



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Evelyn Quintanilha Vianna

**Identificação de genes/mecanismos moleculares associados à
deficiência intelectual em mulheres a partir de padrões extremos de
desvio de inativação do cromossomo X**

Rio de Janeiro

2019

Evelyn Quintanilha Vianna

Identificação de genes/mecanismos moleculares associados à deficiência intelectual
em mulheres a partir de padrões extremos de desvio de inativação
do cromossomo X

Tese apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor, ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências, da Universidade do Estado do
Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V617 Vianna, Evelyn Quintanilha.
Identificação de genes/mecanismos moleculares associados à
deficiência intelectual em mulheres a partir de padrões extremos de
desvio de inativação do cromossomo X / Evelyn Quintanilha Vianna. –
2019.

170 f.

Orientadora: Cíntia Barros Santos-Rebouças.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Biociências.

1. Deficiência intelectual – Teses. 2. Variação do número de cópias
de DNA - Teses. 3. Cromossomo x - Teses. 4. Sequenciamento
Completo do Exoma. I. Rebouças, Cíntia Barros Santos. II. Universidade
do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara
Gomes. III. Título.

..... CDU 616.899

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial
desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Evelyn Quintanilha Vianna

Identificação de genes/mecanismos moleculares associados à deficiência intelectual em mulheres a partir de padrões extremos de desvio de inativação do cromossomo X

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2019

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof.^a Dra. Leonor Gusmão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Enrique Medina-Acosta
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Prof. Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira
Instituto Nacional do Cancer

Rio de Janeiro
2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos que constroem minha vida todos os dias,
Alvaro e Giovanna.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, permitindo que eu pudesse chegar até esse momento.

Aos meus pais, Carlos e Edenilma, que sempre fizeram esforços para me auxiliar mesmo pensando “*para quem estudar tanto?*” ou sem entender a importância dessa titulação em minha vida ou carreira acadêmica. Meu muito obrigada a vocês, hoje no papel de mãe entendo um pouco do que fizeram ou fazem por mim diariamente.

Ao meu querido e amado marido, Alvaro. Essa tese é em parte sua também pois sempre foi meu cúmplice em todas situações e nessa não foi diferente. Mesmo com todos os problemas que vivemos no fim desse trabalho, você é sempre meu maior incentivador, depositando sempre seus créditos em mim e me fazendo me sentir capaz até mesmo quando eu acho que não sou. Obrigada por sempre acreditar em mim e obrigada por me proporcionar a alegria de ter formado uma família contigo que não cabe no *Lattes*.

À minha alegria de todos os dias, Giovanna, que mesmo sendo tão pequena durante a parte que viveu dessa jornada, pôde ser compreensiva. Nunca duvidei do amor materno, mas não poderia imaginar quanta alegria que estar nessa posição me traria.

À minha irmã, Ana Carla, por ter sido sempre tão suporte em vários momentos de execução desse trabalho. Obrigada por ter se tornado uma grande amiga e parceira.

À minha orientadora, prof.^a Cíntia Barros Santos-Rebouças, por ter me proporcionado uma orientação de verdade, amparando a minha trajetória de perto, mesmo em momentos tão delicados da sua vida. Obrigada por tantos ensinamentos que obtive nessa jornada, que se iniciou antes mesmo da seleção para o doutorado.

Em especial, ao Prof. Enrique Medina-Acosta por todo o suporte prestado ao longo deste trabalho e das ideias em vários momentos com nosso grupo de estudos. Foi um prazer tê-lo como colaborador deste estudo, além da honra de conhecer um professor tão singular em ideias, com descontração e humildade. Ao laboratório NUDIM, e principalmente ao Antônio, que em apenas uma visita foram tão

acolhedores. Agradeço ao Prof. Filipe Brum Machado que sempre esteve à disposição para qualquer dúvida e auxílio, respondendo rapidamente a todos os e-mails.

Às ICs e pupilas, Beatriz e Gabriela (ou “Gabia”) que viveram parte dessa jornada no projeto paralelo e puderam compartilhar tantas coisas além de brigadeiros e digestões. As zodiacas figuras: Camilla, Caroline e Sarah pelos momentos de descontração. À Camilla, pela sua companhia desde os primeiros momentos SERVGEN, pois sua companhia mesmo sem muitas palavras me trouxe acolhimento em vários momentos. À Caroline, pelo carinho de sempre e por ter se tornado uma amiga “extracurricular”, me permitindo participar de momentos de decisão e auxílio. Aos alunos que vivenciaram tantos e tantos dias ao meu lado, desde risadas, perguntas e posições políticas: Bianca, Danielle, Felipe, Mateus, Maria Clara e José Igor.

Às queridas técnicas do SERVGEN que fizeram parte dessa tese acontecer: Andressa, Jussara e Veluma. À Andressa pelas inúmeras reações e reagentes, e embora no início da jornada não ter sido fácil uma aproximação, fico muito feliz de estar mais próxima de você nesses 45’ do último tempo e de ter visto parte da sua história de bolsista à servidora acontecer. À Jussara, pelas inúmeras feições divertidas do dia a dia, mostrando sempre comprometimento e bom humor, da coleta ao fluxo preparando alíquotas de dNTP. Obrigada também pelas inúmeras caronas Rio/Niterói. À Veluma, por sempre apresentar organização e prontidão em todas as circunstâncias, seja para um tubo de DNA do freezer ou dividir um yakisoba. Agradeço também à Débora, em diversos momentos de sufoco na coleta ou situações adversas esteve pronta a ajudar.

À prof.^a Marcia Pimentel, que conquistou minha admiração pela vida e profissional que se mostra diariamente sendo sempre tão prestativa.

À Nanda, por resistir como amiga/madrinha/comadre desde a graduação e compartilhar tantas alegrias e momentos difíceis durante esses anos. À Helena, minha prima e mais antiga amiga, por todas as dúvidas sanadas em Português, as vivências de família ou dos laços que criamos (porque além de família, te escolhi pra estar perto também). Mesmo longe por um Oceano, obrigada por estar presente como se estivesse no mesmo prédio.

Aos amigos que a Genética me deu: Ayslan, Leili e Malu. Muito obrigada por participarem das discussões de ideias, troca de experiências na ciência e na vida sempre.

Aos amigos que a maternidade me deu ou trouxe para perto: Carol, Lessa, Débora, Vitor, Luísa, Thiago e Rachel. Obrigada por se fazerem presentes nas angústias, nos ouvidos presentes e no amor compartilhado desses tempos tão sombrios.

Ao prof. Miguel Moreira, que desde a minha iniciação científica se mostrou solícito a qualquer auxílio, e agora durante a execução da tese nos deu apoio em diversos momentos complicados para uso de equipamentos da UERJ. Agradeço também à Genética do CPq/INCA: Bruna, Renata e Val que sempre demonstraram prontidão em auxiliar.

Ao grupo de colaboração do estudo: Dr.^a Márcia Ribeiro Gonçalves, Dr.^a Raquel Tavares Boy da Silva, Dr.^a Suely Rodrigues dos Santos, Dr.^a Carla Rosenberg e Dr.^a Ana Krepschi.

Ao CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro.

E por último, mas não menos importante, às pacientes e familiares que participaram do estudo, muito obrigada por participarem do estudo e se disponibilizarem muitas vezes com poucos recursos para estarem presentes. A ciência só se constrói com a participação de vocês!

O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.

Leonardo da Vinci

RESUMO

VIANNA, Evelyn Quintanilha. *Identificação de genes/mecanismos moleculares associados à deficiência intelectual em mulheres a partir de padrões extremos de desvio de inativação do cromossomo X*. 2019. 170 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A Deficiência Intelectual (DI) é um problema de saúde pública com uma alta prevalência na população mundial (2-3%), afetando 30% mais homens do que mulheres. Um dos fatores associados a essa discrepância na razão sexual é a participação de mutações em genes localizados no cromossomo X. Devido ao fato das mulheres apresentarem o mecanismo de inativação do cromossomo X (ICX) para compensar a dose gênica entre os sexos homo e heterogamético, mulheres portadoras de mutações neste cromossomo podem não ser severamente afetadas pela DI. Assim, os estudos sobre a DI ligada ao X (DILX) que incluem mulheres são raros e o conhecimento sobre genes no cromossomo X que causam DI nestas é limitado. Com base nisso, esse estudo teve como objetivo principal caracterizar, a partir de desvios extremos de ICX, alterações genéticas envolvidas na DI em mulheres. Em amostras de DNA (sangue periférico e mucosa bucal) de 53 mulheres com DI, foram avaliados os perfis de ICX (genes *AR* e *RP2*) e variações no número de cópias gênicas (CNVs) associadas à DI em diferentes regiões cromossômicas, através da metodologia de amplificação multiplex por sondas ligação-dependentes (MLPA). Para as amostras identificadas com desvios moderados ($\geq 80\%$) e extremos de ICX ($\geq 90\%$), foi investigada a presença de variantes no gene *XIST*, principal envolvido na ICX. As amostras com desvios extremos foram submetidas às metodologias de hibridação genômica comparativa (*array-CGH*) e sequenciamento de exoma total (WES). Foram encontradas quatro pacientes com desvio moderado e sete pacientes com desvio extremo de ICX. Dentre as pacientes com desvio extremo de ICX, foram identificadas alterações relacionadas à DI, dentre elas, duas CNVs patogênicas nos cromossomos 3 (deleção em 3q26) e X [t(2;X)-der(2)], e quatro mutações de ponto nos genes *HDAC8*, *NLGN4X*, *TAF1* e *USP9X*, sendo duas delas inéditas. Em paralelo, seis pacientes com CNVs intersticiais e subteloméricas foram identificadas, sendo uma patogênica (deleção 22q11.21), duas provavelmente benignas (duplicações em *RABL2B* e *TERT*) e três possivelmente patogênicas (duplicação em *SHOX*, deleções em *SOX12* e *RBFA*). A proporção de desvios de ICX observados no estudo (20,7%) foi significativamente superior ao esperado em mulheres saudáveis ($p < 0,001$, $\chi^2 = 18,61$). O ensaio para a ICX foi eficaz para avaliar todas as amostras do estudo e ainda permitiu identificar o perfil de ICX das mulheres homozigotas para o gene *AR*, incluindo uma paciente identificada com mutação relacionada à DILX. Adicionalmente, a investigação de CNVs permitiu a identificação de um caso fenotipicamente atípico da síndrome de deleção em 22q11.21 e de mais três CNVs possivelmente associadas à DI. Desta forma, os desvios de ICX se mostraram excelentes ferramentas para a caracterização de (novos) genes/mecanismos moleculares associados à DILX em mulheres e ainda permitiu identificar alterações não descritas responsáveis pela DI e pelo desvio de ICX.

Palavras-chave: Inativação do cromossomo X. Variação no número de cópias gênicas.

XIST. Sequenciamento de exoma total.

ABSTRACT

VIANNA, Evelyn Quintanilha. *Identification of genes/molecular mechanisms associated with intellectual disability in females based on patterns of extreme deviation of X chromosome inactivation*. 2019. 170 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Intellectual disability (ID) is a public health problem with high prevalence in general population (2-3%) that affects 30% more males than females. One of the factors associated with this sex ratio discrepancy is the participation of mutations in X chromosome genes. Since females present a X chromosome inactivation (XCI) mechanism to compensate the gene dosage between homo and heterogametic sexes, females carrying mutations on this chromosome may not be severely affected by ID. Thus, studies on X-linked ID (XLID) including females are rare and the knowledge about genes on the X chromosome causing ID in females is limited. Based on this, the main aim of this study was to characterize, from extreme XCI skewing, genetic alterations involved in ID in females. The XCI profile (*AR* and *RP2* genes) was evaluated in DNA samples (peripheral blood and buccal mucosa) from 53 females with ID, and copy number variations (CNVs) in genes associated with ID were investigated through multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). For the samples identified with moderate ($\geq 80\%$) and extreme XCI skewing ($\geq 90\%$), variants on *XIST* gene, the main involved in XCI, were also investigated. Besides, samples with extreme XCI skewing were submitted to comparative genomic hybridization (*array*-CGH) and whole exome sequencing (WES) methodologies. Four patients with moderate XCI skewing and seven patients with extreme XCI skewing were found. Among the patients with XCI skewing, ID-related changes were identified, including two pathogenic CNVs on chromosomes 3 (deletion in 3q26) and X (t(2;X)-der(2)), and four point mutations on *HDAC8*, *NLGN4X*, *TAF1* and *USP9X* genes, two of them unpublished. In parallel, six patients with interstitial and subtelomeric CNVs were found, one of them pathogenic (22q11.21 deletion), two probably benign (*RABL2B* and *TERT* duplications) and three possibly pathogenic (*SHOX* duplication, *SOX12* and *RBFA* deletions). The percentage of extreme XCI skewing observed in this study (20,7%) was significantly higher than expected in healthy females ($p < 0,001$, $\chi^2 = 18,61$). The XCI assay was effective in evaluating all studied samples and allowed the identification of XCI profiles in homozygous females for the *AR* gene, including a patient with a DILX mutation. In addition, CNVs investigation allowed the identification of a phenotypically atypic case of 22q11.2 deletion syndrome, and of three other CNVs possibly associated with ID. In conclusion, XCI skewing proved to be an excellent tool for the characterization of (new) genes/molecular mechanisms associated with DILX in females, allowing the identification of previously unrecognized alterations responsible for ID and XCI skewing.

