

Sinopse do diagnóstico molecular de patologias do desenvolvimento sexual no Departamento de Genética Humana do INSA: dos primeiros estudos à relevância de uma abordagem multigénica por sequenciação de nova geração

Synopsis of the molecular diagnosis of disorders of sexual development in the Department of Human Genetics of INSA: from early studies to the relevance of a multigenic approach through next-generation sequencing

Iris Pereira-Caetano^{1,2}, Susana Gomes¹, João Gonçalves^{1,2}

joao.goncalves@insa.min-saude.pt

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

(2) Grupo de Patologias do Desenvolvimento Sexual. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Departamento de Genética Humana, Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Lisboa, Portugal

_Resumo

As patologias do desenvolvimento sexual (PDS) cujos primeiros estudos foram iniciados no Departamento de Genética Humana (DGH) em 1991, constituem um grupo heterogéneo de doenças congénitas caracterizadas por alterações no sexo cromossómico, gonadal e/ou anatómico. A sua incidência global é estimada em 5/1.000 nascimentos, variando, contudo, em função de características fenotípicas, desde a presença de hipospádias (cerca de 1/250 nascimentos do sexo masculino), a manifestações muito raras, como a disgenesia gonadal completa (1/50.000). A marcada sobreposição fenotípica e a heterogeneidade genética destas patologias dificultam o diagnóstico clínico e a orientação adequada dos doentes.

Esta sinopse de revisitação de doentes com PDS, resume os resultados do estudo molecular da hiperplasia suprarrenal congénita (CAH – *Congenital Adrenal Hyperplasia*), iniciado em 2002, num total de 411 doentes (em idade pediátrica), e reflete sobre o impacto da recente implementação, em 2019, de uma abordagem molecular multigénica por sequenciação de nova geração (NGS) na Unidade de Genética Molecular, no estudo mais alargado de outras PDS, comparativamente à metodologia clássica sequencial gene-a-gene. Atualmente, são analisados 40 genes, organizados em sete subpainéis: determinação primária do sexo, diferenciação sexual, esteroidogénese, infertilidade masculina ou feminina associadas a hipogonadismo hipogonadotrópico, e falência ovárica prematura. Até à data, foram estudados por NGS 58 doentes com manifestações fenotípicas e endocrinológicas características destas doenças raras (excluindo a CAH, não estudada por NGS). Foram identificadas 18 variantes patogénicas em 15 doentes, em 10 genes diferentes, e uma variante de significado clínico incerto no gene AR.

Concluimos que a NGS aumentou a taxa de deteção de variantes patogénicas e reduziu o tempo de resposta, potenciando significativamente o diagnóstico molecular das PDS, contribuindo assim para uma orientação clínica mais precisa, incluindo o aconselhamento genético e apoio na tomada de decisões reprodutivas.

_Abstract

Disorders of sexual development (DSD), whose initial studies began at the Department of Human Genetics (DGH) in 1991, are a heterogeneous group of congenital conditions characterised by alterations in chromosomal, gonadal and/or anatomical sex. Their overall incidence is estimated at 5 per 1,000 births; however, the incidence differs according to phenotypic

characteristics – ranging from the presence of hypospadias (approximately 1 in 250 male births) to very rare manifestations such as complete gonadal dysgenesis (1/50,000). The significant phenotypic overlap and genetic heterogeneity of these disorders make the clinical diagnosis and appropriate patient management challenging.

This synopsis revisits the patients studied with DSD and, besides briefly summarizing the molecular studies of congenital adrenal hyperplasia (CAH), initiated in 2002, involving a total of 411 pediatric patients, aims to reflect on the impact of the recent implementation, in 2019, of a multi-gene molecular approach using next-generation sequencing (NGS) in the Molecular Genetics Unit, which has expanded the study into other DSD, when compared to the traditional sequential gene-by-gene methodology. Currently, 40 genes are analyzed, arranged into seven sub-panels: primary sex determination, sexual differentiation, steroidogenesis, male or female infertility associated with hypogonadotropic hypogonadism, and premature ovarian failure. To date, 58 patients with phenotypic and endocrinological features characteristic of these rare disorders (excluding CAH, not studied by NGS) have been studied using NGS. Eighteen pathogenic variants were identified in 15 patients, involving 10 different genes, along with one variant of uncertain clinical significance in the AR gene.

