P2072P_Fwd	CTGACTGACATATGAGTGTACAATGTAGAATGCCCT
CHD7_P2072P_Rev	TCAGTAGAGATCTTGTGTCCATGCAACCCTTCT
CHD7_S559S_Fwd	CTGACTGACATATGTTTGCCATTACCATTTTCA
CHD7_S559S_Rev	TCAGTAGAGATCTCAGAATGCGTAAAAGCCTTAGC
CHD7_S817S_Fwd	CTGACTGAAGATCTACACTGTGGGTTTGGCAGAA
CHD7_S817S_Rev	TCAGTAGAGATCTGCTCACTGCATTTTAGAACCTGA
CHD7_T689T_Fwd	CTGACTGACATATGTTTGCCATTACCATTTTCA
CHD7_T689T_Rev	TCAGTAGAGATCTTCCCACCCCTCATTTTCATAG
CHD7_V1452L_Fwd	CTGACTGACATATGCCCTTGCCCAAACCATTTAT
CHD7_V1452L_Rev	TCAGTAGAGATCTTGTGTGGATTTTAGCTCTGAAG
DUSP6_P204P_Fwd	CTGACTGACATATGATCCTCCACCATCACCTGT
DUSP6_P204P_Rev	TCAGTAGCATATGCCCTTCCCCTGAGTCAAAG
FGFR1_D59D_Fwd	CTGACTGACATATGATTGCCTTCTCTCGACTTGG
FGFR1_D59D_Rev	TCAGTAGAGATCTGGCAGGGAGCAATGTTAGTG
FGFR1:c.359-4A>G_Fwd	CTGACTGACATATGTCTGGCATGAACCCTGATGG
FGFR1:c.359-4A>G_Rev	TCAGTAGAGATCTTCTGTCCTAAGGAAGCACGC
KISS1R_A317A_Fwd	CTGACTGACATATGGCAATAGCTCTGCCTGCCTA
KISS1R_A317A_Rev	TCAGTAGAGATCTCCGAACGTCACAAGAGACCA
NSMF_L442L_Fwd	CTGACTGACATATGGAGGGCTGGAGGCAGAGT
NSMF_L442L_Rev	TCAGTAGAGATCTGGGCTCAGGCATAAAGGATT
NSMF_P360P_Fwd	CTGACTGACATATGGCAGTGCTCCTCTACACCC
NSMF_P360P_Rev	TCAGTAGAGATCTACATCAAGGCTGCGTCAGAG
NSMF_Y240Y_Fwd	CTGACTGACATATGTGGTCCCCACACCAAAGAAG
NSMF_Y240Y_Rev	TCAGTAGAGATCTGAACAAAGGTGCAGTGCCTG
PROK2_R81R_Fwd	CTGACTGACATATGCCTCCCTGCCCTTAGTTGTG
PROK2_R81R_Rev	TCAGTAGAGATCTAGCACCTTCCCTGAGAATCTGC
SPRY4_L225L_Fwd	CTGACTGACATATGGTGCTTAGGAGAGTACCTCC
SPRY4_L225L_Rev	TCAGTAGAGATCTGCATTCAAGCAGCTGCAGTT
SPRY4_P169P_Fwd	CTGACTGACATATGGTGCTTAGGAGAGTACCTCC
SPRY4_P169P_Rev	TCAGTAGAGATCTGCATTCAAGCAGCTGCAGTT
WDR11_Y157Y_Fwd	CTGACTGACATATGTGACATCTTGGTTGTGGCTAA

WDR11_Y157Y_Rev	TCAGTAGAGATCTCTCTCTGTCCCTGGCTAGTCT
-----------------	------------------------------------

**Anexo 6:** Variantes raras identificadas nos 81 doentes com Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito.

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população de controlo portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
AMH	NM_000479.3	c.23G>C (p.Ser8Thr)	Missense	0.000143	-	VUS	5191	-
	NM_000479.3	c.295A>T (p.Thr99Ser)	Missense	0.000219	-	VUS (PM2)	5943	PMID: 28505284
	NM_000479.3	c.428C>T (p.Thr143Ile)	Missense	0.005473	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5183, 6319	PMID: 33202802
	NM_000479.3	c.974A>G (p.Gln325Arg)	Missense	0.005543	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	5404	PMID: 1483695
	NM_000479.3	c.1054C>T (p.Pro352Ser)	Missense	0.000476	0.004	VUS	7074	PMID: 28505284
	NM_000216.4	c.31A>G (p.Thr11Ala)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	8302	-
	NM_000216.4	c.542-1G>C <sup>(b)</sup>	Splice site	-	-	LP (PVS1, PM2)	5102	PMID: 28122887 <sup>(a)</sup>
ANOS1	NM_000216.4	c.571C>T (p.Arg191*)	Nonsense	-	-	P (PVS1, PM2, PM3, PP1)	7074	PMID: 11297579 PMID: 28122887 <sup>(a)</sup>
	NM_000216.4	Gross deletion ~ 4.8Mb <sup>(b)</sup>	Gross Deletion	-	-	P	6776	PMID: 28122887 <sup>(a)</sup>
ARHGAP35	NM_004491.5	c.2495G>A (p.Arg832Gln)	Missense	0.000100	-	VUS (PM2, PP2)	5237	-
	NM_001030055.2	c.805G>C (p.Val269Leu)	Missense	0.000021	-	VUS (PM2, PP2)	5187	-
ARHGAP5	NM_001030055.2	c.2067dupA (p.Tyr690Ilefs*4)	Frameshift	-	-	LP (PVS1, PM2)	8214	-
	NM_001030055.2	c.4216G>A (p.Alal406Thr)	Missense	0.005966	0.004	B (PP2, BS1, BS2)	5182, 5183, 7081, 7013	-
AXL	NM_001030055.2	c.4430T>G (p.Val1477Gly)	Missense	0.000081	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	7386	-
	NM_021913.3	c.1829G>T (p.Arg610Leu)	Missense	0.000020	-	VUS (PM2)	8302	-
BBS10	NM_024685.4	c.273C>G (p.Cys91Trp)	Missense	0.000028	-	P (PS3, PM2, PM3, PP2)	5187	PMID: 16582908
	NM_024685.4	c.1837T>C (p.Tyr613His)	Missense	0.000044	-	LP (PM1, PM2, PM5, PP3)	5040	PMID: 16582908
CCDC141	NM_173648.4	c.1394G>C (p.Gly465Ala)	Missense	0.000188	0.002	VUS (PM2, BP4)	7335	-
	NM_173648.4	c.1396delT (p.Tyr466Thrfs*33)	Frameshift	0.000188	0.002	VUS (PM2)	7335	-
CCDC88C	NM_173648.4	c.1521A>C (p.Gln507His)	Missense	0.003767	0.006	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7381, 7074, 7359	-
	NM_001080414.4	c.322G>A (p.Gly108Ser)	Missense	0.000225	-	VUS (PM2)	6980	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
	NM_001080414.4	c.925C>T (p.Arg309Cys)	Missense	0.000054	-	VUS (PM2)	5185	-
	NM_001080414.4	c.2393C>T (p.Ala798Val)	Missense	0.000272	-	LB (BS1, BP4, BP6)	5135	PMID: 29590070
	NM_001080414.4	c.4327G>A (p.Ala1443Thr)	Missense	0.001922	0.008	B (BA1, BS1, BS2, BP4, BP6)	2661	PMID: 29499638
	NM_001080414.4	c.5251G>A (p.Val1751Ile)	Missense	0.001183	-	LB (BS1, BS2, BP4, BP6)	6178	-
	NM_001080414.4	c.5927G>C (p.Gly1976Ala)	Missense	0.000767	0.004	LB (BS1, BP4)	5183, 8500	-
	NM_001080414.4	c.5980C>G (p.Arg1994Gly)	Missense	0.006488	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7013	-
CCKAR	NM_000730.3	c.1093G>A (p.Val365Ile)	Missense	0.002210	-	B (BS1, BS2, BP6)	6024	PMID: 11773861
CCKBR	NM_176875.2	c.199A>G (p.Met67Val)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	6024	-
CHD4	NM_001273.3	c.86C>G (p.Pro29Arg)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7030	-
	NM_001273.3	c.1715G>A (p.Arg572Gln)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	5194	PMID: 29844320
CHD7	NM_017780.3	c.1018A>G (p.Met340Val)	Missense	0.004606	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	6178, 7390	PMID: 18073582
	NM_017780.3	c.1163G>A (p.Gly388Glu)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP2)	5178	PMID: 30733481(a)
	NM_017780.3	c.1808_1811delACAA (p.Asn603Thrfs*4)	Frameshift	-	-	P (PVSI, PS4, PM2)	7381	PMID: 19159393
	NM_017780.3	c.2185A>G (p.Lys729Glu)	Missense	0.000356	0.002	LB (PP2, BS2, BP6)	2661	PMID: 33270637
	NM_017780.3	c.2708A>C (p.His903Pro)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	5139	PMID: 30733481*
	NM_017780.3	c.3036G>C (p.Leu1012Phe)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7355	-
	NM_017780.3	c.3245C>T (p.Thr1082Ile)	Missense	-	-	LP (PM2, PM5, PP2, PP3)	7081	PMID: 30733481(a)
	NM_017780.3	c.4354G>T (p.Val452Leu) <sup>(b)</sup>	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	5186	PMID: 30733481(a)
	NM_017780.3	c.5561A>G (p.Asp1854Gly)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	5136	PMID: 30733481(a)
	NM_017780.3	c.6194G>A (p.Arg2065His)	Missense	-	-	P (PS4, PM2, PM5, PP2, PP3)	5164	PMID: 21158681 PMID: 30733481(a)
	NM_017780.3	c.7579A>C (p.Met2527Leu)	Missense	0.002038	0.002	LB (PP2, BS1, BS2, BP6)	5102, 8474	PMID: 25077900
CHL1	NM_006614.2	c.1504G>A (p.Glu502Lys)	Missense	0.000620	-	LB (PM2, BP4, BP6)	5679	-
	NM_006614.2	c.3153G>C (p.Glu1051Asp)	Missense	0.000882	0.008	LB (PM2, BP4, BP6)	5102	-
CNTN2	NM_005076.3	c.505C>T (p.Leu169Phe)	Missense	0.002543	-	LB (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	5164	-
	NM_005076.3	c.1975A>G (p.Asn659Asp)	Missense	0.008071	0.004	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	6178	-
CPE	NM_001873.3	c.884C>G (p.Pro295Arg)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	8299	-
DCAF17	NM_025000.3	c.552_554delACA (p.Gln184del)	In-frame deletion	0.000016	-	VUS (PM2, PM4)	8214	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita	
<i>DCC</i>	NM_005215-3	c.527A>G (p.Asn176Ser)	Missense	0.000124	0.002	VUS	7367	PMID: 24808016	
	NM_005215-3	c.1256A>G (p.Lys419Arg)	Missense	0.002868	0.004	LB (BS1, BP4, BP6)	7625	-	
	NM_005215-3	c.1409G>A (p.Gly470Asp)	Missense	0.002885	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7075	PMID: 24808016	
	NM_005215-3	c.2708dupT (p.Ser904Lysfs*14)	Frameshift	-	-	LP (PVS1, PM2)	6130	-	
<i>DLG2</i>	NM_001142699-1	c.1346C>T (p.Pro449Leu)	Missense	0.000735	-	VUS (PM2)	6889	-	
	NM_001142699-1	c.1541T>C (p.Leu514Pro)	Missense	0.000946	0.004	LB (PM2, BS2, BP6)	6178	-	
<i>DMXL2</i>	NM_001174116-3	c.23C>G (p.Thr8Ser)	Missense	0.004346	0.002	B (PP2, BA1, BS1, BS2, BP4, BP6)	6263	-	
	NM_001174116-3	c.1330A>G (p.Met444Val)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	6130	-	
<i>DUSP6</i>	NM_001174116-3	c.2069G>A (p.Ser690Asn)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	7183	-	
	NM_001174116-3	c.4334T>C (p.Ile1445Thr)	Missense	0.002499	-	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	5195	-	
	NM_001174116-3	c.4442A>G (p.Asp1481Gly)	Missense	0.009030	0.006	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	5070	-	
	NM_001946-2	c.1037C>T (p.Thr346Met)	Missense	0.000286	0.002	VUS (PM2, BP6)	5182	PMID: 23643382	
	NM_000115-4	c.167A>C (p.Lys56Thr)	Missense	0.000029	0.002	VUS (PM2)	6263	PMID: 20009762	
	NM_001963-5	c.531G>C (p.Glu177Asp)	Missense	-	-	VUS (PM2)	7030	-	
	NM_001963-5	c.1478T>C (p.Ile493Thr)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP3)	8297	PMID: 19319977	
	NM_001963-5	c.1481G>A (p.Arg494Gln)	Missense	0.000028	-	VUS (PM2, PP3)	5139	-	
	NM_001963-5	c.1789A>G (p.Ile597Val)	Missense	0.001118	0.002	B (BS2, BP6)	2661	-	
	NM_001963-5	c.2378A>T (p.Glu793Val)	Missense	0.000074	-	VUS (PM2)	5236	-	
<i>EGFR</i>	NM_001963-5	c.2827C>T (p.Arg943Cys)	Missense	0.000057	-	VUS (PM2, BP4)	6024	-	
	NM_001963-5	c.2943T>A (p.Asp981Glu)	Missense	0.000117	-	VUS (PM2, BP4)	6024	-	
	NM_001963-5	c.3068G>A (p.Arg1023His)	Missense	0.000012	-	VUS (PM2, BP4)	6178	-	
	NM_005228-3	c.1580G>A (p.Arg527Gln)	Missense	0.000141	-	LB (BS1, BS2, BP4, BP6)	8347	-	
	NM_004439-5	c.1276G>A (p.Val426Ile)	Missense	0.000804	-	VUS (PM2)	8255	-	
	NM_004439-5	c.1480C>T (p.Arg494Cys)	Missense	0.000199	0.006	VUS (PM2)	2661, 5136	PMID: 27582484	
	NM_004439-5	c.1690G>A (p.Ala564Thr)	Missense	0.000052	-	VUS (PM2, BS2)	5190	-	
	NM_005103-5	c.960C>G (p.Ile320Met)	Missense	0.000085	-	VUS (PM2, BP4)	8214	-	
	<i>EPHA5</i>	NM_004439-5	c.1276G>A (p.Val426Ile)	Missense	0.000804	-	VUS (PM2)	8255	-
		NM_004439-5	c.1480C>T (p.Arg494Cys)	Missense	0.000199	0.006	VUS (PM2)	2661, 5136	PMID: 27582484
<i>FEZ1</i>	NM_005103-5	c.960C>G (p.Ile320Met)	Missense	0.000085	-	VUS (PM2, BP4)	8214	-	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
<i>FEZF1</i>	NM_001024613.3	c.253A>G (p.Ser85Gly)	Missense	0.005837	-	B (BS2, BP4, BP6)	2661	PMID: 26204995
	NM_001024613.3	c.869G>C (p.Cys290Ser)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP1, PP3)	5404	-
	NM_001024613.3	c.1397T>G (p.Leu466Arg)	Missense	0.000061	-	LB (PM2, PP1, BS2, BP4)	5404	-
	NM_023110.2	c.12G>T (p.Trp4Cys)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7081	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
	NM_023110.2	c.95dupA (p.Pro33Alafs*17) <sup>(b)</sup>	Frameshift	-	-	LP (PVS1, PM2)	5184	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
<i>FGFR1</i>	NM_023110.2	c.242T>C (p.Ile81Thr)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7367	PMID: 35457241 <sup>(a)</sup>
	NM_023110.2	c.287C>G (p.Ser96Cys)	Missense	-	-	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	5174	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
	NM_023110.2	c.677_678delGCinsAA (p.Gly226Glu)	Indel	-	-	LP (PM1, PM2, PM5, PP2)	8325	-
	NM_023110.2	c.1961dupA (p.Tyr654*)	Frameshift	-	-	LP (PVS1, PM2)	3329	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
	NM_023110.2	c.2155A>G (p.Met719Val)	Missense	-	-	P (PS4, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	2520	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
<i>FSHB</i>	NM_000510.2	c.59G>T (p.Ser20Ile)	Missense	0.002118	0.006	LB (PM2, BS2, BP6)	5182	PMID: 32242295
	NM_000510.2	c.177C>A (p.Asp59Glu)	Missense	-	-	VUS (PM2)	7407	-
	NM_020116.5	c.51G>C (p.Glu17Asp)	Missense	0.002928	0.006	LB (PM2, BS2, BP4)	6980	-
	NM_207359.3	c.9C>A (p.Ser3Arg)	Missense	0.000098	-	VUS (PM2, BP4)	5163	-
	NM_207359.3	c.620C>T (p.Ser207Leu)	Missense	0.000805	0.002	LB (PM2, PP1, BS2, BP4)	5404	-
<i>FSTL5</i>	NM_207359.3	c.1312G>A (p.Ala438Thr)	Missense	0.004121	0.008	B (BS1, BS2, BP4)	5185	-
	NM_000163.4	c.484G>A (p.Val162Ile)	Missense	0.001392	-	B (BA1, BS2, BP6)	5404	PMID: 9814495
	NM_000163.4	c.686G>A (p.Arg229His)	Missense	0.001213	-	B (PM5, PP3, BS1, BS2, BP6)	6776	PMID: 7565946
	NM_000163.4	c.1156C>T (p.Arg386Cys)	Missense	0.000336	0.002	VUS (BS4)	5163	PMID: 18393074
	NM_004004.6	c.101T>C (p.Met34Thr)	Missense	0.008996	0.008	LP (PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3, PP5)	8302	PMID: 9139825
<i>GJB2</i>	NM_004004.6	c.284T>C (p.Val95Ala)	Missense	0.000004	-	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	7355	-
	NM_004004.6	c.358_360delGAG (p.Glu120del)	In-frame deletion	0.000071	-	P (PS3, PM2, PM3, PM4)	5404	PMID: 29501291
	NM_004004.6	478G>A (p.Gly160Ser)	Missense	0.000602	0.002	LB (PP2, PP3, BS1, BP6)	5102	PMID: 12189487

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
<i>GLI2</i>	NM_005270.4	c.47A>G (p.Lys16Arg)	Missense	-	-	VUS (PM2)	5186	PMID: 23788652
	NM_005270.4	c.968T>C (p.Phe323Ser)	Missense	0.000024	-	VUS (PM2)	5182	-
	NM_005270.4	c.2159G>A (p.Arg720His)	Missense	0.000429	0.004	LB (BS1, BP6)	8214	PMID: 25327282
	NM_005270.4	c.2998C>T (p.Pro1000Ser)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	5943	-
	NM_005270.4	c.3348C>G (p.Asn1116Lys)	Missense	0.000079	-	LB (PM2, BP4, BP6)	5196, 8297	-
	NM_005270.4	c.3590G>A (p.Gly1197Asp)	Missense	0.001640	-	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	8347	PMID: 22967285
	NM_000168.5	c.233C>T (p.Ser78Leu)	Missense	0.000008	-	VUS (PM2, BP6)	6889	-
	NM_000168.5	c.3208A>T (p.Thr1070Ser)	Missense	0.000835	-	B (BS1, BP4, BP6)	7506	-
	NM_000168.5	c.3664C>T (p.Pro1222Ser)	Missense	0.002656	0.004	B (BP4, BS1, BS2, BP6)	7081	-
	NM_000825.3	c.99delA (p.Leu34Cysfs*12)	Frameshift	-	-	LP (PVSI, PM2)	8255	PMID: 19567835
<i>GNRHR</i>	NM_000406.2	c.317A>G (p.Gln106Arg)	Missense	0.002749	0.004	LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	7355, 6980, 8299, 8302	PMID: 9371856
	NM_000406.2	c.401T>G (p.Val34Gly)	Missense	0.000028	-	P (PS3, PM1, PM2, PM3, PP2, PP3)	5196, 7363	PMID: 25016926 PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
	NM_000406.2	c.410T>C (p.Leu137Pro)	Missense	-	-	LP (PM1, PM2, PM3, PP2)	8500	-
	NM_000406.2	c.415C>T (p.Arg139Cys)	Missense	0.000012	-	P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3)	7363	PMID: 17179725 PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
	NM_000406.2	c.785G>A (p.Arg262Gln)	Missense	0.001789	-	P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3)	7407, 8299	PMID: 9371856
	NM_000406.2	c.847T>C (p.Tyr283His) <sup>(b)</sup>	Missense	0.000008	-	LP (PM1, PM2, PP1, PP2, PP3)	6263	PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
<i>HJV</i> <i>IFT172</i>	NM_000406.2	c.937_947delTTTTTAAACCC (p.Phe313Metfs*3)	Frameshift	-	-	LP (PVSI, PM2, PP1)	7407, 6980	PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
	NM_213653.3	c.904G>A (p.Glu302Lys)	Missense	0.000290	-	VUS (PP2)	7390	PMID: 15254010
	NM_015662.2	c.806T>A (p.Ile269Asn)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	7506	-
	NM_015662.2	c.1678A>G (p.Met560Val)	Missense	0.000178	-	LB (BS1, BP4, BP6)	6024	-
	NM_015662.2	c.3196C>T (p.Arg1066Trp)	Missense	0.000024	-	VUS (PM2)	7506	-
	NM_015662.2	c.4130C>T (p.Alai377Val)	Missense	0.000106	-	VUS (PM2, PP3)	5140	-
	NM_001170961.1	c.3119G>A (p.Arg1040His)	Missense	0.000141	-	LB (PM2, BS2, BP6)	7628	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
<i>IGSF10</i>	NM_001170961.1	c.3243G>C (p.Met108Ile)	Missense	0.003153	0.007	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	8500	-
	NM_178822.4	c.353G>A (p.Arg118Gln)	Missense	0.000878	0.002	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7379	PMID: 28324054
	NM_178822.4	c.467G>T (p.Arg156Leu)	Missense	0.000354	0.002	VUS (PM2, PP5)	7030	PMID: 27137492
	NM_178822.4	c.2610G>A (p.Met870Ile)	Missense	0.000021	-	VUS (PM2, BP4)	8474	-
	NM_178822.4	c.3574A>G (p.Ile1192Val)	Missense	0.000814	-	LB (PM2, BP4, BP6)	7407	-
	NM_178822.4	c.3712A>G (p.Thr1238Ala)	Missense	0.006200	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	5070	-
	NM_178822.4	c.3797C>G (p.Thr1266Ser)	Missense	0.001642	0.004	LB (PM2, BP4, BP6)	7013	-
	NM_178822.4	c.3856A>G (p.Lys1286Glu)	Missense	0.000693	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	8347	-
	NM_178822.4	c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Missense	0.000233	0.006	VUS (PM2, BP4)	6889, 7363	PMID: 31726455
	NM_178822.4	c.4564G>A (p.Val1522Ile)	Missense	0.002844	-	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8347	-
	NM_178822.4	c.5405A>T (p.Asp1802Val)	Missense	0.002789	-	B (PM2, BS2, BP6)	7391	-
	NM_178822.4	c.5983G>A (p.Val1995Ile)	Missense	0.000772	0.002	VUS (PM2, BS2)	8474	PMID: 31726455
	NM_178822.4	c.7350_7353dupATCA (p.Leu2452Ilefs*7)	Frameshift	0.001380	-	LB (PM2, BS2, BP6)	7081, 5915	PMID: 27137492
	<i>IL17RD</i>	NM_017563.4	c.392A>C (p.Lys131Thr)	Missense	0.000856	0.002	VUS (PM2)	5174
NM_017563.4		c.1697C>T (p.Pro566Leu)	Missense	0.002099	-	B (BS1, BS2, BP6)	5102	-
<i>JAG1</i>	NM_017563.4	c.2158T>C (p.Cys720Arg)	Missense	-	-	VUS (PM2)	5161	-
	NM_000214.2	c.5G>T (p.Arg2Leu)	Missense	0.000045	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	6319	-
<i>KIF14</i>	NM_014875.2	c.1087G>A (p.Val363Ile)	Missense	0.002968	0.006	B (BS1, BS2, BP6)	5161	-
	NM_014875.2	c.1685G>A (p.Gly562Asp)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2)	7407	-
<i>KLB</i>	NM_014875.2	c.2648G>A (p.Arg883His)	Missense	0.000064	0.002	VUS (PM2, BP4)	5187, 6263	-
	NM_175737.3	c.1015G>A (p.Asp339Asn)	Missense	0.001570	-	B (BS1, BS2, BP6)	8347	-
<i>LEP</i>	NM_175737.3	c.3124G>A (p.Val1042Ile)	Missense	0.003275	0.002	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	5192, 8325	PMID: 32870266
	NM_000230.2	c.397G>A (p.Gly133Ser)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	8214	-
<i>LHX3</i>	NM_014564.4	c.38C>T (p.Ser13Leu)	Missense	0.000017	-	VUS (PM2)	5140, 6130	-
	NM_014564.4	c.964G>T (p.Val322Phe)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	7386	-
<i>MAGEL2</i>	NM_019066.5	c.1286C>T (p.Pro429Leu)	Missense	0.002873	0.006	B (BS1, BS2, BP6)	7612	-
	NM_019066.5	c.2028G>T (p.Glu676Asp)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2)	7359	-
	NM_019066.5	c.2074G>A (p.Val692Ile )	Missense	0.003543	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	5102	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita	
MASTL	NM_019066.5	c.2330C>T (p.Pro777Leu)	Missense	-	-	VUS (PM2)	5183	-	
	NM_019066.5	c.3017C>G (p.Thr1006Ser)	Missense	0.003454	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	6024, 7095	-	
	NM_032844.5	c.247G>T (p.Asp83Tyr)	Missense	0.000020	-	VUS (PM2)	5189	-	
	NM_032844.5	c.1156G>A (p.Val386Ile)	Missense	0.000008	-	VUS (PM2, BP4)	5136	-	
	NM_032844.5	c.1415A>G (p.Glu472Gly)	Missense	0.000702	-	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	8347	-	
	NM_032844.5	c.1774A>G (p.Arg592Gly)	Missense	0.000008	-	VUS (PM2, BP4)	8299	-	
	NM_032844.5	c.1828G>A (p.Val610Ile)	Missense	0.009365	0.008	B (BS2, BP4, BP6)	8255	-	
	NM_032844.5	c.2620G>A (p.Val874Ile)	Missense	0.004148	-	B (BS2, BP4, BP6)	5185	-	
	MC4R	NM_005912.2	c.751A>C (p.Ile251Leu)	Missense	0.006936	-	B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	5191, 7374	PMID: 12646666
	MET	NM_001127500.1	c.3029C>T (p.Thr1010Ile)	Missense	0.008249	0.004	B (BA1, BS2, BP6)	5140, 5190	PMID: 21970370
	MKKS	NM_018848.3	c.724G>T (p.Ala242Ser)	Missense	0.005251	0.006	B (PP3, BA1, BS2, BP6)	5943, 7183	PMID: 10802661
		NM_018848.3	c.1462G>A (p.Ala488Thr)	Missense	0.003649	-	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7030	PMID: 20472660
	MTOR	NM_004958.3	c.4128T>G (p.Asp1376Glu)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP2, BP6)	5163	PMID: 27830187
		NM_004958.3	c.5350C>T (p.Arg1784Cys)	Missense	0.000025	-	VUS (PM2, PP2, BP6)	5163	-
	NM_004958.3	c.5501C>T (p.Thr1834Met)	Missense	0.000358	-	LB (PP2, BP4, BP6)	5404	-	
NDNF	NM_024574.3	c.1624C>A (p.Leu542Met)	Missense	0.000012	-	VUS (PM2, BP4)	5136	-	
NEUROG3	NM_020999.4	c.46G>C (p.Glu16Gln)	Missense	0.000432	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	7030	-	
NOS1	NM_000620.4	c.335C>T (p.Thr112Ile)	Missense	0.000161	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	7625	-	
	NM_000620.4	c.458C>T (p.Ser153Leu)	Missense	0.002062	0.002	B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	8347	-	
	NM_000620.4	c.2591G>A (p.Gly864Asp)	Missense	0.004400	-	B (PM2, BS2, PP2, BP4, , BP6)	7013	-	
NOTCH1	NM_017617.4	c.64C>T (p.Pro22Ser)	Missense	0.002126	0.006	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7625	-	
	NM_017617.4	c.4699G>A (p.Glu1567Lys)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	5404	-	
	NM_017617.4	c.5011G>A (p.Val1671Ile)	Missense	0.003530	0.006	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7625	PMID: 29332214	
	NM_017617.4	c.5837G>A (p.Arg1946His)	Missense	0.000024	-	VUS (PM2, PP2, BP6)	5174	-	
	NM_017617.4	c.6119A>G (p.Asn2040Ser)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP2)	8325	PMID: 29177441	
	NM_017617.4	c.6365C>T (p.Pro2122Leu)	Missense	0.000008	-	VUS (PM2, PP2, BP6)	2520	PMID: 28649221	
	NM_017617.4	c.6949G>A (p.Gly2317Ser)	Missense	0.000020	-	LB (PM2, PP2, BP4, BP6)	6263	-	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
<i>NRP2</i>	NM_201266.1	c.1000C>T (p.Arg334Cys)	Missense	0.001622	-	VUS (PM2, BS2, PP3)	8214	PMID: 33212964
	NM_201266.1	c.1909G>A (p.Asp637Asn)	Missense	-	-	VUS (PM2)	5182	-
<i>NTN1</i>	NM_201266.1	c.2552C>T (p.Ser851Leu)	Missense	0.000056	0.002	VUS (PM2, BP4)	7081	-
	NM_004822.2	c.1378A>C (p.Thr460Pro)	Missense	0.000336	-	LB (PM2, BS2, BP4)	7390	-
	NM_004822.2	c.1466A>G (p.Lys489Arg)	Missense	0.000145	0.002	VUS (PM2)	7374	PMID: 28945198
	NM_004822.2	c.1751C>G (p.Thr584Arg)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP1, BP4)	5404	-
<i>OTUD4</i>	NM_001102653.1	c.331G>C (p.Val111Leu)	Missense	-	-	VUS (PM2)	5070	-
	NM_000439.4	c.337C>A (p.Leu113Ile)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	5187	-
<i>PCSK1</i>	NM_000439.4	c.1918A>G (p.Thr640Ala)	Missense	0.001306	0.006	LB (BS1, BP4, BP6)	5135	PMID: 29726959
	NM_000921.4	c.296A>C (p.Glu99Ala)	Missense	0.003209	0.004	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	5192, 5070, 7183	-
<i>PDE3A</i>	NM_000921.4	c.578T>C (p.Val193Ala)	Missense	0.003176	0.004	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7081	-
	NM_000921.4	c.1807G>A (p.Glu603Lys)	Missense	0.000007	-	VUS (PM2, BP4)	7335	-
<i>PHF6</i>	NM_032458.3	c.1045A>G (p.Lys349Glu)	Missense	0.000011	-	VUS (PM2, BS2, PP2)	7628	-
	NM_032242.3	c.841A>C (p.Lys281Gln)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7363	-
<i>PLXNA1</i>	NM_032242.3	c.965G>A (p.Arg322His)	Missense	0.000108	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	7074	-
	NM_032242.3	c.1628G>A (p.Arg543Gln)	Missense	0.000007	-	VUS (PM2, PP2)	8302	-
	NM_032242.3	c.2218C>G (p.Arg740Gly)	Missense	0.000032	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	6889	-
	NM_032242.3	c.2564G>A (p.Arg855His)	Missense	0.000145	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	7013	-
	NM_032242.3	c.5627C>T (p.Alai876Val)	Missense	0.000017	-	VUS (PM2, PP2)	6776	-
	NM_017514.4	c.124A>T (p.Thr42Ser)	Missense	0.000020	-	VUS (PM2, BS2)	6178	-
	NM_017514.4	c.1357A>T (p.Thr453Ser)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	5182	-
	NM_017514.4	c.1709C>T (p.Ala570Val)	Missense	0.000046	-	LB (PM2, BS2, BP4)	5404	-
	NM_002673.4	c.655G>A (p.Val219Met)	Missense	0.001526	0.006	VUS (PM2, BS2, PP2)	7407	-
	NM_002673.4	c.1327T>G (p.Ser443Ala)	Missense	0.000203	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	5040	-
<i>POGZ</i>	NM_002673.4	c.2987G>A (p.Arg996His)	Missense	0.000026	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	5237	-
	NM_015100.4	c.2789C>G (Pro930Arg)	Missense	0.001292	-	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	8214	-
<i>POLA1</i>	NM_015100.4	c.364A>G (p.Thr122Ala)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	8255	-
	NM_016937.3	c.1555A>G (p.Met519Val)	Missense	0.000073	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	5943	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
	NM_016937.3	c.2267A>G (p.Lys756Arg)	Missense	0.003633	-	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5140-het; 2594-homo	-
<i>POLK3A</i>	NM_016937.3	c.3981C>A (p.Ser1327Arg)	Missense	0.000018	-	LB (PM2, BS2, BP4)	5182	-
<i>POLK3B</i>	NM_007055.3	c.1177C>T (p.Pro393Ser)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	7335	-
<i>POU6F2</i>	NM_018082.5	c.1568T>A (p.Val523Glu)	Missense	0.000290	-	P (PM2, PM3, PP1, PP2, PP3)	6776	PMID: 22036172
	NM_007252.4	c.587_589dupAGC (p.Gln196dup)	In-frame insertion	0.001682	-	VUS (PM2, PM4)	5915	-
<i>PROK2</i>	NM_007252.4	c.1340C>G (p.Ala447Gly)	Missense	0.000054	-	VUS (PM2)	8347	-
	NM_001126128.1	c.163delA (p.Ile55*)	Frameshift	0.000113	-	P (PVS1, PS4, PM2)	7075	PMID: 17959774
	NM_001126128.1	c.297dupT (p.Gly100Trpfs*22)	Frameshift	0.000110	-	LP (PVS1, PM2)	8276	PMID: 17054399
<i>PROKR2</i>	NM_144773.3	c.238C>T (p.Arg80Cys)	Missense	0.000008	-	VUS (PM1, PM2)	5196	PMID: 18682503 PMID: 28611058(a)
	NM_144773.3	c.253C>T (p.Arg85Cys)	Missense	0.000601	0.002	LP (PM1, PM2, PM5, PP5)	7390	PMID: 17054399
	NM_144773.3	c.518T>G (p.Leu173Arg)	Missense	0.002196	0.004	LB (BS2, BP6)	5070	PMID: 17054399
	NM_144773.3	c.528G>C (p.Leu176Phe)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, BP4)	5070	PMID: 30733481(a)
<i>PTCH1</i>	NM_000264.3	c.1306G>A (p.Asp436Asn)	Missense	0.000704	0.002	LB (PP2, BS1, BP6)	7381	PMID: 16231297
	NM_000264.3	c.2173C>T (p.Pro725Ser)	Missense	0.000891	0.002	B (PP2, BS1, BP6)	7381, 7013	PMID: 28733979
	NM_000264.3	c.3487G>A (p.Gly1163Ser)	Missense	0.000513	0.002	VUS (PM5, PP2, PP3, BP6)	6776, 7359	PMID: 25260786
	NM_000264.3	c.3883C>T (p.Pro1295Ser)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7031	-
	NM_000264.3	c.4031C>T (p.Ala1344Val)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	5183	-
<i>RAB3GAP1</i>	NM_000264.3	c.4219G>A (p.Gly1407Ser)	Missense	0.000110	-	LB (PM2, PP2, BS2, BP6)	5196	PMID: 26590974
	NM_012233.3	c.244G>A (p.Glu82Lys)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	8299	-
	NM_012233.3	c.1006C>T (p.Arg336Cys)	Missense	0.004542	0.006	B (BA1, BS2, BP6)	7081, 8325	PMID: 29924831
	NM_012233.3	c.2800C>G (p.Pro934Ala)	Missense	0.000909	-	B (BA1, BS2, BP6)	8276	-
<i>RAB3GAP2</i>	NM_012414.3	c.745C>T (p.Pro249Ser)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP1)	6980	-
	NM_012414.3	c.1346T>A (p.Phe449Tyr)	Missense	-	-	VUS (PM2, BP4)	5194	-
	NM_012414.3	c.2290C>T (p.Leu764Phe)	Missense	0.000991	-	LB (BS1, BP4)	6889	-
	NM_012414.3	c.3058T>A (p.Tyr1020Asn)	Missense	0.000032	-	VUS (PM2)	7355	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
RBM28	NM_018077.2	c.280A>T (p.Asn94Tyr)	Missense	0.000168	-	LB (PM2, BP4, BP6)	7381	-
	NM_018077.2	c.1744_1745insT (p.Arg582Leufs*5)	Frameshift	-	-	LP (PVS1, PM2)	8299	-
RELN	NM_018077.2	c.2077C>T (p.His693Tyr)	Missense	0.002121	0.008	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	5185	-
	NM_005045.3	c.877G>A (p.Asp293Asn)	Missense	0.000425	-	LB (PM2, PP2, BP4, BP6)	5194	PMID: 30619712
	NM_005045.3	c.4279T>C (p.Cys1427Arg)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	7506	-
	NM_005045.3	c.4408G>A (p.Val1470Ile)	Missense	0.002425	0.006	B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	7367	-
	NM_005045.3	c.5468C>A (p.Alai823Glu)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	5163	-
	NM_005045.3	c.6170T>G (p.Leu2057Arg)	Missense	0.000081	-	VUS (PM2, PP2)	5186, 6263	PMID: 26934580
	NM_005045.3	c.6214G>A (p.Glu2072Lys)	Missense	0.000046	-	LB (PM2, PP2, BS2, BP6)	7183	PMID: 26934580
	NM_005045.3	c.6749A>G (p.Tyr2250Cys)	Missense	-	-	VUS (PM2, PP2)	7625	-
	NM_005045.3	c.7634C>T (p.Ala2545Val)	Missense	0.000216	0.004	VUS (PP2, BP6)	7349, 7506	PMID: 29969175
	NM_022370.3	c.1189C>A (p.Pro397Thr)	Missense	0.001725	-	B (BA1, BS2, BP6)	5943	-
ROBO3	NM_022370.3	c.1655C>G (p.Pro552Arg)	Missense	0.000036	-	VUS (PM2)	7612	-
	NM_022370.3	c.2763G>C (p.Glu921Asp)	Missense	0.001301	0.002	B (BA1, BP6)	5070	PMID: 30098700
	NM_022370.3	c.2899C>T (p.Pro967Ser)	Missense	0.000128	0.002	VUS (PM2)	5679	-
	NM_022370.3	c.3922G>A (p.Val1308Met)	Missense	0.000051	-	LB (PM2, BP4, BP6)	7031	-
	NM_001376914.1	c.1015C>T (p.Arg339*)	Nonsense	0.000322	-	VUS (PM2)	5268	-
	NM_006080.2	c.229A>G (p.Ile77Val)	Missense	0.000046	-	VUS (PM2, BP4)	5679	-
	NM_006080.2	c.458A>G (p.Asn153Ser)	Missense	0.002292	-	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	3329	PMID: 22927827
	NM_012431.2	c.2102G>T (p.Ser701Ile)	Missense	0.005935	-	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	5184	-
	NM_006378.4	c.2182C>T (p.Leu728Phe)	Missense	0.002207	-	B (BS1, BS2, BP6)	8500	-
	NM_003612.3	c.290T>A (p.Leu97His)	Missense	0.001274	0.002	VUS (PM2, BP4)	5196	-
SIN3A	NM_003612.3	c.1865G>A (p.Arg622His)	Missense	0.000404	0.002	VUS (PM2, BP4)	5186	-
	NM_00145358.2	c.2252A>G (p.Asn751Ser)	Missense	0.000096	-	VUS (PM2, PP2)	7075	-
SLC29A3	NM_00145358.2	c.2519A>G (p.Glu840Gly)	Missense	0.000048	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	5194	-
	NM_018344.5	c.59C>G (p.Thr20Arg)	Missense	0.000016	-	VUS (PM2, BP4)	8474	-
	NM_018344.5	c.128T>G (p.Leu43Arg)	Missense	0.000697	-	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5404	-
	NM_018344.5	c.946T>G (p.Phe316Val)	Missense	0.000768	-	LB (BS1, BS2)	5161	-