Keywords: X-chromosome inactivation. Copy number variation. *XIST*. Whole exome sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Características dos cromossomos X e Y atuais.....	24
Figura 2 -	Esquema representativo da evolução dos cromossomos sexuais de acordo com a Hipótese de Ohno.....	27
Figura 3-	O ciclo de inativação e reativação do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário de camundongos.	31
Figura 4 -	Etapas da atuação do PRC2 na propagação da ICX.	35
Figura 5 -	Atuação do gene <i>Xist</i> no XIC e a cromatina do X no estado ativo e inativo.....	37
Figura 6 -	Principais fatores envolvidos na ICX.....	39
Figura 7-	ncRNAs responsáveis pelo processo de ICX em camundongos e humanos.	41
Figura 8 -	Estrato evolutivo e genes que escapam à ICX.	42
Figura 9 -	Tipos de ICX com desvio.	45
Figura 10-	Aumento da associação de genes ligados à DI com a inserção das tecnologias de <i>array</i> -CGH e Sequenciamento de nova geração.	49
Figura 11 -	Representação de CNVs recorrentes e não recorrentes observadas nas condições genômicas.....	50
Figura 12 -	Genes no cromossomo X associados à DI.	52
Figura 13 -	Fluxograma metodológico realizado no presente estudo.....	57
Figura 14 -	Sítio de restrição da endonuclease <i>HhaI</i>	60
Figura 15 -	Fórmula para cálculo do desvio de ICX.	63
Figura 16 -	Etapas de filtragem das variantes obtidas por WES.	66
Figura 17 -	Região do gene <i>XIST</i> sequenciada e iniciadores.....	68
Figura 18 -	Etapas da técnica de MLPA com os volumes, reagentes e ciclagens utilizadas nas reações para os kits P036, P070 e P245.....	71
Figura 19 -	Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos da PCR <i>biplex</i>	74
Figura 20 -	Distribuição dos percentuais de ICX na amostra de mulheres com DI .	74
Figura 21 -	Eletroferograma da paciente 4398 com desvio de ICX moderado	75
Figura 22 -	Eletroferograma da paciente 4329 com desvio extremo de ICX (acima de 90%).....	76

Figura 23 -	Eletoferograma da paciente 4330 homozigota para o polimorfismo do gene <i>AR</i> e heterozigota para o gene <i>RP2</i>	77
Figura 24 -	Heredograma da família 4311 e perfil de ICX	80
Figura 25 -	Sequenciamento de Sanger para o gene <i>HDAC8</i>	81
Figura 26 -	Heredograma da família 4313 e perfil de ICX	82
Figura 27 -	Sequenciamento de Sanger para o gene <i>NLGN4X</i>	83
Figura 28 -	Heredograma da família 4329 e perfil de ICX	84
Figura 29 -	Sequenciamento de Sanger para o gene <i>TAF1</i>	85
Figura 30 -	Heredograma da família 4489 e perfil de ICX	87
Figura 31 -	Sequenciamento de Sanger para o gene <i>USP9X</i>	87
Figura 32 -	Heredograma da paciente 4351 e perfil de ICX	89
Figura 33 -	Resultado do <i>array</i> -CGH da paciente 4351	90
Figura 34 -	Resultado da qPCR da paciente 4351	91
Figura 35 -	Heredograma da paciente 4517 e perfil de ICX	92
Figura 36-	Eletoforese em gel de agarose 1% com produtos da PCR para sequenciamento do gene <i>XIST</i>	93
Figura 37 -	Análise do marcador <i>XIST1</i>	94
Figura 38 -	Polimorfismo rs41305409 identificado na região do marcador <i>XIST3</i> na paciente 4351.....	95
Figura 39 -	Resultado da MLPA da paciente 4306.....	97
Figura 40 -	Genes situados na região subtelomérica 22q13.3.	97
Figura 41 -	Resultado da MLPA da paciente 4327	98
Figura 42 -	Resultado da MLPA da paciente 4390.....	100
Figura 43 -	Resultado da <i>array</i> -CGH da paciente 4390	101
Figura 44 -	Genes envolvidos na deleção da paciente 4390.....	102
Figura 45 -	Resultado da MLPA e qPCR da paciente 4487	103
Figura 46-	Localização dos genes em 5p presentes nos kits de MLPA testados.	103
Figura 47 -	Resultado da MLPA da paciente 4488.....	105
Figura 48 -	Genes envolvidos na deleção presente no cromossomo X da paciente 4488 (Xq25-28).	105
Figura 49 -	Genes envolvidos na duplicação presente no cromossomo 2 da paciente 4488	106

Figura 50 - CNVs encontrada na paciente 4488, sugerindo uma translocação 2:X	106
Figura 51 - Resultado de MLPA da paciente 4531	107
Figura 52 - Localização dos genes presentes na região subtelomérica 20p13	108
Figura 53 - Resultado da MLPA da paciente 4545	109
Figura 54 - Localização dos genes presentes na região subtelomérica 18q23	109
Figura 55 - Região da deleção em 3q26 encontrada em nosso estudo	127
Figura 56- Comparativo das repetições de baixo número de cópias (LCRs) encontradas em paciente com a Síndrome de Deleção de 22q11.21	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Genes e elementos reguladores que estão envolvidos no processo de ICX em camundongos e humanos, através da atuação direta com o processo de ICX ou na interação com proteínas e demais elementos que atuam no processo.....	38
Tabela 2 -	Diferenças entre humanos e camundongos quanto à ICX	40
Tabela 3 -	Concentrações e reagentes usados para as PCRs <i>biplex</i>	61
Tabela 4 -	Ciclagens usadas para as PCRs <i>biplex</i>	61
Tabela 5 -	Ciclagens usadas para as PCRs do sequenciamento de confirmação do WES.....	67
Tabela 6 -	Ciclagens usadas para as PCRs do sequenciamento do gene <i>XIST</i> .	68
Tabela 7 -	Ciclagem da reação de sequenciamento.	69
Tabela 8 -	Perfil de inativação das amostras com desvio de ICX moderado para ambos os genes <i>AR</i> e <i>RP2</i>	74
Tabela 9 -	Perfil de ICX (sangue e mucosa bucal) das amostras de mulheres com DI com desvio extremo ($\geq 90\%$) em ambos os genes <i>AR</i> e <i>RP2</i>	77
Tabela 10 -	Perfil de ICX (sangue e mucosa bucal) nas amostras das mães das pacientes com DI que apresentaram desvio extremo de ICX	78
Tabela 11 -	Resultados obtidos através do <i>array-CGH</i> e WES nas pacientes que apresentaram desvio extremo de ICX.....	79
Tabela 12 -	Alterações encontradas através da metodologia de MLPA.....	96
Tabela 13-	Comparação da prevalência de desvio de ICX entre diferentes estudos.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3'UTR	Região 3' não traduzida (<i>3' untranslated region</i>)
5'UTR	Região 5' não traduzida (<i>5' untranslated region</i>)
A	Adenina
AR	Gene <i>Androgen Receptor</i>
Array-CGH	Hibridação genômica comparativa por microarranjo (<i>Array-Comparative Genome Hybridization</i>)
ASD	Transtornos do espectro autista (<i>Autism Spectrum Disorder</i>)
ATRX	Gene <i>ATRX, Chromatin Remodeler</i>
C	Citosina
CNV	Variação do número de cópias gênicas (<i>Copy Number Variation</i>)
CpG	Citosinas e guaninas ligadas covalentemente
Ct	Limiar de ciclos (<i>Cycle threshold</i>)
CTCF	Gene <i>CCCTC-Binding Factor</i>
CUX1	Gene <i>Cut Like Homeobox 1</i>
DGV	Base de dados de variantes genômicas (<i>Database of Genomic Variants</i>)
DI	Deficiência Intelectual
DILX	Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X
DILX-NS	Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X Não Sindrômica
DILX-S	Deficiência Intelectual Ligada ao cromossomo X Sindrômica
DMAP1	Gene <i>DNA Methyltransferase 1 Associated Protein 1</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT1	Gene <i>DNA Methyltransferase 1</i>
DNMT3A	Gene <i>DNA Methyltransferase 3 Alpha</i>
DNMT3B	Gene <i>DNA Methyltransferase 3 Beta</i>
EED	Gene <i>Embryonic Ectoderm Development</i>
ESCO2	Gene <i>Establishment of Sister Chromatid Cohesion N-Acetyltransferase 2</i>
Exac	Base de dados do Consórcio de Exomas (<i>Exome Aggregation Consortium</i>)
Firre	Gene <i>Intergenic Repeating RNA Element</i>

FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
<i>Ftx</i>	Gene <i>Five Prime to XIST</i>
G	Guanina
GnomAD	Base de dados genômica (<i>Genome Aggregation Database</i>)
GRCh37/hg19	Referência 37 do genoma humano (<i>Genome Reference Consortium Human Build 37, Human genome reference 19</i>)
<i>H2AFY</i>	Gene <i>H2A Histone Family Member Y</i>
HDAC	Desacetilases de histonas
<i>HDAC8</i>	Gene <i>Histone Deacetylase 8</i>
<i>HhaI</i>	Endonuclease extraída de <i>Haemophilus haemolyticus</i>
<i>HNRNPK</i>	Gene <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K</i>
<i>HNRNPU</i>	Gene <i>Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U</i>
<i>HPRT</i>	Gene <i>Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
HUGG/UNIRIO	Hospital Universitário Gaffrée e Guinle – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ICX	Inativação do cromossomo X
Indel	Variantes de inserções ou deleções
IPPMG/UFRJ	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira– Universidade Federal do Rio de Janeiro
<i>JARID2</i>	Gene <i>Jumonji and AT-Rich Interaction Domain Containing 2</i>
<i>Jpx</i>	Gene <i>Just Proximal to XIST</i>
kb	Quilobase
kg	Quilogramas
<i>Klf4</i>	Gene <i>Kruppel Like Factor 4</i>
<i>LBR</i>	Gene <i>Lamin B Receptor</i>
LCR	Repetição com baixo número de cópias (<i>Low Copy number Repeat</i>)
LOH	Perda de heterozigose (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
M	Molar
Mb	Megabase
MAF	Frequência alélica menor (<i>Minor Allele Frequency</i>)
<i>MECP2</i>	Gene <i>Methyl-CpG Binding Protein 2</i>
miRNA	MicroRNA

MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependentes de ligação (<i>Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification</i>)
mM	Milimolar
mu	Mutado
NAHR	Recombinação homóloga não-alélica
<i>Nanog</i>	Gene <i>Nanog Homeobox</i>
<i>NCOR2 (SMRT)</i>	Gene <i>Nuclear Receptor Corepressor 2</i>
ncRNA	RNA longo não codificante
<i>NLGN4X</i>	Gene <i>Neurologin 4 X-Linked</i>
OMIM	Base de dados de herança mendeliana (<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)
p	Braço cromossômico curto
PAR1	Região pseudoautossômica 1
PAR2	Região pseudoautossômica 2
pb	Par de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PcG	Grupo <i>Polycomb</i>
<i>PML</i>	Gene <i>Promyelocytic Leukemia</i>
<i>PRDM14</i>	Gene <i>PR/SET Domain 14</i>
PX	Proto cromossomo X
PY	Proto cromossomo Y
q	Braço cromossômico longo
qPCR	PCR em tempo real quantitativa
<i>RBFA</i>	Gene <i>Ribosome Binding Factor A</i>
<i>Rbm15</i>	Gene <i>RNA Binding Motif Protein 15</i>
<i>Rex1</i>	Gene <i>RNA Exonuclease 1 Homolog</i>
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento completo de RNA (transcriptoma)
<i>RNF12 (RLIM)</i>	Gene <i>Ring Finger Protein (LIM Domain Interacting)</i>
RP2	Gene <i>Retinitis Pigmentosa 2</i>
RPM	Rotações por minuto
<i>SATB1</i>	Gene <i>SATB Homeobox 1</i>
<i>SATB2</i>	Gene <i>SATB Homeobox 2</i>

scRNA-seq	<i>Single-cell RNA-seq</i>
SERVGEN	Serviço de Genética Humana/UERJ
SHOX	Gene <i>Short Stature Homeobox</i>
SMC1A	Gene <i>Structural Maintenance of Chromosomes 1A</i>
SMCHD1	Gene <i>Structural Maintenance of Chromosomes Flexible Hinge Domain Containing 1</i>
SNP	Polimorfismos de único nucleotídeo (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>)
STR	Repetições pequenas em tandem (<i>Short Tandem Repeats</i>)
SOX12	Gene <i>SRY-Box 12</i>
SOX2	Gene <i>SRY-Box 2</i>
SPEN	Gene <i>Spen Family Transcriptional Repressor</i>
T	Timina
TAD	Domínios topologicamente associados
TAF1	Gene <i>TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1</i>
TBE	Tampão Tris, ácido bórico e EDTA
TFIID	Fator de transcrição basal
TERT	Gene <i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>
Tris	Trihidroximetil aminometano
Tsix	Gene <i>Xist antisense RNA</i>
UCSC	Universidade da Califórnia – Santa Cruz (University of California Santa Cruz)
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
USP	Universidade de São Paulo
USP9X	Gene <i>Ubiquitin Specific Peptidase 9 X-Linked</i>
WES	Sequenciamento de exoma total (<i>Whole Exome Sequencing</i>)
WTAP	Gene <i>WT1 Associated Protein</i>
wt	Selvagem
Xa	Cromossomo X ativo
Xi	Cromossomo X inativo
XIC	Centro de inativação do cromossomo X (<i>X Inactivation Center</i>)
XIST	Gene <i>X inactive specific transcript</i>
YY1	Gene <i>YY1 Transcription Factor</i>
ZFP42	Gene <i>Zinc Finger Protein 42</i>

$\Delta\Delta C_t$	Método comparativo para análise de dados quantitativos
ng	Nanograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	22
1.	OBJETIVOS	55
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	56
2.1.	Considerações éticas	56
2.2.	Grupo Amostral	56
2.3.	Obtenção das amostras para as análises moleculares	57
2.3.1.	<u>Coleta de sangue periférico e de mucosa bucal</u>	57
2.3.2.	<u>Extração de DNA a partir de sangue periférico</u>	58
2.3.3.	<u>Extração de DNA a partir de mucosa bucal</u>	58
2.3.4.	<u>Quantificação das amostras</u>	58
2.4.	Ensaio de inativação do cromossomo X	59
2.4.1.	<u>Testes estatísticos</u>	63
2.5.	Array-Comparative Genome Hybridization	63
2.6.	Sequenciamento de Exoma Total (WES)	64
2.6.1.	<u>Seleção de Variantes para Validação</u>	65
2.7.	Sequenciamento de Sanger	66
2.7.1.	<u>Validação dos dados do WES</u>	67
2.7.2.	<u>Sequenciamento de Sanger para o gene <i>XIST</i></u>	67
2.7.3.	<u>Purificação dos produtos da PCR e reação de sequenciamento</u>	69
2.8.	Detecção de variações no número de cópias gênicas a partir do <i>Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification</i>	70
2.9.	PCR em tempo real quantitativa	71
3.	RESULTADOS	73
3.1.	Ensaio de inativação do cromossomo X	73
3.2.	Investigação das causas de desvios extremos de ICX nas mulheres com DI	79
3.2.1.	<u>Variante <i>missense</i> em <i>HDAC8</i> – Paciente 4311</u>	80
3.2.2.	<u>Variante <i>missense</i> em <i>NLGN4X</i> – Paciente 4313</u>	81
3.2.3.	<u>Variante <i>missense</i> em <i>TAF1</i> – Paciente 4329</u>	84
3.2.4.	<u>Inserção <i>frameshift</i> em <i>USP9X</i> – Paciente 4489</u>	86
3.2.5.	<u>Deleção em 3q26 – Paciente 4351</u>	88
3.2.6.	<u>Paciente 4517</u>	92