We concluded that NGS increased the detection rate of pathogenic variants and reduced turnaround time, significantly enhancing the molecular diagnosis of PDS, thereby contributing to more accurate clinical management, including genetic counselling and support for reproductive decision-making.

_Introdução

O desenvolvimento sexual normal, essencial em múltiplas vertentes do Homem, caracteriza-se por um processo sequencial e altamente regulado, iniciando-se após a fertilização do óvulo pelo espermatozoide, com o estabelecimento do sexo cromossómico. Compreende a diferenciação das gónadas primordiais em testículos ou em ovários, o desenvolvimento dos órgãos genitais internos e externos e a diferenciação sexual secundária, culminando na formação completa do fenótipo sexual do

indivíduo (masculino ou feminino). Alterações genéticas que perturbem qualquer uma destas etapas — seja em genes que desencadeiam ou regulam o desenvolvimento das gónadas, os restantes órgãos genitais internos ou externos, ou as vias de biossíntese ou a ação hormonal ou endocrinológica — podem comprometer o desenvolvimento sexual normal, originando manifestações patológicas designadas por patologias do desenvolvimento sexual (PDS).

Assim, as PDS constituem um grupo bastante heterogéneo de manifestações clínicas nas quais o sexo cromossómico, gonadal e/ou anatómico pode ser atípico. Estas patologias possuem elevada sobreposição fenotípica e a possibilidade de ocorrerem em diferentes fases do desenvolvimento humano, desde o período embrionário até à idade adulta — podendo ocorrer genitais externos ambíguos, disgenesia gonadal, virilização e masculinização antecipadas, puberdade precoce, tardia ou ausente, ginecomastia, infertilidade (sem manifestações fenotípicas aparentes), entre outras — o que dificulta o diagnóstico clínico, mas torna o diagnóstico molecular essencial, tanto para a orientação clínica adequada, como para uma melhor integração social e familiar, e até para a decisão reprodutiva de cada indivíduo. A sua prevalência global é estimada em cerca de 5 por 1000 nascimentos, embora varie significativamente entre os diferentes fenótipos: por exemplo, as hipospádias ocorrem em cerca de 1/250 nascimentos do sexo masculino, enquanto outras condições clínicas raras, como a disgenesia gonadal, podem variar de 1/20.000 a 50.000 nascimentos (1,2).

O estudo molecular das PDS, iniciou-se em 1991 no Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), e, num primeiro período, compreendeu a caracterização de cromossomas Y estruturalmente anormais, presentes, predominantemente, em doentes com órgãos genitais externos indefinidos, em homens inférteis ou em doentes com síndrome de Turner. Posteriormente, e mantendo-se a abordagem anterior nos casos aplicáveis, a análise molecular expandiu-se para o estudo de diversos genes, refletindo à data a sua descoberta (ex. *SRY*, *AR*, *KAL1/ANOS1*, *GNRHR*), em doentes cujos fenótipos típicos de PDS careciam de identificação da sua causa primária, proporcionando um diagnóstico clínico mais objetivo.

Embora esta sinopse não aborde os estudos moleculares em homens inférteis, que compreendem a análise das regiões AZF do cromossoma Y implicadas na espermatogénese, realizados no DGH desde 1992, importa destacar os desenvolvimentos subsequentes da caracterização de deleções nestas regiões, nomeadamente o contributo pioneiro, em 2002, na identificação de microdeleções parciais em AZFc associadas a oligozoospermia e a subsequente caracterização da diversidade genómica das mesmas cujos resultados foram publicados em 2007 (3,4).