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica no gnomAD	Frequência alélica na população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID doentes	Previamente descrita
<i>SLIT2</i>	NM_004787.3	c.1395C>A (p.Asn465Lys)	Missense	0.000004	-	VUS (PM2, PP2)	5404	-
	NM_004787.3	c.2372C>T (p.Thr791Met)	Missense	0.000018	-	VUS (PM2, PP2)	6263	-
<i>SOX10</i>	NM_004787.3	c.4049G>A (p.Ser1350Asn)	Missense	0.003739	0.006	B (PM2, PP2, BS2, BP6)	2594	-
	NM_006941.3	c.191A>T (p.Asp64Val)	Missense	0.000021	-	VUS (PM2, PP1)	3329	PMID: 29419413
<i>SOX11</i>	NM_006941.3	c.778G>A (p.Gly260Arg)	Missense	0.000022	-	VUS (PM2, PP3)	8474	-
	NM_003108.4	c.650T>C (p.Val217Ala)	Missense	0.000005	-	VUS (PM2, PP2)	8276	-
<i>SPRED3</i>	NM_001042522.2	c.360_363dup (p.Ser122Leufs*299)	Frameshift	0.000411	-	VUS (PM2)	2520	-
<i>SRA1</i>	NM_001035235.2	c.236C>T (p.Pro79Leu)	Missense	-	-	VUS (PM2)	8347	-
	NM_001035235.2	c.413G>A (p.Gly138Glu)	Missense	0.002195	0.004	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	5164	-
<i>TACK3</i>	NM_001059.2	c.1345G>A (p.Ala449Thr)	Missense	0.005288	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5040	PMID: 21209029
<i>TBCE</i>	NM_003193.3	c.214C>T (p.Pro72Ser)	Missense	0.003571	0.004	B (BA1, BS1, BS2, BP6)	5161, 7625	-
	NM_003193.3	c.830C>T (p.Pro277Leu)	Missense	0.000002	-	VUS (PM2)	7625	-
<i>TBX3</i>	NM_005996.3	c.1122G>C (p.Lys374Asn)	Missense	-	-	VUS (PM2)	7367	-
<i>TFR2</i>	NM_003227.3	c.840C>G (p.Phe280Leu)	Missense	0.000397	0.002	VUS	5185, 6024	PMID: 18762941
	NM_003227.3	c.1127C>A (p.Ala376Asp)	Missense	0.002704	-	B (BS1, BS2, BP6)	5190	PMID: 22890139
<i>TTC8</i>	NM_198309.3	c.254A>G (p.Lys85Arg)	Missense	0.005035	-	B (BA1, BS2, BP6)	8297	-
	NM_198309.3	c.278G>T (p.Gly93Val)	Missense	0.000020	-	VUS (PM2)	5189	-
<i>WDPCP</i>	NM_015910.7	c.1333G>C (p.Ala445Pro)	Missense	0.005543	-	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5187	PMID: 26386247
	NM_015910.7	c.2063A>G (p.Asn688Ser)	Missense	0.009322	-	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5194, 7335	-
<i>WDR11</i>	NM_018117.11	c.797G>C (p.Arg266Pro)	Missense	0.000012	-	LP (PM2, PP3, PP5)	5040	-
	NM_018117.11	c.811C>T (p.Leu271Phe)	Missense	-	-	VUS (PM2)	7095	-
<i>WDR4</i>	NM_033661.4	c.265C>T (p.Arg89Cys)	Missense	0.000014	-	VUS (PM2)	8299	-
	NM_033661.4	c.652T>C (p.Tyr218His)	Missense	0.000063	-	VUS (PM2)	7039	-

Abreviaturas: ID, identificação; gnomAD, Genome Aggregation Database; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics. As variantes foram classificadas como Benignas (B), Provavelmente benignas (LB), Variantes de significado indeterminado (VUS), Provavelmente patogénicas (LP) ou Patogénicas (P) de acordo com a evidência de

patogenicidade (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (PP1-5)) ou *benign impact (stand-alone* (BA), *strong* (BS1-4), ou *supporting* (BP1-7)). PMID, PubMed® identifier. <sup>(a)</sup> trata-se do mesmo doente da publicação. <sup>(b)</sup> variantes identificadas apenas por Sanger.

**Anexo 7:** Características dos doentes com variantes patogénicas (P), provavelmente patogénicas (LP) ou de significado indeterminado (VUS).

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>2520</b>	M	SK	Criptorquidia, problemas auditivos, atraso do desenvolvimento cognitivo, espinha bífida	NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.2155A>G (p.Met719Val)	Het	-	P (PS4, PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
<b>2594</b>	M	SK	Obesidade	Nenhuma	Het	0.000008	VUS (PM2, PP2, BP6)	PMID: 28649221
<b>2661</b>	M	HHCn		NM_001042522.2( <i>SPRED3</i> ):c.360_363dup (p.Ser122Leufs*299)	Het	0.000411	VUS (PM2)	-
<b>3329</b>	M	SK	Um irmão afetado	NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.1961dupA (p.Tyr654Ter)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	PMID: 27582484 PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
<b>5040</b>	M	SK		NM_006941.3( <i>SOX10</i> ):c.191A>T (p.Asp64Val)	Het	0.000021	VUS (PM2)	PMID: 29419413
				NM_024685.4( <i>BBS10</i> ):c.1837T>C (p.Tyr613His)	Het	0.000044	LP (PM1, PM2, PM5, PP3)	PMID: 16582908
<b>5070</b>	M	HHCn	Hipoplasia hipofisária	NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.1327T>G (p.Ser443Ala)	Het	0.000203	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
				NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.797G>C (p.Arg266Pro)	Het	0.000012	LP (PM2, PP3, PP5)	-
				NM_001102653.1( <i>OTUD4</i> ):c.331G>C (p.Val111Leu)	Het	-	VUS (PM2)	-
<b>5102</b>	M	SK	Agnesia renal unilateral. Um irmão afetado	NM_144773.3( <i>PROKR2</i> ):c.528G>C (p.Leu176Phe)	Het	0.000004	VUS (PM2, BP4)	PMID: 39733481 <sup>(a)</sup>
				NM_000216.4( <i>ANOS1</i> ):c.542-1G>C <sup>(b)</sup>	Hemi	-	LP (PVS1, PM2)	PMID: 28122887 <sup>(a)</sup>

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>5135</b>	M	SK		Nenhuma	Het	-	VUS (PM2, PP2)	PMID: 30733481 (a)
<b>5136</b>	M	SK	Criptorquidia, problemas auditivos	NM_017780.3(CHD7):c.5561A>G (p.Asp1854Gly)	Het	0.000199	VUS (PM2)	PMID: 27582484
				NM_004439.5(EPHA5):c.1480C>T (p.Arg494Cys)	Het	0.000008	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_032844.5(MASTL):c.1156G>A (p.Val386Ile)	Het	0.000012	VUS (PM2, BP4)	-
<b>5139</b>	M	HHCn		NM_024574.3(NDNF):c.1624C>A (p.Leu542Met)	Het	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	PMID: 30733481 (a)
				NM_017780.3(CHD7):c.2708A>C (p.His903Pro)	Het	0.000028	VUS (PM2, PP3)	-
<b>5140</b>	F	SK	Atraso do desenvolvimento cognitivo, problemas auditivos, hipoplasia hipofisária	NM_001963.5(EGF):c.1481G>A (p.Arg494Gln)	Het	0.000106	VUS (PM2, PP3)	-
				NM_015662.2(IFIT172):c.4130C>T (p.Alai377Val)	Het	-	-	-
<b>5161</b>	M	HHCn		NM_014564.4(LHX3):c.38C>T (p.Ser13Leu)	Het	0.000017	VUS (PM2)	-
<b>5163</b>	M	SK		NM_017563.4(IL17RD):c.2158T>C (p.Cys720Arg)	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_207359.3(GADL1):c.9C>A (p.Ser3Arg)	Het	0.000100	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_000163.4(GHR):c.1156C>T (p.Arg386Cys)	Het	0.000336	VUS (BS4)	PMID: 18303074
				NM_004958.3(MTOR):c.4128T>G (p.Asp1376Glu)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2, BP6)	PMID: 27830187
				NM_004958.3(MTOR):c.5350C>T (p.Arg1784Cys)	Het	0.000025	VUS (PM2, PP2, BP6)	-
				NM_005045.3(RELN):c.5468C>A (p.Alai1823Glu)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
<b>5164</b>	M	SK	Insuficiência renal crónica-Dois irmãos afetados	NM_017780.3(CHD7):c.6194G>A (p.Arg2065His)	Het	-	P (PS4, PM2, PM5, PP2, PP3)	PMID: 21158681 PMID: 30733481 (a)
<b>5174</b>	M	SK	Criptorquidia	NM_023110.2(FGFR1):c.287C>G (p.Ser96Cys)	Het	-	LP (PM1, PM2, PP2, PP3, PP5)	PMID: 26277103 (a)
				NM_017563.4(IL17RD):c.392A>C (p.Lysi131Thr)	Het	0.000856	VUS (PM2)	PMID: 23643382

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
5178	M	SK	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária	NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.5837G>A (p.Arg1946His)	Het	0.000024	VUS (PM2, PP2, BP6)	-
				NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.1163G>A (p.Gly388Glu)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)	PMID: 30733481 <sup>(a)</sup>
5182	M	HHCn		NM_001946.2( <i>DUSP6</i> ):c.1037C>T (p.Thr346Met)	Het	0.000286	VUS (PM2, BP6)	PMID: 23643382
				NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.968T>C (p.Phe323Ser)	Het	0.000024	VUS (PM2)	-
5183	M	SK	Criptorquidia	NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.1909G>A (p.Asp637Asn)	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_017514.4( <i>PLXNA3</i> ):c.1357A>T (p.Thr453Ser)	Hemi	-	VUS (PM2, BP4)	-
5184	M	HHCn	Criptorquidia	NM_019066.5( <i>MAGEL2</i> ):c.2330C>T (p.Pro777Leu)	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_000264.3( <i>PTCH1</i> ):c.4031C>T (p.Alal1344Val)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
5185	M	HHCn	Criptorquidia	NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.95dupA (Pro33Alafs*17) <sup>(b)</sup>	Het	-	LP (PVS1, PM2)	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
				NM_001080414.4( <i>CCDC88C</i> ):c.925C>T (p.Arg309Cys)	Het	0.000100	VUS (PM2)	-
5186	M	SK	Reversão do hipogonadismo	NM_003227.3( <i>TFR2</i> ):c.840C>G (p.Phe280Leu)	Het	0.000397	VUS	PMID: 18762941
				NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.4354G>T (p.Val1452Leu) <sup>(b)</sup>	Het	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	PMID: 30733481 <sup>(a)</sup>
5187	F	HHCn		NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.47A>G (p.Lys16Arg)	Het	-	VUS (PM2)	PMID: 23788652
				NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.6170T>G (p.Leu2057Arg)	Het	0.000081	VUS (PM2, PP2)	PMID: 26934580
5189	M	HHCn		NM_003612.3( <i>SEMA7A</i> ):c.1865G>A (p.Arg622His)	Het	0.000404	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_001030055.2( <i>ARHGAP5</i> ):c.805G>C (p.Val269Leu)	Het	0.000021	VUS (PM2, PP2)	-
5189	M	HHCn		NM_024685.4( <i>BBS10</i> ):c.273C>G (p.Cys91Trp)	Het	0.000028	P (PS3, PM2, PM3, PP2)	PMID: 16582908
				NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.2648G>A (p.Arg883His)	Het	0.000064	VUS (PM2, BP4)	-
5189	M	HHCn		NM_000439.4( <i>PCSK1</i> ):c.337C>A (p.Leu113Ile)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_032844.5( <i>MASTL</i> ):c.247G>T (p.Asp83Tyr)	Het	0.000020	VUS (PM2)	-

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
5190	M	HHCn	Criptorquidia, problemas auditivos, hipoplasia hipofisária	NM_198309.3(TTC8):c.278G>T (p.Gly93Val)	Het	0.000020	VUS (PM2)	-
				NM_004439.5(EPHA5):c.1690G>A (p.Ala564Thr)	Het	0.000052	VUS (PM2, BS2)	-
5191	M	SK	Problemas auditivos	NM_000479.3(AMH):c.23G>C (p.Ser8Thr)	Het	0.000143	VUS	-
5192	M	HHCn	Atraso do desenvolvimento cognitivo, epilepsia, malformação de Chiari, hipoplasia hipofisária	Nenhuma	Het	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	PMID: 29844320
5194	M	HHCn		NM_001273.3(CHD4):c.1715G>A (p.Arg572Gln)				
5195	M	HHCn	Criptorquidia	NM_012414.3(RAB3GAP2):c.1346T>A (p.Phe449Tyr)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
5196	M	HHCn		NM_001145358.2(SIN3A):c.2519A>G (p.Glu840Gly)	Het	0.000048	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
5236	M	HHCn	Criptorquidia	Nenhuma	Het	0.000028	P (PS3, PML, PM2, PM3, PP2, PP3)	PMID: 25016926 PMID: 28611058 (a)
				NM_000406.2(GNRHR):c.401T>G (p.Val134Gly)				
5237	M	HHCn	Criptorquidia	NM_144773.3(PROKR2):c.238C>T (p.Arg80Cys)	Het	0.000008	VUS (PML, PM2)	PMID: 18682503 PMID: 28611058 (a)
				NM_003612.3(SEMA7A):c.290T>A (p.Leu97His)	Het	0.001274	VUS (PM2, BP4)	-
5268	M	SK	Hipoplasia hipofisária, baixa estatura	NM_001963.5(EGF):c.2378A>T (p.Glu793Val)	Het	0.000074	VUS (PM2)	-
				NM_004491.5(ARHGAP35):c.2495G>A (p.Arg832Gln)	Het	0.000001	VUS (PM2, PP2)	-
5268	M	SK	Hipoplasia hipofisária, baixa estatura	NM_002673.4(PLXNB1):c.2987G>A (p.Arg996His)	Het	0.000026	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
				NM_001376914.1(SEC14L3):c.1015C>T (p.Arg339*)	Het	0.000322	VUS (PM2)	-

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>5404</b>	M	HHCn	Doença de Hirschsprung. Um irmão e uma irmã afetados	NM_001024613.3( <i>FEZF1</i> ):c.869G>C (p.Cys290Ser)	Het	-	VUS (PM2, PP1, PP3)	-
<b>5679</b>	M	HHCn		NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.358_360delGAG (p.Glu120del)	Het	0.000071	P (PS3, PM2, PM3, PM4)	PMID: 29501291
<b>5915</b>	F	HHCn	Hipoplasia hipofisária	NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.4699G>A (p.Glu1567Lys)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
<b>5943</b>	M	HHCn	Atraso do desenvolvimento cognitivo, estrabismo, obesidade, reversão do hipogonadismo	NM_004822.2( <i>NTN1</i> ):c.1751C>G (p.Thr584Arg)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP1, BP4)	-
				NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.1395C>A (p.Asn465Lys)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.2899C>T (p.Pro967Ser)	Het	0.000128	VUS (PM2)	-
				NM_006080.2( <i>SEMA3A</i> ):c.229A>G (p.Ile77Val)	Het	0.000046	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_007252.4( <i>POU6F2</i> ):c.587_589dupAGC (p.Gln196dup)	Het	0.001682	VUS (PM2, PM4)	-
				NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.295A>T (p.Thr99Ser)	Het	0.000219	VUS (PM2)	PMID: 28505284
<b>6024</b>	M	HHCn		NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.2998C>T (p.Pro1000Ser)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_176875.2( <i>CCKBR</i> ):c.199A>G (p.Met67Val)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_001963.5( <i>EGF</i> ):c.2827C>T (p.Arg943Cys)	Het	0.000057	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_001963.5( <i>EGF</i> ):c.2943T>A (p.Asp981Glu)	Het	0.000117	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_003227.3( <i>TFR2</i> ):c.840C>G (p.Phe280Leu)	Het	0.000397	VUS	PMID: 18762941
<b>6130</b>	M	SK	Hipoplasia hipofisária	NM_005215.3( <i>DCC</i> ):c.2708dupT (p.Ser904Lysfs*14)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	-

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>6178</b>	F	SK		NM_001174116.2(DMXL2):c.1330A>G (p.Met444Val)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
				NM_014564.4(LHX3):c.38C>T (p.Ser13Leu)	Het	0.000017	VUS (PM2)	-
<b>6263</b>				NM_001963.5(EGF):c.3068G>A (p.Arg1023His)	Het	0.000012	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_017514.4(PLXNA3):c.124A>T (p.Thr42Ser)	Het	0.000020	VUS (PM2, BS2)	-
	F	HHCh	Um irmão e uma irmã afetados	NM_000115.4(EDNRRB):c.167A>C (p.Lys56Thr)	Het	0.000029	VUS (PM2)	PMID: 20009762
				NM_000406.2(GNRHR):c.847T>C (p.Tyr283His) <sup>(b)</sup>	Homo	0.000008	LP (PM1, PM2, PP1, PP2, PP3)	PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
<b>6319</b>				NM_014875.2(KIF14):c.2648G>A (p.Arg883His)	Het	0.000064	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_005045.3(RELN):c.6170T>G (p.Leu2057Arg)	Het	0.000081	VUS (PM2, PP2)	PMID: 26934580
				NM_004787.3(SLIT2):c.237C>T (p.Thr791Met)	Het	0.000018	VUS (PM2, PP2)	-
	F	SK	Hipoplasia hipofisária, baixa estatura, IGF1 baixa	NM_000214.2(JAG1):c.5G>T (p.Arg2Leu)	Het	0.000045	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
<b>6776</b>	M	SK	Agnesia renal unilateral, atraso do desenvolvimento cognitivo, obesidade, ictiose. Um irmão afetado	Hemi	-	P	PMID: 28122887 <sup>(a)</sup>	
<b>6889</b>				NM_000216.4(ANOS1):deletion ~4.8 Mb <sup>(b)</sup>				
				NM_032242.3(PLXNA1):c.5627C>T (p.Ala1876Val)	Het	0.000017	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_018082.5(POLR3B):c.1568T>A (p.Val523Glu)	Het	0.000290	P (PM2, PM3, PP1, PP2, PP3)	PMID: 22036172
				NM_000264.3(PTCH1):c.3487G>A (p.Gly1163Ser)	Het	0.000513	VUS (PM5, PP2, PP3, BP6)	PMID: 25260786
			NM_001142699.1(DLGL2):c.1346C>T (p.Pro449Leu)	Het	0.000735	VUS (PM2)	-	

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>6980</b>	M	HHCn	Uma irmã afetada	NM_000168.5( <i>GLI3</i> ):c.233C>T (p.Ser78Leu)	Het	0.000008	VUS (PM2, BP6)	-
				NM_178822.4( <i>IGSF10</i> ):c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Het	0.000200	VUS (PM2, BP4)	PMID: 31726455
				NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.2218C>G (p.Arg740Gly)	Het	0.000032	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
				NM_001080414.4( <i>CCDC88C</i> ):c.322G>A (p.Gly108Ser)	Het	0.000225	VUS (PM2)	-
<b>7013</b> <b>7030</b>	M M	SK SK		NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het	0.002749	LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	PMID: 9371856 PMID: 28611058 (a)
				NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.937_947delTTTTTAAACCC (p.Phe313Metfs*3)	Het	-	LP (PVS1, PM2, PP1)	PMID: 28611058 (a)
				NM_012414.3( <i>RAB3GAP2</i> ):c.745C>T (p.Pro249Ser)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP1)	-
				NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.2564G>A (p.Arg855His)	Het	0.000145	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
<b>7031</b> <b>7039</b> <b>7074</b>	F M M	HHCn SK SK	Hipoplasia hipofisária, IGF1 baixa. Um irmão e dois sobrinhos afetados	NM_001273.3( <i>CHD4</i> ):c.86C>G (p.Pro29Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_001963.5( <i>EGF</i> ):c.531G>C (p.Glu177Asp)	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_178822.4( <i>IGSF10</i> ):c.467G>T (p.Arg156Leu)	Het	0.000354	VUS (PM2, PP5)	PMID: 27137492
				NM_000264.3( <i>PTCH1</i> ):c.3883C>T (p.Pro1295Ser)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
<b>7075</b>	M	SK	Deficiência de ACTH	NM_033661.4( <i>WDR4</i> ):c.652T>C (p.Tyr218His)	Het	0.000063	VUS (PM2)	-
				NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.1054C>T (p.Pro352Ser)	Het	0.000476	VUS	PMID: 28505284
				NM_000216.4( <i>ANOS1</i> ):c.571C>T (p.Arg191*)	Hemi	-	P (PVS1, PM2, PM3, PP1)	PMID: 11297579 PMID: 28122887 (a)

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>7081</b>	M	HHCn		NM_001145357.2( <i>SIN3A</i> ):c.2252A>G (p.Asn751Ser)	Het	0.000096	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.3245C>T (p.Thr1082Ile)	Het	-	LP (PM2, PM5, PP2, PP3)	PMID: 30733481 <sup>(a)</sup>
<b>7095</b>	M	SK		NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.12G>T (p.Trp4Cys)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	PMID: 26277103 <sup>(a)</sup>
				NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.2552C>T (p.Ser851Leu)	Het	0.000056	VUS (PM2, BP4)	-
<b>7183</b>	M	HHCn	Obesidade, reversão do hipogonadismo	NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.811C>T (p.Leu271Phe)	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.2069G>A (p.Ser690Asn)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
<b>7334</b>	M	HHCn		Nenhuma				
<b>7335</b>	M	SK	Reversão do hipogonadismo	NM_173648.4( <i>CCDC141</i> ):c.1394G>C (p.Gly465Ala)	Het	0.000188	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_173648.4( <i>CCDC141</i> ):c.1396delT (p.Tyr466Thrfs*33)	Het	0.000188	VUS (PM2)	-
<b>7349</b>	M	SK		NM_000921.4( <i>PDE3A</i> ):c.1807G>A (p.Glu603Lys)	Het	0.000007	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_007055.3( <i>POLR3A</i> ):c.1177C>T (p.Pro393Ser)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2, PP3)	-
<b>7355</b>	F	HHCn	IGF1 baixa	NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.7634C>T (p.Ala2545Val)	Het	0.000216	VUS (PP2, BP6)	PMID: 29969175
				NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.3036G>C (p.Leu1012Phe)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
<b>7359</b>	M	HHCn	Problemas auditivos, insuficiência renal crónica	NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.284T>C (p.Val95Ala)	Het	0.000004	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	-
				NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het	0.002749	LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	PMID: 9371856 PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
<b>7359</b>	M	HHCn		NM_012414.3( <i>RAB3GAP2</i> ):c.3058T>A (p.Tyr1020Asn)	Het	0.000032	VUS (PM2)	-
				NM_019066.5( <i>MAGEL2</i> ):c.2028G>T (p.Glu676Asp)	Het	0.000016	VUS (PM2)	-
<b>7359</b>	M	HHCn		NM_000264.3( <i>PTCH1</i> ):c.3487G>A (p.Gly1163Ser)	Het	0.000513	VUS (PM5, PP2, PP3, BP6)	PMID: 25260786

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>7363</b>	M	HHCn		NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.401T>G (p.Val134Gly)	Het	0.000028	P (PS3, PM1, PM2, PM3, PP2, PP3)	PMID: 25016026 PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
<b>7367</b>	M	HHCn		NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.415C>T (p.Arg139Cys)	Het	0.000012	P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3)	PMID: 17179725 PMID: 28611058 <sup>(a)</sup>
<b>7374</b>	M	HHCn	Problemas auditivos	NM_178822.4( <i>IGSF10</i> ):c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Het	0.000200	VUS (PM2, BP4)	PMID: 31726455
<b>7379</b>	M	SK	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária, IGF1 baixa	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.841A>C (p.Lys281Gln)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
<b>7381</b>	M	SK	Problemas auditivos, atraso do desenvolvimento cognitivo	NM_005215.3( <i>DCC</i> ):c.527A>G (p.Asn176Ser)	Het	0.000124	VUS	PMID: 24808016
<b>7386</b>	M	HHCn		NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.242T>C (p.Ile81Thr)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	PMID: 35457241 <sup>(a)</sup>
<b>7390</b>	M	HHCn		NM_005996.3( <i>TBX3</i> ):c.1122G>C (p.Lys374Asn)	Het	-	VUS (PM2)	-
<b>7391</b>	M	SK		NM_004822.2( <i>NTN1</i> ):c.1466A>G (p.Lys489Arg)	Het	0.000145	VUS (PM2)	PMID: 28945198
				Nenhuma				
				NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.1808_1811delACAA (p.Asn603Thrs*4)	Het	-	P (PVS1, PS4, PM2)	PMID: 19159393
				Nenhuma				
				NM_001030055.2( <i>ARHGAP5</i> ):c.4430T>G (p.Val1477Gly)	Het	0.000081	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_014564.4( <i>LHX3</i> ):c.964G>T (p.Val322Phe)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_144773.3( <i>PROKR2</i> ):c.253C>T (p.Arg85Cys)	Het	0.000601	LP (PM1, PM2, PM5, PP5)	PMID: 17054399
				NM_213653.3( <i>HJV</i> ):c.904G>A (Glu302Lys)	Het	0.000290	VUS (PP2)	PMID: 15254010
				Nenhuma				

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>7407</b>	M	HHCn		NM_000510.2( <i>FSHB</i> ):c.177C>A (p.Asp59Glu)	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.785G>A (p.Arg262Gln)	Het	0.001789	P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3) LP (PVS1, PM2)	PMID: 9371856 PMID: 28611058 (a) PMID: 28611058 (a)
<b>7506</b>	M	HHCn	Criptorquidia	NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.937_947del(TTTTAAACCC (p.Phe313Metfs*3))	Het	-	VUS (PM2)	-
				NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.1685G>A (p.Gly562Asp)	Het	0.000004	VUS (PM2)	-
				NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.655G>A (p.Val219Met)	Het	0.001526	VUS (PM2, BS2, PP2)	-
				NM_015662.2( <i>IFI172</i> ):c.806T>A (p.Ile269Asn)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_015662.2( <i>IFI172</i> ):c.3196C>T (p.Arg1066Trp)	Het	0.000024	VUS (PM2)	-
				NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.4279T>C (p.Cys1427Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP2, PP3)	-
<b>7612</b>	M	HHCn		NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.7634C>T (p.Ala2545Val)	Het	0.000216	VUS (PP2, BP6)	PMID: 29969175
				NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.1655C>G (p.Pro552Arg)	Het	0.000036	VUS (PM2)	-
<b>7625</b>	M	HHCn	Hipoplasia hipofisária, deficiência de ACTH	NM_000620.4( <i>NOS1</i> ):c.335C>T (p.Thr112Ile)	Het	0.000161	VUS (PM2, PP2, BP4)	-
<b>7628</b>	M	HHCn		NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.6749A>G (p.Tyr2250Cys)	Het	-	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_003193.3( <i>TBCE</i> ):c.830C>T (p.Pro277Leu)	Het	0.000002	VUS (PM2)	-
<b>8214</b>	M	SK	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária	NM_032458.3( <i>PHF6</i> ):c.1045A>G (p.Lys349Glu)	Hemi	0.000011	VUS (PM2, BS2, PP2)	-
				NM_001030055.2( <i>ARHGAP5</i> ):c.2067dupA (p.Tyr690Ilefs*4)	Het	-	LP (PVS1, PM2)	-
<b>8214</b>	M	SK	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária	NM_025000.3( <i>DCAF17</i> ):c.552_554delACA (p.Gln184del)	Het	0.000016	VUS (PM2, PM4)	-
				NM_005103.5( <i>FEZ1</i> ):c.960C>G (p.Ile320Met)	Het	0.000085	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_000230.2( <i>LEP</i> ):c.397G>A (p.Gly133Ser)	Het	-	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.1000C>T (p.Arg334Cys)	Het	0.001622	VUS (PM2, BS2, PP3)	PMID: 33212964