3.3.	Sequenciamento do gene <i>XIST</i>	93
3.4.	Análise das variações do número de cópias gênicas	95
3.4.1.	<u>Duplicação em 22q13.3 – Paciente 4306</u>	96
3.4.2.	<u>Duplicação em Xp22.33 – Paciente 4327</u>	98
3.4.3.	<u>Deleção em 22q11.2 – Paciente 4390</u>	99
3.4.4.	<u>Duplicação em 5p15.33 – Paciente 4487</u>	102
3.4.5.	<u>Deleção em Xq28 – Paciente 4488</u>	104
3.4.6.	<u>Deleção em 20p13 – Paciente 4531</u>	107
3.4.7.	<u>Deleção em 18q23 – Paciente 4545</u>	109
4.	DISCUSSÃO	111
4.1.	Aplicação de nova metodologia para estudo de ICX em mulheres com DI	111
4.2.	Desvios de inativação do cromossomo X	112
4.2.1.	<u>Avaliação das mães das mulheres com desvio extremo de ICX</u>	116
4.3.	Variantes detectadas a partir dos desvios extremos de inativação do cromossomo X	117
4.3.1.	<u>Variante <i>missense</i> no gene <i>HDAC8</i> – Paciente 4311</u>	117
4.3.2.	<u>Variante <i>missense</i> no gene <i>NLGN4X</i> - Paciente 4313</u>	120
4.3.3.	<u>Variante <i>missense</i> no gene <i>TAF1</i> – Paciente 4329</u>	121
4.3.4.	<u>Inserção <i>frameshift</i> no gene <i>USP9X</i> – Paciente 4489</u>	123
4.3.5.	<u>CNVs patogênicas - Translocação 2:X – Paciente 4488</u>	125
4.3.6.	<u>CNVs patogênicas - deleção em 3q26 – Paciente 4351</u>	126
4.4.	Sequenciamento do gene <i>XIST</i>	128
4.5.	Alterações no número de cópias gênicas	129
4.5.1.	<u>Duplicação em 22q13.3 – Paciente 4306</u>	131
4.5.2.	<u>Duplicação em Xp22.33 – Paciente 4327</u>	132
4.5.3.	<u>Deleção em 22q11.21 – Paciente 4390</u>	133
4.5.4.	<u>Duplicação em 5p15.33 – Paciente 4487</u>	134
4.5.5.	<u>Deleção em 20p13 – Paciente 4531</u>	135
4.5.6.	<u>Deleção em 18q23 – Paciente 4545</u>	137
	CONCLUSÕES	140
	REFERÊNCIAS	141
	ANEXO A – Sequência dos iniciadores usados de outros trabalhos	157
	ANEXO B – Sondas dos Kits de MLPA	158

APENDICE A – Iniciadores desenhados para este trabalho	161
APENDICE B - Resultados individuais <i>Array</i>-CGH e MLPA	162
APENDICE C – Perfil de ICX para das mulheres com DI.....	165
APENDICE D – Predições <i>in silico</i> das variantes encontradas por WES	167

INTRODUÇÃO

A inativação do cromossomo X (ICX) é um mecanismo complexo, regido por fatores genéticos e epigenéticos, que foi descrito primeiramente por Mary Lyon (LYON, 1961). De acordo com a Lei de Lyon, esse mecanismo ocorre em células somáticas femininas como uma compensação de dose para que não haja expressão duplicada dos genes do cromossomo X no sexo homogamético em relação ao heterogamético.

Embora um dos cromossomos X seja inativado, uma parcela de genes neste cromossomo permanece ativo em diferentes estratos, escapando à ICX (BALATON; COTTON; BROWN, 2015). Além disso, devido à ICX, as mulheres passam a ser mosaicos para as suas populações celulares, apresentando parte das células com a linhagem do X paterno ativa e parte das células com a linhagem do X materno ativa, em uma proporção esperada de 50% para cada linhagem celular. Todavia, desvios do perfil aleatório de ICX podem ser evidenciados, fazendo com que uma população celular de uma determinada origem parental seja preferida em detrimento da outra (MUSALKOVA *et al.*, 2015). Neste contexto, desvios de ICX têm sido associados a uma série de condições clínicas como doenças autoimunes, distrofias musculares ligadas ao X, Síndrome de Rett, insuficiência ovariana prematura idiopática e deficiência intelectual (DI) (FIEREMANS *et al.*, 2014; KANAAN *et al.*, 2016; VACCA *et al.*, 2016; VIGGIANO *et al.*, 2016, 2017; MIRANDA-FURTADO *et al.*, 2018).

A DI tem uma incidência populacional mundial de 2% a 3% e possui diversos fatores etiológicos a ela associados, sendo 50% dos casos atribuídos a causas genéticas, 10% a causas de exposição pré-natal, 10% a complicações perinatais, 5% a causas adquiridas e 25% ainda encontram-se sem causa atribuída (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2013; MARRUS; HALL, 2017). Contudo, há muito se reconhece que o número de homens com DI supera em aproximadamente 30% o número de mulheres (STEVENSON *et al.*, 2000), o que aponta para a participação de genes no cromossomo X nessa condição. Indivíduos do sexo masculino, por serem hemizigotos para genes localizados nesse cromossomo, são mais suscetíveis a expressarem alterações genéticas no cromossomo X. Além disso, o cromossomo X de mamíferos é enriquecido em genes envolvidos em funções neurológicas (DENG *et al.*, 2014). Assim, mulheres portadoras de mutações no cromossomo X geralmente

não são tão severamente afetadas, devido à compensação causada pela inativação do cromossomo X e ainda à presença de um cromossomo X normal. Com isso, pouco se sabe a respeito de genes nesse cromossomo que possam causar DI em indivíduos do sexo feminino. Sendo assim, nesse estudo, exploramos genes e mecanismos moleculares relacionados à DI em mulheres, usando como ponto de partida desvios extremos de ICX.

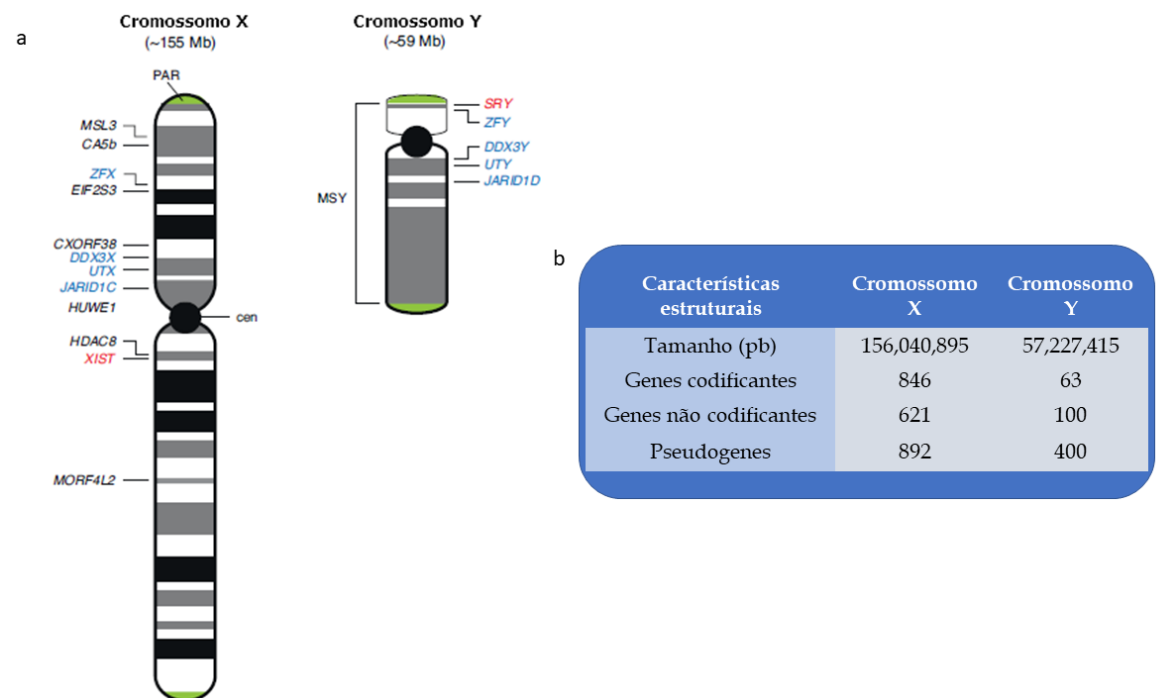
Inativação do cromossomo X

Histórico

O sexo dos mamíferos eutérios e metatérios é determinado por cromossomos heteromórficos, de modo que os machos apresentam um cromossomo X e um cromossomo Y, enquanto que as fêmeas possuem dois cromossomos X. Acredita-se, portanto, que as primeiras evidências que resultaram nos cromossomos sexuais distintos surgiram há cerca de 181 milhões de anos a partir de um par de autossomos ancestrais comuns a mamíferos placentários e marsupiais (CORTEZ *et al.*, 2014).

Ao longo do processo evolutivo, o cromossomo X humano foi conservado em tamanho (156 Mb), compreendendo cerca de 4% do conteúdo haploide do genoma humano, o que totaliza 846 genes codificantes de proteínas. Por outro lado, o cromossomo Y humano teve seu tamanho degenerado, possuindo atualmente cerca de 57 Mb e 63 genes codificantes de proteínas, o que representa menos de 2% de todo o conteúdo genômico (Figura 1) (Ensembl *release* 94, 2018). Mesmo com a redução significativa do cromossomo Y, os cromossomos X e Y de mamíferos mantiveram pequenas regiões de homologia. Essas regiões se encontram principalmente no início e fim de cada cromossomo, denominadas regiões pseudo-autossômicas (PAR1 e PAR2). As PARs se comportam como regiões autossômicas, se recombinando durante a meiose. Isso faz com que essas regiões não sejam estritas ao sexo. A PAR1, situada no braço curto dos cromossomos X e Y, representa aproximadamente 2,7 Mb do conteúdo cromossômico, enquanto que a PAR2, situada na extremidade do braço longo dos cromossomos X e Y, possui apenas 320 kb (MANGS; MORRIS, 2007).

Figura 1 - Características dos cromossomos X e Y atuais. (a) Ideogramas dos cromossomos X e Y; (b) Características estruturais dos cromossomos X e Y



Legenda: região específica masculina (MSY), regiões pseudoautossômicas (PAR).

Nota: as marcações em verde representam as regiões pseudoautossômicas de recombinação entre ambos os cromossomos, denominadas PAR1 e PAR2. A maior área do cromossomo Y não sofre recombinação, denominada MSY. Os genes que aparecem em vermelho são alguns dos quais apresentam expressão exclusiva em homens (SRX) ou em mulheres (XIST); genes em azul escapam à ICX em mulheres e possuem homologia com o cromossomo Y; genes em preto representam alguns dos genes que escapam à ICX e não possuem homólogos no cromossomo Y.

Fonte: adaptada de Wijchers e Festenstein, 2011 e dados do Ensembl (release 94, 2018).

A PAR1 representa grande importância na recombinação X:Y e a falta dessa recombinação já foi associada à infertilidade em homens (SHI *et al.*, 2001). Outro erro frequente causado pela ausência da recombinação X:Y ou de não disjunção XY é a aneuploidia conhecida como síndrome de Klinefelter (47,XXY) (HALL; HUNT; HASSOLD, 2006). Evolutivamente, acreditava-se que a PAR1 era estável durante a maior parte da evolução dos primatas. No entanto, estudos recentes demonstraram uma translocação de uma região de 110 kb do cromossomo X em homens que carregam uma PAR1 estendida (ePAR), demonstrando que os limites de PAR1 não permaneceram estáticos nos humanos atuais (MENSAH *et al.*, 2014; PORISWANISH *et al.*, 2018). Além disso, outro trabalho recente com o uso de transcriptoma dos cromossomos X e Y em diversos tecidos demonstrou que há uma super-expressão de genes presentes na região PAR1 do cromossomo Y, quando comparados com

aqueles do cromossomo X (TUKIAINEN *et al.*, 2017). Dessa forma, mesmo ocorrendo expressão de ambas as regiões PAR1 dos cromossomos X, a expressão masculina de PAR1 ainda é superior à feminina (TUKIAINEN *et al.*, 2017).

Como os cromossomos X de mamíferos apresentam uma extensa região específica que não sofrem recombinação, as fêmeas por apresentarem um par de cromossomos sexuais homogaméticos precisam equalizar essa dose gênica. Assim, as fêmeas realizam um mecanismo de compensação de dose em suas células somáticas para que não haja expressão duplicada dos genes do cromossomo X em relação aos machos. Esse mecanismo é denominado de ICX.

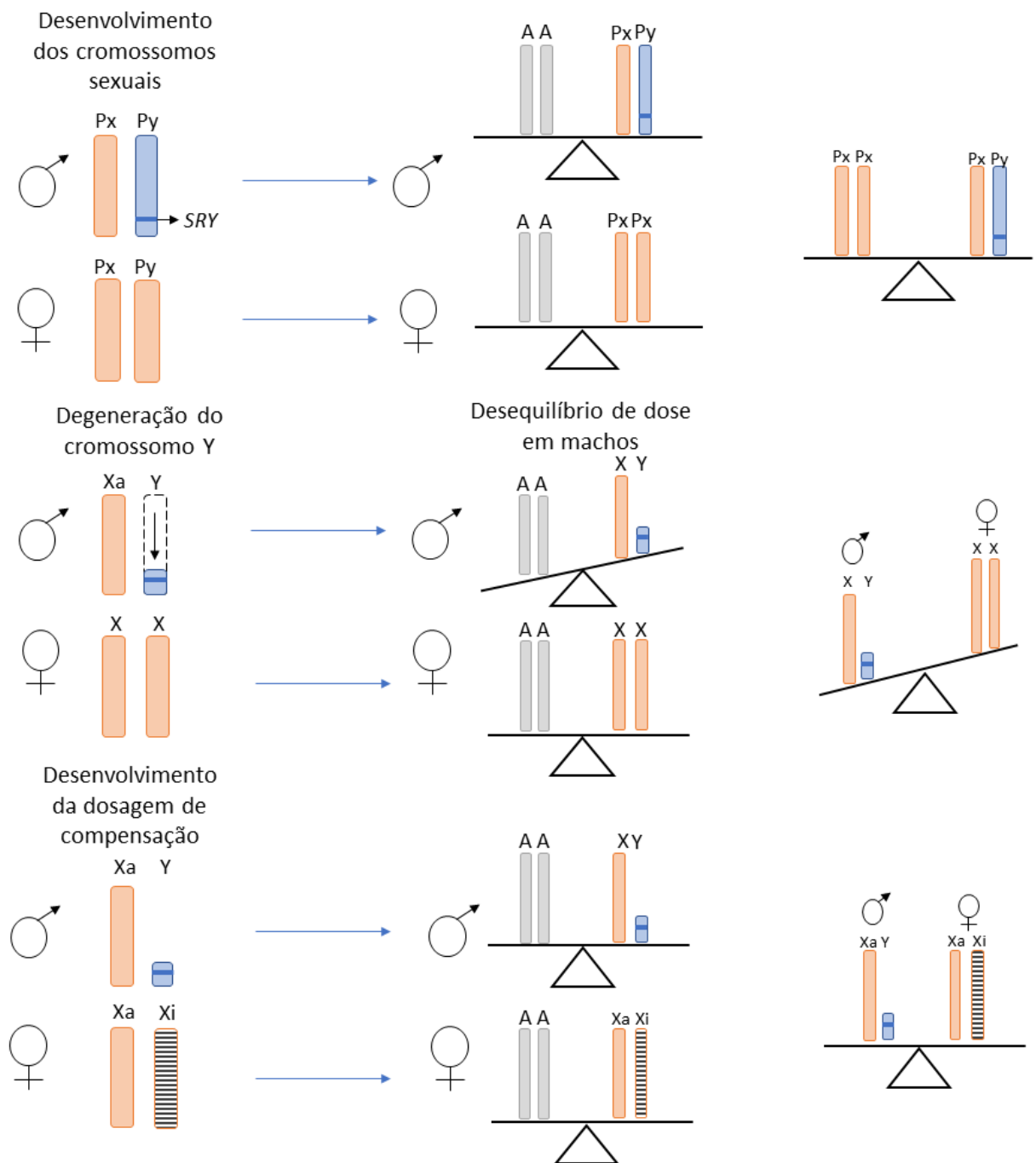
O mecanismo de ICX foi descoberto através de observações em camundongos fêmeas que apresentavam uma mutação em um gene ligado ao cromossomo X que controla a cor do pelo (LYON, 1961). No ano seguinte a essa constatação, Mary Lyon publicou um artigo mais detalhado sobre suas observações, sugerindo que o processo de ICX ocorre no estágio embrionário e de maneira aleatória, ou seja, tanto o cromossomo X materno, quanto o X paterno podem ser inativados, mas uma vez definida a origem parental do X inativo, esse permanece inativo por todas as divisões celulares subsequentes. Dessa forma, as fêmeas adultas são mosaicos quanto à expressão de genes do cromossomo X. Um exemplo perceptível desse padrão em forma de mosaico pode ser visto nas gatas cálico. Essas fêmeas possuem uma pelagem alternada em manchas brancas, alaranjadas e pretas, que correspondem a duas populações de células, uma que possui cromossomos X, nos quais o alelo responsável pela cor alaranjada está ativo e outra, na qual o alelo responsável pela cor preta está ativo. Já os machos, não exibem uma coloração de pelo alternada por possuírem apenas um cromossomo X. Nesse trabalho, Lyon evidenciou também que a ICX garante que apenas um cromossomo X esteja ativo por grupo diploide. Até mesmo nos casos de polissomia do X, os cromossomos X adicionais se apresentam inativos formando na periferia das células o corpúsculo de Barr, também conhecido como cromatina sexual (LYON, 1962).