Merece ainda particular ênfase, o estudo molecular da hiperplasia suprarrenal congénita (CAH), associada a deficiência em 21-hidroxilase, iniciado pela primeira vez em Portugal no DGH em 2002, cujos primeiros resultados foram publicados a nível internacional em 2006 (5).

Nos últimos anos, a implementação da Sequenciação de Nova Geração (NGS – *Next Generation Sequencing*), a qual proporciona o estudo simultâneo de múltiplos genes e de diferentes doentes com diferentes fenótipos, tem impulsionado de forma significativa o aprofundar do conhecimento sobre as causas genéticas que constituem a base molecular das doenças raras em causa, proporcionando tempos de resposta e custos significativamente inferiores, comparativamente às metodologias anteriormente usadas.

_Objetivos

Neste trabalho, pretendeu-se resumidamente contextualizar os estudos moleculares realizados no Departamento de Genética Humana (DGH) do INSA desde 1991 para diferentes patologias do desenvolvimento sexual (PDS), com incidência concisa nos resultados da análise molecular da hiperplasia suprarrenal congénita associada à deficiência em 21-hidroxilase, e analisar o impacto da implementação, em 2019, na Unidade de Genética Molecular do DGH, de uma abordagem multigénica por NGS no estudo mais alargado das PDS, em comparação com a metodologia clássica sequencial gene-a-gene.

_Abordagem metodológica

Ao longo das diferentes décadas, acompanhando o conhecimento científico internacional e a evolução tecnológica, recorreu-se sempre às metodologias que proporcionavam os melhores resultados, entre as quais o *Southern blotting*, muito usado nos estudos iniciais, a PCR, a sequenciação de Sanger e o MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que, embora numa abordagem monogénica de estudo dos principais genes, conduziram a resultados clinicamente relevantes e definitivos para muitos doentes.

A recente implementação da NGS, usando um painel multigénico customizado, o qual inclui 40 genes associados a PDS (excluindo o gene *CYP21A2* associado a CAH), organizados em subpainéis específicos (tabela 1), visou caracterizar, a nível molecular e, de forma abrangente, as doenças raras em causa. Esta nova metodologia tem sido realizada de acordo com o protocolo AmpliSeq (Illumina®). A validação inicial da mesma foi baseada no uso de 61 amostras controlo com a deteção de múltiplas variantes presentes nas

mesmas e em diferentes genes, variantes essas previamente identificadas pelas metodologias tradicionais acima referidas, tendo-se obtido uma sensibilidade e especificidade de 100%. Nos doentes estudados (58 casos índice) as variantes detetadas por NGS foram confirmadas por sequenciação de Sanger, assim como todas as regiões com cobertura <20x.

No âmbito da CAH realça-se o estudo, de âmbito nacional, de doentes maioritariamente diagnosticados desde o nascimento até antes de atingirem 18 anos, cuja genotipagem do gene *CYP21A2*, iniciada por *Southern-blotting*, PCR e sequenciação de Sanger evoluiu com a substituição da primeira metodologia pelo MLPA, mantendo-se as restantes duas. Estes doentes foram clinicamente classificados de acordo com as três formas da CAH, ou seja, CAH com perda de Sal (CAH-PS, n=83), forma simplesmente virilizante (CAH-SV, n=61) e forma não clássica (CAH-NC, n=267), totalizando 411 doentes.

Tabela 1: Painéis de genes para as patologias do desenvolvimento sexual concebidos para análise por sequenciação de nova geração.