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>8255</b>	M	HHCn	Criptorquidia, hipoplasia hipofisária	NM_004439.5( <i>EPHA5</i> ):c.1276G>A (p.Val426Ile)	Het	0.000804	VUS (PM2)	-
	F	SK	Hipoplasia hipofisária, rotação anormal do pescoço	NM_000825.3( <i>GNRH1</i> ):c.99delA (p.Leu34Cysfs*12) NM_015100.4( <i>POGZ</i> ):c.364A>G (p.Thr122Ala) NM_001126128.1( <i>PROK2</i> ):c.297dupT (p.Gly100Trpfs*22)	Homo Het Homo	- - 0.000110	LP (PVS1, PM2) VUS (PM2, PP2, BP4) LP (PVS1, PM2)	PMID: 19567835 - PMID: 17054399
<b>8297</b>	M	SK		NM_003108.4( <i>SOX11</i> ):c.650T>C (p.Val217Ala)	Het	0.000005	VUS (PM2, PP2)	-
	F	HHCn		NM_001963.5( <i>EGF</i> ):c.1478T>C (p.Ile493Thr) NM_001873.3( <i>CPE</i> ):c.884C>G (p.Pro295Arg) NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het Het Het Het	- - - 0.002749	VUS (PM2, PP3) VUS (PM2, BP4) LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	PMID: 19319977 - - PMID: 9371856 PMID: 28611058 (a)
<b>8302</b>	M	HHCn		NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.785G>A (p.Arg262Gln) NM_032844.5( <i>MASTL</i> ):c.1774A>G (p.Arg592Gly) NM_012233.3( <i>RAB3GAP1</i> ):c.244G>A (p.Glu82Lys) NM_018077.2( <i>RBM28</i> ):c.1744_1745insT (p.Arg582Leufs*5) NM_033661.4( <i>WDR4</i> ):c.265C>T (p.Arg89Cys) NM_000216.4( <i>ANOS1</i> ):c.31A>G (p.Thr11Ala) NM_021913.3( <i>AXL</i> ):c.1829G>T (p.Arg610Leu) NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.101T>C (p.Met34Thr) NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het Het Het Het Het Hemi Het Het Het Het	0.001789 0.000008 0.000004 - 0.000014 - 0.000020 0.008996 0.002749	P (PM1, PM2, PM3, PM5, PP2, PP3) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BP4) LP (PVS1, PM2) VUS (PM2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2) LP (PM1, PM2, PM5, PP1, PP2, PP3, PP5) LP (PM1, PP2, PM2, PP5)	PMID: 9371856 PMID: 28611058 (a) - - - - - - PMID: 9139825 PMID: 9371856 PMID: 28611058 (a)

ID do doente	Sexo	Função olfativa	Outros fenótipos	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG	Previamente descrita
<b>8325</b>	M	SK	Hipoplasia hipofisária	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.1628G>A (p.Arg543Gln)	Het	0.000007	VUS (PM2, PP2)	-
				NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.677_678delGCinsAA (p.Gly226Glu)	Het	-	LP (PM1, PM2, PM5, PP2)	-
<b>8347</b>	F	HHCn		NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.6119A>G (p.Asn2040Ser)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)	PMID: 29177441
				NM_001035235.2( <i>SR41</i> ):c.236C>T (p.Pro79Leu)	Het	-	VUS (PM2)	-
<b>8474</b>	M	SK		NM_007252.4( <i>POU6F2</i> ):c.1340C>G (p.Ala447Gly)	Het	0.000054	VUS (PM2)	-
				NM_178822.4( <i>IGSF10</i> ):c.2610G>A (p.Met870Ile)	Het	0.000021	VUS (PM2, BP4)	-
<b>8500</b>				NM_178822.4( <i>IGSF10</i> ):c.5983G>A (p.Val1995Ile)	Het	0.000772	VUS (PM2, BS2)	PMID:31726455
				NM_018344.5( <i>SLC29A3</i> ):c.59C>G (p.Thr20Arg)	Het	0.000016	VUS (PM2, BP4)	-
				NM_006941.3( <i>SOX10</i> ):c.778G>A (p.Gly260Arg)	Het	0.000022	VUS (PM2, PP3)	-
	M	HHCn		NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.410T>C (p.Leu137Pro)	Homo	-	LP (PM1, PM2, PM3, PP2)	-

Abreviaturas: ID, identificação; M, masculino; F, feminino; HHCn, Hipogonadismo Hipogonadotrófico Congénito normósico; SK, Síndrome de Kallmann; Het, heterozigotia; Homo, homozigotia; Hemi, hemizigotia; gnomAD, Genome Aggregation Database; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics. As variantes foram classificadas como Patogénicas (P), Possivelmente patogénicas (LP), Variantes de significado indeterminado (VUS), de acordo com a evidência de patogénica (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (PP1-5)) ou *benign impact* (*stand-alone* (BA), *strong* (BS1-4), ou *supporting* (BP1-7)). PMID, PubMed® identifier. <sup>(a)</sup> trata-se do mesmo doente da publicação. <sup>(b)</sup> variantes identificadas apenas por Sanger.

**Anexo 8:** Variantes raras identificadas nos 263 controlos.

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Classificação ACMG	ID controlos
AMH	NM_000479.3	c.16C>G (p.Leu6Val)	Missense	0.000005	0.002	VUS (PM2, BP4)	5497
	NM_000479.3	c.35T>G (p.Val12Gly)	Missense	0.001422	0.004	LB (BS1, BS2)	7995, 8177
	NM_000479.3	c.53C>T (p.Alai8Val)	Missense	0.001032	0.002	LB (BS1, BP6)	7763
	NM_000479.3	c.428C>T (p.Thri43Ile)	Missense	0.005473	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5156, 6040, 7835
	NM_000479.3	c.553C>G (p.Gln185Glu)	Missense	0.000353	0.002	VUS (PM2, BP6)	8092
	NM_000479.3	c.556-2A>G	Splice site	-	0.002	LP (PVS1, PM2)	8232
	NM_000479.3	c.790G>C (p.Gly264Arg)	Missense	0.000129	0.004	VUS (PP3, BS1)	7634, 7637
	NM_000479.3	c.802A>G (p.Thr268Ala)	Missense	0.000231	0.002	VUS (PM2)	8045
	NM_000479.3	c.864C>G (p.Asp288Glu)	Missense	0.001269	0.002	LB (PP3, BS1, BS2, BP6)	6045
	NM_000479.3	c.974A>G (p.Gln325Arg)	Missense	0.005543	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7635
	NM_000479.3	c.1054C>T (p.Pro352Ser)	Missense	0.000476	0.004	VUS	5160, 7892
	NM_000479.3	c.1193C>T (p.Pro398Leu)	Missense	0.000650	0.004	LB (BS1, BS2)	7879, 7885
	NM_000479.3	c.1232G>A (p.Cys411Tyr)	Missense	-	0.004	VUS (PM2)	7644, 8022
	NM_000479.3	c.1303C>T (p.Arg435Cys)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7920
	NM_000479.3	c.1505G>T (p.Arg502Leu)	Missense	0.000034	0.004	VUS (PM2)	5725, 7722

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
ANOS1	NM_000479.3	c.1556C>T (p.Ala519Val)	Missense	0.001632	0.008		LB (BS1, BS2, BP4, BP6)	7736, 7833, 7935, 7958
	NM_000479.3	c.1668G>C (p.Glu556Asp)	Missense	-	0.002		VUS (PM2)	7635
	NM_000216.4	c.383T>C (p.Leu128Ser)	Missense	0.000024	0.002		VUS (PM2, BP4)	7851
	NM_000216.4	c.727A>G (p.Thr243Ala)	Missense	0.000005	0.002		VUS (PM2)	8018
	NM_000216.4	c.1283C>T (p.Pro428Leu)	Missense	0.000785	0.002		B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7680
	NM_000216.4	c.1759G>T (p.Val587Leu)	Missense	0.002226	0.002		B (BS1, BS2, BP6)	7853
	NM_004491.5	c.1090A>G (p.Ile364Val)	Missense	0.000111	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	8304
	NM_004491.5	c.1190T>A (p.Met397Lys)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	6077
	NM_004491.5	c.2230C>T (p.Arg744Cys)	Missense	0.000036	0.002		VUS (PM2, PP2)	7943
	NM_004491.5	c.2885G>C (p.Ser962Thr)	Missense	0.000759	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	7863
ARHGAP5	NM_004491.5	c.3362A>G (p.Asn1121Ser)	Missense	0.000004	0.002		VUS (PM2, PP2)	8174
	NM_001030055.2	c.3290C>A (p.Thr1097Lys)	Missense	0.000096	0.002		VUS (PM2, PP2)	7674
	NM_001030055.2	c.3340G>A (p.Asp1114Asn)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	8296
	NM_001030055.2	c.3508A>G (p.Arg1170Gly)	Missense	0.000181	0.002		VUS (PM2, PP2)	7935
	NM_001030055.2	c.4216G>A (p.Ala1406Thr)	Missense	0.005966	0.004		B (PP2, BS1, BS2)	5555, 8215
	NM_177976.1	c.30G>C (p.Leu10Phe)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	8298
ARL6	NM_177976.1	c.538C>T (p.Gln180*)	Nonsense	0.000008	0.002		VUS (PM2, PVS1)	7792

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>AXL</i>	NM_021913.3	c.53C>T (p.Ala18Val)	Missense	0.000314	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	8024
	NM_021913.3	c.1549G>A (p.Gly517Ser)	Missense	0.004279	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	7853
	NM_021913.3	c.2399G>A (p.Arg800Gln)	Missense	0.000085	0.002	VUS (PM2)	7839
	NM_015681.3	c.278A>G (p.Asp93Gly)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP3)	6077
	NM_015681.3	c.376T>A (p.Ser126Thr)	Missense	0.000272	0.002	VUS (PM2, BP6)	8026
	NM_015681.3	c.380C>T (p.Thr127Met)	Missense	0.000028	0.002	VUS (PM2)	7678
	NM_001195306.2	c.135A>G (p.Ile45Met)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2, BP4)	8221
	NM_024649.5	c.158dupA (p.Leu54Alafs*45)	Frameshift	0.000004	0.002	P (PVS1, PM2, PP5)	8025
	NM_024649.5	c.616T>G (p.Leu206Val)	Missense	0.000516	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	8206
	NM_024649.5	c.725T>C (p.Met242Thr)	Missense	0.000036	0.002	VUS (PM2)	8095
<i>BBS10</i>	NM_024649.5	c.1036G>A (p.Val346Ile)	Missense	0.000841	0.002	B (BS1, BS2, BP6)	8178
	NM_024649.5	c.1318C>T (p.Arg440*)	Nonsense	0.000008	0.002	P (PVS1, PM2, PM3)	7945
	NM_024685.4	c.137T>G (p.Leu46Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	8181
	NM_024685.4	c.424G>A (p.Asp142Asn)	Missense	0.007475	0.008	B (PP2, BS1, BS2, BP6)	5153, 7694, 7894, 8181
	NM_024685.4	c.765G>A (p.Met255Ile)	Missense	0.000595	0.002	VUS (PM1, PP2, PM2, BP6)	7116
	NM_024685.4	c.1634C>T (p.Ser545Phe)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	8294

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>BBS5</i>	NM_152384.2	c.551A>G (p.Asn184Ser)	Missense	0.004164	0.002	B (PP3, BA1, BS2, BP6)	8294
	NM_152384.2	c.620G>A (p.Arg207His)	Missense	0.006398	0.004	B (PP3, BA1, BS2, BP6)	7956, 7993
	NM_152384.2	c.751A>G (p.Asn251Asp)	Missense	0.001036	0.002	VUS (BS1)	7883
	NM_000388.3	c.2265G>T (p.Glu755Asp)	Missense	0.000025	0.002	VUS (PM1, PM2, PP2, BP6)	7870
	NM_000388.3	c.2563A>C (p.Asn855His)	Missense	-	0.004	VUS (PM2, PP2)	7687, 7840
<i>CCDC141</i>	NM_173648.4	c.103-1G>T	Splice site	0.000018	0.002	VUS (PM2)	7684
	NM_173648.4	c.665G>A (p.Arg222His)	Missense	0.001087	0.002	VUS (PM2, BP4)	8180
	NM_173648.4	c.781G>C (p.Val261Leu)	Missense	0.002886	0.006	B (PP3, BS1, BS2, BP6)	7637, 7694, 8045
	NM_173648.4	c.1394G>C (p.Gly465Ala)	Missense	0.000188	0.002	VUS (PM2, BP4)	7769
	NM_173648.4	c.1396delT (p.Tyr466Thrs*33)	Frameshift	0.000188	0.002	VUS (PM2)	7769
	NM_173648.4	c.1521A>C (p.Gln597His)	Missense	0.003767	0.006	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	6077, 7641, 7883
	NM_173648.4	c.1600G>A (p.Val534Ile)	Missense	0.000545	0.002	VUS (PM2, BP4)	8195
	NM_173648.4	c.2299G>A (p.Asp767Asn)	Missense	0.003676	0.002	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	6051
	NM_173648.4	c.2614C>G (p.Leu872Val)	Missense	0.000679	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	8195
	NM_173648.4	c.3091A>G (p.Thr1031Ala)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2)	8184
<i>CASR</i>	NM_173648.4	c.3321delA (p.Leu1107Phefs*12)	Frameshift	0.000292	0.004	VUS (PM2)	7763, 7943
	NM_173648.4	c.3782C>T (p.Ala1261Val)	Missense	0.000108	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7656

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
CCDC88C	NM_173648.4	c.4369G>A (p.Val1457Ile)	Missense	0.004793	0.004	B (BS2, BP6)	7663, 7836
	NM_173648.4	c.4565C>T (p.Ser1522Phe)	Missense	0.000029	0.002	VUS (PM2, BP4)	7770
	NM_001080414.4	c.41A>G (p.Gln14Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7920
	NM_001080414.4	c.1669A>G (p.Lys557Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8044
	NM_001080414.4	c.1878G>C (p.Lys626Asn)	Missense	0.001281	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	7712
	NM_001080414.4	c.1885C>T (p.Arg629Trp)	Missense	0.000075	0.002	VUS (PM2)	7676
	NM_001080414.4	c.2819T>C (p.Leu940Pro)	Missense	0.000127	0.002	VUS (PM2)	8232
	NM_001080414.4	c.2958G>A (p.Met986Ile)	Missense	0.000182	0.002	VUS (PM2, BP4)	5147
	NM_001080414.4	c.3202G>T (p.Ala1068Ser)	Missense	0.001601	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	6077, 8128
	NM_001080414.4	c.3419A>G (p.Gln1140Arg)	Missense	0.001630	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7633
	NM_001080414.4	c.3596A>G (p.His1199Arg)	Missense	0.000095	0.002	VUS (PM2)	6908
	NM_001080414.4	c.3628G>A (p.Gly1210Arg)	Missense	0.000049	0.002	VUS (PM2, BP4)	7778
	NM_001080414.4	c.3640G>A (p.Gly1214Ser)	Missense	0.000965	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	7878
	NM_001080414.4	c.4265C>T (p.Ser1422Leu)	Missense	0.003619	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7813, 7924
	NM_001080414.4	c.4327G>A (p.Ala1443Thr)	Missense	0.001922	0.008	B (BA1, BS1, BS2, BP4, BP6)	5546, 7648, 7792, 7839
	NM_001080414.4	c.4433T>C (p.Val1478Ala)	Missense	0.001841	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7728

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
CCKAR	NM_001080414.4	c.5087T>C (p.Leu1696Pro)	Missense	0.002496	0.002	B (BS1, BS2, BP6)	7804
	NM_001080414.4	c.5090G>A (p.Ser1697Asn)	Missense	0.000099	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	7985
	NM_001080414.4	c.5183T>C (p.Phe1728Ser)	Missense	0.002143	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7728
	NM_001080414.4	c.5332T>C (p.Ser1778Pro)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2, BP4)	7820
	NM_001080414.4	c.5899G>A (p.Gly1967Arg)	Missense	0.000015	0.002	VUS (PM2, BP4)	8253
	NM_001080414.4	c.5927G>C (p.Gly1976Ala)	Missense	0.000767	0.004	LB (BS1, BP4)	5559, 7686
	NM_001080414.4	c.5980C>G (p.Arg1994Gly)	Missense	0.006488	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7883, 8118
	NM_001080414.4	c.6053C>T (p.Pro2018Leu)	Missense	0.000045	0.002	VUS (PM2, BP4)	7853
	NM_000730.3	c.97C>A (p.Pro33Thr)	Missense	0.002434	0.002	B (BS1, BS2)	8296
	NM_000730.3	c.329G>A (p.Gly110Glu)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2, PP3)	7791
	NM_000730.3	c.590G>A (p.Arg197His)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2)	7986
	NM_000730.3	c.628C>T (p.His210Tyr)	Missense	0.002487	0.004	LB (PM2, BS2, BP4)	5147, 7884
	NM_000730.3	c.685T>C (p.Tyr229His)	Missense	0.000025	0.002	VUS (PM2, PP3)	7744
	NM_000730.3	c.799G>A (p.Asp267Asn)	Missense	0.000032	0.002	VUS (PM2)	8072
	NM_000730.3	c.1006C>T (p.Arg336Trp)	Missense	0.000024	0.002	VUS (PM2)	8232
	CDKN1C	NM_000076.2	c.355C>T (p.Leu119Phe)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2)
NM_016952.4		c.458G>A (p.Arg153His)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2)	7970
CDON	NM_016952.4	c.791C>A (p.Pro264Gln)	Missense	0.000103	0.002	VUS (PM2, BP6)	8057
	NM_016952.4	c.848C>T (p.Ala283Val)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2, BP4)	7949

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
CHD4	NM_016952.4	c.1495A>G (p.Ile499Val)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	7745
	NM_016952.4	c.2051C>G (p.Thr684Ser)	Missense	0.007158	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	6077, 7642
	NM_016952.4	c.2177G>T (p.Arg726Leu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7111
	NM_016952.4	c.2383G>A (p.Val795Ile)	Missense	0.000074	0.002	VUS (PM2, BP6)	7656
	NM_016952.4	c.2462G>A (p.Arg821His)	Missense	0.000605	0.004	LB (PM2, BS2, BP6)	5473, 5547
	NM_016952.4	c.3367A>G (p.Lys1123Glu)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2)	8235
	NM_016952.4	c.3689T>A (p.Ile1230Asn)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2, BS2)	7889
	NM_001273.3	c.304C>T (p.Arg102Cys)	Missense	0.000039	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	7689
	NM_001273.3	c.1064G>A (p.Gly355Asp)	Missense	0.000315	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3, BP6)	7879
	NM_001273.3	c.3088A>G (p.Met1030Val)	Missense	0.000099	0.002	VUS (PP2)	7952
	NM_017780.3	c.1018A>G (p.Met340Val)	Missense	0.004606	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	8030
	NM_017780.3	c.1046A>G (p.Asn349Ser)	Missense	0.000089	0.002	LB (PM2, PP2, BP4, BP6)	5469
	NM_017780.3	c.1056_1070delATTCCCATC AAACAG (p.Phe353_Ser357del)	In-frame deletion	-	0.002	VUS (PM2, PM4)	7929
CHD7	NM_017780.3	c.1472T>A (p.Ile491Asn)	Missense	-	0.002	LB (PM2, PP2, BP4, BP6)	7894
	NM_017780.3	c.1554G>T (p.Gln518His)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	8018

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_017780.3	c.2053_2058dupGCAAAA (p.Ala685_Lys686dup)	<i>In-frame insertion</i>	0.006230	0.002		B (PM4, BA1, BS2, BP6)	5155
	NM_017780.3	c.2185A>G (p.Lys729Gln)	<i>Missense</i>	0.000357	0.002		LB (PP2, BS2, BP6)	8181
	NM_017780.3	c.2209_2211delCCT (p.Pro737del)	<i>In-frame deletion</i>	0.000086	0.002		VUS (PM4, BP6)	7637
	NM_017780.3	c.2787C>G (p.Ile929Met)	<i>Missense</i>	0.000018	0.002		VUS (PM2, PP2, BP6)	8265
	NM_017780.3	c.2830C>T (p.Arg944Cys)	<i>Missense</i>	0.000028	0.002		LP (PM2, PM5, PP2, PP3)	8298
	NM_017780.3	c.4972G>C (p.Glu1658Gln)	<i>Missense</i>	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	6052
	NM_017780.3	c.5533G>A (p.Gly1845Arg)	<i>Missense</i>	0.000040	0.002		VUS (PM2, PP2, PP3)	6052
	NM_017780.3	c.7253G>A (p.Arg2418Gln)	<i>Missense</i>	0.000068	0.002		VUS (PM2, PM5, PP2, BP6)	8054
	NM_017780.3	c.7579A>C (p.Met2527Leu)	<i>Missense</i>	0.002038	0.002		LB (PP2, BS1, BS2, BP6)	8126
	NM_017780.3	c.8950C>T (p.Leu2984Phe)	<i>Missense</i>	0.003887	0.004		B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	8212, 8235
<i>CHLI</i>	NM_006614.2	c.704C>T (p.Ser235Leu)	<i>Missense</i>	0.000950	0.002		B (PM2, BS2, BP4, BP6)	8294
	NM_006614.2	c.946G>A (p.Val316Ile)	<i>Missense</i>	0.001210	0.002		B (BS2, BP4, BP6)	7850
	NM_006614.2	c.1706G>A (p.Ser569Asn)	<i>Missense</i>	0.000354	0.002		LB (PM2, BP4, BP6)	7851
	NM_006614.2	c.2488G>A (p.Val830Met)	<i>Missense</i>	0.000024	0.002		VUS (PM2, BP4)	7111
	NM_006614.2	c.3153G>C (p.Glu1051Asp)	<i>Missense</i>	0.000882	0.008		LB (PM2, BP4, BP6)	5575, 7111, 7744, 8167

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
CNTN2	NM_006614.2	c.3437A>C (p.Asp1146Ala)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP3)	8095
	NM_005076.3	c.191G>A (p.Arg64Gln)	Missense	0.000036	0.002	VUS (PM2, PP2)	6045
	NM_005076.3	c.689C>T (p.Ala230Val)	Missense	0.000040	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	5555
	NM_005076.3	c.821G>A (p.Arg274His)	Missense	0.000121	0.002	VUS (PM2, PP2)	8079
	NM_005076.3	c.947C>T (p.Thr316Ile)	Missense	0.005082	0.008	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	5153, 7722, 7924, 8054
CPE	NM_005076.3	c.1276C>T (p.Arg426Cys)	Missense	0.000020	0.002	VUS (PM2, PP2)	8072
	NM_005076.3	c.1975A>G (p.Asn659Asp)	Missense	0.008071	0.004	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	8051, 8221
	NM_005076.3	c.2050C>T (p.Arg684Trp)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	5546
	NM_005076.3	c.2307G>C (p.Gln769His)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8022
	NM_005076.3	c.3011G>A (p.Gly1004Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	8126
CRY1	NM_005076.3	c.3014-2A>G	Splice site	-	0.002	VUS (PVS1, PM2)	7873
	NM_001873.3	c.1268C>T (p.Ala423Val)	Missense	0.004678	0.004	B (BS1, BS2, BP6)	7703, 7993
	NM_001873.3	c.1309G>A (p.Val437Ile)	Missense	0.000539	0.002	VUS (PM2, BP4)	8253
	NM_004075.5	c.199C>T (p.Arg67*)	Nonsense	0.000020	0.002	VUS (PM2)	8203
	NM_004075.5	c.1718C>T (p.Thr573Ile)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	7870

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Frequência alélica controle	Classificação ACMG	ID controles
CXCR4	NM_003467.2	c.50G>A (p.Gly17Asp)	Missense	0.000008	0.002		VUS (PM2, BP4)	7745
	NM_031226.2	c.578G>A (p.Arg193His)	Missense	0.000048	0.002		VUS (PM2, BP4)	8021
CYP19A1	NM_031226.2	c.1094G>A (p.Arg365Gln)	Missense	0.000032	0.002		P (PS4, PP3, PM2)	5463
	NM_005215.3	c.527A>G (p.As176Ser)	Missense	0.000124	0.002		VUS	8018
DCC	NM_005215.3	c.744T>G (p.As176Ser)	Missense	0.000028	0.002		VUS (PM2)	7945
	NM_005215.3	c.1157G>A (p.Arg386Gln)	Missense	0.000251	0.002		LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7804
DLG2	NM_005215.3	c.1256A>G (p.Lys419Arg)	Missense	0.002868	0.004		LB (BS1, BP4, BP6)	7667, 8184
	NM_005215.3	c.1409G>A (p.Gly470Asp)	Missense	0.002885	0.002		B (BA1, BS2, BP6)	7686
DLX5	NM_005215.3	c.1904A>G (p.As1635Ser)	Missense	0.000134	0.002		VUS (PM2, BP4)	7884
	NM_005215.3	c.3404C>T (p.Thr1135Ile)	Missense	0.000012	0.002		VUS (PM2, BP4)	7813
DLX5	NM_005215.3	c.4027C>T (p.Arg1343Cys)	Missense	0.000141	0.002		VUS (PM2)	7675
	NM_001142699.1	c.1001A>G (p.As1334Gly)	Missense	0.000071	0.002		VUS (PM2)	8182
DMXL2	NM_001142699.1	c.1337C>T (p.Thr446Ile)	Missense	0.000742	0.004		LB (PM2, BS2, BP4)	5147, 7675
	NM_005221.5	c.1541T>C (p.Leu514Pro)	Missense	0.000946	0.004		LB (PM2, BS2, BP6)	5158, 8044
DMXL2	NM_005221.5	c.702C>A (p.Ser234Arg)	Missense	0.009918	0.006		B (BS1, BS2, BP6)	7641, 7728, 7844
	NM_001174116.3	c.712C>A (p.His238Asn)	Missense	0.000195	0.002		VUS (PM2)	8189
DMXL2	NM_001174116.3	c.23C>G (p.Thr8Ser)	Missense	0.004346	0.002		B (PP2, BA1, BS1, BS2, BP4, BP6)	8041

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_001174116.3	c.368A>G (p.Asn123Ser)	Missense	0.001332	0.006		B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7828,7837, 8105
	NM_001174116.3	c.1235G>A (p.Arg412Gln)	Missense	0.000024	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	7970
	NM_001174116.3	c.1318C>T (p.Arg440Trp)	Missense	0.000043	0.002		VUS (PM2, PP2)	7952
	NM_001174116.3	c.1427C>G (p.Thr476Ser)	Missense	0.000124	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	8215
	NM_001174116.3	c.1463C>T (p.Thr488Met)	Missense	0.000382	0.002		LB (PP2, BS1, BS2)	5546
	NM_001174116.3	c.2096T>C (p.Ile699Thr)	Missense	0.000509	0.002		LB (PP2, BS1, BP4, BP6)	8041
	NM_001174116.3	c.2806G>A (p.Val936Ile)	Missense	0.000099	0.002		LB (PP2, BS1, BP4)	8045
	NM_001174116.3	c.2866C>A (p.Pro956Thr)	Missense	0.002185	0.002		B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	8045
	NM_001174116.3	c.3935T>C (p.Val1312Ala)	Missense	0.001168	0.002		B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7850
	NM_001174116.3	c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Missense	0.001582	0.002		B (PP2, BS1, BS2, BP6)	8022
	NM_001174116.3	c.4442A>G (p.Asp1481Gly)	Missense	0.009030	0.006		B (PP2, BA1, BS2, BP6)	7870, 7878, 7971
	NM_001174116.3	c.4379C>G (p.Thr1460Arg)	Missense	0.000014	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	8115
	NM_001174116.3	c.4540C>G (p.Leu1514Val)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	8304
	NM_001174116.3	c.4670C>T (p.Ser1557Leu)	Missense	0.000016	0.004		VUS (PM2, PP2)	7680, 8178

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_001174116.3	c.4987G>A (p.Alai663Thr)	Missense	0.000078	0.002		VUS (PM2, PP2)	7929
	NM_001174116.3	c.7454A>G (p.Asp2485Gly)	Missense	0.002658	0.006		B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7675, 7804, 7828
	NM_001174116.3	c.8065G>A (p.Asp2689Asn)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	8184
	NM_001174116.3	c.8428G>C (p.Val2810Leu)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	8003
	NM_001174116.3	c.8770C>A (p.His2924Asn)	Missense	0.000152	0.002		LB (PP2, BS1, BP4)	8041
<i>DUSP6</i>	NM_001946.2	c.11C>G (p.Thr4Arg)	Missense	0.000022	0.002		VUS (PM2, BP4)	6908
	NM_001946.2	c.1037C>T (p.Thr346Met)	Missense	0.000286	0.002		VUS (PM2, BP6)	8112
<i>EBF2</i>	NM_022659.4	c.1513G>A (p.Gly505Ser)	Missense	0.000071	0.002		VUS (PM2, BP4)	7686
	NM_022659.4	c.1537_1539delTCA (p.Ser513del)	In-frame deletion	0.001882	0.002		VUS (PM2, BS2, PM4)	7868
<i>EDNRRB</i>	NM_000115.4	c.167A>C (p.Lys56Thr)	Missense	0.000029	0.002		VUS (PM2)	7916
	NM_000115.4	c.169G>A (p.Gly57Ser)	Missense	0.005143	0.002		LB (BP4, BP6)	7814
	NM_000115.4	c.778G>T (p.Val260Phe)	Missense	0.000851	0.002		B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8051
<i>EGF</i>	NM_001963.5	c.1789A>G (p.Ile597Val)	Missense	0.001118	0.002		B (BS2, BP6)	5160
<i>EGF</i>	NM_001963.5	c.3251C>G (p.Alai084Gly)	Missense	0.001373	0.004		B (BS2, BP4, BP6)	7637, 8234
<i>EGFR</i>	NM_005228.3	c.635A>G (p.Lys212Arg)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, BP4)	5557
	NM_005228.3	c.671G>A (p.Arg224His)	Missense	0.000032	0.002		VUS (PM2)	8111
	NM_005228.3	c.3629C>T (p.Alai210Val)	Missense	0.000304	0.002		VUS (PM2)	8002

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>EPHA5</i>	NM_004439.5	c.1480C>T (p.Arg494Cys)	Missense	0.000199	0.006	VUS (PM2)	5546, 5557, 7712
	NM_004439.5	c.2134G>A (p.Gly712Ser)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8304
	NM_004439.5	c.2726A>G (p.Gln909Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7728
<i>ERBB4</i>	NM_005235.2	c.890T>G (p.Phe297Cys)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP3)	7850
	NM_005235.2	c.1395C>A (p.Asn465Lys)	Missense	0.000085	0.002	VUS (PM2)	8030
<i>FEZF1</i>	NM_001024613.3	c.727T>C (p.Phe243Leu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7814
	NM_001024613.3	c.752G>T (p.Gly251Val)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8014
<i>FGF8</i>	NM_033163.3	c.77C>T (p.Pro26Leu)	Missense	0.001149	0.002	VUS (PP2, BS1, BP6)	8253
	NM_033163.3	c.652C>A (p.Leu218Met)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7821
<i>FGFR1</i>	NM_033163.3	c.693C>A (p.Ser231Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7836
	NM_023110.2	c.266A>G (p.Gln89Arg)	Missense	0.000048	0.004	LB (PM2, PP2, BP4, BP6)	7742, 8245
	NM_023110.2	c.584A>G (p.Lys195Arg)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8078
	NM_023110.2	c.1368G>T (p.Met456Ile)	Missense	0.000409	0.002	VUS (PP2, PP3, BP6)	7878
	NM_023110.2	c.2314C>T (p.Pro772Ser)	Missense	0.004194	0.004	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	7637, 7850
<i>FLRT3</i>	NM_023110.2	c.2464C>T (p.Arg822Cys)	Missense	0.000256	0.002	VUS (PP2, BP6)	7835
	NM_198391.2	c.596C>G (p.Thr199Ser)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2, BP4)	8177
	NM_198391.2	c.1255A>T (p.Thr419Ser)	Missense	0.000110	0.002	VUS (PM2, BP4)	8203

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>FSHB</i>	NM_000510.2	c.59G>T (p.Ser20Ile)	Missense	0.002118	0.006	LB (PM2, BS2, BP6)	5158, 7993, 8097
	NM_000510.2	c.327C>A (p.Ser109Arg)	Missense	0.000769	0.002	VUS (PM2, BS2)	7836
<i>FSTL5</i>	NM_020116.5	c.51G>C (p.Glu17Asp)	Missense	0.002928	0.006	LB (PM2, BS2, BP4)	7862, 7986, 8112
	NM_020116.5	c.447A>T (p.Lys149Asn)	Missense	0.000260	0.002	VUS (PM2)	7742
<i>GADL1</i>	NM_020116.5	c.517A>G (p.Ile173Val)	Missense	0.000605	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7764
	NM_020116.5	c.871A>T (p.Asn291Tyr)	Missense	0.002126	0.002	VUS (PM2, BS2)	7821
	NM_020116.5	c.1358T>C (p.Met453Thr)	Missense	0.001177	0.002	VUS (PM2)	7631
	NM_020116.5	c.2029G>A (p.Val677Ile)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8057
	NM_207359.3	c.8G>A (p.Ser3Asn)	Missense	0.000071	0.002	VUS (PM2, BP4)	5540
	NM_207359.3	c.473C>T (p.Ala158Val)	Missense	0.000053	0.002	VUS (PM2, BP4)	8181
	NM_207359.3	c.620C>T (p.Ser207Leu)	Missense	0.000805	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7837
	NM_207359.3	c.1114G>T (p.Asp372Tyr)	Missense	0.001477	0.002	VUS (BS2)	8045
	NM_207359.3	c.1234G>T (p.Ala412Ser)	Missense	0.000004	0.004	VUS (PM2)	7952, 8245
	NM_207359.3	c.1312G>A (p.Ala438Thr)	Missense	0.004121	0.008	B (BS1, BS2, BP4)	6055, 6058, 7821, 7971
<i>GHI</i>	NM_000515.3	c.7A>C (p.Thr3Pro)	Missense	0.000238	0.002	VUS (PM2, BS2)	8112
	NM_000515.3	c.134G>A (p.Arg45His)	Missense	0.000187	0.002	VUS (BS2)	7687
<i>GHR</i>	NM_000515.3	c.493T>C (p.Phe165Leu)	Missense	0.000103	0.002	VUS	8189
	NM_000163.4	c.25A>G (p.Thr9Ala)	Missense	0.000032	0.002	VUS (PM2)	8026