Além do processo de ICX, em 1967, Susumu Ohno elaborou uma proposição de que o conteúdo gênico do cromossomo X deveria ser expresso duas vezes para compensar a dosagem gênica entre os cromossomos sexuais e autossomos. Inicialmente, machos e fêmeas eram cromossomicamente indistinguíveis e o sexo era determinado por mecanismos ambientais como conhecemos até hoje em algumas espécies (PAYER; LEE, 2008). O proto cromossomo X (PX) e o proto cromossomo Y

(PY) surgiram a partir de um par de autossomos ancestrais. Através das análises dos genes presentes nos cromossomos sexuais humanos evidencia-se que o PY sofreu grandes inversões, o que progressivamente impediu que grandes regiões sofressem recombinação X/Y. Com o processo de degeneração gradativa e ganho de um gene determinante sexual no Py (*SRY – sex determining region Y*), as regiões palindrômicas presentes no cromossomo Y ajudaram a reter genes específicos no cromossomo Y, mas também facilitaram deleções e perdas gênicas (DISTECHE, 2016). Com essa degeneração, muitos genes do cromossomo X ficaram em haploinsuficiência, gerando um desequilíbrio genético em relação aos autossomos, tanto em machos como em fêmeas. Para controlar esse desbalanço, Ohno afirma que seria necessário que os mamíferos mantivessem duas compensações de dose: a ICX nas fêmeas e uma superdosagem do único X presente nos machos e do único X ativo das fêmeas para compensar a dose em relação aos autossomos. Atualmente, essa observação é conhecida como Hipótese de Ohno e sugere que os genes do cromossomo X são superexpressos para balancear o desequilíbrio genético entre autossomos e cromossomos sexuais, com a perda de genes no cromossomo Y (Figura 2) (OHNO, 1967; PAYER; LEE, 2008).

Com o avanço recente das técnicas moleculares, a hipótese de Ohno pôde ser testada experimentalmente. Em uma análise de *microarray* com humanos e camundongos, realizada por Nguyen e Disteché (2006), foi verificado que a relação de expressão X:autossomos era de aproximadamente 1, conforme o proposto por Ohno. No entanto, recentemente, Wang e colaboradores (2017) usaram dados de transcriptomas (RNA-seq) de duas linhagens distantes de camundongos com o objetivo de avaliar a ICX randômica *in vivo* e refutaram a hipótese de Ohno. Através do estudo, eles observaram que no estágio pós-implantação do camundongo não havia uma super-expressão do X em relação aos autossomos (WANG *et al.*, 2017).

Figura 2 - Esquema representativo da evolução dos cromossomos sexuais de acordo com a Hipótese de Ohno (1967)



Legenda: Xa: X ativo; Xi: X inativo; PX: proto-cromossomo X; PY: proto-cromossomo Y.

Nota: Na primeira etapa, o surgimento do gene *SRY* em uma cópia do autossomo ancestral. Esses "proto-cromossomos" (PX e PY) compartilhavam muitos genes e não havia diferença de dosagem entre eles. Com a supressão parcial de recombinação PX:PY através de inversões cromossômicas, houve degeneração do cromossomo Y (segunda etapa), ocasionando um desequilíbrio genético em relação aos autossomos e entre os cromossomos sexuais. Assim, os mamíferos desenvolveram duas compensações de dose, através das quais os genes do X foram superexpressos para equilibrar a dose com autossomos e as fêmeas inativam um dos cromossomos X para equalizar a expressão de genes deste cromossomo em relação aos machos.

Fonte: A Autora, 2019 (baseado em Payer & Lee, 2008).

Tipos de inativação do cromossomo X

O processo de ICX é realizado por todos os mamíferos eutérios. Dentre estes, o mecanismo de ICX é melhor compreendido em camundongos, tanto pela facilidade de acesso aos tecidos envolvidos, como pela viabilidade de manipulação experimental na embriogênese. Isto se dá porque a maioria das células humanas embrionárias disponíveis para estudos já sofreram o processo de ICX ou não remetem perfeitamente as propriedades das células de epiblasto durante a pré-implantação (COLLIER *et al.*, 2017; PATEL *et al.*, 2017).

O protagonista da ICX é um *locus* no cromossomo X denominado de “Centro de Inativação do X” (XIC) que está associado a uma complexidade de eventos genéticos e epigenéticos. O primeiro candidato descrito como responsável pela inativação de um dos cromossomos X no XIC foi o gene *XIST*, localizado em Xq13.2 (BROWN *et al.*, 1991). Durante o desenvolvimento embrionário em mulheres, o *XIST* gera um transcrito longo não codificante de 18 kb que fica retido no núcleo e se associa *in cis* ao cromossomo X a ser inativado e a partir do qual é exclusivamente expresso (BROCKDORFF *et al.*, 1992; SMOLA *et al.*, 2016). Por outro lado, em camundongos o cromossomo X que permanece ativo expressa o gene *Tsix*, antisenso do *Xist*. Esse transcrito é requerido para silenciar o transcrito *Xist* no cromossomo X que precisa estar ativo, protegendo assim o cromossomo de ser inativado, sendo funcional tanto em machos quanto em fêmeas (GAYEN *et al.*, 2015). Inicialmente, foi proposto que o *Tsix* também influenciaria a escolha do X que permanece ativo e orquestraria o início da ICX (AVNER; HEARD, 2001). Essa relação do *Tsix* com a ICX foi estabelecida em experimentos com nocautes heterozigotos para *Tsix*, que resultaram em desvio completo de ICX a favor do cromossomo X que possui uma mutação (LEE; LU, 1999; LEE, 2005). No entanto, estudos mais recentes indicam que o *Tsix* é reprimido na fase de epiblasto, de modo que o início do mecanismo de ICX é independente de sua expressão, sendo responsável por proteger o X ativo do silenciamento por *Xist*, após o início da ICX (GAYEN *et al.*, 2015).

Como a transcrição em eucariotos geralmente envolve múltiplos elementos reguladores de longo alcance e é influenciada pelo ambiente genômico, recentemente, a ICX foi associada a elementos denominados domínios associados topologicamente (TADs, do inglês *Topologically Associated Domains*). Os TADs são

unidades de cromossomos organizadas e limitadas pela proteína CTCF, que são separadas e permitem um maior contato físico entre os genes e elementos reguladores situados nesses domínios (DIXON *et al.*, 2012; NORTON; PHILLIPS-CREMINS, 2017). Esses TADs variam entre 200 kb a 1 Mb e estão presentes tanto antes quanto depois da diferenciação celular e nos cromossomos X ativo e inativo. Dessa maneira, os TADs que abrigam *Tsix* e *Xist* são adjacentes, e esses domínios facilitam a segregação espacial para abrigar cada um de seus reguladores positivos (NORA *et al.*, 2012).

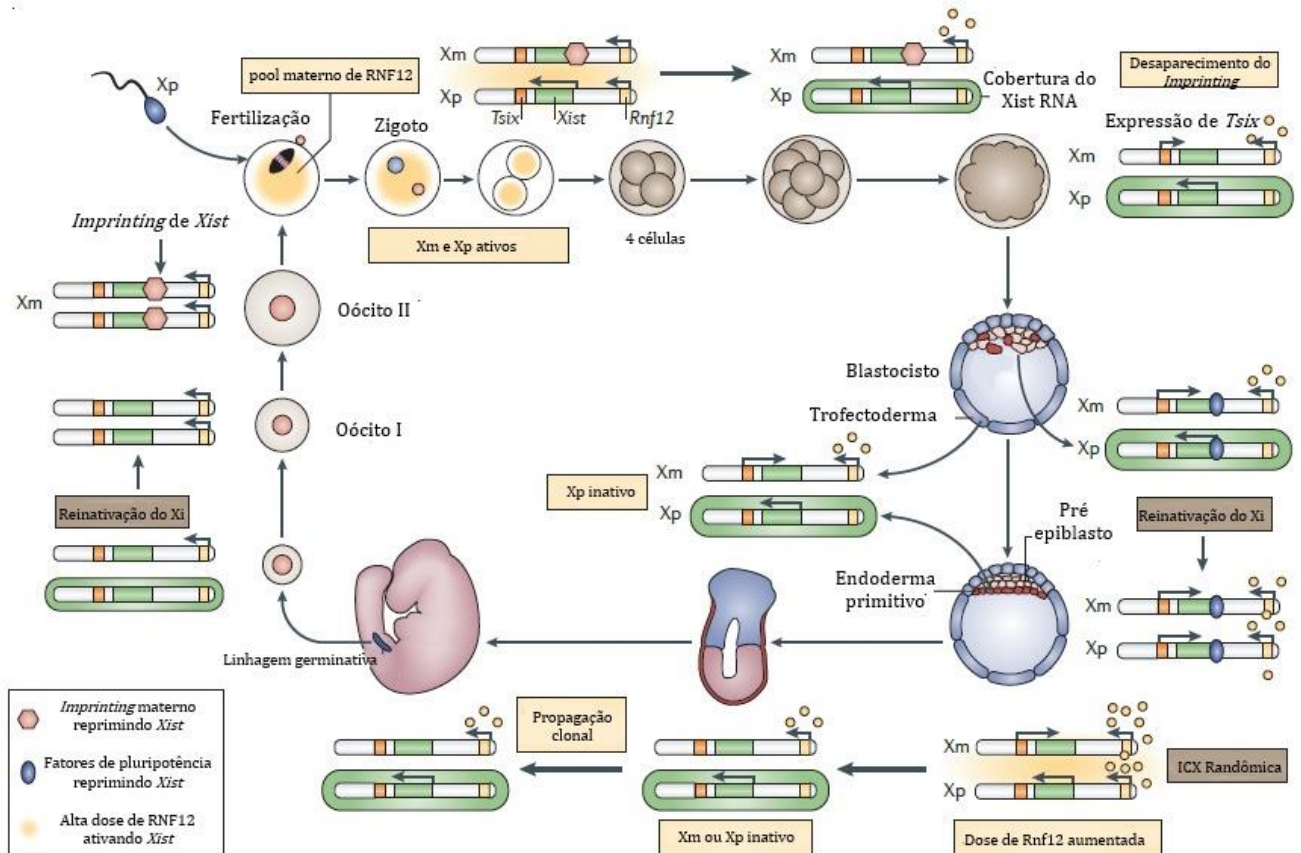
Um estudo recente realizado por um grupo brasileiro a partir de dados prévios de expressão utilizando-se *single cell* RNA-seq (scRNA-Seq) demonstrou que o início da ICX em embriões humanos ocorre antes do que se imaginava. A partir do estágio de oito células para o último estágio de blastocisto (7º dia do desenvolvimento embrionário) há um decréscimo da expressão de genes ligados ao cromossomo X, sendo consistente com o início mais precoce da ICX (MOREIRA DE MELLO *et al.*, 2017). Os dados usados por Moreira Mello e colaboradores (2017) foram obtidos através de uma publicação prévia que indicava que durante o processo de ICX ambos os cromossomos X tinham sua expressão reduzida, processo denominado como *dampening* por Petropoulos e colaboradores (2016). No entanto, os dados de scRNA-Seq utilizados para tais conclusões do processo de *dampening* possuíam uma baixa cobertura e profundidade. Através de ajustes dos dados pelo grupo brasileiro, ficou claro que a expressão bialélica dos genes ligados ao X diminui durante o desenvolvimento embrionário, rejeitando a hipótese proposta de *dampening* (MOREIRA DE MELLO *et al.*, 2017).