Designação da patologia ou do painel	Painel de genes
Determinação primária do sexo	<i>ATRX, DHH, DMRT1, LHCGR, MAP3K1, NR0B1, NR5A1, SOX9, SRY, WNT4, WT1</i>
Diferenciação sexual	<i>AMH, AMHR2, AR, ATRX, BMP15, CYP17A1, CYP19A1, DHH, DMRT1, FSHR, HSD17B3, INSL3, LHCGR, MAMLD1, MAP3K1, NR0B1, NR5A1, RXFP2, SRD5A2, SRY, STAR, WT1</i>
Esteroidogénese	<i>CYP11A1, CYP11B1, CYP17A1, CYP19A1, HSD3B2, HSD17B3, NR0B1, NR5A1, POR, STAR</i>
Hipogonadismo hipogonadotrófico	<i>ANOS1, CHD7, FGFR1, GNRHR, IL17RD, LHCGR, NR0B1(DAX1), PROKR2, SOX10, SPRY4, TAC3</i>
Falência ovárica prematura	<i>BMP15, FOXL2, FSHR, LHCGR, NOBOX, NR5A1, WNT4</i>
Infertilidade masculina e Hipogonadismo hipogonadotrófico	<i>ADGRG2, ANOS1, CFTR, CHD7, DMRT1, FGFR1, FSHR, GNRHR, IL17RD, INSL3, LHCGR, NR0B1, NR5A1, PROKR2, RXFP2, SOX10, SPRY4, TAC3, TEX11</i>
Infertilidade feminina e Hipogonadismo hipogonadotrófico	<i>CHD7, FGFR1, FSHR, GNRHR, IL17RD, LHCGR, NR5A1, PROKR2, SOX10, SPRY4, TAC3</i>

Os resultados do estudo molecular dos doentes com CAH revelou uma enorme diversidade de genótipos, a qual é característica do gene em causa. Neste âmbito, as três alterações mais frequentes detetadas em *CYP21A2*, associadas às três formas da doença, foram: c.293-13C>G, associada a CAH-PS, c.518T>A, associada a CAH-SV, e c.844G>T, associada a CAH-NC. Estas alterações coincidem com os dados da literatura internacional para a população de origem caucasiana, tendo-se obtido também uma elevada taxa de correlação genótipo/fenótipo, similar ao descrito na literatura (CAH-PS: 87,9%; CAH-SV: 60,7% e CAH-NC: 71,9%).

_Discussão

A aplicação da NGS às PDS referidas, resultou numa melhoria substancial da taxa de diagnóstico molecular nos doentes em causa e evidenciou uma grande diversidade na natureza das variantes patogénicas identificadas (*frameshift*, *missense*, *nonsense*, *splicing*, inserção, deleção), confirmando a heterogeneidade genética subjacente a estas patologias, reflexo também da diversidade de genes analisados.

Um caso particularmente relevante foi o da doente PDS-NGS3, que apresentou um genótipo não descrito na literatura e associado a dois genes com modos de herança distintos, ou seja, a presença de duas variantes patogénicas: uma variante em homocigotia no gene *LHCGR* (autossómico recessivo) e uma variante em hemizigotia no *AR* (recessivo ligado ao cromossoma X). Ambas as alterações, isoladamente, seriam suficientes para explicar o fenótipo clínico apresentado. A concomitância destas alterações refletiu não só a complexidade genética envolvida, mas também a relevância de uma abordagem multi-génica, que permitiu a sua identificação.

A NGS possibilitou também a avaliação de risco em familiares dos doentes. No caso da doente 7, o padrão de hereditariedade, recessivo ligado ao cromossoma X, motivou o estudo familiar em contexto de consulta de genética médica, conduzindo à identificação da variante na mãe, não afetada, bem como a ausência da alteração familiar na tia materna. Também para a doente 6, cuja variante identificada no gene *NR5A1* está igualmente descrita em indivíduos 46,XX com menopausa precoce (PMID: 34095474), foi sugerido o estudo familiar, com vista à vigilância clínica preventiva dos seus familiares.