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
GJB2	NM_000163.4	c.679G>C (p.Glu227Gln)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP3)	7694
	NM_000163.4	c.968A>G (p.Asn323Ser)	Missense	0.000515	0.002	B (BA1, BP4, BP6)	8164
	NM_000163.4	c.1156C>T (p.Arg386Cys)	Missense	0.000336	0.002	VUS (BS4)	6056
	NM_000163.4	c.1463C>T (p.Ala488Val)	Missense	0.000103	0.002	VUS (PM2)	7861
	NM_004004.6	c.11G>A (p.Gly4Asp)	Missense	0.000463	0.002	B (PP2, BS1, BP6)	8253
	NM_004004.6	c.88A>G (p.Ile30Val)	Missense	0.000044	0.002	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3)	8130
	NM_004004.6	c.101T>C (p.Met34Thr)	Missense	0.008996	0.008	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)	7644, 7736, 7827, 7862
	NM_004004.6	c.478G>A (p.Gly160Ser)	Missense	0.000602	0.002	LB (PP2, PP3, BS1, BP6)	8054
GLI2	NM_004004.6	c.663G>C (p.Lys221Asn)	Missense	0.000043	0.002	VUS (PM2, PP2)	7656
	NM_004004.6	c.670A>C (p.Lys224Gln)	Missense	0.000129	0.002	VUS (PM2, PP2)	8212
	NM_005270.4	c.8C>T (p.Thr3Met)	Missense	0.000032	0.002	VUS (PM2, BP4)	7632
	NM_005270.4	c.188C>T (p.Pro63Leu)	Missense	0.000042	0.002	VUS (PM2, PP3)	7906
	NM_005270.4	c.592G>A (p.Gly198Arg)	Missense	0.000050	0.002	VUS (PM2)	7636
	NM_005270.4	c.803C>T (p.Ala268Val)	Missense	0.000822	0.002	B (BA1, BP6)	7851
	NM_005270.4	c.1294G>A (p.Val432Met)	Missense	0.001542	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7850, 8234

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Frequência alélica controle	Classificação ACMG	ID controles
GLI3	NM_005270.4	c.1445A>C (p.Lys482Thr)	Missense	0.000032	0.002		VUS (PM2, PP3)	7904
	NM_005270.4	c.2159G>A (p.Arg720His)	Missense	0.000429	0.004		LB (BS1, BP6)	8005, 8093
	NM_005270.4	c.3281C>T (p.Ser1094Phe)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, BP4)	8131
	NM_005270.4	c.3528G>T (p.Gln1176His)	Missense	0.000690	0.002		B (BA1, BP6)	7667
	NM_005270.4	c.3623G>A (p.Arg1208His)	Missense	0.000229	0.002		LB (BP4, BP6)	5147
	NM_005270.4	c.3626G>T (p.Ser1209Ile)	Missense	0.000145	0.002		LB (BS1, BP4, BP6)	7837
	NM_005270.4	c.3721A>C (p.Met1241Leu)	Missense	0.000111	0.002		VUS (PM2, BP4)	7916
	NM_005270.4	c.4018G>C (p.Val1340Leu)	Missense	0.000033	0.002		VUS (PM2, BP4)	8282
	NM_005270.4	c.4054A>G (p.Met1352Val)	Missense	0.008556	0.008		B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7632, 7641, 7656, 7712
	NM_005270.4	c.4558G>A (p.Asp1520Asn)	Missense	0.009183	0.008		B (BA1, BS2, BP6)	7632, 7641, 7656, 7712
	NM_005270.4	c.4628G>A (p.Arg1543His)	Missense	0.000534	0.002		VUS (BP6)	8238
	NM_000168.5	c.245G>A (p.Arg82Lys)	Missense	0.000014	0.002		VUS (PM2, BP6)	7791
	NM_000168.5	c.314G>A (p.Arg105His)	Missense	0.000020	0.002		VUS (PM2)	8093
	NM_000168.5	c.538C>T (p.Arg180Trp)	Missense	0.000008	0.002		VUS (PM2, PM5)	7863
	NM_000168.5	c.557C>A (p.Ser186Tyr)	Missense	-	0.002		VUS (PM2)	8095
	NM_000168.5	c.1354C>A (p.Gln452Lys)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP3)	8195
NM_000168.5	c.1471T>C (p.Phe491Leu)	Missense	0.000018	0.002		VUS (PM2, PP3, BP6)	7682	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_000168.5	c.2006C>T (p.Thr669Ile)	Missense	0.000180	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	7868
	NM_000168.5	c.2395C>A (p.Pro799Thr)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	6048
	NM_000168.5	c.2424A>G (p.Ile808Met)	Missense	0.001937	0.004	B (BS1, BS2, BP6)	7844, 8306
	NM_000168.5	c.2887G>A (p.Ala963Thr)	Missense	0.000024	0.002	VUS (PM2, BP4)	6906
	NM_000168.5	c.3001G>A (p.Gly1001Ser)	Missense	0.000586	0.004	B (BS1, BP4, BP6)	7676, 7923
	NM_000168.5	c.3598C>G (p.His1200Asp)	Missense	0.000963	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	5158
	NM_000168.5	c.3664C>T (p.Pro1222Ser)	Missense	0.002656	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	5160
	NM_000168.5	c.3935T>G (p.Met1312Arg)	Missense	0.000316	0.002	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7729
<i>GNRH1</i>	NM_000825.3	c.153G>C (p.Glu51Asp)	Missense	0.001482	0.004	LB (PM2, BS2, PP3, BP6)	7920, 8126
<i>GNRHR</i>	NM_000406.2	c.317A>G (p.Gln106Arg)	Missense	0.002749	0.004	P (PM1, PP2, PM2, PP5)	7845, 8238
	NM_000406.2	c.436C>T (p.Pro146Ser)	Missense	0.001237	0.002	LB (PM1, PP2, PP3, BS1, BS2)	5156
<i>HDAC8</i>	NM_018486.2	c.20C>G (p.Pro7Arg)	Missense	0.000068	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	8306
<i>HESX1</i>	NM_003865.2	c.102C>G (p.Asp34Glu)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2, PP2)	7889
	NM_003865.2	c.134G>T (p.Trp45Leu)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	7889
	NM_003865.2	c.385G>A (p.Val129Ile)	Missense	0.000791	0.002	LB (PP2, BS1, BS2)	5477
<i>HFE</i>	NM_000410.3	c.18G>C (p.Arg6Ser)	Missense	0.000684	0.002	VUS	7949

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_000410.3	c.50C>T (p.Thr17Ile)	Missense	0.000444	0.002		LB (BS2, BP4)	5470
	NM_000410.3	c.884T>C (p.Val295Ala)	Missense	0.000793	0.002		LB (BS1, BP6)	7952
<i>HGF</i>	NM_000601.4	c.1787C>T (p.Thr596Met)	Missense	0.000060	0.002		VUS (PM2)	5547
<i>HJV</i>	NM_213653.3	c.46A>C (p.Ser16Arg)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	7633
	NM_213653.3	c.143C>G (p.Ser48Trp)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2, BP4)	8168
	NM_213653.3	c.1003C>T (p.Arg335Trp)	Missense	0.000011	0.002		VUS (PM2, PP2)	7806
	NM_213653.3	c.1246T>C (p.Ser416Pro)	Missense	0.000057	0.002		VUS (PP2)	7644
<i>HS6ST1</i>	NM_004807.2	c.917G>A (p.Arg306Gln)	Missense	0.000694	0.002		VUS (PM2, PM5, PP3)	5557
	NM_004807.2	c.1124G>A (p.Arg375His)	Missense	0.000212	0.002		VUS (PM2)	7945
<i>IFT172</i>	NM_015662.2	c.178A>G (p.Met60Val)	Missense	0.000012	0.002		VUS (PM2, BP4)	8075
	NM_015662.2	c.649C>T (p.Arg217Trp)	Missense	0.000032	0.002		VUS (PM2)	8005
	NM_015662.2	c.704G>A (p.Ser235Asn)	Missense	-	0.002		VUS (PM2)	8198
	NM_015662.2	c.1056C>G (p.His352Gln)	Missense	0.000042	0.002		VUS (PM2, BP4)	8152
	NM_015662.2	c.1243G>A (p.Gly415Arg)	Missense	0.000024	0.002		VUS (PM2)	5160
	NM_015662.2	c.1426G>A (p.Gly476Ser)	Missense	0.000209	0.002		VUS (PM2)	7835
	NM_015662.2	c.1513C>T (p.Arg505Trp)	Missense	0.000074	0.002		VUS (BS2)	7116
	NM_015662.2	c.1685C>G (p.Thr562Ser)	Missense	0.006290	0.006		B (BAI, BS2, BP6)	7853, 8115, 5473
	NM_015662.2	c.2026G>A (p.Gly676Arg)	Missense	0.000024	0.002		VUS (PM2)	8093
	NM_015662.2	c.2551G>T (p.Val851Leu)	Missense	0.000875	0.002		B (BAI, BS2, BP4, BP6)	7851

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
IGSF1	NM_015662.2	c.2597A>G (p.Gln866Arg)	Missense	0.000142	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	7820
	NM_015662.2	c.2691G>T (p.Lys897Asn)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7992
	NM_015662.2	c.2858G>A (p.Arg953His)	Missense	0.002376	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7943
	NM_015662.2	c.3073C>G (p.Pro1025Ala)	Missense	0.001276	0.002	B (BA1, BS1, BS2, BP4, BP6)	7826
	NM_015662.2	c.3610G>C (p.Val1204Leu)	Missense	0.000901	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7851
	NM_015662.2	c.4147G>A (p.Glu1383Lys)	Missense	0.000213	0.002	VUS	7806
	NM_015662.2	c.4363C>T (p.Arg1455Trp)	Missense	0.000322	0.002	VUS	7833
	NM_015662.2	c.4745T>C (p.Ile1582Thr)	Missense	0.007594	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5480, 5546
	NM_015662.2	c.4933G>A (p.Val1645Ile)	Missense	0.000653	0.002	B (BA1, BP4, BP6)	8208
	NM_001170961.1	c.314G>A (p.Arg105Gln)	Missense	0.000076	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	7945
	NM_001170961.1	c.929A>T (p.Asp310Val)	Missense	0.000142	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	7722
	NM_001170961.1	c.1184T>G (p.Leu395Arg)	Missense	0.009223	0.007	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	8237, 7904, 8118
	NM_001170961.1	c.2807C>T (p.Thr936Ile)	Missense	0.000006	0.002	VUS (PM2, BP4)	8047
	NM_001170961.1	c.2954T>C (p.Val985Ala)	Missense	0.008812	0.005	B (BA1, BS2, BP6)	6058, 7904
NM_001170961.1	c.3243G>C (p.Met1081Ile)	Missense	0.003153	0.007	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7689, 7956, 8152	
IGSF10	NM_178822.4	c.187A>C (p.Asn63His)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	5153

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Frequência alélica controle	Classificação ACMG	ID controles
	NM_178822.4	c.353G>A (p.Arg118Gln)	Missense	0.000878	0.002		LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7914
	NM_178822.4	c.467G>T (p.Arg156Leu)	Missense	0.000354	0.002		VUS (PM2, PP5)	8018
	NM_178822.4	c.620A>G (p.Tyr207Cys)	Missense	0.000110	0.002		VUS (PM2)	7814
	NM_178822.4	c.823G>A (p.Ala275Thr)	Missense	0.000131	0.002		VUS (PM2, BP4)	7821
	NM_178822.4	c.1420A>G (p.Met474Val)	Missense	0.000028	0.004		VUS (PM2, BP4)	5485, 7911
	NM_178822.4	c.1792A>G (p.Thr598Ala)	Missense	0.000004	0.002		VUS (PM2, BP4)	8278
	NM_178822.4	c.2126G>T (p.Gly709Val)	Missense	0.000325	0.002		LB (PM2, BS2, BP6)	7680
	NM_178822.4	c.2161T>G (p.Tyr721Asp)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, BP4)	8072
	NM_178822.4	c.2165G>A (p.Arg722Gln)	Missense	0.001917	0.002		B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8075
	NM_178822.4	c.2204G>A (p.Arg735Gln)	Missense	0.000050	0.002		VUS (PM2, BP4)	7680
	NM_178822.4	c.2210_2211delTT (p.Phe737*)	Frameshift	0.000736	0.004		VUS (PM2, BP6)	5471, 7845
	NM_178822.4	c.2359C>T (p.Pro787Ser)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, BP4)	7764
	NM_178822.4	c.2360C>T (p.Pro787Leu)	Missense	0.000693	0.002		LB (PM2, BS2, BP4)	7663
	NM_178822.4	c.2852C>A (p.Thr951Lys)	Missense	0.006092	0.006		B (BS2, BP4, BP6)	7029, 7805, 8042
	NM_178822.4	c.2942C>T (p.Thr981Met)	Missense	0.000735	0.002		LB (PM2, BS, BP6)	7680
	NM_178822.4	c.3712A>G (p.Thr1238Ala)	Missense	0.006200	0.002		B (PM2, BS2, BP4, BP6)	8115
	NM_178822.4	c.3797C>G (p.Thr1266Ser)	Missense	0.001642	0.004		LB (PM2, BP4, BP6)	5555, 7956
	NM_178822.4	c.3856A>G (p.Lys1286Glu)	Missense	0.000693	0.002		LB (PM2, BP4, BP6)	8296

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Frequência alélica controle	Classificação ACMG	ID controles
	NM_178822.4	c.3941C>T (p.Thr1314Met)	Missense	0.000138	0.002		VUS (PM2, BP4)	5575
	NM_178822.4	c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Missense	0.000233	0.006		VUS (PM2, BP4)	5147, 7828, 7993
	NM_178822.4	c.4804G>T (p.Glu1602*)	Nonsense	0.002472	0.002		LB (PM2, BS2, , BP6)	6077
	NM_178822.4	c.5278G>A (p.Gly1760Arg)	Missense	0.000032	0.002		VUS (PM2, PP3)	5559
	NM_178822.4	c.5983G>A (p.Val1995Ile)	Missense	0.000772	0.002		VUS (PM2, BS2)	8195
	NM_178822.4	c.6006T>G (p.Phe2002Leu)	Missense	0.000280	0.002		VUS (PM2, BP4)	7682
	NM_178822.4	c.6245A>G (p.Asn2082Ser)	Missense	0.000400	0.002		LB (PM, BS2, BP4)	7680
	NM_178822.4	c.6499G>A (p.Gly2167Arg)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP3)	8023
	NM_178822.4	c.7334_7336dupTCA (p.Ile2445dup)	In-frame insertion	0.000173	0.006		VUS (PM2, PM4)	7686, 7887, 7904
	NM_178822.4	c.7568T>C (p.Ile2523Thr)	Missense	0.001312	0.002		B (BS2, BP6)	7850
	NM_178822.4	c.7840G>A (p.Asp2614Asn)	Missense	0.006676	0.004		B (BS1, BS2, BP6)	6905, 7835
IL17RD	NM_017563.4	c.359C>T (p.Ser120Leu)	Missense	0.000021	0.002		VUS (PM2)	7835
	NM_017563.4	c.392A>C (p.Lys131Thr)	Missense	0.000856	0.002		VUS (PM2)	7764
	NM_017563.4	c.481G>A (p.Val161Ile)	Missense	0.000021	0.002		VUS (PM2)	8181
	NM_017563.4	c.604C>A (p.Pro202Thr)	Missense	-	0.002		VUS (PM2)	8204
	NM_017563.4	c.665C>T (p.Pro222Leu)	Missense	0.000028	0.002		VUS (PM2)	5554

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_017563.4	c.964C>T (p.Arg322Cys)	Missense	0.000049	0.002	VUS (PM2)	7684
	NM_017563.4	c.1570C>G (p.His524Asp)	Missense	0.000025	0.002	VUS (PM2, BP4)	8208
	NM_017563.4	c.1646T>G (p.Met549Arg)	Missense	0.000142	0.002	VUS (PM2)	8025
	NM_017563.4	c.1900C>T (p.Arg634Trp)	Missense	0.000012	0.004	VUS (PM2, BP4)	7675, 7821
<i>JAG1</i>	NM_000214.2	c.5G>T (p.Arg2Leu)	Missense	0.000045	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7853
	NM_000214.2	c.494G>A (p.Arg165Gln)	Missense	0.000025	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	8018
<i>KIF14</i>	NM_014875.2	c.346G>A (p.Glu116Lys)	Missense	0.001234	0.002	B (BS1, BP6)	5575
	NM_014875.2	c.397T>C (p.Trp133Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7956
	NM_014875.2	c.941A>G (p.Lys314Arg)	Missense	0.001230	0.004	B (BA1, BP4, BP6)	8199, 8204
	NM_014875.2	c.1009G>A (p.Glu337Lys)	Missense	0.000134	0.008	VUS (PM2, BP4)	5579, 7853, 8182, 8253
	NM_014875.2	c.1087G>A (p.Val363Ile)	Missense	0.002968	0.006	B (BS1, BS2, BP6)	6559, 7853, 8182
	NM_014875.2	c.1184C>T (p.Thr395Met)	Missense	0.000750	0.002	B (BA1, BP6)	7728
	NM_014875.2	c.1734G>A (p.Met578Ile)	Missense	0.003042	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7923
	NM_014875.2	c.2030C>T (p.Thr677Met)	Missense	0.000040	0.002	VUS (PM2, PP3)	7861
	NM_014875.2	c.2201G>A (p.Arg734Gln)	Missense	0.003110	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	8045
	NM_014875.2	c.2648G>A (p.Arg883His)	Missense	0.000064	0.002	VUS (PM2, BP4)	7985
	NM_014875.2	c.3181A>G (p.Ile1061Val)	Missense	0.000078	0.002	VUS (PM2, BP4)	7844
	NM_014875.2	c.3192A>T (p.Glu1064Asp)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7945

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
KISS1	NM_014875.2	c.3274A>G (p.Met1092Val)	Missense	0.000456	0.002	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8003
	NM_014875.2	c.3808A>C (p.Ser1270Arg)	Missense	0.005705	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	6472, 7884
	NM_014875.2	c.4057C>G (p.Gln1353Glu)	Missense	0.000065	0.002	VUS (PM2)	8030
	NM_014875.2	c.4843G>A (p.Gly1615Ser)	Missense	0.000573	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	7688
	NM_002256.3	c.154_156dupCCG (p.Pro52dup)	In-frame insertion	0.000030	0.002	VUS (PM2, PM4)	7923
KISS1R	NM_002256.3	c.244C>A (p.Gln82Lys)	Missense	0.000161	0.004	VUS (PM2, BP4)	5540, 8208
	NM_032551.4	c.305T>C (p.Leu102Pro)	Missense	0.000027	0.002	LP (PS4, PS3, PM2)	7712
	NM_032551.4	c.872C>T (p.Ala291Val)	Missense	0.000013	0.004	VUS (PM2, BP4)	7852, 7904
	NM_175737.3	c.497T>C (p.Val166Ala)	Missense	0.001018	0.002	LB (BS2, BP4, BP6)	7637
	NM_175737.3	c.2329_2331delITC (p.Phe777del)	In-frame deletion	0.002451	0.002	VUS (PM2, BS2, PM4)	5473
LEPR	NM_175737.3	c.2443A>G (p.Lys815Glu)	Missense	0.000978	0.002	VUS (PM2, BP4)	8030
	NM_175737.3	c.3124G>A (p.Val1042Ile)	Missense	0.003275	0.002	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7845
	NM_002303.5	c.296G>A (p.Cys99Tyr)	Missense	0.000100	0.002	VUS (PM2, BP6)	7904
	NM_002303.5	c.371A>G (p.Asp124Gly)	Missense	0.000714	0.004	B (BA1, BP4, BP6)	8234, 7995
	NM_002303.5	c.1246C>T (p.His416Tyr)	Missense	0.000295	0.002	VUS	6077

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_002303.5	c.2260G>A (p.Val754Met)	Missense	0.000559	0.002	LB (BS1, BP6)	8221
	NM_002303.5	c.2918C>A (p.Thr973Asn)	Missense	0.000159	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	8234
<i>LHB</i>	NM_000894.2	c.239G>A (p.Arg80His)	Missense	0.000032	0.004	VUS (PM2)	8075, 8174
<i>LHX3</i>	NM_014564.4	c.400G>A (p.Asp134Asn)	Missense	0.000050	0.002	VUS (PM2, PP3)	7663
	NM_014564.4	c.748G>A (p.Val250Ile)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	6055
	NM_014564.4	c.944G>C (p.Arg315Pro)	Missense	0.000665	0.004	LB (BS1, BS2)	5477, 8215
<i>LHX4</i>	NM_014564.4	c.949G>A (p.Gly317Ser)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2, BP4)	7116
	NM_033343.3	c.256G>A (p.Gly86Ser)	Missense	0.000021	0.002	VUS (PM2, PP3)	5793
<i>LIF</i>	NM_002309.3	c.256G>A (p.Val86Met)	Missense	0.005179	0.002	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7992
	NM_002309.3	c.415G>A (p.Alai39Thr)	Missense	0.001771	0.002	B (BS1, BS2, BP4)	7850
	NM_002309.3	c.481G>A (p.Val161Met)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2)	6036
<i>LZTFL1</i>	NM_020347.4	c.26T>C (p.Met9Thr)	Missense	0.000922	0.004	LB (BS1, BS2, BP4)	8002, 8296
<i>MAGEL2</i>	NM_019066.5	c.263C>T (p.Pro88Leu)	Missense	0.000202	0.002	VUS (PM2, BP6)	7637
	NM_019066.5	c.383T>C (p.Leu128Pro)	Missense	0.002584	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	8045
	NM_019066.5	c.1038G>C (p.Arg346Ser)	Missense	0.001977	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7820
	NM_019066.5	c.1079C>T (p.Ala360Val)	Missense	0.006048	0.006	B (BA1, BS2, BP6)	7631, 8030, 8115
	NM_019066.5	c.1266_1286dup (p.Ile423_Pro429)	In-frame insertion	0.000067	0.002	VUS (PM2, PM4)	8198
	NM_019066.5	c.1286C>T (p.Pro429Leu)	Missense	0.002873	0.006	B (BS1, BS2, BP6)	7675, 7729, 7844

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_019066.5	c.1386_1406del (p.Ala463_Pro469del)	<i>In-frame insertion</i>	0.000457	0.002	B (BS1, BP3, BP6)	8044
	NM_019066.5	c.1720C>G (p.Leu574Val)	<i>Missense</i>	0.000091	0.002	VUS (BP6)	7837
	NM_019066.5	c.2028G>T (p.Glu676Asp)	<i>Missense</i>	0.000016	0.002	VUS (PM2)	7806
	NM_019066.5	c.2074G>A (p.Val692Ile)	<i>Missense</i>	0.003543	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7634
	NM_019066.5	c.2281G>C (p.Ala761Pro)	<i>Missense</i>	0.000831	0.002	B (BS1, BP6)	7929
	NM_019066.5	c.2290G>A (p.Ala764Thr)	<i>Missense</i>	0.000710	0.006	B (BS1, BP6)	7674, 7959, 8239
	NM_019066.5	c.2343G>T (p.Glu781Asp)	<i>Missense</i>	0.000008	0.002	VUS (PM2)	7860
	NM_019066.5	c.2633C>T (p.Pro878Leu)	<i>Missense</i>	0.001623	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	8044
	NM_019066.5	c.2692A>G (p.Ser898Gly)	<i>Missense</i>	0.001681	0.004	B (BA1, BS2, BP6)	8131, 8174
	NM_019066.5	c.3017C>G (p.Thr1006Ser)	<i>Missense</i>	0.003454	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7648
	NM_019066.5	c.3464A>C (p.Lys1155Thr)	<i>Missense</i>	0.000032	0.002	VUS (PM2)	7689
	NM_019066.5	c.3690G>C (p.Glu1230Asp)	<i>Missense</i>	0.000325	0.002	LB (BS1, BP6)	8024
MASTL	NM_032844.5	c.34G>C (p.Gly12Arg)	<i>Missense</i>	0.002931	0.002	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8189
	NM_032844.5	c.70A>G (p.Ile24Val)	<i>Missense</i>	0.000594	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	8045
	NM_032844.5	c.496A>T (p.Asn166Tyr)	<i>Missense</i>	0.000032	0.002	VUS (PM2, PP3)	7745
	NM_032844.5	c.1012A>G (p.Met338Val)	<i>Missense</i>	0.000007	0.002	VUS (PM2, BP4)	7813

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_032844.5	c.1016T>A (p.Met339Lys)	Missense	0.000677	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	7689
	NM_032844.5	c.1828G>A (p.Val610Ile)	Missense	0.009365	0.008	B (BS2, BP4, BP6)	6119, 7778, 7860, 8079
MC4R	NM_032844.5	c.1930A>C (p.Lys644Gln)	Missense	0.001139	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	8126
	NM_032844.5	c.2051C>T (p.Ser684Leu)	Missense	0.000020	0.002	VUS (PM2)	7985
	NM_005912.2	c.94G>A (p.Gly32Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	5579
	NM_001127500.1	c.37G>A (p.Val13Met)	Missense	0.000018	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	7839
	NM_001127500.1	c.305G>A (p.Ser102Asn)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2, BP4)	7820
	NM_001127500.1	c.607T>A (p.Ser203Thr)	Missense	0.000594	0.002	LB (BS1, BS2, BP6)	6045
MKKS	NM_001127500.1	c.2962C>T (p.Arg988Cys)	Missense	0.002843	0.004	B (BA1, BS2, BP6)	8180, 8232
	NM_001127500.1	c.3029C>T (p.Thr1010Ile)	Missense	0.008249	0.004	B (BA1, BS2, BP6)	5473, 6559
	NM_018848.3	c.67A>G (p.Arg23Gly)	Missense	0.000609	0.002	LB (BS1, BP6)	7956
	NM_018848.3	c.721G>T (p.Val241Leu)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2)	8234
	NM_018848.3	c.724G>T (p.Ala242Ser)	Missense	0.005251	0.006	B (PP3, BA1, BS2, BP6)	5496, 7920, 8051
	NM_018848.3	c.1015A>G (p.Ile339Val)	Missense	0.004174	0.004	B (BA1, BS2, BP6)	8128, 8204
	NM_018848.3	c.1318C>G (p.Gln440Glu)	Missense	0.000064	0.002	VUS (PM2)	5485
	NM_018848.3	c.1456T>C (p.Cys486Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8022
	NM_018848.3	c.1474G>A (p.Asp492Asn)	Missense	0.000318	0.002	VUS	7906
	NM_004958.3	c.889G>A (p.Asp297Asn)	Missense	0.000078	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	7970

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
NDNF	NM_004958.3	c.1688A>G (p.His563Arg)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	7329
	NM_004958.3	c.2323A>G (p.Ile775Val)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7906
	NM_004958.3	c.3671A>G (p.Asp1224Gly)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	8203
	NM_004958.3	c.4885A>C (p.Ile1629Leu)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	6086
	NM_024574.3	c.239C>T (p.Thr80Met)	Missense	0.001357	0.006	VUS	7029, 7806, 8042
	NM_024574.3	c.602C>G (p.Thr201Ser)	Missense	0.001023	0.004	LB (BS2, BP6)	5491, 7804
	NM_024574.3	c.653A>G (p.Glu218Gly)	Missense	0.000320	0.002	VUS (PM2)	7935
	NM_020999.4	c.17C>T (p.Ser6Leu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8057
	NM_020999.4	c.44G>A (p.Arg15His)	Missense	0.000036	0.002	VUS (PM2, BP6)	8167
	NM_020999.4	c.46G>C (p.Glu16Gln)	Missense	0.000432	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	5575
NHLH2	NM_020999.4	c.367G>C (p.Glu123Gln)	Missense	0.000074	0.002	VUS (PM2, PP3)	8296
	NM_005599.3	c.283T>A (p.Leu95Met)	Missense	0.000000	0.002	VUS (PM2)	7952
NOS1	NM_000620.4	c.142C>T (p.Arg48Cys)	Missense	0.000064	0.002	VUS (PM2, PP2)	6077
	NM_000620.4	c.234C>G (p.Asp78Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	6077
	NM_000620.4	c.458C>T (p.Ser153Leu)	Missense	0.002062	0.002	B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	8024

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
NOTCH1	NM_000620.4	c.721G>A (p.Asp241Asn)	Missense	0.001968	0.006	LB (PM2, BS2, PP2, BP4, BP6)	7845, 8054, 8265
	NM_000620.4	c.1082C>T (p.Pro361Leu)	Missense	0.000056	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7703
	NM_000620.4	c.1181A>C (p.Asp394Ala)	Missense	0.004755	0.002	B (PM2, BS2, PP2, BP4, BP6)	5485
	NM_000620.4	c.1517T>C (p.Phe506Ser)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7635
	NM_000620.4	c.2173A>G (p.Asn725Asp)	Missense	0.002325	0.002	B (PP2, BS1, BS2, BP6)	8075
	NM_000620.4	c.3092A>T (p.Gln1031Leu)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	7805
	NM_017617.4	c.64C>T (p.Pro22Ser)	Missense	0.002126	0.006	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7863, 7911, 8296
	NM_017617.4	c.368C>T (p.Thr123Met)	Missense	0.000907	0.004	B (PP2, BA1, BS1, BS2, BP6)	8195, 8047
	NM_017617.4	c.452A>G (p.Asn151Ser)	Missense	0.000017	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	8023
	NM_017617.4	c.701G>A (p.Arg234His)	Missense	0.000446	0.002	LB (PP2, BS1, BP6)	8075
	NM_017617.4	c.1543G>C (p.Glu515Gln)	Missense	0.000061	0.002	VUS (PM2, PP2)	7682
	NM_017617.4	c.1682C>T (p.Thr561Met)	Missense	0.000102	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	8126
	NM_017617.4	c.2482G>A (p.Val828Met)	Missense	0.000018	0.002	VUS (PM2, PP2)	7892
	NM_017617.4	c.3190G>A (p.Asp1064Asn)	Missense	0.000060	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	7929
NM_017617.4	c.3767C>T (p.Pro1256Leu)	Missense	0.002026	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	8174	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_017617.4	c.5011G>A (p.Val1671Ile)	Missense	0.003530	0.006	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7116, 7863, 7911
	NM_017617.4	c.5273G>A (p.Arg1758His)	Missense	0.000140	0.006	VUS (PP2, BP6)	7992, 8126, 8141
	NM_017617.4	c.5476G>A (p.Glu1826Lys)	Missense	0.000028	0.002	VUS (PM2, PP2)	7895
	NM_017617.4	c.5508C>A (p.Asp1836Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7883
	NM_017617.4	c.6454G>C (p.Gly2152Arg)	Missense	0.001472	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7820
	NM_017617.4	c.6644C>T (p.Ser2215Leu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	7674
	NM_017617.4	c.6814C>T (p.Arg2272Cys)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2, PP2)	5147
	NM_017617.4	c.6910T>G (p.Leu2304Val)	Missense	0.000008	0.004	VUS (PM2, PP2, BP6)	8212, 8233
	NM_017617.4	c.7223T>C (p.Leu2408Pro)	Missense	0.000096	0.002	VUS (PP2, BP6)	8278
	NM_017617.4	c.7397C>G (p.Thr2466Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7789
	NM_017617.4	c.7498C>G (p.His2500Asp)	Missense	0.000033	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	7993
<i>NROB1</i>	NM_000475.4	c.16C>A (p.His6Asn)	Missense	0.001142	0.002	B (BS1, BS2, BP6)	8047
<i>NR5A1</i>	NM_004959.4	c.523G>A (p.Gly175Ser)	Missense	0.000009	0.002	VUS (PM2, PP2)	5160
	NM_004959.4	c.754A>T (p.Thr252Ser)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM1, PM2, PP2, BP4)	7993
	NM_004959.4	c.787G>A (p.Gly263Ser)	Missense	0.000041	0.002	VUS (PM1, PM2, PP2)	5470

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
NRP1	NM_003873.7	c.800G>A (p.Ser267Asn)	Missense	0.002862	0.006	B (BS1, BS2, BP6)	5575, 8266, 8278
	NM_003873.7	c.1030G>A (p.Ala344Thr)	Missense	0.000020	0.002	VUS (PM2, PP3)	5160
	NM_003873.7	c.1531T>C (p.Phe511Leu)	Missense	0.000025	0.002	VUS (PM2, PP3, BS2)	7852
	NM_003873.7	c.1610C>T (p.Ala537Val)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2)	7722
	NM_003873.7	c.1775C>T (p.Pro592Leu)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2, PP3)	8131
	NM_003873.7	c.2471T>C (p.Ile824Thr)	Missense	0.000213	0.002	VUS (PM2)	7894
	NM_003873.7	c.2500G>A (p.Glu834Lys)	Missense	0.000825	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	7680
	NM_201266.1	c.292G>T (p.Ala98Ser)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2)	7820
	NM_201266.1	c.487C>T (p.Pro163Ser)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2)	7970
	NM_201266.1	c.860G>A (p.Arg287Gln)	Missense	0.001142	0.002	LB (BS2, BP6)	8024
	NM_201266.1	c.1198G>A (p.Ala400Thr)	Missense	0.000088	0.004	VUS (PM2)	7793, 8092
	NM_201266.1	c.1412G>A (p.Arg471His)	Missense	0.000174	0.002	VUS (PM2, PP3)	7878
	NM_201266.1	c.2552C>T (p.Ser851Leu)	Missense	0.000056	0.002	VUS (PM2, BP4)	8195
NSMF	NM_015537.4	c.241G>A (p.Gly81Ser)	Missense	0.000157	0.004	VUS (PM2, BP4)	8003, 8130
	NM_015537.4	c.1019G>C (p.Gly340Ala)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2, BP4)	7778
	NM_015537.4	c.1091G>A (p.Arg364His)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2)	7689
	NM_015537.4	c.1330C>T (p.Arg444Cys)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2)	8026
	NM_015537.4	c.1453G>A (p.Val485Ile)	Missense	0.000039	0.002	VUS (PM2, BP4)	7804