De uma maneira geral, dois tipos de ICX podem ser reconhecidos, pelo menos em camundongos: a inativação imprintada e a inativação randômica (Figura 3). Na inativação imprintada, o cromossomo X de origem paterna (XP) é silenciado no início do desenvolvimento embrionário de camundongos (HUYNH; LEE, 2001). Esse estágio ocorre a partir de duas células, durante a pré-implantação do embrião. A inativação imprintada é essencial para que os tecidos extra-embrionários da placenta mantenham o XP inativo. Embriões femininos que apresentam alterações em *Xist* ou na proteína *polycomb* Eed falham no *imprinting* e morrem após a implantação por defeitos placentários (PAYER, 2016; BORENSZTEIN *et al.*, 2017). Os dados sobre a ICX imprintada em humanos são escassos e não há confirmação se esse processo ocorre em humanos. Um estudo brasileiro realizado com 22 placentas a termo e as

correspondentes amostras de mucosa bucal das mães doadoras avaliou 27 polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) presentes em 22 genes expressos em placentas. Os autores inferiram que a expressão dos genes ligados ao X na placenta é heterogênea, pois não houve um padrão na expressão/inativação (MOREIRA DE MELLO *et al.*, 2010). Dados recentes de um estudo realizado por Hamada e colaboradores (2016), através da análise de metiloma e transcriptoma a partir de placentas e sangue materno, verificaram evidências consistentes com *imprinting* materno na placenta. No entanto, os autores também sugerem que isso pode ser efeito de um apagamento incompleto das marcas epigenéticas na linhagem germinativa da placenta (HAMADA *et al.*, 2016). Ainda assim, Hamada e colaboradores (2016) sugeriram que o estudo necessita de maiores comparações com diferentes grupos étnicos e com um maior grupo amostral, uma vez que a avaliação foi realizada em apenas 26 placentas e suas respectivas doadoras.

A ICX imprintada não é um processo permanente. No estágio de epiblasto do blastocisto tardio, a ICX imprintada é apagada nas células que darão origem ao embrião e ocorre uma reativação do cromossomo X. Contudo, o cromossomo X paterno continua inativo no trofoderma, endoderma primitivo e ectoderma extraembrionário. Em seguida, a ICX randômica ocorre na fase de gastrulação (epiblasto). Sendo assim, as células que formam o epiblasto se encontram com os dois cromossomos X ativos para a escolha da ICX que ocorre no estágio de gástrula. Dessa maneira, ambos os cromossomos X têm igual chance de sofrerem ICX (AVNER; HEARD, 2001; PAYER, 2016). Outro estágio no qual as marcas de ICX são apagadas é durante a formação das gônadas. Neste estágio, as células germinativas retornam ao estado de ativação em ambos os cromossomos X, pois passarão pelo processo de espermatogênese e ovocitogênese para a formação de gametas (PAYER, 2016). O *imprinting* do X materno (Xm) também desempenha uma importante função, marcando o futuro Xm durante a fase de crescimento do ovócito para assegurar que o Xm esteja protegido em ambos os embriões, XX e XY (LEE; BARTOLOMEI, 2013).

Figura 3 - O ciclo de inativação e reativação do cromossomo X durante o desenvolvimento embrionário de camundongos



Legenda: XP – X paterno; XM – X materno ativo; Xi – X inativo.

Nota: A ICX é iniciada a partir do estágio de duas células, com a inativação preferencial do X paterno (XP). O XP permanece inativo nos tecidos extraembrionários (trofoderma e placenta) e as marcas de ICX são apagadas nas células pré epiblasticas, as quais darão origem ao embrião. O estado inativo é mantido ao longo das divisões celulares, mas o X inativo é reativado durante a formação das células germinativas femininas. O *imprinting* e a inativação randômica são *Xist*-dependentes e ambos são iniciados somente através do recrutamento de *Rnf12* (ou *Rlim*). O pool materno de RNF12 é requerido para iniciar o *imprinting* da inativação do XP e duas cópias de *Rnf12* são requeridas para ativar *Xist* nos embriões femininos durante a ICX randômica.

Fonte: adaptada de Augui e colaboradores (2011).

Etapas de inativação randômica do cromossomo X

A ICX randômica é dividida nas seguintes etapas: contagem dos cromossomos X, escolha do X que será inativado, início da inativação, propagação da inativação e manutenção estável do estado inativo durante as divisões celulares subsequentes.

Contagem dos cromossomos

O mecanismo de contagem dos cromossomos X é a primeira etapa do processo de ICX randômica. O conhecimento sobre esta etapa ainda é limitado, mas acredita-se que elementos reguladores ligados ao X e autossômicos interajam para determinar a razão X:autossomos. Em 2009, um gene presente no cromossomo X em humanos e camundongos, à montante de *Xist*, denominado *Rlim/RLIM* ou *Rnf12/RNF12*, foi identificado como o responsável por realizar essa contagem para início da ICX (JONKERS *et al.*, 2009). O *Rnf12* atua como um fator dose dependente de *XIST*, funcionando como um ativador da ICX após a contagem. Dessa forma, um cromossomo X é mantido ativo por célula diploide, enquanto que todos os demais cromossomos X são inativados (regra n-1), como descrito nos primeiros achados de Mary Lyon (GENDREL; HEARD, 2011).

O *Jpx/JPX*, que é um dos genes presentes no XIC, tanto em camundongos como em humanos, escapa à ICX e também é associado ao processo de contagem X:autossomos. O *Jpx* é transcrito à montante de *Xist* e produz um longo RNA não codificante (ncRNA) que atua na ligação à CTCF e ativa o *Xist* pela remoção de CTCF. A CTCF é uma proteína autossômica de ligação ao RNA que define a razão X:autossomos em células pré-ICX, reprimindo assim a transcrição de *Xist* (SUN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2016).

Outro evento que é importante para a contagem no processo de ICX é o pareamento entre os cromossomos X, denominado “beijo cromossômico” (do inglês, *chromosome kissing*). É hipotetizado que durante o beijo cromossômico ambos os cromossomos X ativos no núcleo estejam em contato com autossomos por não possuírem territórios cromossômicos distintos ainda estabelecidos através dos TADs, e isso sinaliza para a manutenção de um X ativo para cada grupo diploide (RINČIĆ; IOUROV; LIEHR, 2016).

Escolha do cromossomo X

Após a contagem, a escolha do cromossomo X a ser inativado também é influenciada pelo beijo cromossômico, já que o posicionamento entre ambos os

cromossomos X sinaliza a escolha do X a ser inativo através da super expressão de *Xist* (CAVALLI, 2007). A escolha do X a ser inativado deve ser randômica e a probabilidade do X_m ou X_p ser escolhido é igual. Há exceções, nas quais polimorfismos ou mutações em genes do *XIC*, ou em outro(s) gene(s) envolvido(s) diretamente ou indiretamente na ICX, podem ocasionar uma preferência de inativação por um determinado cromossomo X. Uma vez que o cromossomo X for escolhido, elementos reguladores adicionais atuam para que o outro X não seja inativado. O *Rnf12*, gene que participa da contagem, também atua regulando fatores de pluripotência sintetizados por genes autossômicos e degrada repressores de *Xist*, o que pode estar relacionado com o marcador de pluripotência *Rex1*, que tem como papel ativar o *Tsix* e reprimir o *Xist* (NAVARRO *et al.*, 2010; BARAKAT *et al.*, 2011). Os fatores de pluripotência Oct4, Nanog e Sox2 também participam em *trans* desta regulação, através da ligação ao íntron 1 do *Xist* e regulando o *Rnf12* para ativar o *Xist* e inativar um dos cromossomos X (NAVARRO *et al.*, 2008; BARAKAT *et al.*, 2011).

Início da inativação do cromossomo X

O evento que marca o início da ICX é a expressão do *Xist* e seu acúmulo *in cis* no cromossomo X escolhido para ser inativo. Segundo van den Berg e colaboradores (2009), o início da ICX em embriões humanos foi mantido ao longo da evolução e no estágio de blastocisto a ICX já está presente.

Em 2013, Vallot e colaboradores identificaram um gene, denominado *XACT*, que produz um longo RNA não codificante nas células pluripotentes de humanos. Através deste estudo, verificaram que *XACT* é expresso pelo X ativo e o reveste. Além disso, na ausência de *XIST*, ele é expresso em ambos os cromossomos X. O *XACT* está localizado em Xq23, entre os genes *AMOT* e *HTR2C*. O *XACT* é pouco conservado entre mamíferos e ausente em camundongos, sendo associado ao processo de ICX aparentemente de modo primata-específico (VALLOT *et al.*, 2013).

O RNA de *XACT* é co-acumulado *in cis* com o *XIST* durante o desenvolvimento embrionário. Acredita-se que seu papel seja o de antagonizar a associação de *XIST* no processo da ICX. A fim de evitar uma nulissomia funcional nos estágios críticos durante o início do desenvolvimento humano, acredita-se que esse evento possa ter

evoluído para permitir uma estratégia alternativa de compensação de dose, uma vez que fêmeas com dois cromossomos X ativos são inviáveis (BORENSZTEIN *et al.*, 2017; VALLOT *et al.*, 2017). Uma vez que *XACT* é expresso em ambos os cromossomos X em células pluripotentes, é sugerido que seu papel seja o de controlar o início da ICX em humanos.

Dentre os genes presentes no XIC, o gene *Ftx* provavelmente possui um papel importante na ICX de camundongos, pois sua deleção gera regulação positiva de *Xist* no início da ICX. Dados recentes apontam que ele influencia a eficiência da atuação e expressão apropriada de *Xist* em *cis*. O *Ftx* está situado a montante de *Jpx* no XIC na TAD de *Xist*, produz várias isoformas de lncRNAs e hospeda *clusters* de miRNAs em seus introns (CHUREAU *et al.*, 2011; FURLAN *et al.*, 2018). A atuação de *Ftx* não é bem clara, uma vez que ele está presente na região reguladora *cis* atuante da ICX imprintada e é expresso no Xp inativo. No entanto, sua depleção não afeta a sobrevivência dos embriões ou a expressão de *Xist* e de outros genes ligados ao X na pré-implantação dos embriões femininos (SOMA *et al.*, 2014).

Um outro ncRNA não codificante, denominado *Linx*, foi associado com o início da ICX randômica em camundongos. O *Linx* é co-expresso com o *Tsix* no epiblasto e, como sua expressão não foi detectada em linhagens extra-embrionárias anteriormente, acredita-se que ele tenha uma função epiblasto-específica (NORA *et al.*, 2012). De acordo com o estudo realizado por Nora e colaboradores (2012), foi observado que, antes da regulação positiva de *Xist*, a expressão dos alelos *Linx* e *Tsix* está presente.

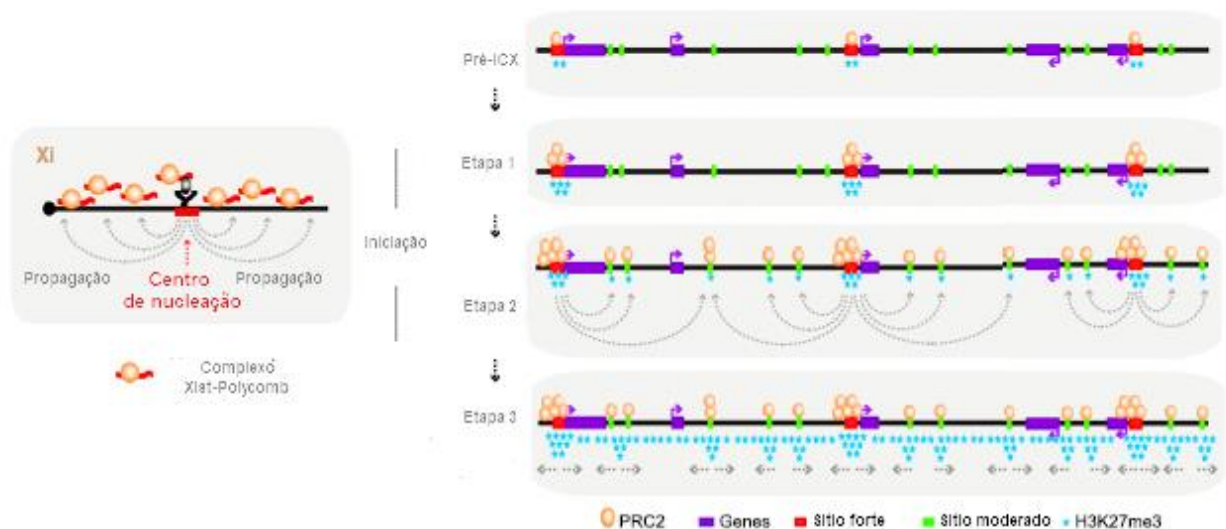
Propagação da inativação do cromossomo X

Após a consolidação do início da ICX, a propagação do estado inativo é realizada pela cobertura do cromossomo X escolhido para ser o inativo pelo longo transcrito de *Xist*. O X inativo assume uma replicação tardia e migra para a periferia do núcleo, se localizando em um anel enriquecido de Snf2h que possivelmente está associado ao estado epigenético repressivo da cromatina, formando a estrutura que é conhecida como corpúsculo de Barr (CAVALLI, 2007). O RNA do XIST possui uma região de repetições AAA que funciona como sinalizadora para as proteínas SPEN, WTAP e RNF20 agirem a favor do silenciamento do cromossomo X (CHU *et al.*, 2015;

MOINDROT *et al.*, 2015; MOINDROT; BROCKDORFF, 2016). A expressão de *XIST* também ocasiona o recrutamento de proteínas do grupo Polycomb (PcG), que fazem a regulação de *XIST* durante a diferenciação. O Complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) contém proteínas Eed, Suz12 e metilases de histonas Ezh2, as quais catalisam a trimetilação de lisinas 27 das histonas H3 (H3K27me3) (PLATH, 2003; SILVA *et al.*, 2003). Essa interação faz com que o PRC2 se concentre no XIC e depois se espalhe por todo o cromossomo X inativo (ZHAO *et al.*, 2008).

Pinter e colaboradores (2012) verificaram que a propagação da ICX é regida por uma hierarquia do PRC2. Nesse trabalho, é proposto um modelo de três etapas para a propagação da ICX (Figura 4). Na primeira etapa, o PRC2 é recrutado pelo RNA de Xist para o que é denominado como “centro de nucleação” (do inglês, *nucleation center*) que se localiza no exon 1 de *Xist*. Na segunda etapa, o PRC2 se espalha para 150 sítios fortes. Como o PRC2 está posicionado nas bolhas canônicas, a terceira etapa ocorre após o início da ICX, quando Xist se espalha sobre o cromossomo X a ser inativo, e sua atividade catalítica age recrutando o PRC2, como ocorre nos *loci* autossômicos (PINTER *et al.*, 2012).

Figura 4 - Etapas da atuação do PRC2 na propagação da ICX



Nota: À esquerda, é ilustrado o centro de nucleação e de onde parte a propagação da ICX. À direita, temos a região pré-ICX. Após a iniciação, o PRC2 é recrutado por Xist para o centro de nucleação (Etapa 1). Em seguida, o PRC2 se espalha pelos sítios fortes (Etapa 2) e por fim, ocorre a propagação de Xist ao longo cromossomo X inativo (Etapa 3).

Fonte: adaptada de Pinter e colaboradores (2012).