Considerando os resultados globais relativos a CAH, para além das alterações graves associadas de zero a ~3% de atividade enzimática identificada nas formas clássicas (CAH-PS e -SV), evidenciou-se que 30% dos doentes com CAH-NC possuem, num dos seus alelos, alterações graves, pelo que, quando pretenderem ter descendência, o respetivo casal (sendo essencial a genotipagem do gene *CYP21A2* no outro elemento do casal) poderá ter um risco de 25% de ter, em cada gravidez, descendentes afetados com as formas mais graves da doença. Nestes casos, com a contribuição da genética médica, poderá ser disponibilizado atempadamente ao casal o respetivo aconselhamento genético, assim como o diagnóstico pré-natal para identificação do sexo cromossómico e eventual genotipagem do feto para as alterações parentais. No caso do mesmo ser 46,XX e afetado para CAH-PS ou CAH-SV, a terapêutica endocrinológica, desde a idade embrionária adequada, é essencial para evitar a virilização dos seus órgãos genitais externos.

_Conclusões

A NGS constitui uma metodologia de primeira linha no contexto do diagnóstico molecular da diversidade das PDS, permitindo a análise simultânea de múltiplos genes, com aumento da taxa de deteção de variantes patogénicas, incluindo em genes não estudados por rotina numa primeira abordagem gene-a-gene. Permite, inclusivamente, a identificação de genótipos mais complexos, em que diversas alterações podem contribuir para o fenótipo, proporcionando, de forma célere, o estudo de doenças hereditárias digénicas e oligogénicas.

Comparativamente à análise sequencial gene-a-gene, a NGS oferece resultados mais rápidos e a custos inferiores, aumentando a probabilidade de se identificar a causa genética destas doenças e, conseqüentemente, estabelecer ou confirmar o diagnóstico clínico. Tal facto é determinante para reduzir o período de indefinição do diagnóstico a que estes doentes e famílias frequentemente são sujeitos, possibilitando a sua orientação clínica relativa a tratamento, opções reprodutivas e aconselhamento genético. Assim, a integração da NGS na prática clínica representa um avanço significativo na abordagem das patologias do desenvolvimento sexual, com impacto direto na gestão clínica dos doentes e seu aconselhamento, bem como na avaliação do risco familiar.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a todos os colaboradores do DGH do INSA, aos diversos médicos de outras instituições de saúde, assim como aos próprios doentes, que de forma direta ou indireta, contribuíram ao longo das últimas décadas, para implementar e desenvolver os estudos moleculares no âmbito das doenças raras em causa. Um agradecimento especial ao Doutor João Lavinha pelo desencadear dos estudos em causa, interesse científico, apoio e motivação contínuos.

Referências bibliográficas:

- (1) Kyriakou A, Lucas-Herald A, McGowan R, et al. Disorders of sex development: advances in genetic diagnosis and challenges in management. *Adv Genomics Genet.* 2015;2025(5):165-77. <https://doi.org/10.2147/AGG.S53226>
- (2) Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, et al. ; LWPES Consensus Group; ESPE Consensus Group. Consensus statement on management of intersex disorders. *Arch Dis Child.* 2006 Jul;91(7):554-63. Epub 2006 Apr 19. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.098319>
- (3) Fernandes S, Huellen K, Goncalves J, et al. High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod.* 2002 Mar;8(3):286-98. <https://doi.org/10.1093/molehr/8.3.286>
- (4) Navarro-Costa P, Pereira L, Alves C, et al. Characterizing partial AZFc deletions of the Y chromosome with amplicon-specific sequence markers. *BMC Genomics.* 2007 Sep 28;8:342. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-342>
- (5) Friães A, Rêgo AT, Aragüés JM, et al. CYP21A2 mutations in Portuguese patients with congenital adrenal hyperplasia: identification of two novel mutations and characterization of four different partial gene conversions. *Mol Genet Metab.* 2006 May;88(1):58-65. Epub 2006 Jan 20. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2005.11.015>