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles	
NTN1	NM_004822.2	c.34_42delCTGGCGGCG (p.Leu12_Alai4del)	<i>In-frame deletion</i>	0.000090	0.002	VUS (PM2, PM4)	7684	
	NM_004822.2	c.116A>G (p.Asp39Gly)	<i>Missense</i>	0.000015	0.002	VUS (PM2)	8118	
	NM_004822.2	c.1121A>G (p.Asn374Ser)	<i>Missense</i>	0.000021	0.002	VUS (PM2)	8178	
	NM_004822.2	c.1289C>T (p.Thr430Met)	<i>Missense</i>	0.000067	0.002	VUS (PM2)	7949	
	NM_004822.2	c.1466A>G (p.Lys489Arg)	<i>Missense</i>	0.000145	0.002	VUS (PM2)	7791	
	NM_004822.2	c.1693C>G (p.Pro565Ala)	<i>Missense</i>	-	0.002	VUS (PM2)	7763	
	OTUD4	NM_001102653.1	c.386C>G (p.Alai29Gly)	<i>Missense</i>	0.001292	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7663
		NM_001102653.1	c.1042C>T (p.Arg348Trp)	<i>Missense</i>	0.000036	0.002	VUS (PM2)	7821
		NM_001102653.1	c.2755A>G (p.Thr191Ala)	<i>Missense</i>	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	8044
		NM_001037293.3	c.464C>G (p.Ser155Cys)	<i>Missense</i>	0.000004	0.002	VUS (PM2)	6055
PALM2	NM_001037293.3	c.818A>G (p.Asn273Ser)	<i>Missense</i>	0.004110	0.008	B (BS1, BS2, BP4)	7687, 7789, 7813, 7839	
	NM_001037293.3	c.979G>A (p.Val327Met)	<i>Missense</i>	0.000025	0.002	VUS (PM2, BP4)	8094	
	NM_000439.4	c.170T>C (p.Leu57Pro)	<i>Missense</i>	-	0.002	VUS (PM2)	7637	
	NM_000439.4	c.680T>C (p.Val227Ala)	<i>Missense</i>	-	0.002	VUS (PM2, PF3)	5544	
PCSK1	NM_000439.4	c.1460T>A (p.Ile487Asn)	<i>Missense</i>	-	0.002	VUS (PM2)	7959	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>PDE3A</i>	NM_000439.4	c.1549C>T (p.Arg517*)	Nonsense	0.000012	0.002	P (PVS1, PM2, PM3)	7894
	NM_000439.4	c.1654G>T (p.Asp552Tyr)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP3)	7688
	NM_000439.4	c.1918A>G (p.Thr640Ala)	Missense	0.001306	0.006	LB (BS1, BP4, BP6)	7631, 8174, 8178
	NM_000439.4	c.2236G>A (p.Val746Met)	Missense	0.000035	0.002	VUS (PM2, BP4)	7911
	NM_000921.4	c.296A>C (p.Glu99Ala)	Missense	0.003209	0.004	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	6051, 8024
	NM_000921.4	c.578T>C (p.Val193Ala)	Missense	0.003176	0.004	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	5555, 8265
	NM_000921.4	c.617T>C (p.Leu206Pro)	Missense	0.000366	0.002	VUS (PM2)	8237
	NM_000921.4	c.761A>G (p.Tyr254Cys)	Missense	0.000591	0.002	VUS (PM2)	7804
	NM_000921.4	c.1219T>G (p.Cys407Gly)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	6559
	NM_000921.4	c.1375C>T (p.Arg459Trp)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM1, PM2)	7934
	NM_000921.4	c.1376G>A (p.Arg459Gln)	Missense	0.001456	0.006	LB (PM2, BS2, BP6)	7868, 7929, 8014
	NM_000921.4	c.3284G>A (p.Arg1095Gln)	Missense	0.000262	0.002	VUS (PM2, BP4)	7850
	<i>PGM1</i>	NM_002633.2	c.107C>A (p.Ala36Glu)	Missense	0.000105	0.004	VUS
NM_002633.2		c.1103C>T (p.Ala368Val)	Missense	0.000474	0.002	VUS (BS1)	7992
<i>PKNOX2</i>	NM_001382323.2	c.210C>G (p.Asp70Glu)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2)	8294
	NM_001382323.2	c.846C>A (p.Asp282Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	5157
	NM_001382323.2	c.1141G>A (p.Ala381Thr)	Missense	0.000046	0.002	VUS (PM2)	7879
	NM_001382323.2	c.1339G>A (p.Glu447Lys)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8296
<i>PLEKHA5</i>	NM_001143821.3	c.890G>C (p.Arg297Thr)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7870

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
PLXNA1	NM_001143821.3	c.2200G>C (p.Glu734Gln)	Missense	0.000217	0.002	VUS (PM2)	6667
	NM_001143821.3	c.2339A>G (p.Tyr780Cys)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7879
	NM_001143821.3	c.2404G>A (p.Gly802Ser)	Missense	0.000214	0.002	VUS (PM2)	7896
	NM_001143821.3	c.2530A>G (p.Met844Val)	Missense	0.000100	0.002	VUS (PM2, BP4)	7745
	NM_001143821.3	c.3389A>C (p.Glu1130Ala)	Missense	0.000298	0.002	VUS (PM2)	7850
	NM_032242.3	c.329G>A (p.Ser110Asn)	Missense	0.000823	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8233
	NM_032242.3	c.649G>A (p.Gly217Ser)	Missense	0.000035	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8178
	NM_032242.3	c.1114C>T (p.Arg372Cys)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2, PP2)	7839
	NM_032242.3	c.1474C>T (p.Leu492Phe)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7896
	NM_032242.3	c.1528G>T (p.Val510Leu)	Missense	0.000005	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8245
	NM_032242.3	c.1832A>G (p.Glu611Gly)	Missense	0.000012	0.004	VUS (PM2, PP2, BP4)	5160, 8118
	NM_032242.3	c.2261G>A (p.Arg754His)	Missense	0.000046	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8177
	NM_032242.3	c.2690G>A (p.Arg897His)	Missense	0.000975	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	6040
	NM_032242.3	c.2908C>T (p.Arg970Cys)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2)	7820
	NM_032242.3	c.3110A>G (p.Asn1037Ser)	Missense	0.000064	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	5155
	NM_032242.3	c.3460C>T (p.Pro1154Ser)	Missense	0.000060	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8237
NM_032242.3	c.3629C>A (p.Ala1210Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	8005	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
PLXNA3	NM_032242.3	c.3679G>A (p.Glu1227Lys)	Missense	0.000017	0.002	VUS (PM2, PP2)	7920
	NM_032242.3	c.4903A>G (p.Ser1635Gly)	Missense	0.001644	0.002	LB (PM2, BS2, PP2, BP6)	7878
	NM_017514.4	c.85A>G (p.Thr29Ala)	Missense	0.000006	0.002	VUS (PM2, BP4)	5579
	NM_017514.4	c.265C>T (p.Arg89Cys)	Missense	0.000016	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7959
	NM_017514.4	c.719C>T (p.Thr240Met)	Missense	0.000127	0.002	VUS (PM2, BS2)	7715
	NM_017514.4	c.1150G>A (p.Gly384Ser)	Missense	0.000894	0.002	B (PM2, BS2, BP6)	5540
	NM_017514.4	c.1204G>A (p.Glu402Lys)	Missense	0.000067	0.002	VUS (PM2, BS2)	7960
	NM_017514.4	c.1237G>A (p.Gly413Ser)	Missense	0.000930	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	7893
	NM_017514.4	c.1249G>A (p.Val417Met)	Missense	0.000162	0.002	VUS (PM2, BS2)	7820
	NM_017514.4	c.1298G>A (p.Arg433His)	Missense	0.009517	0.007	B (BS1, BS2, BP6)	8051, 8206, 7722
	NM_017514.4	c.1357A>T (p.Thr453Ser)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8178
	NM_017514.4	c.1493C>T (p.Ala498Val)	Missense	0.000179	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7934
	NM_017514.4	c.1628G>A (p.Arg543Gln)	Missense	0.003025	0.005	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	6472, 7833
	NM_017514.4	c.1678G>A (p.Val560Ile)	Missense	0.000066	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7793
	NM_017514.4	c.1958C>T (p.Pro653Leu)	Missense	0.005203	0.007	B (BS2, BP6)	5463, 8023, 8121
	NM_017514.4	c.2268T>G (p.His756Gln)	Missense	0.000195	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7880
	NM_017514.4	c.3034A>T (p.Ser1012Cys)	Missense	0.000097	0.002	VUS (PM2, BS2)	8174
	NM_017514.4	c.3705C>G (p.Ile1235Met)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8195
NM_017514.4	c.3712G>A (p.Val1238Met)	Missense	0.000466	0.002	LB (PM2, BS2, BP6)	8130	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles	
PLXNB1	NM_017514.4	c.4861G>A (p.Asp1621Asn)	Missense	0.000016	0.002	0.002	VUS (PM2, BS2)	6040	
	NM_017514.4	c.5111G>A (p.Arg1704His)	Missense	0.000033	0.002	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	7632	
	NM_002673.4	c.378G>T (p.Gln126His)	Missense	-	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7641	
	NM_002673.4	c.479T>G (p.Leu160Trp)	Missense	-	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7728	
	NM_002673.4	c.655G>A (p.Val219Met)	Missense	0.001526	0.006	0.006	VUS (PM2, BS2, PP2)	6905, 7675, 7923	
	NM_002673.4	c.815G>A (p.Arg272His)	Missense	0.004737	0.006	0.006	LB (PP2, BS2, BP4)	7893, 7985, 8149	
	NM_002673.4	c.1186C>T (p.Pro396Ser)	Missense	0.001234	0.002	0.002	VUS (PP2)	8057	
	NM_002673.4	c.1544C>T (p.Ser515Leu)	Missense	0.000171	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7964	
	NM_002673.4	c.2450A>G (p.Asp817Gly)	Missense	0.000111	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7836	
	NM_002673.4	c.2512G>T (p.Ala838Ser)	Missense	0.002461	0.002	0.002	B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	8024	
	PNPLA6	NM_002673.4	c.2653C>A (p.Leu885Ile)	Missense	0.000004	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7792
		NM_002673.4	c.2986C>T (p.Arg996Cys)	Missense	0.000141	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7820
		NM_002673.4	c.3911G>A (p.Arg1304His)	Missense	0.000053	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7964
		NM_002673.4	c.5707C>T (p.Leu1903Phe)	Missense	0.000040	0.002	0.002	VUS (PM2, PP2)	8105
NM_006702.4		c.1340C>T (p.Pro447Leu)	Missense	0.004745	0.002	0.002	B (PM5, PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	6091	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_006702.4	c.3067C>T (p.His1023Tyr)	Missense	0.000081	0.002	VUS (PM2, PP2)	7111
	NM_006702.4	c.3577C>G (p.Gln1193Glu)	Missense	0.000149	0.002	VUS (PM2, PP2)	7878
	NM_006702.4	c.3598C>G (p.Gln1200Glu)	Missense	0.000166	0.002	VUS (PM2, PP2)	7674
	NM_006702.4	c.3611C>T (p.Ala1204Val)	Missense	0.000028	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8245
	NM_006702.4	c.3632G>A (p.Arg1211His)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2, PP2)	6907
	NM_006702.4	c.4108G>A (p.Gly1370Ser)	Missense	0.005078	0.004	B (PP2, BA1, BS2, BP4, BP6)	7641, 8021
<i>POGZ</i>	NM_015100.4	c.3979A>G (p.Ser1327Gly)	Missense	0.000018	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	6045
<i>POLA1</i>	NM_016937.3	c.437C>T (p.Thr146Ile)	Missense	0.000032	0.002	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	7945
	NM_016937.3	c.823A>G (p.Lys275Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8097
	NM_016937.3	c.1345A>G (p.Lys449Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8026
	NM_016937.3	c.1555A>G (p.Met519Val)	Missense	0.000073	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	7793
	NM_016937.3	c.3604G>C (p.Asp1202His)	Missense	0.003915	0.005	B (BA1, BS2, BP6)	7805, 8184
	NM_016937.3	c.3731C>T (p.Thr1244Ile)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8306
<i>POLR1C</i>	NM_203290.2	c.34A>G (p.Ser12Gly)	Missense	0.000020	0.002	VUS (PM2, PP2)	7959
	NM_203290.2	c.193A>G (p.Met65Val)	Missense	0.000916	0.004	VUS (PP2, PP5, BS1)	8051, 8239
	NM_203290.2	c.421C>T (p.Arg141Cys)	Missense	0.000619	0.006	LB (PP2, BS1, BP6)	7934, 7995, 8199
<i>POLR3A</i>	NM_007055.3	c.1177C>T (p.Pro393Ser)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3)	7729
	NM_007055.3	c.1744C>T (p.Arg582Cys)	Missense	0.000173	0.002	VUS (PM2, PP2)	8097

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência população portuguesa	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_007055.3	c.2938A>G (p.Ile980Val)	Missense	0.005996	0.004		B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	7880, 8005
	NM_007055.3	c.2993G>A (p.Arg998His)	Missense	0.000120	0.002		VUS (PM2, PP2)	7896
	NM_007055.3	c.3301G>C (p.Val1101Leu)	Missense	0.000032	0.002		VUS (PM2, PP2)	8112
	NM_007055.3	c.3388G>C (p.Val1130Leu)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2)	6667
	NM_007055.3	c.3734G>A (p.Arg1245Gln)	Missense	0.001575	0.002		B (PP2, BS2, BP4, BP6)	5153
	NM_007055.3	c.3840G>A (p.Met1280Ile)	Missense	0.000014	0.002		VUS (PM2, PP2)	7641
<i>POLR3B</i>	NM_018082.5	c.432C>G (p.Asn144Lys)	Missense	0.000007	0.002		VUS (PM2, PP2)	8232
	NM_018082.5	c.469A>G (p.Lys157Glu)	Missense	0.000008	0.002		VUS (PM2, PP2)	5160
	NM_018082.5	c.1244T>C (p.Met415Thr)	Missense	0.000566	0.002		LP (PS4, PP2, PP3, BS1)	5793
	NM_018082.5	c.1502A>G (p.His501Arg)	Missense	-	0.002		VUS (PM2, PP2, PP3)	7770
	NM_018082.5	c.1931C>T (p.Ala644Val)	Missense	0.000012	0.004		VUS (PM2, PP2, PP3)	8072, 8179
	NM_018082.5	c.1958A>T (p.Asp653Val)	Missense	0.006543	0.002		B (PP2, BA1, BS2, BP6)	5497
<i>POU6F2</i>	NM_007252.4	c.551T>G (p.Leu184Arg)	Missense	0.000833	0.002		LB (PM2, BS2, BP6)	6906
	NM_007252.4	c.552_553insAG (p.Gln185Serfs*118)	Frameshift	0.000703	0.002		LP (PVS1, PM2)	6906
	NM_007252.4	c.557T>A (p.Leu186His)	Missense	0.001374	0.002		LB (PM2, BS2, BP6)	6906

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
PRDM13	NM_007252.4	c.734C>T (p.Ala245Val)	Missense	0.001484	0.002	B (BS2, BP4, BP6)	7631
	NM_007252.4	c.1885A>C (p.Asn629His)	Missense	0.000440	0.002	VUS (PM2, BS2, PP3)	8041
	NM_021620.4	c.758A>T (p.Glu253Val)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2)	8206
	NM_021620.4	c.934T>C (p.Tyr312His)	Missense	0.000261	0.004	VUS (PM2, BP4)	7676, 8216
	NM_021620.4	c.1102C>G (p.Leu368Val)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7929
	NM_021620.4	c.1883C>G (p.Thr628Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7893
	NM_021620.4	c.1972C>G (p.Leu658Val)	Missense	0.000774	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	7851
	NM_144773.3	c.151G>A (p.Ala51Thr)	Missense	0.004574	0.006	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7968, 8131, 8253
	NM_144773.3	c.253C>T (p.Arg85Cys)	Missense	0.000601	0.002	LP (PM1, PM2, PM5, PP5)	8232
	NM_144773.3	c.518T>G (p.Leu173Arg)	Missense	0.002196	0.004	LB (BS2, BP6)	7688, 8184
PROPI	NM_144773.3	c.1044G>A (p.Met348Ile)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7689
	NM_006261.4	c.301_302delAG (p.Leu102Cysfs*8)	Frameshift	0.000181	0.004	P (PVS1, PS3, PM2, PM3, PP1)	7648, 8005
PTCH1	NM_006261.4	c.425C>T (p.Ala142Val)	Missense	0.001993	0.004	LB (BS1, BP6)	7880, 8141
	NM_000264.3	c.49_51delGGC (p.Gly17del)	In-frame deletion	0.000835	0.006	LB (PM4, BS1, BP6)	7805, 7924, 7968
	NM_000264.3	c.67G>A (p.Ala23Thr)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7684
	NM_000264.3	c.1306G>A (p.Asp436Asn)	Missense	0.000704	0.002	LB (PP2, BS1, BP6)	7914
	NM_000264.3	c.1628G>A (p.Arg543His)	Missense	0.000016	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3, BP6)	5471

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_000264.3	c.2015C>T (p.Thr672Met)	Missense	0.000020	0.002	VUS (PM2, PP2, PP3, BP6)	7884
	NM_000264.3	c.2173C>T (p.Pro725Ser)	Missense	0.000891	0.002	B (PP2, BS1, BP6)	7116
	NM_000264.3	c.2183C>T (p.Thr728Met)	Missense	0.002135	0.004	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	7850, 8234
	NM_000264.3	c.2689A>G (p.Ile897Val)	Missense	0.000025	0.004	VUS (PP2, PM2, BP6)	7111, 8178
	NM_000264.3	c.3487G>A (p.Gly1163Ser)	Missense	0.000513	0.002	VUS (PM5, PP2, PP3, BP6)	5155
	NM_000264.3	c.3845C>T (p.Pro1282Leu)	Missense	0.002944	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	8024
	NM_000264.3	c.4252G>A (p.Val1418Ile)	Missense	0.000414	0.002	LB (PP2, BS1, BP6)	7945
	NM_000264.3	c.4324C>T (p.Arg1442Trp)	Missense	0.001193	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	7678
	NM_000264.3	c.4325G>A (p.Arg1442Gln)	Missense	0.000411	0.002	B (PP2, BS1, BS2, BP6)	7827
<i>RAB18</i>	NM_021252.3	c.394G>T (p.Asp132Tyr)	Missense	0.000085	0.002	VUS (PM2, PP3)	7862
<i>RAB3GAP1</i>	NM_012233.3	c.244G>A (p.Glu82Lys)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	7703
	NM_012233.3	c.913A>G (p.Ile305Val)	Missense	0.008398	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	6392
	NM_012233.3	c.1006C>T (p.Arg336Cys)	Missense	0.004542	0.006	B (BA1, BS2, BP6)	6051, 7840, 7924
<i>RAB3GAP2</i>	NM_012414.3	c.1580C>T (p.Pro527Leu)	Missense	0.000308	0.002	VUS (PP3, BS1)	7769
	NM_012414.3	c.1657G>A (p.Asp553Asn)	Missense	0.000106	0.002	VUS (PM2)	7736
	NM_012414.3	c.3355G>A (p.Glu119Lys)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7806
	NM_012414.3	c.3991C>A (p.Leu1331Ile)	Missense	0.000810	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7807, 7923

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_012414.3	c.4060A>G (p.Ile1354Val)	Missense	0.000870	0.008	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8045, 8093, 8294, 8304
<i>RBM28</i>	NM_018077.2	c.718G>C (p.Asp240His)	Missense	0.002576	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7863, 8234
	NM_018077.2	c.746A>G (p.Asp249Gly)	Missense	0.000913	0.002	LB (PM2, BS2, BP4)	8180
	NM_018077.2	c.1387A>C (p.Met463Leu)	Missense	0.001527	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	7736
	NM_018077.2	c.1433A>G (p.Lys478Arg)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	7878
	NM_018077.2	c.2015C>T (p.Ala672Val)	Missense	0.002074	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7863, 8234
	NM_018077.2	c.2077C>T (p.His693Tyr)	Missense	0.002121	0.008	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	5158, 5471, 6086, 7873
	NM_018077.2	c.2273A>G (p.Asp758Gly)	Missense	0.001213	0.002	B (PM2, BS2, BP4, BP6)	6091
<i>RD3</i>	NM_183059.2	c.16T>C (p.Trp6Arg)	Missense	0.002725	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	8149
	NM_183059.2	c.69G>C (p.Glu23Asp)	Missense	0.002678	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	8149
	NM_183059.2	c.202C>T (p.Arg68Trp)	Missense	0.000265	0.002	VUS (BP4)	6086
	NM_183059.2	c.223C>T (p.Pro75Ser)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2)	8051
	NM_183059.2	c.584A>T (p.Asp195Val)	Missense	0.009535	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7814, 7894, 8022
<i>RELN</i>	NM_005045.3	c.7C>G (p.Arg3Gly)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7792
	NM_005045.3	c.1108G>C (p.Gly370Arg)	Missense	0.000255	0.002	VUS (PM2, PP2, BP6)	5153
	NM_005045.3	c.2782A>G (p.Ile928Val)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7852

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
	NM_005045.3	c.3651C>G (p.Ile1217Met)	Missense	0.002524	0.002	B (PP2, PP3, BS1, BS2, BP6)	7722
	NM_005045.3	c.4408G>A (p.Val1470Ile)	Missense	0.002425	0.006	B (PP2, BS1, BS2, BP4, BP6)	7633, 8216, 8278
	NM_005045.3	c.5108C>G (p.Pro1703Arg)	Missense	0.003513	0.002	B (PP2, BA1, BS2, BP6)	8014
	NM_005045.3	c.5200C>G (p.Leu1734Val)	Missense	0.000279	0.002	LB (PP2, BS1, BP4, BP6)	7851
	NM_005045.3	c.5345G>A (p.Arg1782His)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	7685
	NM_005045.3	c.5467G>A (p.Ala1823Thr)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	7641
	NM_005045.3	c.5822T>C (p.Val1941Ala)	Missense	0.000358	0.004	VUS (PP2, BP4)	6052, 8130
	NM_005045.3	c.6770C>T (p.Ser2257Leu)	Missense	0.000040	0.004	VUS (PP2, PM2)	5547, 8282
	NM_005045.3	c.7114G>A (p.Val2372Met)	Missense	0.000237	0.002	LB (PP2, BS1, BP6)	8047
	NM_005045.3	c.7438G>A (p.Gly2480Ser)	Missense	0.002620	0.004	LB (PP2, BS1, BP6)	7880, 8025
	NM_005045.3	c.7634C>T (p.Ala2545Val)	Missense	0.000216	0.004	VUS (PP2, BP6)	7964, 7995
	NM_005045.3	c.8005G>A (p.Val2669Ile)	Missense	0.000166	0.002	LB (PM2, PP2, BP4, BP6)	7949
RNF216	NM_207111.4	c.91C>G (p.Pro31Ala)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	8149
	NM_207111.4	c.230A>G (p.Asn77Ser)	Missense	0.000089	0.002	VUS (PM2, BP4)	7715
	NM_207111.4	c.854C>T (p.Ser285Leu)	Missense	0.001577	0.002	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	8025

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
ROBO3	NM_207111.4	c.1865C>T (p.Thr622Met)	Missense	0.000014	0.002	VUS (PM2, BP4)	5559
	NM_207111.4	c.2686G>A (p.Val896Ile)	Missense	0.000495	0.002	B (BA1, BP4, BP6)	8024
	NM_022370.3	c.323G>T (p.Arg108Leu)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2)	5554
	NM_022370.3	c.377C>A (p.Pro126Gln)	Missense	0.000046	0.002	VUS (PM2)	5470
	NM_022370.3	c.1542G>A (p.Met514Ile)	Missense	0.000511	0.002	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7637
	NM_022370.3	c.1615C>T (p.Arg539Trp)	Missense	0.003234	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5480, 5579, 6545
	NM_022370.3	c.2021G>A (p.Arg674His)	Missense	0.000068	0.002	VUS (PM2)	8079
	NM_022370.3	c.2300C>A (p.Ala767Asp)	Missense	0.000047	0.002	VUS (PM2, BP4)	8005
	NM_022370.3	c.2461C>G (p.Arg821Gly)	Missense	0.000013	0.002	VUS (PM2, BP4)	8045
	NM_022370.3	c.2621T>A (p.Leu874Gln)	Missense	0.005196	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7678, 7885, 7895
	NM_022370.3	c.2763G>C (p.Glu921Asp)	Missense	0.001301	0.002	B (BA1, BP6)	7952
	NM_022370.3	c.2899C>T (p.Pro967Ser)	Missense	0.000128	0.002	VUS (PM2)	8167
	NM_022370.3	c.2993G>T (p.Gly998Val)	Missense	0.001755	0.002	B (PF3, BS1, BS2, BP6)	5557
	NM_022370.3	c.3271T>C (p.Ser1091Pro)	Missense	0.000068	0.002	VUS	7985
	NM_022370.3	c.3593G>A (p.Arg1198His)	Missense	0.007416	0.004	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	5496, 7728
	NM_022370.3	c.3836C>T (p.Alai279Val)	Missense	0.000240	0.002	LB (BS1, BS2, BP4, BP6)	6077
	NM_022370.3	c.4100_4104delGGAGT (p.Arg1367Profs*29)	Frameshift	0.002672	0.004	B (PVSI, BA1, BS2, BP6)	7851, 8296
NM_022370.3	c.4116C>A (p.Ser1372Arg)	Missense	0.002020	0.004	B (BS1, BS2, BP4, BP6)	7889, 8232	

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>SEC14L3</i>	NM_174975.4	c.81delT (p.Pro28Leufs*52)	<i>Frameshift</i>	0.000219	0.002	VUS (PM2)	7634
	NM_174975.4	c.808G>C (p.Val270Leu)	<i>Missense</i>	0.004186	0.004	B (BS1, BS2, BP4)	5555, 6052
	NM_174975.4	c.1120G>A (p.Ala374Thr)	<i>Missense</i>	0.000272	0.006	VUS (PM2, BP4)	6051, 8025, 8177
	NM_006080.2	c.196C>T (p.Arg66Trp)	<i>Missense</i>	0.000513	0.002	VUS (PM2)	8051
<i>SEMA3A</i>	NM_006080.2	c.271A>G (p.Ile91Val)	<i>Missense</i>	0.000020	0.002	VUS (PM2)	6392
	NM_006080.2	c.1923G>C (p.Gln641His)	<i>Missense</i>	0.001140	0.002	LB (BP4, BP6)	7674
	NM_012431.2	c.142A>G (p.Ile48Val)	<i>Missense</i>	-	0.002	VUS (PM2, BP4)	5156
	NM_012431.2	c.1174G>A (p.Gly392Arg)	<i>Missense</i>	0.000379	0.002	LB (PM2, BP4, BP6)	7971
<i>SEMA4D</i>	NM_012431.2	c.1296C>A (p.Asn432Lys)	<i>Missense</i>	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	7860
	NM_006378.3	c.1528G>A (p.Glu510Lys)	<i>Missense</i>	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	6052
	NM_006378.3	c.1957G>A (p.Val653Ile)	<i>Missense</i>	0.000028	0.002	VUS (PM2, BP4)	7637
	NM_006378.3	c.2393G>A (p.Ser798Asn)	<i>Missense</i>	0.000941	0.002	VUS (PM2, BP4)	8075
<i>SEMA7A</i>	NM_003612.3	c.290T>A (p.Leu97His)	<i>Missense</i>	0.001274	0.002	VUS (PM2, BP4)	8054
	NM_003612.3	c.379G>A (p.Glu127Lys)	<i>Missense</i>	0.000053	0.002	VUS (PM2, BP4)	5480
	NM_003612.3	c.709G>A (p.Asp237Asn)	<i>Missense</i>	0.000230	0.002	VUS (PM2, BP4)	7935
	NM_003612.3	c.1864C>T (p.Arg622Cys)	<i>Missense</i>	0.000598	0.002	VUS (PM2, BP4)	5158
	NM_003612.3	c.1865G>A (p.Arg622His)	<i>Missense</i>	0.000404	0.002	VUS (PM2, BP4)	7935



Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
SOX11	NM_015295.2	c.424C>T (p.Pro142Ser)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM1, PM2, PP2, PP3)	8047
	NM_015295.2	c.3527C>T (p.Thr1176Ile)	Missense	0.000304	0.002	VUS (PP2, BP4)	8238
	NM_015295.2	c.5024A>G (p.His1675Arg)	Missense	0.000139	0.002	LB (PP2, BS1, BP4)	8045
	NM_015295.2	c.5729A>G (p.Gln1910Arg)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	8024
	NM_015295.2	c.5737C>G (p.Arg1913Gly)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	5469
SOX3	NM_003108.4	c.1051_1062dupAGCGGCAG CAGC (p.Ser351_Ser354dup)	In-frame insertion	0.003398	0.004	B (PM4, BA1, BS2, BP6)	5570, 5793
	NM_005634.2	c.14G>A (p.Arg5Gln)	Missense	0.003194	0.002	B (BS2, BP6)	7920
SPRY4	NM_005634.2	c.1059_1076delCACCGCCGC GGCCGCAGC	In-frame deletion	-	0.002	VUS (PM2, BP3)	7924
	NM_030964.5	(p.Thr354_Ala359del)	Missense	0.004530	0.006	VUS (PM2, BP6)	7644, 8018, 8111
	NM_030964.5	c.722C>A (p.Ser241Tyr)	Missense	0.000280	0.002	VUS (PM2)	8054
	NM_001035235.2	c.841G>A (p.Val281Met)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	7885
STX1	NM_001035235.2	c.184C>A (p.Pro62Thr)	Missense	0.002195	0.004	LB (PM2, BS2, BP4, BP6)	8025, 6086
	NM_001035235.2	c.413G>A (p.Gly138Glu)	Missense	0.001549	0.002	B (BS1, BS2, BP6)	8045
STS	NM_000351.4	c.1124G>C (p.Gly375Ala)	Missense	0.000429	0.002	B (PP3, BS1, BS2, BP6)	6040

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>STUB1</i>	NM_000351.4	c.1717G>A (p.Asp573Asn)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	7945
	NM_005861.4	c.44C>T (p.Ala15Val)	Missense	0.000078	0.002	VUS (PM2, PP2, BP4)	6040
	NM_013251.3	c.153C>G (p.Phe51Leu)	Missense	0.000004	0.002	VUS (PM2, BP4)	8130
<i>TACR3</i>	NM_001059.2	c.496A>C (p.Ile166Leu)	Missense	0.000007	0.002	VUS (PM2)	5160
	NM_001059.2	c.745A>G (p.Ile249Val)	Missense	0.000142	0.002	VUS (PM2, BP4)	8105
<i>TBCE</i>	NM_001059.2	c.918G>A (p.Met306Ile)	Missense	0.000128	0.002	VUS (PM2, BP4)	7682
	NM_001059.2	c.1345G>A (p.Ala449Thr)	Missense	0.005288	0.006	B (BA1, BS2, BP4, BP6)	7885, 8005, 8180
	NM_003193.3	c.146A>C (p.His49Pro)	Missense	0.000032	0.002	VUS (PM2, PP3)	7870
	NM_003193.3	c.214C>T (p.Pro72Ser)	Missense	0.003571	0.004	B (BA1, BS1, BS2, BP6)	6907, 7826
	NM_003193.3	c.1465C>A (p.Leu489Ile)	Missense	0.000520	0.002	VUS (BP4)	8216
	NM_005996.3	c.1052G>T (p.Ser351Ile)	Missense	0.000023	0.002	VUS (PM2)	8181
<i>TBX3</i>	NM_005996.3	c.1242C>G (p.Asp414Glu)	Missense	0.000008	0.002	VUS (PM2)	7958
	NM_005996.3	c.1783T>G (p.Ser595Ala)	Missense	0.000664	0.002	B (BS1, BS2, BP6)	8051
	NM_207036.1	c.454C>T (p.Pro152Ser)	Missense	0.000329	0.002	VUS (BP4)	7743
<i>TCF12</i>	NM_207036.1	c.1409G>A (p.Ser470Asn)	Missense	0.000011	0.002	VUS (PM2, BP4)	7676
	NM_207036.1	c.1520T>G (p.Leu507Arg)	Missense	0.000999	0.002	B (BA1, BS2, BP6)	7729
<i>TFR2</i>	NM_003227.3	c.840C>G (p.Phe280Leu)	Missense	0.000397	0.002	VUS	8235
	NM_003227.3	c.1259G>A (p.Arg420His)	Missense	0.000170	0.002	VUS (PM2)	8218
<i>TLE4</i>	NM_001282748.2	c.440C>T (p.Pro147Leu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP2)	8024

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica controle portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
<i>TRAPPC9</i>	NM_001282748.2	c.494G>C (p.Ser165Thr)	Missense	0.002545	0.002	LB (PM2, BS2, PP2, BP4)	8234
	NM_031466.5	c.29C>G (p.Ala10Gly)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8105
	NM_031466.5	c.140G>A (p.Arg47Gln)	Missense	0.000315	0.004	VUS (PM2, BP4)	7821, 8178
	NM_031466.5	c.853C>T (p.Arg285Trp)	Missense	0.000453	0.002	VUS	8079
	NM_031466.5	c.2354T>G (p.Val785Gly)	Missense	0.000007	0.002	VUS (PM2, BP4)	8265
	NM_031466.5	c.2632C>G (p.Leu878Val)	Missense	0.000012	0.002	VUS (PM2)	8164
	NM_031466.5	c.2671A>C (p.Thr891Pro)	Missense	0.000191	0.002	VUS (BS1)	7736
	NM_031466.5	c.3149G>A (p.Arg1050Gln)	Missense	0.000890	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	7863
	NM_012210.3	c.558G>C (p.Gln186His)	Missense	0.001857	0.002	LB (BS1, BS2, BP6)	7329
	<i>TTC8</i>	NM_198309.3	c.1219C>T (p.His407Tyr)	Missense	-	0.004	VUS (PM2)
<i>TYRO3</i>	NM_006293.3	c.1790C>G (p.Pro597Arg)	Missense	0.000092	0.002	VUS	7945
	NM_006293.3	c.2264C>T (p.Pro755Leu)	Missense	0.000057	0.002	VUS (PM2)	7745
<i>WDPCP</i>	NM_015910.7	c.160G>A (p.Asp54Asn)	Missense	0.000129	0.002	VUS (PM2, PP3, PP5)	8057
	NM_015910.7	c.691A>G (p.Ile231Val)	Missense	0.000056	0.004	LB (PM2, BP4, BP6)	5477, 7656
	NM_015910.7	c.1079C>T (p.Ser360Leu)	Missense	0.000171	0.002	VUS (BS1)	8005
	NM_015910.7	c.1263A>C (p.Leu421Phe)	Missense	0.000504	0.002	LB (BS1, BP4, BP6)	8206
	NM_015910.7	c.1429A>G (p.Lys477Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2)	8047

Gene	Reference sequence	Variante	Efeito	Frequência alélica gnomAD	Frequência alélica população portuguesa	Classificação ACMG	ID controles
WDR11	NM_015910.7	c.1606C>G (p.Leu536Val)	Missense	0.000008	0.004	VUS (PM2)	7630, 7839
	NM_015910.7	c.1799delG (p.Arg600Leufs*12)	Frameshift	0.000012	0.002	P (PVS1, PM2, PP5)	7923
	NM_018117.11	c.1449G>C (p.Met483Ile)	Missense	0.000305	0.002	VUS	7764
	NM_018117.11	c.2305A>G (p.Met769Val)	Missense	0.000562	0.008	VUS (BS1)	5555, 7887, 7934, 8018
	NM_018117.11	c.2584C>G (p.Gln862Glu)	Missense	-	0.002	VUS (PM2, PP3)	7637
	NM_018117.11	c.3571G>A (p.Gly1191Ser)	Missense	0.000141	0.008	VUS (PM2, PP3)	5147, 6559, 7840, 7943
WDR4	NM_033661.4	c.586G>A (p.Val196Met)	Missense	0.000641	0.002	LB (BS2, BP4)	7663
	NM_033661.4	c.1036A>G (p.Met346Val)	Missense	0.000435	0.002	LB (BS1, BP6)	7885
	NM_033661.4	c.1148T>C (p.Leu383Pro)	Missense	0.000024	0.002	VUS (PM2)	7895
	NM_033661.4	c.1150G>A (p.Glu384Lys)	Missense	0.000024	0.002	VUS (PM2, BP4)	7895

Abreviaturas: ID, identificação; gnomAD, Genome Aggregation Database; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics. As variantes foram classificadas como Benignas (B), Provavelmente benignas (LB), Variantes de significado indeterminado (VUS), Provavelmente patogénicas (LP) ou Patogénicas (P) de acordo com a evidência de patogenicidade (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (PP1-5)) ou *benign impact* (*stand-alone* (BA), *strong* (BS1-4), ou *supporting* (BP1-7)).



ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
5471	M	NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.377C>A (p.Pro126Gln)	Het	0.000046	VUS (PM2)
5473	M	NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.2210_2211delTT (p.Phe737*)	Het	0.000736	VUS (PM2, BP6)
5477	F	NM_000264.3( <i>PITCH1</i> ):c.1628G>A (p.Arg543His)	Het	0.000016	VUS (PM2, PP2, PP3, BP6)
5480	M	NM_175737.3( <i>KLJB</i> ):c.2329_2331delTTC (p.Phe777del)	Het	0.002451	VUS (PM2, BS2, PM4)
5485	F	Nenhuma	Het	0.000053	VUS (PM2, BP4)
5491	M	NM_003612.3( <i>SEMA7A</i> ):c.379G>A (p.Glu127Lys)	Het	0.000028	VUS (PM2, BP4)
5496	M	NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.1420A>G (p.Met474Val)	Het	0.000064	VUS (PM2)
5497	M	NM_018848.3( <i>MKKS</i> ):c.1318C>G (p.Gln440Gln)	Het	0.000080	VUS (PM2, PP2, BP4)
5540	F	Nenhuma	Het	0.000005	VUS (PM2, BP4)
5544	F	NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.1850G>A (p.Arg617Gln)	Het	0.000071	VUS (PM2, BP4)
5546	M	NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.16C>G (p.Leu6Val)	Het	0.000161	VUS (PM2, PP3)
5547	M	NM_207359.3( <i>GADL1</i> ):c.8G>A (p.Ser3Asn)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
5554	F	NM_002256.3( <i>KISS1</i> ):c.244C>A (p.Gln82Lys)	Het	0.000199	VUS (PM2)
5555	M	NM_000439.4( <i>PCSK1</i> ):c.680T>C (p.Val227Ala)	Het	0.00006	VUS (PM2)
5557	M	NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.2050C>T (p.Arg684Trp)	Het	0.00004	VUS (PP2, PM2)
5559	F	NM_004439.5( <i>EPHA5</i> ):c.1480C>T (p.Arg494Cys)	Het	0.000028	VUS (PM2)
		NM_000601.4( <i>HGF</i> ):c.1787C>T (p.Thr596Met)	Het	0.000008	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.6770C>T (p.Ser2257Leu)	Het	0.000040	VUS (BS1)
		NM_017563.4( <i>IL17RD</i> ):c.665C>T (p.Pro222Leu)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
		NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.323G>T (p.Arg108Leu)	Het	0.000199	VUS (PM2)
		NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.689C>T (p.Alaz30Val)	Het	0.000562	VUS (PM2, BP4)
		NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.2305A>G (p.Met769Val)	Het	0.000199	VUS (PM2)
		NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.635A>G (p.Lys212Arg)	Het	0.000694	VUS (PM2, PM5, PP3)
		NM_004439.5( <i>EPHA5</i> ):c.1480C>T (p.Arg494Cys)	Het	0.000032	VUS (PM2, PP3)
		NM_004807.2( <i>HS6ST1</i> ):c.917G>A (p.Arg306Gln)	Het	0.000014	VUS (PM2, BP4)
		NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.5278G>A (p.Gly1760Arg)	Het		
		NM_207111.4( <i>RNF216</i> ):c.1865C>T (p.Thr622Met)	Het		

ID Controle	Sexo	Variante	Zígotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
5570	M	Nenhuma			
5575	F	NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.3941C>T (p.Thr1314Met)	Het	0.000138	VUS (PM2, BP4)
5579	M	NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.1009G>A (p.Glu337Lys)	Het	0.000134	VUS (PM2, BP4)
		NM_005912.2( <i>MC4R</i> ):c.94G>A (p.Gly32Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_017514.4( <i>PLXNA3</i> ):c.85A>G (p.Thr29Ala)	Hemi	0.000006	VUS (PM2, BP4)
		NM_198309.3( <i>TTC8</i> ):c.1219C>T (p.His407Tyr)	Het	-	VUS (PM2)
5725	M	NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.1505G>T (p.Arg502Leu)	Het	0.000034	VUS (PM2)
5793	M	NM_033343.3( <i>LHX4</i> ):c.256G>A (p.Gly86Ser)	Het	0.000021	VUS (PM2, PF3)
		NM_018082.5( <i>POLR3B</i> ):c.1244T>C (p.Met415Thr)	Het	0.000566	LP (PS4, PP2, PP3, BS1)
6036	F	NM_002309.3( <i>LIF</i> ):c.481G>A (p.Val161Met)	Het	0.000014	VUS (PM2)
6040	F	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.2690G>A (p.Arg897His)	Het	0.000975	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_017514.4( <i>PLXNA3</i> ):c.4861G>A (p.Asp1621Asn)	Het	0.000016	VUS (PM2, BS2)
		NM_005861.4( <i>STUB1</i> ):c.44C>T (p.Alai5Val)	Het	0.000078	VUS (PM2, PP2, BP4)
6045	F	NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.191G>A (p.Arg64Gln)	Het	0.000036	VUS (PM2, PP2)
		NM_015100.4( <i>POGZ</i> ):c.3979A>G (p.Ser1327Gly)	Het	0.000018	VUS (PM2, PP2, BP6)
6048	M	NM_000168.5( <i>GLI3</i> ):c.2395C>A (p.Pro799Thr)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
6051	M	NM_174975.5( <i>SEC14L3</i> ):c.1120G>A (p.Ala374Thr)	Het	0.000272	VUS (PM2, BP4)
		NM_018344.5( <i>SLC29A3</i> ):c.1285C>A (p.Leu429Ile)	Het	0.000011	VUS (PM2)
6052	M	NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.4972G>C (p.Glu1658Gln)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.5533G>A (p.Gly1845Arg)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2, PP3)
		NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.5822T>C (p.Val1941Ala)	Het	0.000358	VUS (PP2, BP4)
		NM_006378.3( <i>SEMA4D</i> ):c.1528G>A (p.Glu510Lys)	Het	0.000004	VUS (PM2, BP4)
		NM_198309.3( <i>TTC8</i> ):c.1219C>T (p.His407Tyr)	Het	-	VUS (PM2)
6055	M	NM_000163.4( <i>GHR</i> ):c.1156C>T (p.Arg386Cys)	Het	0.000336	VUS

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
6056	F	NM_014564.4(LHX3):c.748G>A (p.Val250Ile)	Het	-	VUS (PM2)
6058	M	NM_001037293.3(PALM2):c.464C>G (p.Ser155Cys)	Het	0.000004	VUS (PM2)
6077	F	NM_000163.4(GHR):c.1156C>T (p.Arg386Cys)	Het	0.000336	VUS (BS4)
		Nenhuma			
		NM_004491.5(ARHGAP35):c.1190T>A (p.Met397Lys)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_015681.3(B9D1):c.278A>G (p.Asp93Gly)	Het	-	VUS (PM2, PP3)
		NM_002303.5(LEPR):c.1246C>T (p.His416Tyr)	Het	0.000295	VUS
		NM_000620.4(NOS1):c.142C>T (p.Arg48Cys)	Het	0.000064	VUS (PM2, PP2)
		NM_000620.4(NOS1):c.234C>G (p.Asp78Glu)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)
6086	F	NM_004958.3(MTOR):c.4885A>C (p.Ile1629Leu)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)
		NM_183059.2(RD3):c.202C>T (p.Arg68Trp)	Het	0.000265	VUS (BP4)
6091	F	Nenhuma			
6119	F	Nenhuma			
6392	M	NM_006080.2(SEMA3A):c.271A>G (p.Ile91Val)	Het	0.000020	VUS (PM2)
		NM_018344.5(SLC29A3):c.40A>G (p.Asn14Asp)	Het	0.000036	VUS (PM2, BP4)
6472	F	Nenhuma			
6545	F	NM_015295.2(SMCHD1):c.23G>A (p.Gly8Glu)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)
6559	F	NM_000921.4(PDE3A):c.1219T>G (p.Cys407Gly)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_018117.11(WDR11):c.3571G>A (p.Gly1191Ser)	Het	0.000141	VUS (PM2, PP3)
6667	F	NM_001143821.3(PLEKHA5):c.2200G>C (p.Glu734Gln)	Het	0.000217	VUS (PM2)
		NM_007055.3(POLR3A):c.3388G>C (p.Val130Leu)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
6905	M	NM_002673.4(PLXNB1):c.655G>A (p.Val219Met)	Het	0.001526	VUS (PM2, BS2, PP2)
6906	F	NM_000168.5(GLI3):c.2887G>A (p.Ala963Thr)	Het	0.000024	VUS (PM2, BP4)
		NM_007252.4(POU6F2):c.552_553insAG (p.Gln185Serfs*118)	Het	0.000703	LP (PVS1, PM2)
6907	M	NM_006702.4(PNPLA6):c.3632G>A (p.Arg1211His)	Het	0.000016	VUS (PM2, PP2)
6908	M	NM_001080414.4(CCDC88C):c.3596A>G (p.His1199Arg)	Het	0.000095	VUS (PM2)
		NM_001946.2(DUSP6):c.11C>G (p.Thr4Arg)	Het	0.000022	VUS (PM2, BP4)

ID Controle	Sexo	Variante	Zígotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7029	F	NM_024574.3( <i>NDNF</i> ):c.239C>T (p.Thr80Met)	Het	0.001357	VUS
7111	M	NM_016952.4( <i>CDON</i> ):c.2177G>T (p.Arg726Leu)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_006614.2( <i>CHLI</i> ):c.2488G>A (p.Val830Met)	Het	0.000024	VUS (PM2, BP4)
		NM_006702.4( <i>PNPLA6</i> ):c.3067C>T (p.His1023Tyr)	Het	0.000081	VUS (PM2, PP2)
7116	F	NM_000264.3( <i>PTCHI</i> ):c.2689A>G (p.Ile897Val)	Het	0.000025	VUS (PP2, PM2, BP6)
		NM_024685.4( <i>BBS10</i> ):c.765G>A (p.Met255Ile)	Het	0.000595	VUS (PM1, PP2, PM2, BP6)
		NM_015662.2( <i>IFT172</i> ):c.1513C>T (p.Arg505Trp)	Het	0.000074	VUS (BS2)
7329	M	NM_014564.4( <i>LHX3</i> ):c.949G>A (p.Gly317Ser)	Het	0.000014	VUS (PM2, BP4)
7630	M	NM_004958.3( <i>MTOR</i> ):c.1688A>G (p.His563Arg)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)
7631	F	NM_015910.7( <i>WDPCP</i> ):c.1606C>G (p.Leu536Val)	Het	0.000008	VUS (PM2)
		NM_020116.5( <i>FSTL5</i> ):c.1358T>C (p.Met453Thr)	Het	0.001177	VUS (PM2)
7632	F	NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.3724A>G (p.Ile1242Val)	Het	0.000025	VUS (PM2, PP2, BP4)
7633	F	NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.8C>T (p.Thr3Met)	Het	0.000032	VUS (PM2, BP4)
7634	M	NM_213653.3( <i>HJV</i> ):c.46A>C (p.Ser16Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.790G>C (p.Gly264Arg)	Het	0.000129	VUS (PP3, BS1)
		NM_174975.5( <i>SEC14L3</i> ):c.81delT (p.Pro28Leufs*52)	Het	0.000219	VUS (PM2)
7635	M	NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.1668G>C (p.Glu556Asp)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_000620.4( <i>NOSt</i> ):c.1517T>C (p.Phe506Ser)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.688G>T (p.Val230Phe)	Het	0.000040	VUS (PM2, PP2)
7636	F	NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.592G>A (p.Gly198Arg)	Het	0.000050	VUS (PM2)
7637	F	NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.790G>C (p.Gly264Arg)	Het	0.000129	VUS (PP3, BS1)
		NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.2209_2211delCCT (p.Pro737del)	Het	0.000086	VUS (PM4, BP6)
		NM_019066.5( <i>MAGEL2</i> ):c.263C>T (p.Pro88Leu)	Het	0.000202	VUS (PM2, BP6)
		NM_000439.4( <i>PCSK1</i> ):c.170T>C (p.Leu57Pro)	Het	-	VUS (PM2)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7641	F	NM_006378.3( <i>SEMA4D</i> ):c.1957G>A (p.Val653Ile) NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.2584C>G (p.Gln862Glu) NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.378G>T (p.Gln126His) NM_007055.3( <i>POLR3A</i> ):c.3840G>A (p.Met128Ile) NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.5467G>A (p.Alai823Thr) Nenhuma	Het Het Het Het Homo	0.000028 - - 0.000014 -	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP3) VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, PP2)
7642	M	Nenhuma			
7644	M	NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.1232G>A (p.Cys411Tyr) NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.101T>C (p.Met34Thr)	Het Het	- 0.008996	VUS (PM2) LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)
7648	M	NM_213653.3( <i>HJV</i> ):c.1246T>C (p.Ser416Pro) NM_030964.5( <i>SPRY4</i> ):c.722C>A (p.Ser241Tyr)	Het Het	0.000057 0.004530	VUS (PP2) VUS (PM2, BP6)
7656	M	NM_006261.4( <i>PROPT</i> ):c.301_302delAG (p.Leu102Cysfs*8) NM_016952.4( <i>CDON</i> ):c.2383G>A (p.Val795Ile) NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.663G>C (p.Lys221Asn) NM_014564.4( <i>LHX3</i> ):c.400G>A (p.Asp134Asn) Nenhuma	Het Het Het Het	0.000181 0.000074 0.000043 0.000050	P (PVS1, PS3, PM2, PM3, PP1) VUS (PM2, BP6) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, PP3)
7663	M		Het		
7667	F	Nenhuma			
7674	F	NM_001030055.2( <i>ARHGAP5</i> ):c.3290C>A (p.Thr1097Lys) NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.6644C>T (p.Ser2215Leu) NM_006702.4( <i>PNPLA6</i> ):c.3598C>G (p.Gln1200Glu) NM_005215.3( <i>DCC</i> ):c.4027C>T (p.Arg1343Cys) NM_017563.4( <i>IL17RD</i> ):c.1900C>T (p.Arg634Trp) NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.655G>A (p.Val219Met) NM_001080414.4( <i>CCDC88C</i> ):c.1885C>T (p.Arg629Trp)	Het Het Het Het Het Het Het	0.000096 - 0.000166 0.000141 0.000012 0.001526 0.000075	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, PP2, PP3) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BS2, PP2) VUS (PM2)
7675	M	NM_021620.4( <i>PRDM13</i> ):c.934T>C (p.Tyr312His) NM_207036.1( <i>TCF12</i> ):c.1409G>A (p.Ser470Asn) NM_015681.3( <i>B9D1</i> ):c.380C>T (p.Thr127Met) NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.4670C>T (p.Ser1557Leu)	Het Het Het Het	0.000261 0.000011 0.000028 0.000016	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2) VUS (PM2, PP2)
7676	M		Het		
7678	F		Het		
7680	F		Het		





ID Controle	Sexo	Variante	Zígotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7769	M	NM_173648.4(CCDC141):c.1394G>C (p.Gly465Ala) NM_173648.4(CCDC141):c.1396delT (p.Tyr466Thrfs*33)	Het	0.000188	VUS (PM2, BP4)
7770	M	NM_012414.3(RAB3GAP2):c.1580C>T (p.Pro527Leu) NM_173648.4(CCDC141):c.4565C>T (p.Ser1522Phe) NM_018082.5(POLR3B):c.1502A>G (p.His501Arg)	Het Het Het	0.000188 0.000308 0.000029	VUS (PM2, BS1) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2, PP3)
7778	M	NM_001080414.4(CCDC88C):c.3628G>A (p.Gly1210Arg) NM_015537.4(NSMF):c.1019G>C (p.Gly340Ala)	Het Het	0.000049 0.000011	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BP4)
7789	M	NM_004787.3(SLIT2):c.287G>A (p.Arg96Lys) NM_017617.4(NOTCH1):c.7397C>G (p.Thr2466Arg)	Het Het	0.000020 -	VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, PP2)
7791	M	NM_000730.3(CCKAR):c.329G>A (p.Gly110Glu) NM_000168.5(GLI3):c.245G>A (p.Arg82Lys)	Het Het	0.000011 0.000014	VUS (PM2, PP3) VUS (PM2, BP6)
7792	M	NM_004822.2(NTN1):c.1466A>G (p.Lys489Arg) NM_177976.1(ARL6):c.538C>T (p.Gln180*) NM_002673.4(PLXNB1):c.2653C>A (p.Leu85Ile)	Het Het Het	0.000145 0.000008 0.000004	VUS (PM2) VUS (PM2, PVS1) VUS (PM2, PP2, BP4)
7793	F	NM_005045.3(RELN):c.7C>G (p.Arg3Gly) NM_201266.1(NRIP2):c.1198G>A (p.Ala400Thr)	Het Het	- 0.000088	VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2)
7804	M	NM_015537.4(NSMF):c.1453G>A (p.Val485Ile) NM_000921.4(PDE3A):c.761A>G (p.Tyr254Cys)	Het Het	0.000039 0.000591	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2)
7805	F	NM_000620.4(NOS1):c.3092A>T (p.Gln1031Leu) NM_213653.3(HJV):c.1003C>T (p.Arg335Trp)	Het Het	0.000004 0.000011	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, PP2)
7806	M	NM_015662.2(JFT172):c.4147G>A (p.Glu1383Lys) NM_019066.5(MAGEL2):c.2028G>T (p.Glu676Asp) NM_024574.3(NDNF):c.239C>T (p.Thr80Met) NM_012414.3(RAB3GAP2):c.3355G>A (p.Glu119Lys)	Het Het Het Het	0.000213 0.000016 0.001357 -	VUS VUS (PM2) VUS VUS (PM2, BP4)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7807	F	Nenhuma			
7813	F	NM_005215.3(DCC):c.3404C>T (p.Thr1135Ile)	Het	0.000012	VUS (PM2, BP4)
7814	F	NM_032844.5(MASTL):c.1012A>G (p.Met338Val)	Het	0.000007	VUS (PM2, BP4)
7820	F	NM_001024613.3(FEZF1):c.727T>C (p.Phe243Leu)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_178822.4(IGSF10):c.620A>G (p.Tyr207Cys)	Het	0.000110	VUS (PM2)
		NM_001080414.4(CCDC88C):c.5332T>C (p.Ser1778Pro)	Het	0.000012	VUS (PM2, BP4)
		NM_001127500.1(MET):c.305G>A (p.Ser102Asn)	Het	0.000008	VUS (PM2, BP4)
		NM_001266.1(NR1P2):c.292G>T (p.Ala98Ser)	Het	0.000012	VUS (PM2)
		NM_032242.3(PLXNA1):c.2908C>T (p.Arg970Cys)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2)
		NM_017514.4(PLXNA3):c.1249G>A (p.Val417Met)	Het	0.000162	VUS (PM2, BS2)
		NM_002673.4(PLXNB1):c.2986C>T (p.Arg996Cys)	Het	0.000141	VUS (PM2, PP2, BP4)
7821	M	NM_033163.3(FGF8):c.652C>A (p.Leu218Met)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_020116.5(FSTL5):c.871A>T (p.Asn291Tyr)	Het	0.002126	VUS (PM2, BS2)
		NM_178822.4(IGSF10):c.823G>A (p.Ala275Thr)	Het	0.000131	VUS (PM2, BP4)
		NM_017563.4(IL17RD):c.1900C>T (p.Arg634Trp)	Het	0.000012	VUS (PM2, BP4)
		NM_001102653.1(OTUD4):c.1042C>T (p.Arg348Trp)	Het	0.000036	VUS (PM2)
		NM_031466.5(TRAPPC9):c.140G>A (p.Arg47Gln)	Het	0.000315	VUS (PM2, BP4)
7826	M	Nenhuma			
7827	M	NM_004004.6(GJB2):c.101T>C (p.Met34Thr)	Het	0.008996	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)
7828	M	NM_178822.4(IGSF10):c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Het	0.000233	VUS (PM2, BP4)
7833	M	NM_015662.2(JFT172):c.4363C>T (p.Arg1455Trp)	Het	0.000322	VUS
7835	F	NM_023110.2(FGFR1):c.2464C>T (p.Arg822Cys)	Het	0.000256	VUS (PP2, BP6)
		NM_015662.2(JFT172):c.1426G>A (p.Gly476Ser)	Het	0.000209	VUS (PM2)
		NM_017563.4(IL17RD):c.359C>T (p.Ser120Leu)	Het	0.000021	VUS (PM2)
		NM_004787.3(SLIT2):c.4400G>T (p.Gly1467Val)	Het	0.000266	VUS (PM2, PP2)
7836	F	NM_033163.3(FGF8):c.693C>A (p.Ser231Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)

ID Controle	Sexo	Variante	Zígotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7837	M	NM_000510.2( <i>FSHB</i> ):c.327C>A (p.Ser109Arg)	Het	0.000769	VUS (PM2, BS2)
7839	M	NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.2450A>G (p.Asp817Gly)	Het	0.000111	VUS (PM2, PP2, BP4)
	M	NM_019066.5( <i>MAGEL2</i> ):c.1720C>G (p.Leu574Val)	Het	0.000091	VUS (BP6)
		NM_021913.3( <i>AXL</i> ):c.2399G>A (p.Arg800Gln)	Het	0.000085	VUS (PM2)
		NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.1114C>T (p.Arg372Cys)	Het	0.000008	VUS (PM2, PP2)
7840	M	NM_015910.7( <i>WDPCP</i> ):c.1606C>G (p.Leu536Val)	Het	0.000008	VUS (PM2)
		NM_000388.3( <i>CASR</i> ):c.2563A>C (p.Asn855His)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
7844	M	NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.3571G>A (p.Gly1191Ser)	Het	0.000141	VUS (PM2, PP3)
7845	F	NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.3181A>G (p.Ile1061Val)	Het	0.000078	VUS (PM2, BP4)
		NM_000406.2( <i>GNRHR</i> ):c.317A>G (p.Gln106Arg)	Het	0.002749	P (PM1, PP2, PM2, PP5)
		NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.2210_2211delTT (p.Phe737*)	Het	0.000736	VUS (PM2, BP6)
7850	M	NM_005235.2( <i>ERBB4</i> ):c.890T>G (p.Phe297Cys)	Het	-	VUS (PM2, PP3)
		NM_000921.4( <i>PDE3A</i> ):c.3284G>A (p.Arg1095Gln)	Het	0.000262	VUS (PM2, BP4)
		NM_001143821.3( <i>PLEKHA5</i> ):c.3389A>C (p.Glu1130Ala)	Het	0.000298	VUS (PM2)
7851	F	NM_000216.4( <i>ANOS1</i> ):c.383T>C (p.Leu128Ser)	Het	0.000024	VUS (PM2, BP4)
7852	M	NM_032551.4( <i>KISS1R</i> ):c.872C>T (p.Ala291Val)	Het	0.000013	VUS (PM2, BP4)
		NM_003873.7( <i>NRP1</i> ):c.1531T>C (p.Phe511Leu)	Het	0.000025	VUS (PM2, PP3, BS2)
		NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.2782A>G (p.Ile928Val)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2, BP4)
7853	F	NM_001080414.4( <i>CCDC88C</i> ):c.6053C>T (p.Pro2018Leu)	Het	0.000045	VUS (PM2, BP4)
		NM_000214.2( <i>JAG1</i> ):c.5G>T (p.Arg2Leu)	Het	0.000045	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.1009G>A (p.Glu337Lys)	Het	0.000134	VUS (PM2, BP4)
7860	M	NM_019066.5( <i>MAGEL2</i> ):c.2343G>T (p.Glu781Asp)	Het	0.000008	VUS (PM2)
		NM_012431.2( <i>SEMA4E</i> ):c.1296C>A (p.Asn432Lys)	Het	0.000004	VUS (PM2, BP4)
7861	M	NM_000163.4( <i>GHR</i> ):c.1463C>T (p.Ala488Val)	Het	0.000103	VUS (PM2)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7862	F	NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.2030C>T (p.Thr677Met) NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.101T>C (p.Met34Thr)	Het Het	0.00004 0.008996	VUS (PM2, PP3) LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3, PP5)
7863	F	NM_021252.3( <i>RAB18</i> ):c.394G>T (p.Asp132Tyr) NM_004491.5( <i>ARHGAP35</i> ):c.2885G>C (p.Ser962Thr)	Het Het	0.000085 0.000759	VUS (PM2, PP3) VUS (PM2, PP2, BP4)
7868	F	NM_000168.5( <i>GLI3</i> ):c.538C>T (p.Arg180Trp)	Het	0.000008	VUS (PM2, PM5)
7870	M	NM_022659.4( <i>EBF2</i> ):c.1537_1539delTCA (p.Ser513del) NM_000388.3( <i>CASR</i> ):c.2265G>T (p.Glu755Asp) NM_004075.5( <i>CRY1</i> ):c.1718C>T (p.Thr573Ile)	Het Het Het	0.001882 0.000025 0.000004	VUS (PM2, BS2, PM4) VUS (PM1, PM2, PP2, BP6) VUS (PM2, BP4)
7873	F	NM_001143821.3( <i>PLEKHA5</i> ):c.890G>C (p.Arg297Thr) NM_001145358.2( <i>SIN3A</i> ):c.17A>G (p.Asp66Gly) NM_003193.3( <i>TBCE</i> ):c.146A>C (p.His49Pro)	Het Het Het	- - 0.000032	VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, PP3)
7878	M	NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.3014-2A>G NM_023110.2( <i>FGRF1</i> ):c.1368G>T (p.Met456Ile) NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.1412G>A (p.Arg471His)	Het Het Het	- 0.000409 0.000174	VUS (PVS1, PM2) VUS (PP2, PP3, BP6) VUS (PM2, PP3)
7879	M	NM_006702.4( <i>PNPLA6</i> ):c.3577C>G (p.Gln1193Glu) NM_018077.2( <i>RBM28</i> ):c.1433A>G (p.Lys478Arg) NM_001273.3( <i>CHD4</i> ):c.1064G>A (p.Gly355Asp)	Het Het Het	0.000149 - 0.000315	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2, PP3, BP6)
7880	F	NM_001382323.2( <i>PKNOX2</i> ):c.1141G>A (p.Ala381Thr) NM_001143821.3( <i>PLEKHA5</i> ):c.2339A>G (p.Tyr780Cys)	Het Het	0.000046 -	VUS (PM2) VUS (PM2)
7883	F	NM_003612.3( <i>SEMA7A</i> ):c.1996C>T (p.His666Tyr) NM_152384.2( <i>BBS5</i> ):c.751A>G (p.Asn251Asp)	Het Het	- 0.001036	VUS (PM2, BP4) VUS (BS1)
7884	F	NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.5508C>A (p.Asp1836Glu) NM_005215.3( <i>DCC</i> ):c.1904A>G (p.Asn635Ser)	Het Het	- 0.000134	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, BP4)
7885	F	NM_000264.3( <i>PTCH1</i> ):c.2015C>T (p.Thr672Met) NM_001035235.2( <i>SRA1</i> ):c.184C>A (p.Pro62Thr)	Het Het	0.00002 0.000004	VUS (PM2, PP2, PP3, BP6) VUS (PM2, BP4)
7887	F	NM_178822.4( <i>IGSF10</i> ):c.7334_7336dupTCA (p.Ile2445dup)	Het	0.000173	VUS (PM2, PM4)



ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7914	M	Nenhuma			
7916	M	NM_000115.4( <i>EDNRRB</i> ):c.167A>C (p.Lys56Thr)	Het	0.000029	VUS (PM2)
7920	M	NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.3721A>C (p.Met1241Leu) NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.1303C>T (p.Arg435Cys) NM_001080414.4( <i>CCDC88C</i> ):c.41A>G (p.Gln14Arg)	Het Het Het	0.000111 - -	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2) VUS (PM2, BP4)
7923	F	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.3679G>A (p.Glu1227Lys) NM_002256.3( <i>KIF5B</i> ):c.154_156dupCCG (p.Pro52dup) NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.655G>A (p.Val219Met)	Het Het Het	0.000017 0.000030 0.001526	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, PM4) VUS (PM2, BS2, PP2)
7924	F	NM_015910.7( <i>WDPCP</i> ):c.1799delG (p.Arg600Leufs*12) NM_005634.2( <i>SOX3</i> ):c.1059_1076delCACCGCGGGCCGCAGC (p.Thr354_Ala359del)	Het Het	0.000012 -	P (PVS1, PM2, PP5) VUS (PM2, BP3)
7929	M	NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.1056_1070delAATCCCATCAAAACAG (p.Phe353_Ser357del) NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.4987G>A (p.Ala1663Thr)	Het Het	- 0.000078	VUS (PM2, PM4) VUS (PM2, PP2)
7934	F	NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.3190G>A (p.Asp1064Asn) NM_021620.4( <i>PRDM13</i> ):c.1102C>G (p.Leu368Val) NM_000921.4( <i>PDE3A</i> ):c.1375C>T (p.Arg459Trp)	Het Het Het	0.000060 - 0.000011	VUS (PM2, PP2, BP6) VUS (PM2, BP4) VUS (PM1, PM2)
7935	M	NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.2305A>G (p.Met769Val) NM_001030055.2( <i>ARHGAP5</i> ):c.3508A>G (p.Arg1170Gly) NM_024574.3( <i>NDNF</i> ):c.653A>G (p.Glu218Gly)	Het Het Het	0.000562 0.000181 0.000320	VUS (BS1) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2)
7943	M	NM_003612.3( <i>SEMA7A</i> ):c.709G>A (p.Asp237Asn) NM_003612.3( <i>SEMA7A</i> ):c.1865G>A (p.Arg622His) NM_004491.5( <i>ARHGAP35</i> ):c.2230C>T (p.Arg744Cys) NM_173648.4( <i>CCDC141</i> ):c.3321delA (p.Leu1107Phefs*12)	Het Het Het Het	0.000230 0.000404 0.000036 0.000292	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2)
7945	F	NM_002633.2( <i>PGM1</i> ):c.107C>A (p.Ala36Glu) NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.3571G>A (p.Gly1191Ser) NM_024649.5( <i>BBS1</i> ):c.1318C>T (p.Arg440*) NM_005215.3( <i>DCC</i> ):c.744T>G (p.Asn248Lys)	Het Het Het Het	0.000105 0.000141 0.000008 0.000028	VUS VUS (PM2, PP3) P (PVS1, PM2, PM3) VUS (PM2)