Recentemente, o *locus FIRRE/Firre* foi associado à formação da arquitetura do Xi (BALATON *et al.*, 2018). O *Firre* é localizado no cromossomo X em um limite TAD de várias espécies e tipos celulares, enriquecido por elementos de ligação CTCF

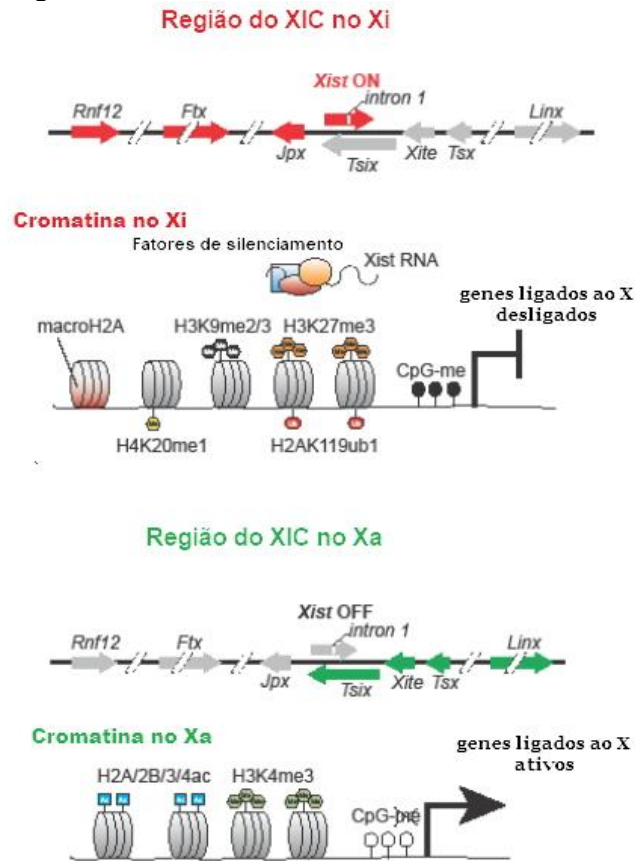
(BARUTCU *et al.*, 2018). No estudo realizado por Barutcu e colaboradores (2018), foi verificado que a deleção do *locus Firre* não teve qualquer efeito na formação de fronteiras TAD. Além disso, nem as inserções ectópicas de cDNA de *Firre* (cDNA), nem sua expressão indutível, levaram à ruptura ou surgimento de novos limites TAD. No entanto, as interações *superloop* do Xi foram interrompidas. O FIRRE/Firre ncRNA é necessário para a formação do *superloop*, localização nucleolar e retenção da marca epigenética repressiva H3k27me3 no Xi (YANG *et al.*, 2015; BARUTCU *et al.*, 2018).

Manutenção da inativação do cromossomo X

Uma vez que a propagação é estabelecida, a manutenção do estado inativo vai permanecer por todas as divisões clonais, mantendo sempre o mesmo X inativo nas células filhas. Existem diferenças epigenéticas que mantêm os estados inativo e ativo dos cromossomos X. O cromossomo X inativo é enriquecido em elementos que reprimem a transcrição como histonas H4 hipoacetiladas, variantes de histonas macroH2A, histonas H3 com trimetilação na lisina 27 e di/trimetilação de lisina 9. Já o cromossomo X ativo possui marcas epigenéticas associadas às histonas que favorecem a expressão transcricional, como a trimetilação de lisina 4 da histona H3 e a acetilação de histonas H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 5). Além desses aspectos, a metilação do DNA também está entre os principais fatores que contribuem para a manutenção do estado inativo do cromossomo X (KEOHANE *et al.*, 1996; CARL COSTANZI & JOHN R. PEHRSON, 1998; MERMOUD *et al.*, 1999; RASMUSSEN *et al.*, 2000; SADO *et al.*, 2000, 2004; MIETTON *et al.*, 2009).

Nos processos em que a ICX é estabelecida, há participação de alguns fatores presentes no XIC e fora dele. Em camundongos, participam deste processo elementos reguladores, tais como os elementos nucleares intercalantes longos (LINEs), presentes em abundância no cromossomo X, genes distribuídos pelos diferentes cromossomos, cujas proteínas atuam como acessórias no processo de ICX, ou até mesmo ncRNAs que auxiliam no processo (Tabela 1 e Figura 6) (CERASE *et al.*, 2015).

Figura 5 - Atuação do gene *Xist* no XIC e a cromatina do X no estado ativo e inativo



Nota: Na primeira etapa, sinalizada em vermelho, o cromossomo X inativo (Xi) expressa o *Xist*, e a atuação dos genes complementares *Ftx*, *Rnf12* e *Jpx*. A figura representa também a região do íntron 1 do *Xist*, região em que há ligação dos fatores de pluripotência. A cromatina no Xi possui uma série de modificações epigenéticas para reprimir a transcrição, tais como a trimetilação de lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), metilação das ilhas CpG, hipocetilação das histonas H4, associação de variantes de histonas macroH2A, di/trimetilação de lisina 9 das histonas H3 (H3K9me2/3), monoubiquitinação de lisina 119 das histonas H2A (H2AK119ub1) e monometilação de lisina 20 das histonas H4 (H4K20me1). Na parte inferior do esquema, sinalizada em verde, a representação do cromossomo X ativo (Xa) indica o *Tsix*, antisenso de *Xist*, e genes complementares atuantes em XIC de camundongos. A cromatina do cromossomo X ativo representa as marcas epigenéticas distintas do Xi, como a desmetilação de ilhas CpG, trimetilação de lisina 4 da histona H3 (H3K4me3) e acetilação de histonas: H2A, H2B, H3 e H4.

Fonte: adaptada de Payer (2016).

Tabela 1 - Genes e elementos reguladores que estão envolvidos no processo de ICX em camundongos e humanos, através da atuação direta com o processo de ICX ou na interação com proteínas e demais elementos que atuam no processo. Os genes marcados em vermelho também já foram associados à DI

Genes/ Elementos	Localização cromossômica	Função
<i>HNRNPU</i> (SAF-A)	1	Fator ligado diretamente a <i>Xist</i> . Medeia sua interação com a cromatina através da interação com elementos SARS/MARS
<i>LBR</i>	1	Proteína ligante de <i>Xist</i> , se localiza na lâmina nuclear e interage com complexos repressivos
<i>DMAP1</i>	1	Interage com HDAC2 fornecendo um mecanismo de desacetilação de histonas na heterocromatina após a replicação de DNA de origem tardia
<i>Rbm15</i>	1	Se liga diretamente ao RNA de <i>Xist</i> , pertence à família SPEN de repressores transcricionais
<i>SPEN</i> (SHARP)	1	Diretamente ligado a <i>Xist</i> e medeia a interação funcional entre <i>Xist</i> e o complexo NCor
<i>DNMT3A</i>	2	Responsável pela metilação <i>de novo</i> durante o desenvolvimento embrionário, realizando a metilação das ilhas CpG
<i>SATB2</i>	2	Sua proteína ligante interage especificamente com a região de ligação à matriz nuclear, além de regular a transcrição e o remodelamento da cromatina
<i>SATB1</i>	3	O papel preciso dele na ICX não é claro, entretanto, atua como regulador celular da organização da cromatina na iniciação da ICX
<i>SOX2</i>	3	Fator de pluripotência e regulador epigenético que atua em <i>Xist</i> e <i>Tsix</i>
<i>ZFP42</i>	4	Envolvido na reprogramação da ICX durante a aquisição da pluripotência. Requerido para um eficiente alongamento de <i>Tsix</i> , se liga ao enhancer DXPas34 dentro do promotor de <i>Tsix</i>
<i>H2AFY</i> (macroH2A)	5	Codifica as histonas de replicação independente, membro da família H2A. Participa da estabilidade da ICX
<i>OCT4</i>	6	Fator de pluripotência e regulador epigenético que atua em <i>Xist</i> e <i>Tsix</i>
<i>JARID2</i>	6	Codifica proteína ligante que atua como repressor transcricional. Essa proteína interage com o complexo repressivo Polycomb (PRC2).
<i>WTAP</i>	6	Sua proteína interage com <i>Xist</i> , possui envolvimento na regulação da metilação do RNA
<i>CUX1</i>	7	Interage com <i>Satb1</i>
<i>PRDM14</i>	8	Fator de pluripotência e regulador epigenético que atua em <i>Xist</i> e <i>Tsix</i>
<i>hnRNPK</i>	9	Sua proteína RNA ligante interage com <i>Xist</i>
<i>Klf4</i>	9	Fator de pluripotência e regulador epigenético que atua em <i>Xist</i> e <i>Tsix</i>
<i>EED</i>	11	Recruta DNA metiltransferases através do complexo PRC2/EED-EZH2
SARS/MAR S	12	Elementos genômicos que fazem anexação facultativa de proteínas <i>scaffold</i> ou enriquecimento da matriz onde há cromatina aberta e genes onde <i>Xist</i> se acumula
<i>Nanog</i>	12	Fator de pluripotência e regulador epigenético que atua em <i>Xist</i> e <i>Tsix</i>
<i>NCOR2</i> (SMRT)	12	Sua proteína atua como parte de um complexo de multisubunidades que inclui histonas desacetilases para modificar a estrutura da cromatina que previne a atividade transcricional basal de genes alvo
<i>YY1</i>	14	Sua proteína é bivalente como ligantes de motivos de DNA e RNA. Atua na regulação de <i>Xist</i> e pode ter um papel no espalhamento <i>in cis</i> de <i>Xist</i>
<i>PML</i>	15	Interage com <i>Satb1</i>
<i>CTCF</i>	16	Atua como uma barreira para a reorganização da cromatina induzida por <i>Xist</i>
<i>SMCHD1</i>	18	Sua proteína é responsável por manter um padrão correto da metilação do DNA no Xi durante a manutenção das fases de ICX
<i>DNMT1</i>	19	Mantém o padrão de metilação no DNA através da hemimetilação
<i>Rex1</i>	19	Fator de pluripotência e regulador epigenético que atua em <i>Xist</i> e <i>Tsix</i>
<i>DNMT3B</i>	20	Responsável pela metilação <i>de novo</i> durante o desenvolvimento embrionário, realizando a metilação das ilhas CpG
<i>ATRX</i>	X	Faz o recrutamento de PRC2 no cromossomo X inativo
<i>Rnf12 (Rlim)</i>	X	Regula a expressão de <i>Xist</i> através da degradação de <i>Rex1</i>
<i>Jpx</i>	X	Seu transcrito não codificante atua na ativação de <i>Xist</i>
<i>Ftx</i>	X	Seu transcrito não codificante atua na ativação de <i>Xist</i>
<i>Tsix</i>	X	Presente no XIC, em camundongos seu longo transcrito não codificante reprime <i>Xist</i> e participa da inativação imprintada nos tecidos extraembrionários. Em humanos, seu papel ainda não está estabelecido
<i>FIRRE</i>	X	ncRNA recrutado para realizar o <i>superloop</i> de bases do Xi, localização nuclear e retenção de H3K27me3

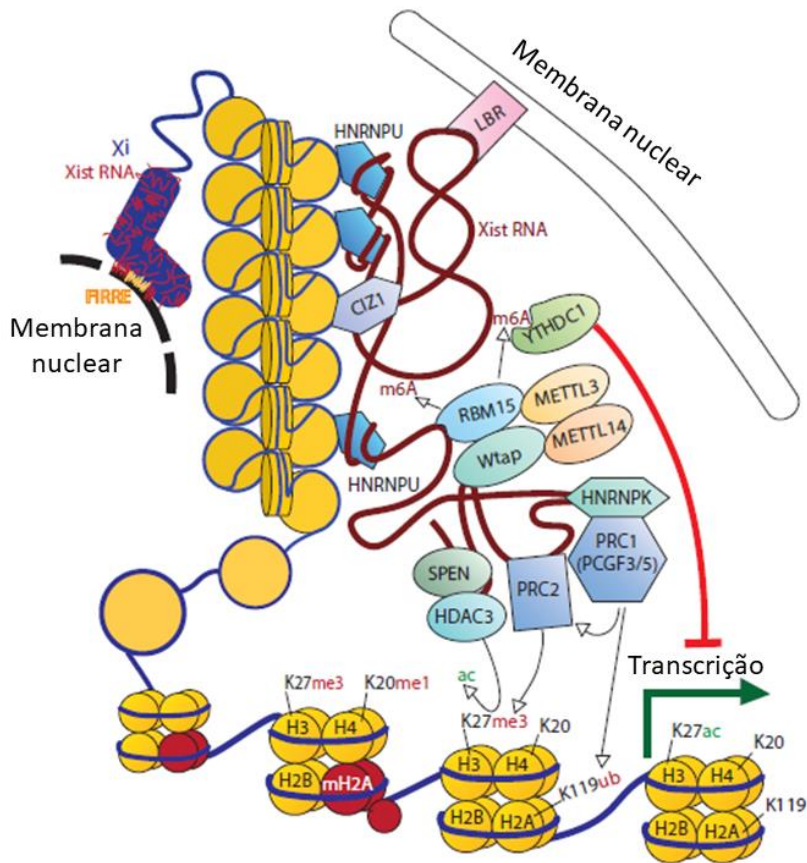
Fonte: dados adaptados de Cerase e colaboradores (2015), Vissers e colaboradores (2015) e base de dados Genecards.

Tabela 1 - Elementos reguladores que estão envolvidos no processo de ICX em camundongos e humanos, através da atuação direta com o processo de ICX ou na interação com proteínas e demais elementos que atuam no processo (Continuação)

Elementos	Função
PRC2	É recrutada pelo X inativo durante o processo de diferenciação das células tronco embrionárias e desenvolvimento embrionário. Catalisa a metilação das histonas H3 nas lisinas 27 da cromatina
PRC1	Reforça o silenciamento gênico na cromatina pela ubiquitinação de histonas H2A na lisina 119 e compactação da cromatina. Há uma suposição de que é recrutada pelo Xi, mas ainda está em debate
LINES presentes no cromossomo X	Comparado aos autossomos, o X possui o dobro de elementos LINE-1. Os LINEs do cromossomo X se localizam próximos a genes inativos no Xi, supõe-se que seu papel seja de estabelecimento e manutenção do estado inativo.

Fonte: dados adaptados de Cerase e colaboradores (2015), Vissers e colaboradores (2015) e base de dados Genecards.

Figura 6 - Principais fatores envolvidos na ICX



Nota: Xist reveste o Xi e é crítico para a sua localização. Na membrana nucleolar, a localização do Xi requer o ncRNA Firre. Xist atua como um andaime molecular recrutando vários complexos repressivos como PRC1/2, enquanto também atua como uma ligação entre vários fatores de ligação da matriz e cromatina. Alguns desses fatores, como PRC2 e HNRNPU, são recrutados tanto para o Xi em humanos quanto em camundongos, mas a maioria das evidências das interações e vias que regulam esses fatores vem do trabalho feito em modelos de camundongos. As H3/H4/H2A/H2B referem-se a subunidades de histona, e os “me” e “ac” referem-se à metilação e acetilação de caudas de histona em lisinas especificadas (K).

Fonte: Adaptada de Balaton e colaboradores (2018).