ID Controle	Sexo	Variante	Zígotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7949	M	NM_004807.2( <i>HS6ST1</i> ):c.1124G>A (p.Arg375His) NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.3192A>T (p.Glu1064Asp) NM_000351.4( <i>STS</i> ):c.1717G>A (p.Asp573Asn) NM_006293.3( <i>TYRO3</i> ):c.1790C>G (p.Pro597Arg) NM_016952.4( <i>CDON</i> ):c.848C>T (p.Ala283Val) NM_000410.3( <i>HFE</i> ):c.18G>C (p.Arg6Ser) NM_004822.2( <i>NTN1</i> ):c.1289C>T (p.Thr430Met) NM_001273.3( <i>CHD4</i> ):c.3088A>G (p.Met1030Val) NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.1318C>T (p.Arg440Trp) NM_207359.3( <i>GADL1</i> ):c.1234G>T (p.Ala412Ser) NM_005599.3( <i>NHLH2</i> ):c.283T>A (p.Leu95Met) NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.397T>C (p.Trp133Arg) NM_005996.3( <i>TBX3</i> ):c.1242C>G (p.Asp414Glu) NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.2875C>G (p.His959Asp) NM_000439.4( <i>PCSK1</i> ):c.1460T>A (p.Ile487Asn) NM_203290.2( <i>POLR1C</i> ):c.34A>G (p.Ser12Gly) NM_017514.4( <i>PLXNA3</i> ):c.1204G>A (p.Glu402Lys) NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.1544C>T (p.Ser515Leu) NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.3911G>A (p.Arg1304His) NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.7634C>T (p.Ala2545Val) Nenhuma	Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Het Hemi Het Het Het	0.000212 - - 0.000092 0.000014 0.000684 0.000067 0.000099 0.000043 0.000004 - - 0.000008 - - 0.000020 0.000067 0.000171 0.000053 0.000216	VUS (PM2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2) VUS VUS (PM2, BP4) VUS VUS (PM2) VUS (PP2) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2) VUS (PM2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, BS2) VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PP2, BP6)
7952	F	NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.1318C>T (p.Arg440Trp)	Het	0.000043	VUS (PM2, PP2)
7956	F	NM_005599.3( <i>NHLH2</i> ):c.283T>A (p.Leu95Met)	Het	-	VUS (PM2)
7958	M	NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.397T>C (p.Trp133Arg)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
7959	M	NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.2875C>G (p.His959Asp)	Het	0.000008	VUS (PM2)
7960	M	NM_000439.4( <i>PCSK1</i> ):c.1460T>A (p.Ile487Asn)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
7964	M	NM_017514.4( <i>PLXNA3</i> ):c.1204G>A (p.Glu402Lys)	Het	0.000067	VUS (PM2, BS2)
7968	M	NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.1544C>T (p.Ser515Leu)	Het	0.000171	VUS (PM2, PP2, BP4)
7970	F	NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.7634C>T (p.Ala2545Val) NM_016952.4( <i>CDON</i> ):c.458G>A (p.Arg153His) NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.1235G>A (p.Arg412Gln) NM_004958.3( <i>MTOR</i> ):c.889G>A (p.Asp297Asn)	Het Het Het Het	0.000053 0.000024 0.000078	VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, PP2, BP6)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
7971	F	NM_001266.1( <i>NRP2</i> ):c.487C>T (p.Pro163Ser)	Het	0.000004	VUS (PM2)
7985	M	Nenhuma	Het	0.000064	VUS (PM2, BP4)
		NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.2648G>A (p.Arg883His)	Het	0.000020	VUS (PM2)
		NM_032844.5( <i>MASTL</i> ):c.2051C>T (p.Ser684Leu)	Het	0.000068	VUS
7986	M	NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.3271T>C (p.Ser1091Pro)	Het	0.000014	VUS (PM2)
7992	M	NM_000730.3( <i>CCKAR</i> ):c.590G>A (p.Arg197His)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
		NM_015662.2( <i>JFT172</i> ):c.2691G>T (p.Lys897Asn)	Het	0.000474	VUS (BS1)
		NM_002633.2( <i>PGM1</i> ):c.1103C>T (p.Ala368Val)	Het	0.000140	VUS (PP2, BP6)
		NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.5273G>A (p.Arg1758His)	Het	0.000233	VUS (PM2, BP4)
7993	F	NM_178822.4( <i>ISF10</i> ):c.4187C>T (p.Ser1396Phe)	Het	0.000233	VUS (PM2, PP2, PP3)
		NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.7498C>G (p.His2500Asp)	Het	0.000033	VUS (PM1, PM2, PP2, BP4)
7995	F	NM_004959.4( <i>NR5A1</i> ):c.754A>T (p.Thr252Ser)	Het	0.000012	VUS (PP2, BP6)
8002	M	NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.7634C>T (p.Ala2545Val)	Het	0.000216	VUS (PM2)
8003	M	NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.3629C>T (p.Ala1210Val)	Het	0.000304	VUS (PM2, PP2)
		NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.8428G>C (p.Val2810Leu)	Het	0.000157	VUS (PM2, BP4)
		NM_015537.4( <i>NSMF</i> ):c.241G>A (p.Gly81Ser)	Het	0.000032	VUS (PM2)
8005	F	NM_015662.2( <i>JFT172</i> ):c.649C>T (p.Arg217Trp)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.3629C>A (p.Ala1210Glu)	Het	0.000181	P (PVS1, PS3, PM2, PM3, PP1)
		NM_006261.4( <i>PROPL</i> ):c.301_302delAG (p.Leu102Cysfs*8)	Het	0.000047	VUS (PM2, BP4)
		NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.2300C>A (p.Ala767Asp)	Het	0.000171	VUS (BS1)
		NM_015910.7( <i>WDPCP</i> ):c.1079C>T (p.Ser360Leu)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
8014	F	NM_001024613.3( <i>FEZF1</i> ):c.752G>T (p.Gly251Val)	Het	0.000005	VUS (PM2)
8018	F	NM_000216.4( <i>ANOS1</i> ):c.727A>G (p.Thr243Ala)	Het	0.000016	VUS (PM2, PP2, BP6)
		NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.1554G>T (p.Gln518His)	Het	0.000124	VUS
		NM_005215.3( <i>DCC</i> ):c.527A>G (p.Asn176Ser)	Het	0.000354	VUS (PM2, PP5)
		NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.467G>T (p.Arg156Leu)	Het	0.000025	VUS (PM2, PP2, BP6)
		NM_000214.2( <i>JAG1</i> ):c.494G>A (p.Arg165Gln)	Het		

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
		NM_030964.5( <i>SPRY4</i> ):c.722C>A (p.Ser241Tyr)	Het	0.004530	VUS (PM2, BP6)
8021	M	NM_018117.11( <i>WDR11</i> ):c.2305A>G (p.Met769Val)	Het	0.000562	VUS (BS1)
8022	M	NM_031226.2( <i>CYP19A1</i> ):c.578G>A (p.Arg193His)	Het	0.000048	VUS (PM2, BP4)
		NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.1232G>A (p.Cys411Tyr)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.2307G>C (p.Gln769His)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_018848.3( <i>MKKS</i> ):c.1456T>C (p.Cys486Arg)	Het	-	VUS (PM2)
8023	M	NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.6499G>A (p.Gly2167Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP3)
		NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.452A>G (p.Asn151Ser)	Het	0.000017	VUS (PM2, PP2, PP3)
8024	F	NM_015295.2( <i>SMCHD1</i> ):c.5729A>G (p.Gln1910Arg)	Het	0.000004	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_001282748.2( <i>TLE4</i> ):c.440C>T (p.Pro147Leu)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_024649.5( <i>BBS1</i> ):c.158dupA (p.Leu54Alafs*45)	Het	0.000004	P (PVS1, PM2, PP5)
8025	F	NM_017563.4( <i>IL17RD</i> ):c.1646T>G (p.Met549Arg)	Het	0.000142	VUS (PM2)
		NM_174975.5( <i>SEC14L3</i> ):c.1120G>A (p.Ala374Thr)	Het	0.000272	VUS (PM2, BP4)
8026	M	NM_015681.3( <i>B9DI</i> ):c.376T>A (p.Ser126Thr)	Het	0.000272	VUS (PM2, BP6)
		NM_000163.4( <i>GHR</i> ):c.25A>G (p.Thr9Ala)	Het	0.000032	VUS (PM2)
		NM_015537.4( <i>NSMF</i> ):c.1330C>T (p.Arg444Cys)	Het	0.000008	VUS (PM2)
		NM_016937.3( <i>POLA1</i> ):c.1345A>G (p.Lys449Glu)	Hemi	-	VUS (PM2, BP4)
8030	F	NM_005235.2( <i>ERBB4</i> ):c.1395C>A (p.Asn465Lys)	Het	0.000085	VUS (PM2)
		NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.4057C>G (p.Gln1353Glu)	Het	0.000065	VUS (PM2)
		NM_175737.3( <i>KLB</i> ):c.2443A>G (p.Lys815Glu)	Het	0.000978	VUS (PM2, BP4)
8041	F	NM_007252.4( <i>POU6F2</i> ):c.1885A>C (p.Asn629His)	Het	0.000440	VUS (PM2, BS2, PP3)
8042	F	NM_024574.3( <i>NDNF</i> ):c.239C>T (p.Thr80Met)	Het	0.001357	VUS
8044	F	NM_001080414.4( <i>CCDC88C</i> ):c.1669A>G (p.Lys557Glu)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
		NM_001102653.1( <i>OTUD4</i> ):c.2755A>G (p.Thr919Ala)	Het	0.000004	VUS (PM2, BP4)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
8045	F	NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.802A>G (p.Thr268Ala) NM_207359.3( <i>GADL1</i> ):c.1114G>T (p.Asp372Tyr) NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.2461C>G (p.Arg821Gly)	Het Het Het	0.000231 0.001477 0.000013	VUS (PM2) VUS (BS2) VUS (PM2, BP4)
8047	F	NM_001170961.1( <i>JGSF1</i> ):c.2807C>T (p.Thr936Ile) NM_015295.2( <i>SMCHD1</i> ):c.424C>T (p.Pro142Ser) NM_015910.7( <i>WDPCP</i> ):c.1429A>G (p.Lys477Glu)	Het Het Het	0.000006 0.000011 -	VUS (PM2, BP4) VUS (PM1, PM2, PP2, PP3) VUS (PM2)
8051	M	NM_203290.2( <i>POLR1C</i> ):c.193A>G (p.Met65Val) NM_183059.2( <i>RD3</i> ):c.223C>T (p.Pro75Ser) NM_006080.2( <i>SEMA3A</i> ):c.196C>T (p.Arg66Trp)	Het Het Het	0.000916 0.000004 0.000513	VUS (PP2, PP5, BS1) VUS (PM2) VUS (PM2)
8054	F	NM_017780.3( <i>CHD7</i> ):c.7253G>A (p.Arg2418Gln) NM_003612.3( <i>SEMA7A</i> ):c.290T>A (p.Leu97His) NM_030964.5( <i>SPRY4</i> ):c.841G>A (p.Val281Met)	Het Het Het	0.000068 0.001274 0.000280	VUS (PM2, PM5, PP2, BP6) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2)
8057	F	NM_016952.4( <i>CDON</i> ):c.791C>A (p.Pro264Gln) NM_020116.5( <i>FSTL5</i> ):c.2029G>A (p.Val677Ile) NM_020999.4( <i>NEUROG3</i> ):c.17C>T (p.Ser6Leu) NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.1186C>T (p.Pro396Ser)	Het Het Het Het	0.000103 - - 0.001234	VUS (PM2, BP6) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2) VUS (PP2)
8072	M	NM_004787.3( <i>SLIT2</i> ):c.3095T>C (p.Leu1032Ser) NM_015910.7( <i>WDPCP</i> ):c.160G>A (p.Asp54Asn) NM_000730.3( <i>CCKAR</i> ):c.799G>A (p.Asp267Asn) NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.1276C>T (p.Arg426Cys) NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.2161T>G (p.Tyr721Asp)	Het Het Het Het Het	0.000129 0.000032 0.000020 - 0.000012	VUS (PM2, PP3, PP5) VUS (PM2) VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2, PP3)
8075	F	NM_018082.5( <i>POLR3B</i> ):c.1931C>T (p.Ala644Val) NM_015662.2( <i>JFT172</i> ):c.178A>G (p.Met60Val) NM_000894.2( <i>LHB</i> ):c.239G>A (p.Arg80His) NM_006378.3( <i>SEMA4D</i> ):c.2393G>A (p.Ser798Asn)	Het Het Het Het	0.000012 0.000012 0.000032 0.000941	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2, PP3) VUS (PM2, BP4)
8078	M	NM_023110.2( <i>FGFR1</i> ):c.584A>G (p.Lys195Arg)	Het	0.000016	VUS (PM2, PP2, BP4)
8079	F	NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.821G>A (p.Arg274His)	Het	0.000121	VUS (PM2, PP2)

ID Controle	Sexo	Variante	Zígotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
8092	F	NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.2021G>A (p.Arg674His) NM_031466.5( <i>TRAPPC9</i> ):c.853C>T (p.Arg285Trp) NM_000479.3( <i>AMH</i> ):c.553C>G (p.Gln185Glu)	Het Het Het	0.000068 0.000453 0.000353	VUS (PM2) VUS VUS (PM2, BP6)
8093	F	NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.1198G>A (p.Ala400Thr) NM_000168.5( <i>GLI3</i> ):c.314G>A (p.Arg105His) NM_015662.2( <i>IFT172</i> ):c.2026G>A (p.Gly676Arg)	Het Het Het	0.000088 0.000020 0.000024	VUS (PM2) VUS (PM2) VUS (PM2, BP4)
8094	F	NM_001037293.3( <i>PALM2</i> ):c.979G>A (p.Val327Met)	Het	0.000025	VUS (PM2)
8095	F	NM_024649.5( <i>BBS1</i> ):c.725T>C (p.Met242Thr) NM_006614.2( <i>CHL1</i> ):c.3437A>C (p.Asp1146Ala) NM_000168.5( <i>GLI3</i> ):c.557C>A (p.Ser186Tyr)	Het Het Het	0.000036 - -	VUS (PM2) VUS (PM2, PP3) VUS (PM2)
8097	F	NM_016937.3( <i>POLA1</i> ):c.823A>G (p.Lys275Glu) NM_007055.3( <i>POLR3A</i> ):c.1744C>T (p.Arg582Cys)	Het Het	- 0.000173	VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2)
8105	M	NM_002673.4( <i>PLXNB1</i> ):c.5707C>T (p.Leu1903Phe) NM_001059.2( <i>TACR3</i> ):c.745A>G (p.Ile249Val) NM_031466.5( <i>TRAPPC9</i> ):c.29C>G (p.Ala10Gly)	Het Het Het	0.000040 0.000142 -	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2)
8111	F	NM_005228.3( <i>EGFR</i> ):c.671G>A (p.Arg224His) NM_030964.5( <i>SPRY4</i> ):c.722C>A (p.Ser241Tyr)	Het Het	0.000032 0.004530	VUS (PM2) VUS (PM2, BP6)
8112	F	NM_001946.2( <i>DUSP6</i> ):c.1037C>T (p.Thr346Met) NM_000515.3( <i>GHI1</i> ):c.7A>C (p.Thr3Pro)	Het Het	0.000286 0.000238	VUS (PM2, BP6) VUS (PM2, BS2)
8115	F	NM_007055.3( <i>POLR3A</i> ):c.3301G>C (p.Val1101Leu)	Het	0.000032	VUS (PM2, PP2)
8118	F	NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.4379C>G (p.Thr1460Arg) NM_004822.2( <i>NTN1</i> ):c.116A>G (p.Asp39Gly)	Het Het	0.000014 0.000015	VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2)
8121	M	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.1832A>G (p.Glu611Gly) Nenhuma	Het	0.000012	VUS (PM2, PP2, BP4)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
8126	F	NM_005076.3( <i>CNTN2</i> ):c.3011G>A (p.Gly1004Glu) NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.1682C>T (p.Thr561Met) NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.5273G>A (p.Arg1758His)	Het Het Het	- 0.000102 0.000140	VUS (PM2, PP2, PP3) VUS (PM2, PP2, BP6) VUS (PP2, BP6)
8128	M	Nenhuma			
8130	F	NM_004004.6( <i>GJB2</i> ):c.88A>G (p.Ile30Val) NM_015537.4( <i>NSMF</i> ):c.241G>A (p.Gly81Ser)	Het Het	0.000044 0.000157	LP (PM1, PM2, PM5, PP2, PP3) VUS (PM2, BP4)
8131	F	NM_005045.3( <i>RELN</i> ):c.5822T>C (p.Val194Ala) NM_013251.3( <i>TAC3</i> ):c.153C>G (p.Phe51Leu) NM_005270.4( <i>GLI2</i> ):c.3281C>T (p.Ser1094Phe) NM_003873.7( <i>NRPI</i> ):c.1775C>T (p.Pro592Leu)	Het Het Het Het	0.000358 0.000004 - 0.000016	VUS (PP2, BP4) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP3)
8141	F	NM_017617.4( <i>NOTCH1</i> ):c.5273G>A (p.Arg1758His)	Het	0.000140	VUS (PP2, BP6)
8149	F	NM_207111.4( <i>RNF216</i> ):c.91C>G (p.Pro31Ala)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
8152	F	NM_015662.2( <i>IFT172</i> ):c.1056C>G (p.His352Gln)	Het	0.000042	VUS (PM2, BP4)
8163	M	Nenhuma			
8164	F	NM_031466.5( <i>TRAPP2</i> ):c.2632C>G (p.Leu878Val)	Het	0.000012	VUS (PM2)
8167	F	NM_020999.4( <i>NEUROG3</i> ):c.44G>A (p.Arg15His) NM_022370.3( <i>ROBO3</i> ):c.2899C>T (p.Pro967Ser)	Het Het	0.000036 0.000128	VUS (PM2, BP6) VUS (PM2)
8168	F	NM_213653.3( <i>HJV</i> ):c.143C>G (p.Ser48Trp)	Het	-	VUS (PM2, PP2, BP4)
8174	F	NM_004491.5( <i>ARHGAP35</i> ):c.3362A>G (p.Asn1121Ser) NM_000894.2( <i>LHB</i> ):c.239G>A (p.Arg80His) NM_017514.5( <i>PLXNA3</i> ):c.3034A>T (p.Ser1012Cys) NM_198391.2( <i>FLRT3</i> ):c.596C>G (p.Thr199Ser)	Het Het Het Het	0.000004 0.000032 0.000097 0.000014	VUS (PM2, PP2) VUS (PM2) VUS (PM2, BS2) VUS (PM2, BP4)
8177	M	NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.2261G>A (p.Arg754His) NM_174975.5( <i>SEC14L3</i> ):c.1120G>A (p.Ala374Thr) NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.4670C>T (p.Ser1557Leu)	Het Het Het	0.000046 0.000272 0.000016	VUS (PM2, PP2, BP4) VUS (PM2, BP4) VUS (PM2, PP2)
8178	F	NM_004822.2( <i>NTN1</i> ):c.1121A>G (p.Asn374Ser) NM_032242.3( <i>PLXNA1</i> ):c.649G>A (p.Gly217Ser)	Het Het	0.000021 0.000035	VUS (PM2) VUS (PM2, PP2, BP4)

ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
		NM_017514.5( <i>PLXNA3</i> ):c.1357A>T (p.Thr453Ser)	Het	-	VUS (PM2, BP4)
		NM_000264.3( <i>PTCH1</i> ):c.2689A>G (p.Ile897Val)	Het	0.000025	VUS (PP2, PM2, BP6)
8179	M	NM_031466.5( <i>TRAPPC9</i> ):c.140G>A (p.Arg47Gln)	Het	0.000315	VUS (PM2, BP4)
8180	F	NM_018082.5( <i>POLR3B</i> ):c.1931C>T (p.Ala644Val)	Het	0.000012	VUS (PM2, PP2, PP3)
8181	F	NM_173648.4( <i>CCDC141</i> ):c.665G>A (p.Arg222His)	Het	0.001087	VUS (PM2, BP4)
		NM_024685.4( <i>BBS10</i> ):c.137T>G (p.Leu46Arg)	Het	-	VUS (PM2, PP2, PP3)
		NM_207359.3( <i>GADL1</i> ):c.473C>T (p.Ala158Val)	Het	0.000053	VUS (PM2, BP4)
		NM_017563.4( <i>IL17RD</i> ):c.481G>A (p.Val161Ile)	Het	0.000021	VUS (PM2)
		NM_005996.3( <i>TBX3</i> ):c.1052G>T (p.Ser351Ile)	Het	0.000023	VUS (PM2)
8182	F	NM_001142699.1( <i>DILG2</i> ):c.1001A>G (p.Asp334Gly)	Het	0.000071	VUS (PM2)
		NM_014875.2( <i>KIF14</i> ):c.1009G>A (p.Glu337Lys)	Het	0.000134	VUS (PM2, BP4)
8184	F	NM_173648.4( <i>CCDC141</i> ):c.3091A>G (p.Thr1031Ala)	Het	0.000016	VUS (PM2)
		NM_001174116.3( <i>DMXL2</i> ):c.8065G>A (p.Asp2689Asn)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
8189	M	NM_005221.5( <i>DLX5</i> ):c.712C>A (p.His238Asn)	Het	0.000195	VUS (PM2)
		NM_000515.3( <i>GHI1</i> ):c.493T>C (p.Phe165Leu)	Het	0.000103	VUS
8195	F	NM_173648.4( <i>CCDC141</i> ):c.1600G>A (p.Val534Ile)	Het	0.000545	VUS (PM2, BP4)
		NM_000168.5( <i>GLI3</i> ):c.1354C>A (p.Gln452Lys)	Het	-	VUS (PM2, PP3)
		NM_178822.4( <i>JGSF10</i> ):c.5983G>A (p.Val1995Ile)	Het	0.000772	VUS (PM2, BS2)
		NM_201266.1( <i>NRP2</i> ):c.2552C>T (p.Ser851Leu)	Het	0.000056	VUS (PM2, BP4)
		NM_017514.5( <i>PLXNA3</i> ):c.3705C>G (p.Ile1235Met)	Het	-	VUS (PM2)
8198	M	NM_015662.2( <i>JFT172</i> ):c.704G>A (p.Ser235Asn)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_019066.5( <i>MAGEL2</i> ):c.1266_1286dupCATCCGCCCTGGCCACCACC (p.Pro429_Val430insIleArgProGlyProPro)	Het	0.000067	VUS (PM2, PM4)
8199	F	NM_018344.5( <i>SLC29A3</i> ):c.385G>A (p.Val129Ile) Nenhuma	Het	0.000068	VUS (PM2, BP4)

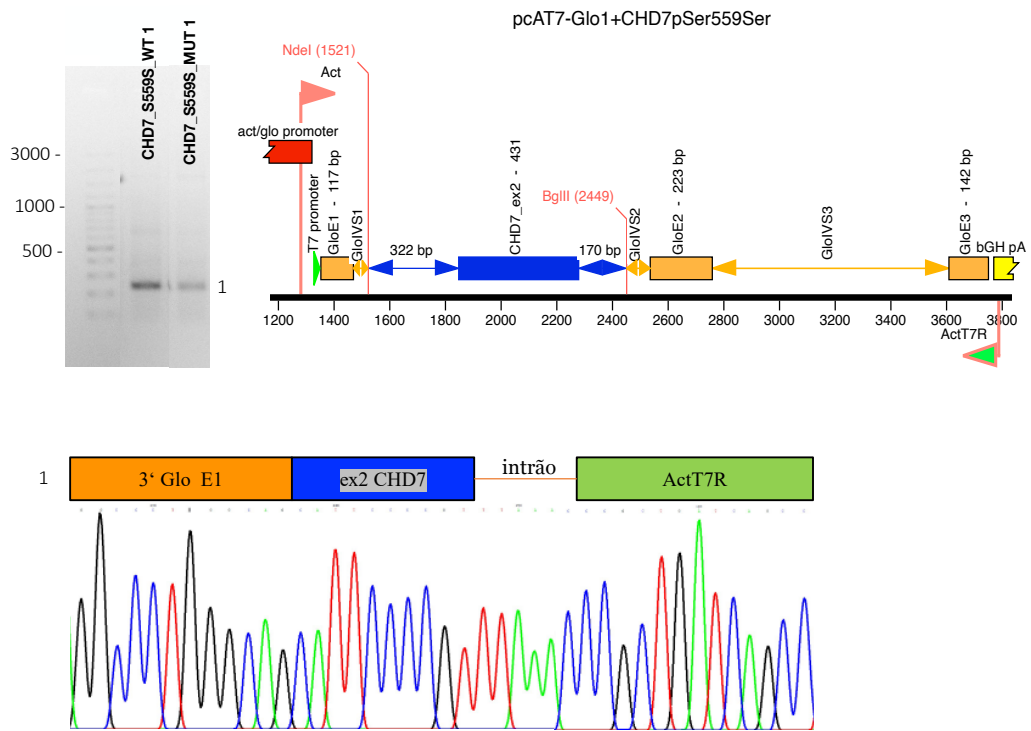




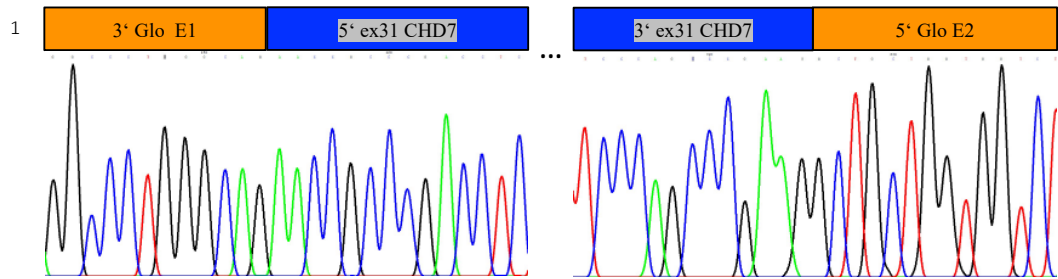
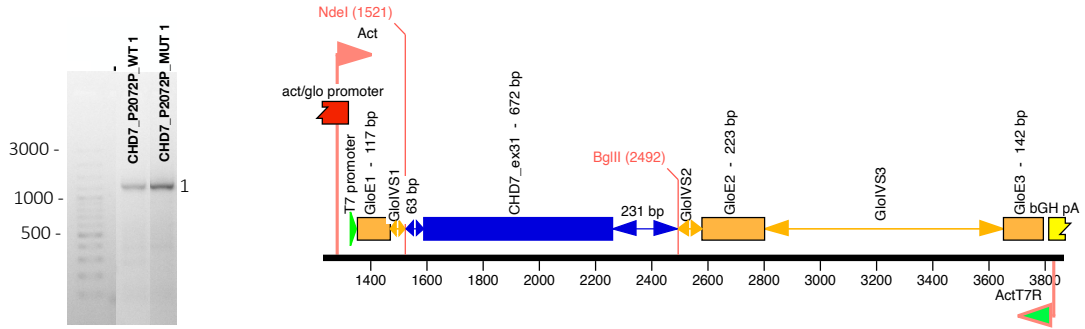
ID Controle	Sexo	Variante	Zigotia	Frequência alélica no gnomAD	Classificação ACMG
8304	M	NM_017780.3(CHD7):c.2830C>T (p.Arg944Cys)	Het	0.000028	LP (PM2, PM5, PP2, PP3)
		NM_004491.5(ARHGAP35):c.1090A>G (p.Ile364Val)	Het	0.000111	VUS (PM2, PP2, BP4)
		NM_001174116.3(DMXL2):c.4540C>G (p.Leu1514Val)	Het	-	VUS (PM2, PP2)
		NM_004439.5(EPHA5):c.2134G>A (p.Gly712Ser)	Het	-	VUS (PM2)
		NM_002633.2(PGMI):c.107C>A (p.Ala36Glu)	Het	0.000105	VUS
8306	F	NM_016937.3(POLA1):c.3731C>T (p.Thr1244Ile)	Het	-	VUS (PM2, BP4)

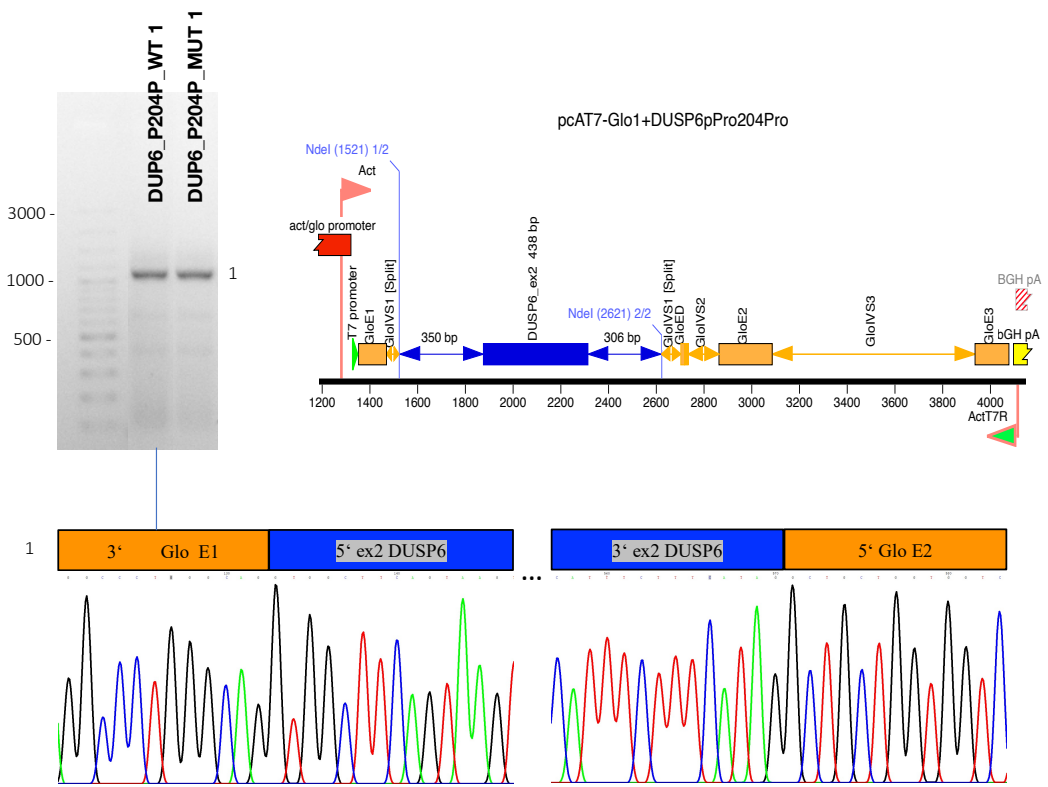
Abreviaturas: ID, identificação; M, masculino; F, feminino; Het, heterozigotia; Homo, homozigotia; Hemi, hemizigotia; gnomAD, Genome Aggregation Database; ACMG, American College of Medical Genetics and Genomics. As variantes foram classificadas como Patogênicas (P), Possivelmente patogênicas (LP), Variantes de significado indeterminado (VUS), de acordo com a evidência de patogenicidade (*very strong* (PVS1), *moderate* (PM1-6), ou *supporting* (PP1-5)) ou *benign impact* (*stand-alone* (BA), *strong* (BS1-4), ou *supporting* (BP1-7)).

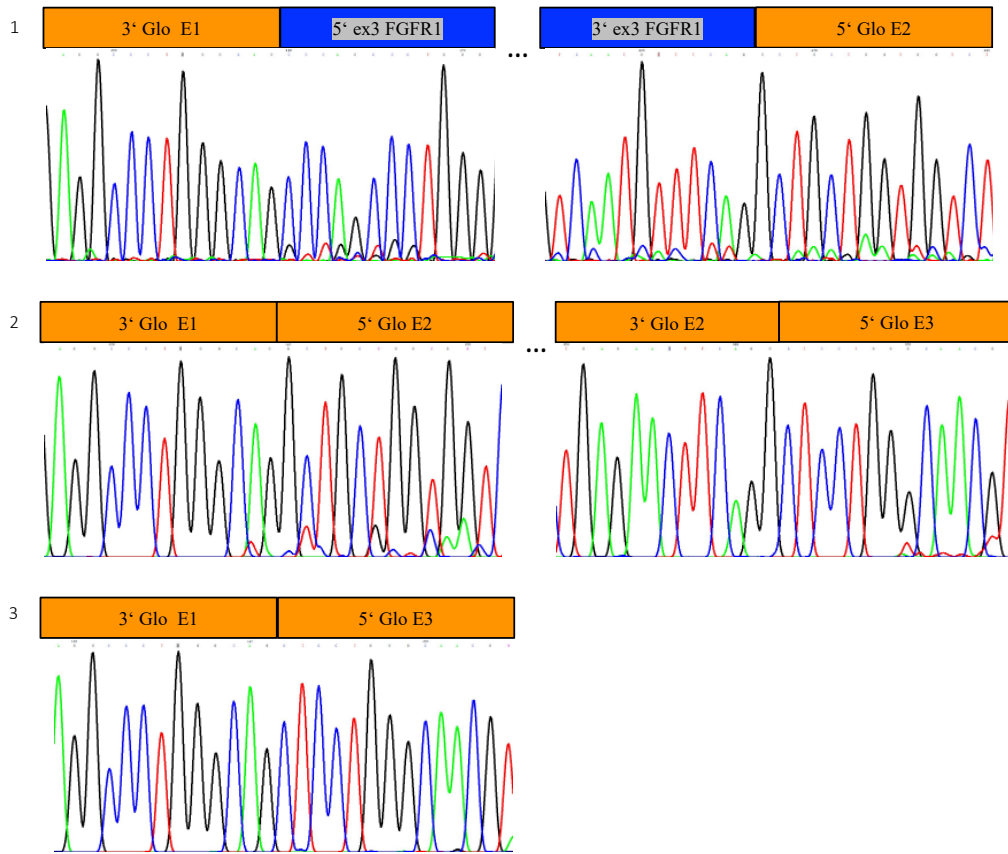
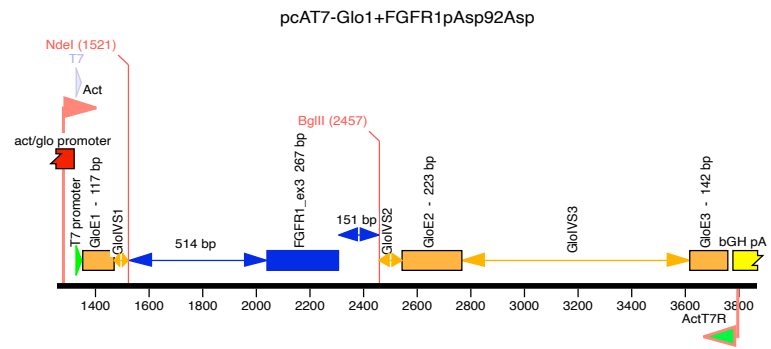
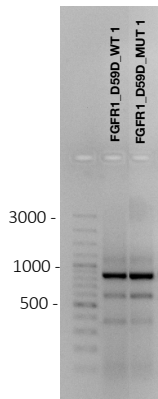
**Anexo 10:** Resultados do estudo do mecanismo de *splicing*, por minigene, das variantes que não mostram diferença na expressão do alelo mutado.

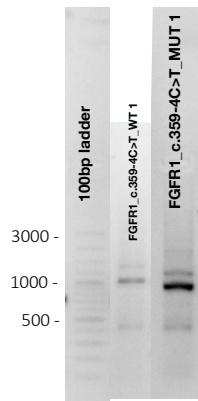


pcAT7-Glo1 +CHD7pPro2072Pro

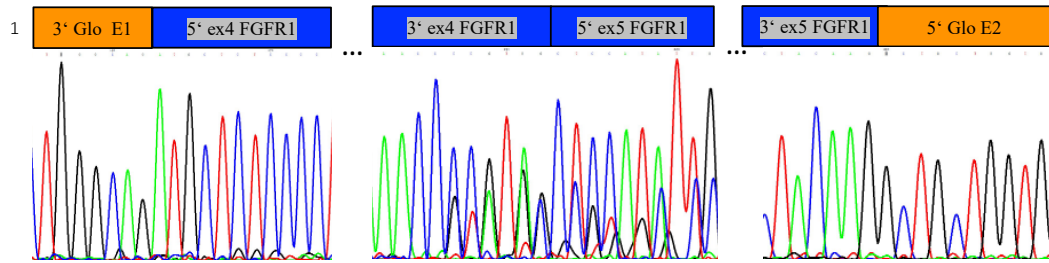
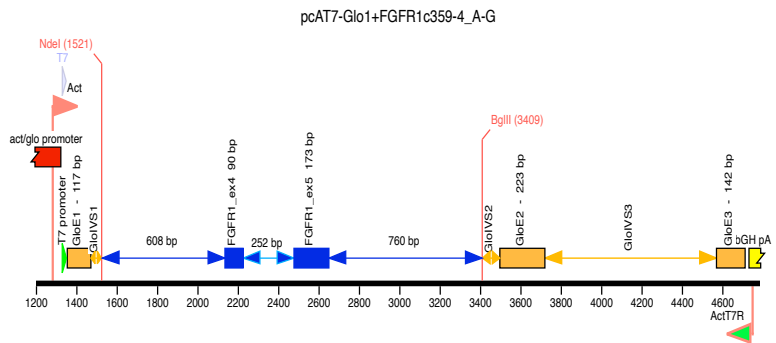


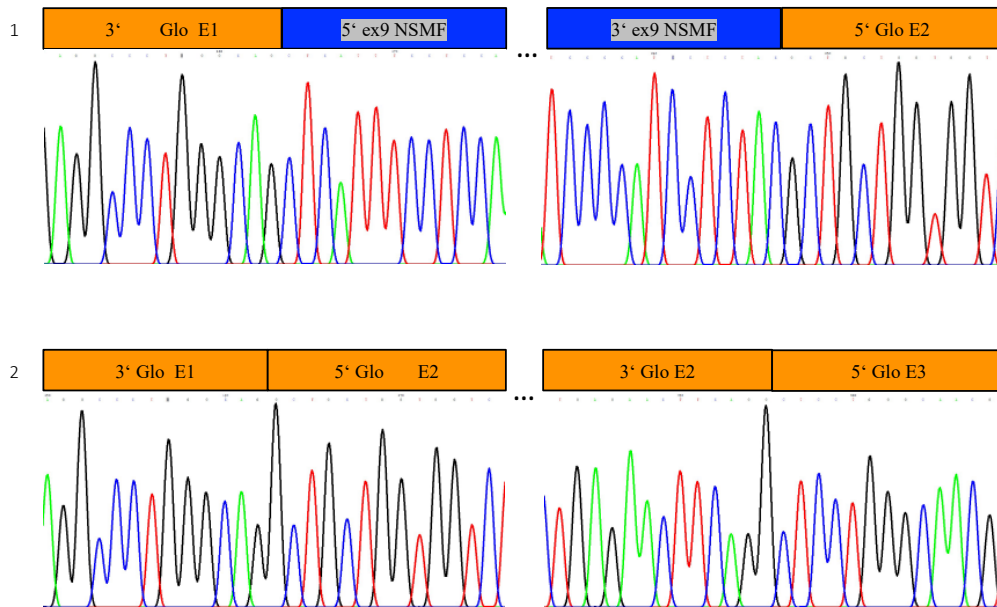
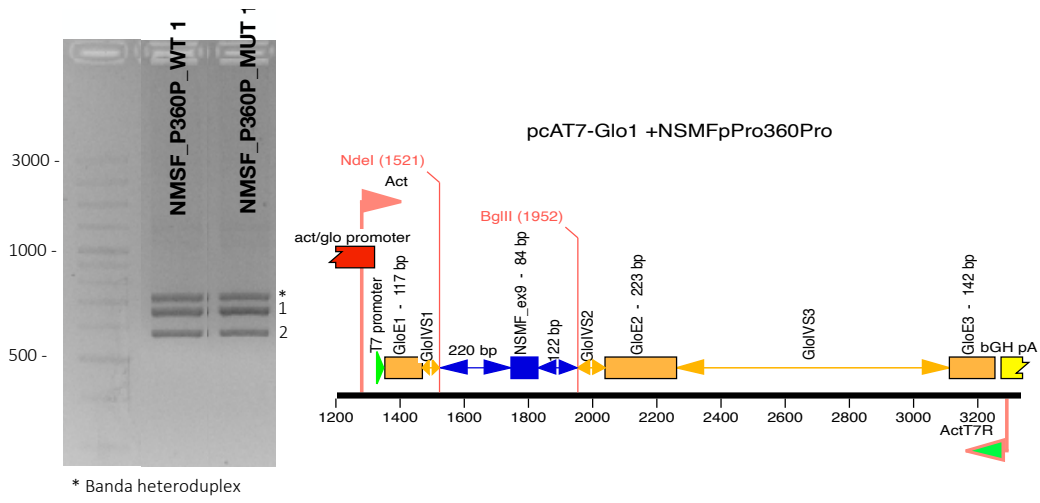


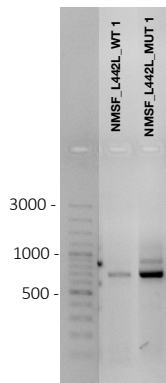




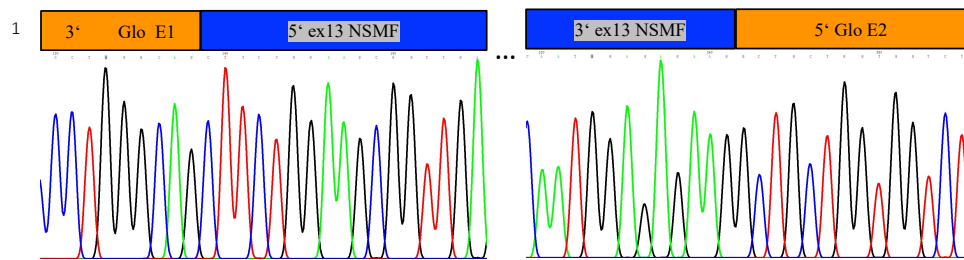
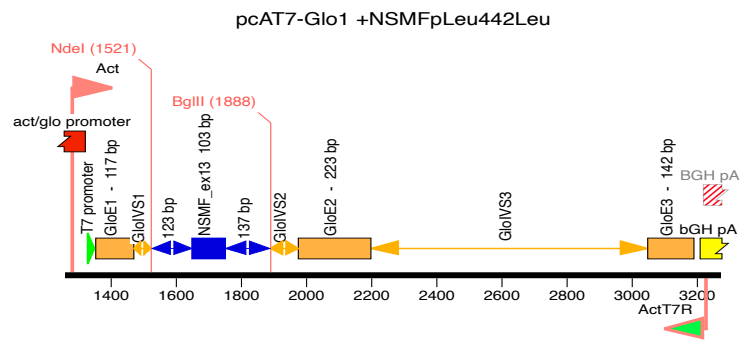
\* Banda heteroduplex

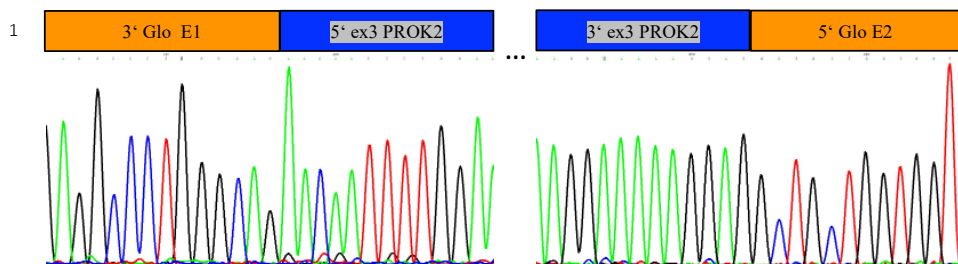
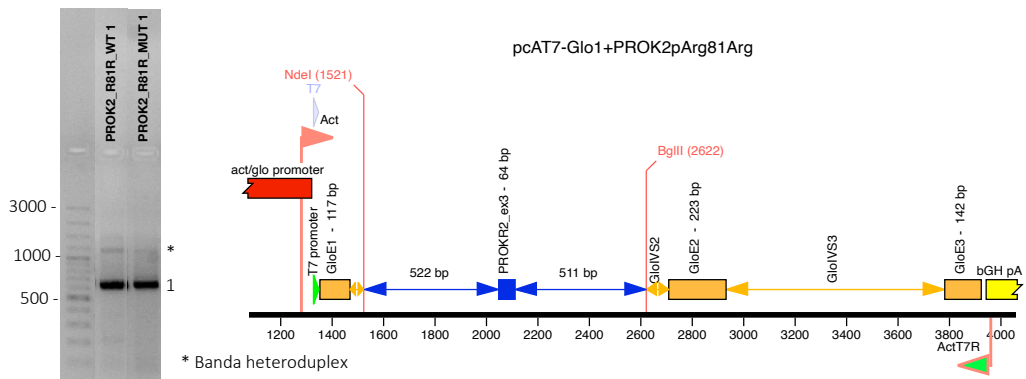


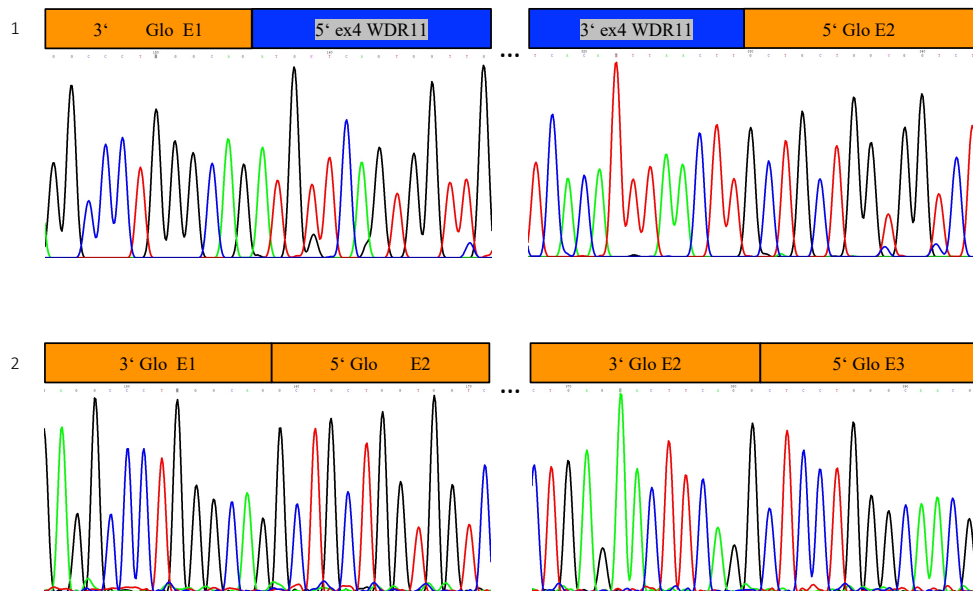
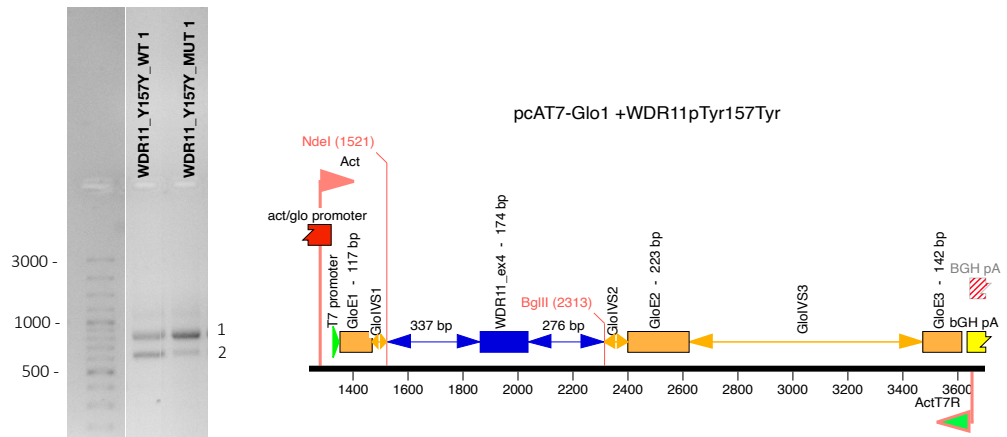




\* Banda heteroduplex

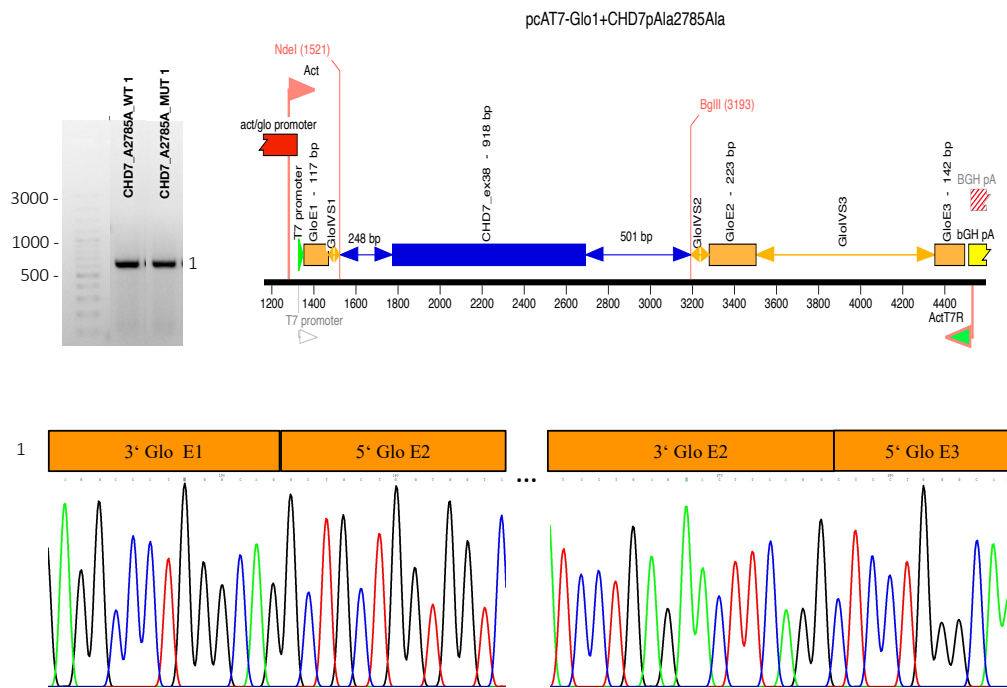


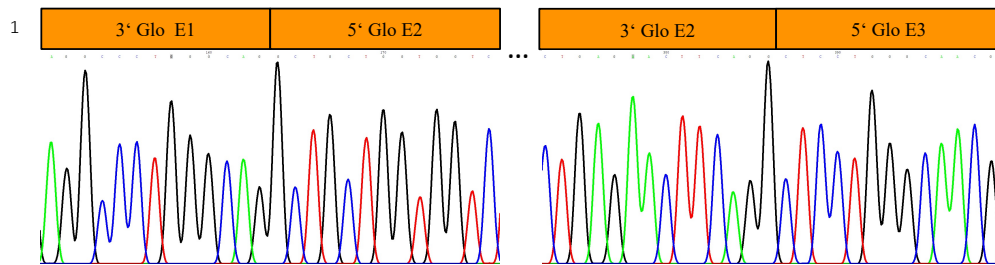
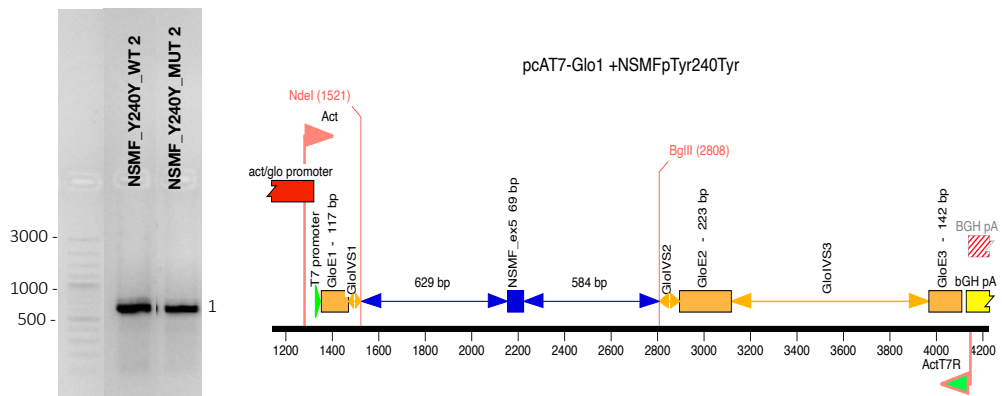


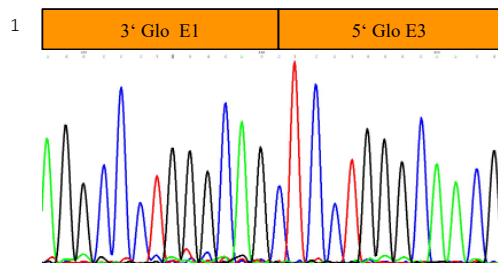
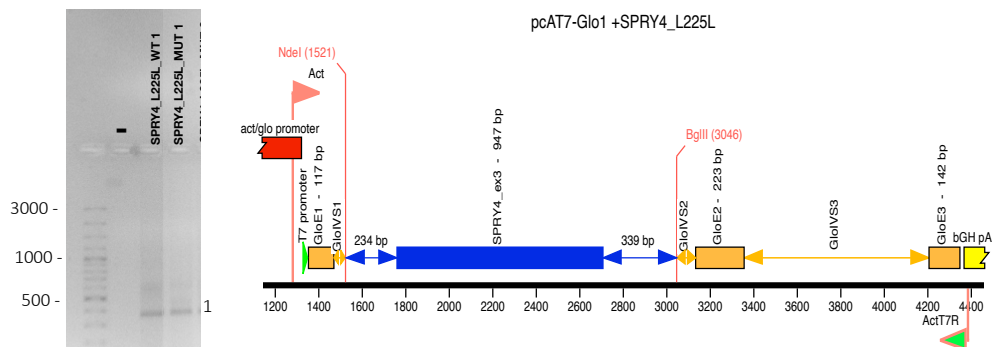




**Anexo 11:** Resultados do estudo do mecanismo de *splicing*, por minigene, das variantes que não expressaram o exão em estudo.









## Anexo 12: Síntese curricular

### WORK EXPERIENCE

---

- 01/02/2019–31/10/2020 **Research fellow**
- Health Sciences Research Centre (CICS-UBI), under the supervision of the Professor Manuel Carlos Loureiro de Lemos, MD, Covilhã (Portugal)
- Participation in the Interdisciplinary challenges in Neurodegeneration (ICON) Project;  
Participation in the GenoPit Project - Genetic Risk Factors in Pituitary Tumors;  
Whole Exome Sequencing (WES) data analysis;  
Application of my knowledge about Human Genetics and methods in Molecular Biology (eg. PCR, TaqMan SNP Genotyping Assays) for SNP and mutations identification;  
Use of databases (NCBI, ENSEMBL, gnomAD, ExAC, ClinVar).
- 01/09/2010–01/09/2017 **Research assistant**
- CHU Sainte-Justine Research Center, Axis Brain and Child Development, Laboratory of Graziella Di Cristo, PhD, Montreal (Canada)
- Application of my scientific skills (molecular biology, confocal and optical microscopy, histopathology, rodent surgery) in several projects;  
Management of a mice colony with multiple lines and respective bureaucratic files in accordance with the requirements of the CCAC, as well as their genotyping;  
Organization, statistical treatment, interpretation and presentation of data;  
Training and integration of new students and trainees in the laboratory;  
Stock management, purchase of consumables and equipment.
- 02/05/2006 – 01/01/2008 **Anatomical pathology technician - professional card nº C-022214020**
- Unidade Local de Saúde da Cova da Beira E.P.E., Covilhã (Portugal)
- Reception and computer recording of histological and cytological samples;  
Execution of histopathological, cytological, histochemical and immunohistochemical techniques;  
Involvement in the Certification process of the Anatomical Pathology Laboratory (ISO9001);  
Total of processed samples between 2006 and 2008 - 9154 samples.

### EDUCATION AND TRAINING

---

- 01/11/2020–in progress, expected 2024/2025 **Biomedicine** PhD program
- Health Sciences Research Centre (CICS-UBI), Universidade da Beira Interior, under the supervision of the Professor Manuel Carlos Loureiro de Lemos, MD, Covilhã (Portugal)
- 08/11/2019 **Postgraduate training course - NGS/WES – Genomic revolution in the clinical practice** Workshop
- Portuguese Society of Inherited Metabolic Diseases,  
Centro de Referência em Doenças Hereditárias do Metabolismo, Centro Hospitalar Universitário do Porto, Porto (Portugal)
- 07/11/2019 **Young researcher training** Training
- By Health Sciences Research Centre (CICS-UBI), Universidade da Beira Interior, Covilhã (Portugal) (final grade 18 out of 20)

20/05/2015	<b>Research animal training</b>	Training
	By Comité institutionnel de bonnes pratiques animales en recherche (CIBPAR) according to the requirements from the Canadian Council on Animal Care (CCAC).	
01/09/2008–08/07/2010	<b>Biochemistry (final grade 18 out of 20)</b>	M.Sc. program
	Université de Montréal, Montreal (Canada) Training at the Research Center CHU Sainte-Justine - Viscogliosi Molecular Genetics Laboratory of Musculoskeletal Disorders under the direction of Alain Moreau, PhD.	
01/04/2008–31/07/2008	<b>Molecular biology</b>	Training
	Université de Montréal - Department of Biochemistry, under the supervision of the Professor Léa Brakier-Gingras, PhD, Montreal (Canada)	
2004–2004	<b>Anatomic pathology laboratory - Immunohistochemistry</b>	Training
	São José Hospital, Lisbon (Portugal) / Egas Moniz Hospital, Lisbon (Portugal)	
2004–2004	<b>Anatomic pathology laboratory - Histopathology</b>	Training
	Main Military Hospital, Lisbon (Portugal)	
2004–2004	<b>Anatomic pathology laboratory - Cytology</b>	Training
	SAMS Hospital, Lisbon (Portugal)	
2004–2004	<b>Anatomic pathology laboratory - Gynaecological Cytology</b>	Training
	Dr Alfredo da Costa Maternity, Lisbon (Portugal)	
2004–2004	<b>Anatomic pathology laboratory - Electronic Microscopy</b>	Training
	Curry Cabral Hospital, Lisbon (Portugal)	
09/2001–25/08/2005	<b>Anatomical Pathology, Cytology and Thanatology (final grade 16 out of 20)</b>	EQF level 6 - B.Sc.
	Lisbon School of Health Technology, Lisbon (Portugal)	
Paper Publications	<p><b>Carrico JN</b>, Gonçalves CI, Aragüés JM, Lemos MC. Kallmann Syndrome: Functional Analysis of a <i>CHD7</i> Missense Variant Shows Aberrant RNA Splicing. <i>Int J Mol Sci</i>. 2024 Nov 10;25(22):12061. doi: 10.3390/ijms252212061.</p> <p><b>Carrico JN</b>, Gonçalves CI, Al-Naama A, Syed N, Aragüés JM, Bastos M, Fonseca F, Borges T, Pereira BD, Pignatelli D, Carvalho D, Cunha F, Saavedra A, Rodrigues E, Saraiva J, Ruas L, Vicente N, Martin Martins J, De Sousa Lages A, Oliveira MJ, Castro-Correia C, Melo M, Martins RG, Couto J, Moreno C, Martins D, Oliveira P, Martins T, Martins SA, Marques O, Meireles C, Garrão A, Nogueira C, Baptista C, Gama-de-Sousa S, Amaral C, Martinho M, Limbert C, Barros L, Vieira IH, Sabino T, Saraiva LR, Lemos MC. Genetic architecture of congenital hypogonadotropic hypogonadism: insights from analysis of a Portuguese cohort. <i>Hum Reprod Open</i>. 2024 Sep 11;2024(3):hoae053. 10.1093/hropen/hoae053.</p> <p>Catarina I. Gonçalves; <b>Josianne N. Carrico</b>; Omneya M. Omar; Ebtesam Abdalla; Manuel C. Lemos. "Hypoparathyroidism, deafness and renal dysplasia syndrome caused by a <i>GATA3</i> splice site mutation leading to the activation of a cryptic splice site". <i>Front Endocrinol (Lausanne)</i>. 2023 Aug 4;14:1207425. doi: 10.3389/fendo.2023.1207425.</p>	

Catarina I. Gonçalves; **Josianne Carriço**; Margarida Bastos; Manuel C. Lemos. "Disorder of Sex Development Due to 17-Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 3 Deficiency: A Case Report and Review of 70 Different HSD17B3 Mutations Reported in 239 Patients". *Int J Mol Sci*. 2022 Sep 2;23(17):10026. doi: 10.3390/ijms231710026.

Clara A. Amegandjin; Mayukh Choudhury; Vidya Jadhav; **Josianne Nunes Carriço**; Ariane Quintal; Martin Berryer; Marina Snappyan; et al. "Sensitive period for rescuing parvalbumin interneurons connectivity and social behavior deficits caused by TSC1 loss". *Nat Commun*. 2021 Jun 16;12(1):3653. doi: 10.1038/s41467-021-23939-7.

Munguba, Hermany; Chattopadhyaya, Bidisha; Nilsson, Stephan; **Nunes-Carriço, Josianne**; Memic, Fatima; Oberst, Polina; Batista-Brito, Renata; et al. "Postnatal Sox6 Regulates Synaptic Function of Cortical Parvalbumin- Expressing Neurons". *J Neurosci*. 2021 Oct 27;41(43):8876-8886. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0021-21.2021.

Awad PN, Amegandjin CA, Szczurkowska J, **Carriço JN**, Fernandes do Nascimento AS, Baho E, Chattopadhyaya B, Cancedda L, Carmant L, Di Cristo G. **KCC2 Regulates Dendritic Spine Formation in a Brain-Region Specific and BDNF Dependent Manner**. *Cereb Cortex*. 2018 Nov 1;28(11):4049-4062. doi: 10.1093/cercor/bhy198.

Awad PN, Sanon NT, Chattopadhyaya B, **Carriço JN**, Ouardouz M, Gagné J, Duss S, Wolf D, Desgent S, Cancedda L, Carmant L, Di Cristo G. Reducing premature KCC2 expression rescues seizure susceptibility and spine morphology in atypical febrile seizures. *Neurobiol Dis*. 2016 Jul;91:10-20. doi: 10.1016/j.nbd.2016.02.014.

**Online Resource** Mayukh Choudhury; Clara A. Amegandjin; Vidya Jadhav; **Nunes-Carriço, Josianne**; Ariane Quintal; Martin Berryer; Marina Snappyan; et al. 2020. Inhibition of mTOR during a postnatal sensitive window rescues deficits in GABAergic PV cell connectivity and social behavior caused by loss of TSC1. <https://doi.org/10.1101/2020.03.29.014563>.

**Conference Abstract Publication** Choudhury M, **Carriço JN**, Berryer M, Di Cristo G. Role of mTOR pathway in GABAergic maturation in the mouse neocortex. Conference abstract published in *International Journal of Developmental Neuroscience*. 2015. 47: 44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2015.04.124>.

**Magazine Publication** **Carriço J**, Bento A, Ferro A, Quintino F, Viegas C, Albuquerque P, Viegas S. Exposição ao Xilol nos laboratórios de Anatomia Patológica. *Revista Segurança*. Maio 2006. (171): 43-49.

**Oral presentations** **Josianne Carriço**, Catarina Inês Gonçalves, Luís R. Saraiva, Manuel C. Lemos. Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism in the Portuguese population. Presented at the XVIII International CICS-UBI Symposium the 10th July 2023, Covilhã, Portugal. Awarded as the best oral communication.

**Poster presentations** **Josianne Nunes-Carriço**, Catarina Inês Gonçalves, José Maria Aragüés e Manuel Carlos Lemos. "PD62 - Kallmann Syndrome: Functional analysis of a *CHD7* missense variant shows aberrant RNA splicing". Poster presented at the Portuguese Congress of Endocrinology 2025 - 76th annual meeting of the Portuguese Society of Endocrinology, Diabetes and Metabolism.

**Nunes-Carriço, Josianne**; Gonçalves, C.I.; Syed, Najeeb; Saraiva, L R; Lemos, Manuel C. "P01.020.D - Genetics of congenital hypogonadotropic hypogonadism in the portuguese population". Poster presented at the European Human Genetics Conference 2023, Glasgow, Scotland, UK, 2023.

Gendron, Karine; **Carriço, Josianne**; Dulude, Dominic; Heveker, Nikolaus; Léa Brakier-Gingras. 2009. "The Internal Ribosome Entry Site (IRES) Present in the 5'UTR of the full-length mRNA of HIV-1 Group M subtype B is functional in cultured cells and conserved among Group M subtypes A and C". Presented at Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI), Montréal, Canada.

Gendron, Karine; **Carrico, Josianne**; Dulude, Dominic; Heveker, Nikolaus; Brakier-Gingras, Léa. 2008. "Does the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) use an internal ribosome entry site to translate its structural and enzymatic proteins?". Presented at RiboClub Annual Meeting, Orford, Canada.

**Awards and distinctions** Award with best PhD student oral communication in the XVIII International CICS-UBI Symposium, Covilhã 10th and 11th July 2023 (300€).

ESHG Conference fellowship for European countries  
European Society of Human Genetics, Austria. 2023

Recognition for my participation in the development of the academic life of the CHU Sainte-Justine Research Center  
Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, Canada. 2011

Master's Scholarships Department of Biochemistry Awarded as part of funding agreements from the Faculty of Graduate Studies, given according to the quality of the scholar record in 2008 (\$4840.90).  
Université de Montréal, Canada.

**Workshops, Symposiums, Meetings, Conferences** Portuguese Congress of Endocrinology 2025 - 76th annual meeting of the Portuguese Society of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, 30th January to 2nd February 2025, Porto, Portugal.

XIX Annual CICS-UBI Symposium, 16th and 17th July 2024, Covilhã, Portugal.

European Human Genetics Conference, 1st to 4th June 2024, Berlin, Germany.  
Continuing Medical Education credits (ECMEC®s) 16.5

Workshop 15th International Symposium on variants in the genome, 12th May 2024, Póvoa de Varzim, Portugal.

15th International Symposium on variants in the genome, 13th to 15th May 2024, Póvoa de Varzim, Portugal (21.5 hours professional development).

Symposium France-Québec (réflexions pluridisciplinaires sur les données incidentes/trouvailles fortuites en génomique et leurs gestion en pratique). 11th March 2024, CHU Sainte-Justine, Montréal, Canada (virtual, 5 hours).

Portuguese Congress of Endocrinology 2024 - 75th annual meeting of the Portuguese Society of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, 1st to 4th February 2024, Vilamoura, Portugal.

XVIII International CICS-UBI Symposium, 10th and 11th July 2023, Covilhã, Portugal (speaker).

European Human Genetics Conference, 10th to 13th June 2023, Glasgow, Scotland, UK. (poster presentation).

Portuguese Congress of Endocrinology 2023 - 74th annual meeting of the Portuguese Society of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, 2nd to 5th February 2023, Vilamoura, Portugal.

XV Annual CICS-UBI Symposium, 1st and 2nd October 2020, Covilhã, Portugal.

Workshop Communication of Science and Technology, 24th October 2019, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal.

XIV Annual CICS-UBI Symposium, 4th and 5th July 2019, Covilhã, Portugal.

Symposium Development, Functions and Disorders of the Nervous System, NeuroDevNet, 19th to 24th July 2014, Montreal, Canada.