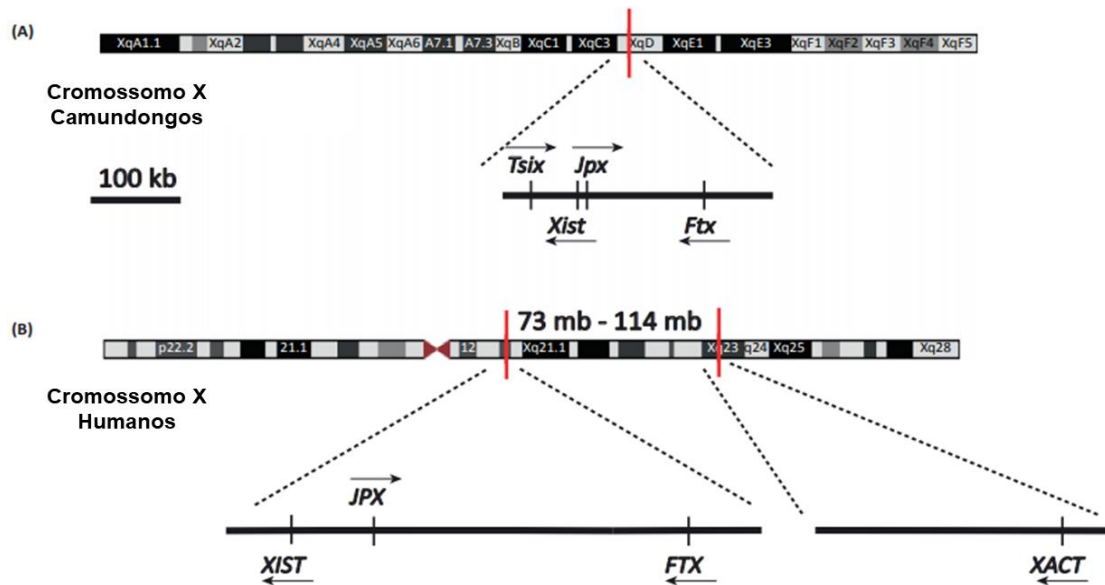
Há diversos elementos reguladores e genes que camundongos e humanos compartilham no processo de ICX. No entanto, também há notáveis diferenças entre eles quanto à ICX (Tabela 2 e Figura 7). Como citado anteriormente, os camundongos são de grande importância para entendimento do mecanismo de ICX, tendo em vista a complexidade do uso de embriões humanos para estudos. Assim, alguns mecanismos foram observados em outras espécies, mas ainda não temos o conhecimento em humanos, como é o caso da ICX imprintada. A ICX imprintada já foi observada em camundongos e marsupiais, no entanto, os dados de outros mamíferos são desconhecidos e a maioria dos estudos com células tronco pluripotentes humanas representa um estágio pós-ICX. Alguns estudos em humanos, realizados com o marcador *G6PD* em placenta a termo, desde a década de 70, apresentam dados discordantes, pois há achados de ICX aleatória e preferencial. Esses estudos também não são tão confiáveis, devido ao risco de contaminação do material por DNA materno, análise de diferentes tecidos, poucos genes analisados e pequeno número amostral (MIGEON; DO, 1979; HARRISON; WARBURTON, 1986; ZENG; YANKOWITZ, 2003; HAMADA *et al.*, 2016).

Tabela 2 - Diferenças entre humanos e camundongos quanto à ICX

Mecanismo/Gene	Camundongos	Humanos	Referências
Expressão de <i>Xist</i> no início do desenvolvimento	Pelo Xp, nas fêmeas	Em todo o cromossomo X de fêmeas e machos	GOODRICH; PANNING; LEUNG, 2016 SAHAKYAN <i>et al.</i> , 2017 VALLOT <i>et al.</i> , 2017
ICX por <i>imprinting</i>	Sim (trofotoderma)	Desconhecido	BORENSZTEIN <i>et al.</i> , 2017
ICX aleatória	Apenas no próprio embrião	Na placenta e embrião	MCCARREY <i>et al.</i> , 2002 GOODRICH; PANNING; LEUNG, 2016
Regulação positiva de <i>Xist</i> no Xi	4-8 células: Seletiva, apenas o futuro Xi é super-regulado	Geralmente após o 7º dia: em todos os cromossomos X com exceção de um	OKAMOTO <i>et al.</i> , 2011 SAHAKYAN <i>et al.</i> , 2017 VALLOT <i>et al.</i> , 2017
Repressão de <i>Xist</i> no futuro Xa	Realizado por <i>Tsix</i> (Início)	Algum outro repressor de <i>XIST</i> sensível à dosagem	DA ROCHA; HEARD, 2017 PINHEIRO; HEARD, 2017
<i>Jpx</i>	Regulador positivo de <i>Xist</i> : ncRNA que atua na ligação CTCF e ativação de <i>Xist</i> (Início ICX)	Desconhecido	SOMA <i>et al.</i> , 2014
<i>Linx</i>	ncRNA co-expresso com <i>Tsix</i>	Ausente	NORA <i>et al.</i> , 2012
<i>Tsix</i>	ICX (<i>imprinting</i>)	Não funcional	OHHATA <i>et al.</i> , 2011 GAYEN <i>et al.</i> , 2015 PRUDHOMME <i>et al.</i> , 2015 LOOS <i>et al.</i> , 2016
<i>XACT</i>	Ausente	Possível inibidor da super-regulação de <i>XIST</i> (início da ICX)	PETROPOULOS <i>et al.</i> , 2016 VALLOT <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Adaptado de Migeon (2017)

Figura 7 - ncRNAs responsáveis pelo processo de ICX em camundongos e humanos



Fonte: Adaptado de Sahakyan *et al.* (2018).

Escape à inativação do cromossomo X

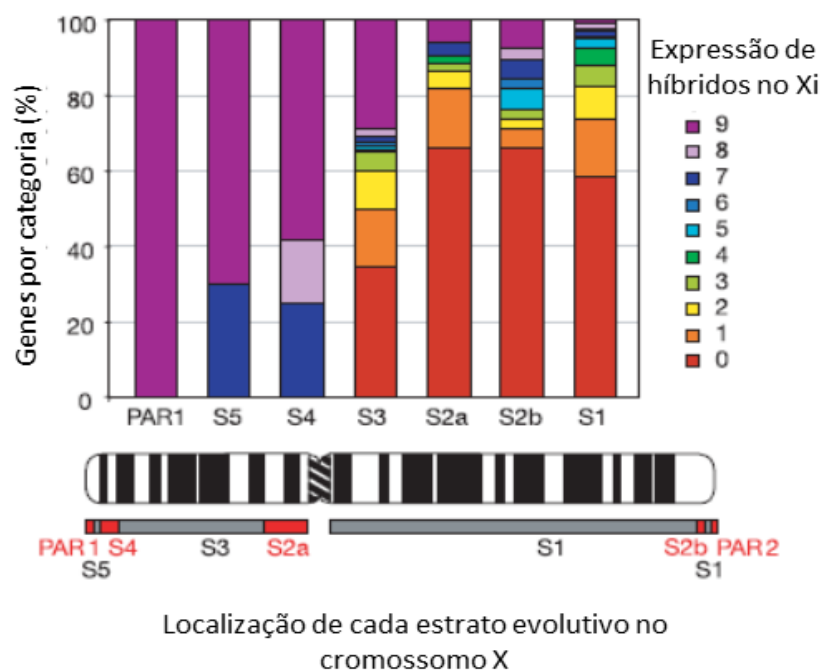
Uma vez que o cromossomo X inativo foi escolhido, a maioria dos genes presentes nesse cromossomo é inativada. Desde os achados de Mary Lyon, na década de 60, estimou-se que nem todo o cromossomo X poderia ser inativo, devido aos fenótipos anormais observados na aneuploidia 45,X (Síndrome de Turner). Algumas diferenças entre humanos e camundongos também foram verificadas quanto à aneuploidia, como a infertilidade nas mulheres 45,X, enquanto as fêmeas de camundongos com apenas um cromossomo X podem se reproduzir. O percentual de escape à ICX em camundongos é cerca de 3-7% no cromossomo X inativo, enquanto que no cromossomo X humano os padrões variam entre indivíduos e tecidos numa faixa de 10-23% (CARREL; WILLARD, 2005; BERLETTCH *et al.*, 2011; BALATON; COTTON; BROWN, 2015; TUKIAINEN *et al.*, 2017).

Alguns genes que estão fora das PARs mantiveram homologia no Y e escapam à ICX, como é o caso de genes importantes para o desenvolvimento como *KDM5C*, *KDM6A* e *DDX3X* (WIJCHERS; FESTENSTEIN, 2011; MIYAKE *et al.*, 2013; GONÇALVES *et al.*, 2014; KIDO; FAI; LAU, 2015). Atualmente, sabemos que, além

das regiões de homologia X:Y, inúmeros genes escapam à ICX ao longo do cromossomo X.

A região específica do cromossomo X pode ser particionada em estratos evolucionários que apresentam níveis crescentes de divergência. O braço curto do cromossomo X (Xp) apresenta o estrato mais antigo de genes e no braço longo do cromossomo X se encontra o estrato mais jovem. Em humanos, o estrato evolutivo mais antigo concentra a maior parte dos genes que escapam à ICX (Figura 8) (CARREL; WILLARD, 2005; BALATON; BROWN, 2016). Dos 639 genes humanos presentes no cromossomo X que foram avaliados sobre o *status* de ICX (cerca de 81% dos genes codificantes de proteínas nas células somáticas), 80 genes escapam à ICX e 93 genes possuem escape variável (BERLETCH *et al.*, 2011; BALATON; BROWN, 2016; DISTECHE, 2016).

Figura 8 - Estrato evolutivo e genes que escapam à ICX



Nota: Representação da porcentagem de genes em cada estrato evolutivo do cromossomo X, em escalas do escape à ICX. S1, S2a, S2b, S3, S4 e S5 – estratos evolutivos do cromossomo X; A escala de cores (1-9) representam quantos híbridos tiveram expressão dos genes no Xi.
 Fonte: Adaptado de Carrel & Willard (2005).

Entre os genes de escape à ICX e os de escape variável à ICX, foram encontradas algumas diferenças quanto às suas estruturas. A ligação da polimerase II ao Xi é significativamente reduzida, com exceção das PARs e genes de escape que

possuem a região promotora hipometilada. Assim, os genes de escape variável apresentam suas regiões promotoras hemimetiladas, permitindo que a expressão possa ser variável entre tecidos ou diferentes em indivíduos (GENDREL; HEARD, 2011). Além dessa diferença, os genes que estão sujeitos à ICX possuem muitas marcas de heterocromatina inativas, como H3K9me3, H4K20me3 e H3K27me3, e também são pobres em marcas ativas, como H3K4me3. Em contrapartida, os genes que escapam em alguma parcela à ICX apresentam marcas de histonas ativas, como H3K4me2 e H3K4me3, H3K9ac, H3K27ac e H3K9me1, e são empobrecidos da marca repressora H3K27me3. Além dessas marcas, o Xi mostra um enriquecimento quádruplo para a variante repressiva da histona macroH2A, enquanto os genes que escapam são deficientes dela. Algumas lacunas ainda não estão bem esclarecidas, como a diferença destas marcas epigenéticas entre os genes que escapam a ICX e os que não escapam. Há dúvidas se as marcas epigenéticas são as responsáveis pelo escape ou se as marcas ocorrem devido à transcrição contínua dos genes (BALATON; BROWN, 2016).

O percentual de genes que escapam à ICX é variável entre diferentes estudos. O estudo pioneiro sobre genes que escapam à ICX (CARREL; WILLARD, 2005) verificou que cerca de 25% dos genes no X inativo (incluindo as regiões PAR1 e PAR2) escapariam à ICX em algum grau. No entanto, como as células utilizadas eram híbridas, esse percentual pode ser questionado, uma vez que o *XIST* humano por inativar o Xi híbrido em camundongos pode enviesar o resultado pela falta de reconhecimento de sítios específicos humanos. Contudo, um estudo mais recente avaliou dados de mais de 5500 transcriptomas, provenientes de 449 indivíduos em 29 tecidos diferentes, combinados com dados de 940 transcriptomas *single-cell*. Através dos resultados, foi observado que menos de 23% dos genes no cromossomo X apresentam inativação incompleta. Estes dados sugerem que as diferenças de porcentagem de escape à ICX podem estar relacionadas à variabilidade fenotípica (TUKIAINEN *et al.*, 2017).

Desvios de inativação do cromossomo X

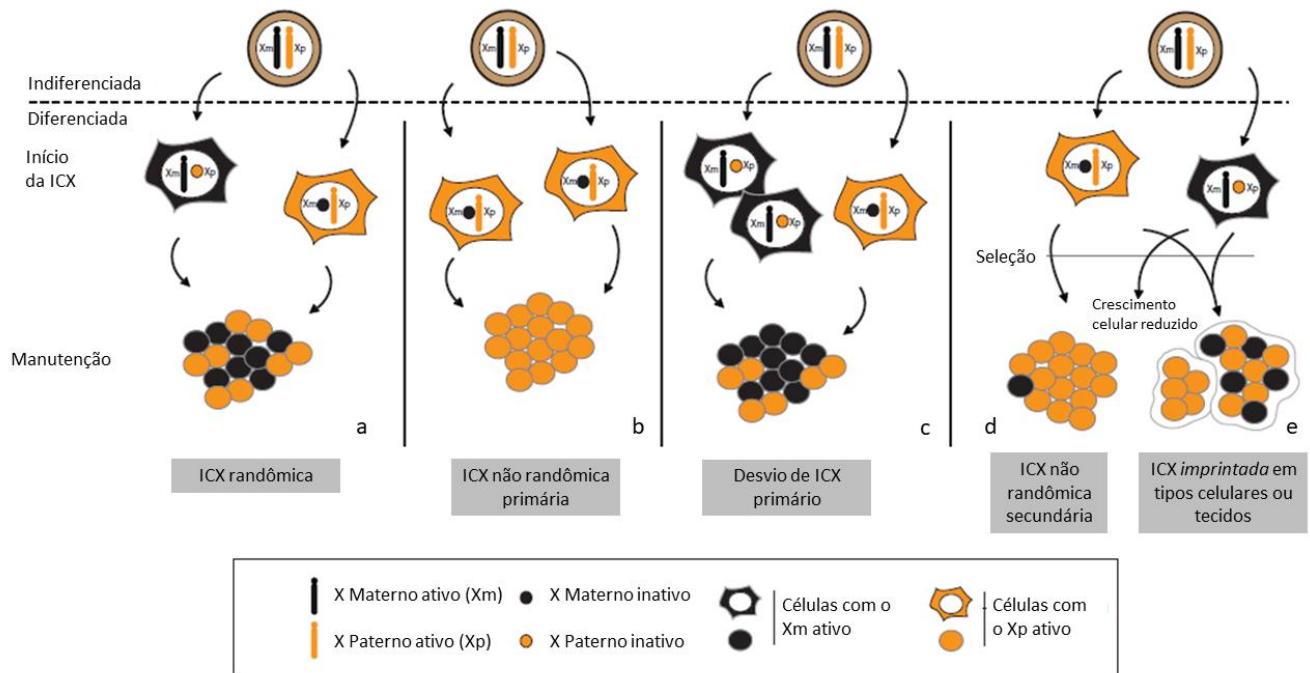
A partir do momento em que a ICX é estabelecida, o cromossomo X inativo com a heterocromatina enriquecida é transmitido para cada célula filha de forma estável.

Acredita-se que a ICX nas células somáticas seja irreversível, tanto em humanos quanto em camundongos, exceto nos estágios de desenvolvimento inicial (blastocisto) e na linhagem germinativa, ambos no início do desenvolvimento. Assim, o esperado é que as mulheres sejam mosaicos para as populações celulares, apresentando uma ICX aleatória com 50% de expressão de genes da linhagem celular do cromossomo X materno e o mesmo para o X paterno. Essa proporção de ICX pode ser tecido-específica ou variável de acordo com a idade (BOLDUC *et al.*, 2008; GENDREL; HEARD, 2011).

A razão 1:1 entre células ICX pode ser desviada por condições que influenciam o processo de ICX. O desvio de ICX pode ocorrer de maneira primária ou de forma secundária durante o desenvolvimento embrionário. No desvio de ICX primário, como o embrião possui um pequeno grupo de células qualquer evento em fatores relacionados à ICX pode causar uma preferência pela expressão de um cromossomo X em detrimento do outro. A ICX não aleatória primária também pode ser resultado de uma seleção causada por mutações ou variações nos genes envolvidos no processo de ICX. Outro cenário no qual a ICX preferencial pode acontecer é após a diferenciação celular. Uma linhagem celular parental pode ser favorecida em relação à outra, ocasionando também uma seleção preferencial que se categoriza como uma ICX não aleatória secundária (Figura 9) (GENDREL; HEARD, 2011). Os desvios de ICX que ocorrem de maneira secundária podem ser tecido-específicos. Por exemplo, estudos realizados com camundongos sobre a expressão de genes em regiões cerebrais observou uma preferência de expressão do X de origem materna nas fêmeas (GREGG *et al.*, 2010; WANG; SOLOWAY; CLARK, 2010). Em um estudo realizado com mulheres e seus neonatos, também foi observado que as células hematopoiéticas são mais susceptíveis a desvios de ICX em relação às amostras de epitélio bucal (BOLDUC *et al.*, 2008). Além disso, o perfil de ICX para células hematopoiéticas pode variar ao longo dos anos dentre mulheres saudáveis. Nesse mesmo estudo realizado por Bolduc e colaboradores (2008), foi observado que as células sanguíneas das mães dos neonatos tiveram uma incidência de desvio dobrada, quando comparada com as células de epitélio bucal. O tecido hematopoiético é mais susceptível a um desvio de inativação a partir dos 30 anos de idade e pode ser mais recorrente na população acima de 60 anos de idade (BUSQUE *et al.*, 1996; BOLDUC *et al.*, 2008). Mulheres com idade mais avançada (> 60 anos) possuem um aumento da incidência de desvios de ICX para as amostras de células

sanguíneas, quando comparadas com amostras de epitélios (urinário e bucal). Assim, acredita-se que há uma seleção secundária preferencial para as células hematopoiéticas (SHARP; ROBINSON; JACOBS, 2000).

Figura 9 - Tipos de ICX com desvio



Nota: Ambos os cromossomos X (paterno e materno) estão ativos em células femininas indiferenciadas. A escolha aleatória da ICX (a) faz com que as fêmeas sejam mosaicos para as populações celulares, parte mantem um X materno ativo (células em preto) e parte um X paterno ativo (células em laranja). A ICX não aleatória primária (b), pode ocorrer quando *Xist* ou *Tsix* ocasionam uma ICX preferencial de grupo de células (com o X paterno o X materno ativo) no estágio de ICX das células, causando um desvio de inativação preferencial. Em camundongos, os alelos *Xce* podem ocasionar um desvio de ICX primário favorável a uma determinada população celular (c). A ICX não aleatória secundária (d) pode ocorrer após o processo de ICX, um grupo de células com um X paterno ou materno ativo ganha vantagens proliferativas como ocorre no caso de doenças ligadas ao cromossomo X, causando uma proporção maior de células portando um X em relação a outro. A ICX secundária pode ocorrer em diferentes tecidos ou tipos celulares como um *imprinting* genômico (e).

Fonte: adaptada de Gendrel e Heard (2011).

A avaliação de desvios de ICX começou a ser realizada através de marcadores em genes do cromossomo X, como o HPRT e o PGK, por meio da técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP, do inglês, Restriction Fragment Length Polymorphism) (WOLF et al., 1984; YEN et al., 1984; VOGELSTEIN et al., 1985, 1987). Desde 1992, as metodologias para identificar os perfis de inativação têm utilizado endonucleases de restrição sensíveis à metilação para a região polimórfica de trinucleotídeos (CAG) presentes no exon 1 do gene receptor de

androgênio humano (AR, ensaio HUMARA) (ALLEN *et al.*, 1992). Esse é o método mais utilizado para avaliar desvios de ICX, já que o gene AR é altamente polimórfico com uma taxa de heterozigose de 85-90% na população (ALLEN *et al.*, 1992). No entanto, mulheres que são homozigotas para o polimorfismo CAG não são informativas para avaliar possíveis desvios de ICX.

Recentemente, uma nova ferramenta foi proposta por um grupo parceiro incluindo o gene da Retinite Pigmentosa 2 (*RP2*) num ensaio bplex com o gene *AR*, permitindo uma maior capacidade de identificar desvios de ICX por ampliar a margem de heterozigose conjunta para 97% da população (MACHADO *et al.*, 2014). Um estudo recente com essa metodologia foi realizado pelo nosso grupo, com uma população controle de 118 mulheres saudáveis oriundas do Estado do Rio de Janeiro que confirmaram a taxa de 97% de heterozigose descrita pelo estudo desenvolvido por Machado e colaboradores. Os dados de ICX demonstraram que o uso do gene *RP2* adicionou informatividade em 7,6% das amostras, nas quais as taxas de ICX não poderiam ser estabelecidas utilizando somente o gene *AR* (BORGES, 2018).

Os desvios de ICX, sejam eles moderados ou extremos, podem ocorrer na população de mulheres saudáveis, numa proporção esperada de 11-13%. Desvios extremos de ICX são mais raros, e ocorrem numa frequência menor que 2% (AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006; BORGES, 2018). Além disso, é postulado por alguns estudos que desvios de ICX podem ser um evento favorável ao cromossomo normal, em casos de mutação em um dos cromossomos X (PLENGE *et al.*, 2002; GENDREL; HEARD, 2011). Todavia, estudos recentes associam casos de ICX preferencial a favor do cromossomo X portador de uma mutação em uma série de doenças. Desvios extremos de ICX estão associados a doenças severas em mulheres como: PHACEs (LEVIN; KALER, 2007), Síndrome de Rett (VICTORINO KREPISCHI; KOK; GUIMARÃES OTTO, 1998; FIEREMANS *et al.*, 2014;); e doenças comumente mais recorrentes em homens tais como: distrofia muscular de Duchenne (VIGGIANO *et al.*, 2016), Hemofilia B (OKUMURA *et al.*, 2008), disceratose congênita (DEVRIENDT *et al.*, 1997) e a DI (VISSERS *et al.*, 2015; FIEREMANS *et al.*, 2016).

Deficiência Intelectual

A Deficiência Intelectual de aparecimento precoce (DI), popularmente conhecida como retardo mental, pode ser definida por três critérios principais: (i) manifestação antes dos 18 anos de idade, (ii) funcionalidade intelectual significativamente abaixo da média e (iii) limitações em duas ou mais áreas das habilidades adaptativas ou cognitivas aplicáveis, como a comunicação, cuidados pessoais, interação social, habilidades acadêmicas, entre outras (*AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION*, 2013). Os domínios abrangidos pelo funcionamento adaptativo são: conceitual, que inclui linguagem, conhecimento e memória; social, que inclui a empatia, o julgamento social e a habilidade de seguir regras; e prático, que inclui cuidar de si, organização e habilidades do dia a dia (MARRUS; HALL, 2017). Houve uma substituição do termo “retardo mental” por “deficiência intelectual” a partir da 5ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatística de Doenças Mentais, por requerimento de um estatuto em 2010 na política educacional, legal e da saúde (*AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION*, 2013).

A DI é considerada um problema de saúde pública, cuja prevalência varia entre estudos epidemiológicos, sendo estimada em 1-3% da população mundial. Esta condição é etiológicamente heterogênea, sendo a causa mais comum de desordem do desenvolvimento (CHIURAZZI *et al.*, 2008; CHIURAZZI; PIROZZI, 2016). Em países com menores condições de renda, a prevalência da DI é duas a três vezes maior, o que é atribuído a questões de nutrição inadequada, privação cultural, casamentos consanguíneos e baixa assistência à saúde (ROPER, 2010). No Brasil, os dados da prevalência de deficiências através da autodeclaração do IBGE (anos referência: 2013-2014) indicam uma taxa de DI de 0,8% na população, sendo maior entre homens (0,9%) do que mulheres (0,7%) (MALTA *et al.*, 2016).

Uma variedade de causas genéticas e ambientais é atribuída à DI. Contudo, os aspectos genéticos contribuem para cerca de 50% dos casos e 25% ainda não têm causas atribuídas (TOTH, DE LACY, 2016; MARRUS; HALL, 2017). A gravidade das manifestações clínicas está correlacionada com o fator causal, e assim, desequilíbrios cromossômicos, asfixia perinatal, infecções pré-natais ou acidentes vasculares estão relacionados aos casos mais graves. Os efeitos variáveis das causas da DI são resultado da exposição materna às substâncias tóxicas durante a gravidez, condições

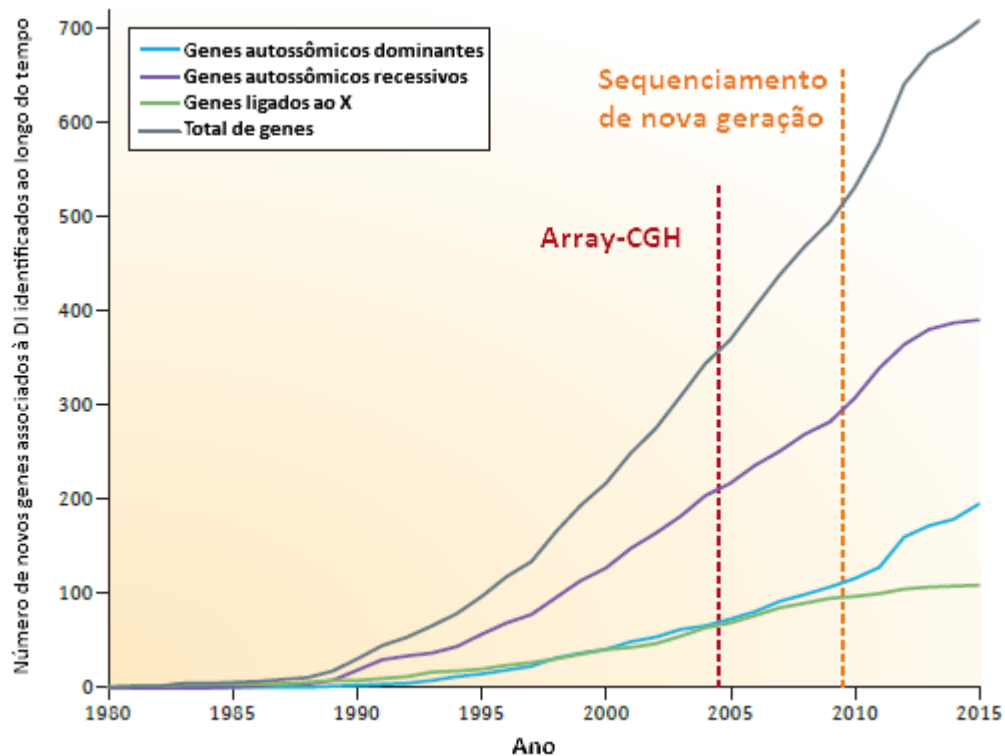
maternas (ex. diabetes ou fenilcetonúria) e nascimento prematuro. Já as causas ambientais mais comuns da DI são hipotireoidismo e desnutrição de mãe e/ou filho, atingindo milhões de pessoas nos países em desenvolvimento (CHIURAZZI; PIROZZI, 2016). Assim, a frequência desses diversos fatores varia entre os diferentes países, bem como o estilo de vida que os indivíduos apresentam e a qualidade dos cuidados de saúde.

A DI pode estar associada a outras condições como uma comorbidade, incluindo: transtornos do espectro autista (ASD), caracterizados por um comprometimento social, interesses restritos e comportamento repetitivo; distúrbio de linguagem; e a epilepsia, que pode se manifestar com atraso do desenvolvimento e regressões de desenvolvimento adquirido, como a fala, por exemplo (CURRY *et al.*, 1997; VAN KARNEBEEK, 2018), dentre outros.

As formas de DI são clinicamente divididas em DI sindrômica (DI-S) e não sindrômica (DI-NS). Nas formas sindrômicas, os indivíduos afetados possuem outras características além da DI como: aspectos clínicos, radiológicos ou biológicos associados à condição. Já a forma não sindrômica, os indivíduos apresentam somente o déficit cognitivo, sem associações fenotípicas. Entretanto, é comum notar que alterações num determinado gene podem causar uma síndrome e que outras mutações neste mesmo gene podem ocasionar uma DI-NS, como é observado em alguns casos envolvendo autismo (CHIURAZZI; PIROZZI, 2016).

Das síndromes cromossômicas que envolvem DI, mais de 80% não são detectáveis através dos métodos de Citogenética clássica, necessitando de análises genéticas com maior resolução por se tratarem de variantes submicroscópicas (SANSOVIĆ *et al.*, 2017). Essas alterações crípticas representam mutações de sequência, alterações epigenéticas e variações no número de cópias gênicas (CNVs, do inglês *copy number variations*), fazendo com que um ou mais genes envolvidos tenham suas funções comprometidas durante ou após o desenvolvimento embrionário, causando consequências severas para o funcionamento cognitivo (VISSERS *et al.*, 2015). Com o advento das novas tecnologias, como os microarranjos de DNA e o sequenciamento de exoma completo (WES, *Whole Exome Sequencing*), houve uma grande inclusão de novos genes associados à DI, sendo mais de 700 genes nos últimos 20 anos (Figura 10) (VISSERS *et al.*, 2015).

Figura 10 - Aumento da associação de genes ligados à DI com a inserção das tecnologias de *array*-CGH e Sequenciamento de nova geração

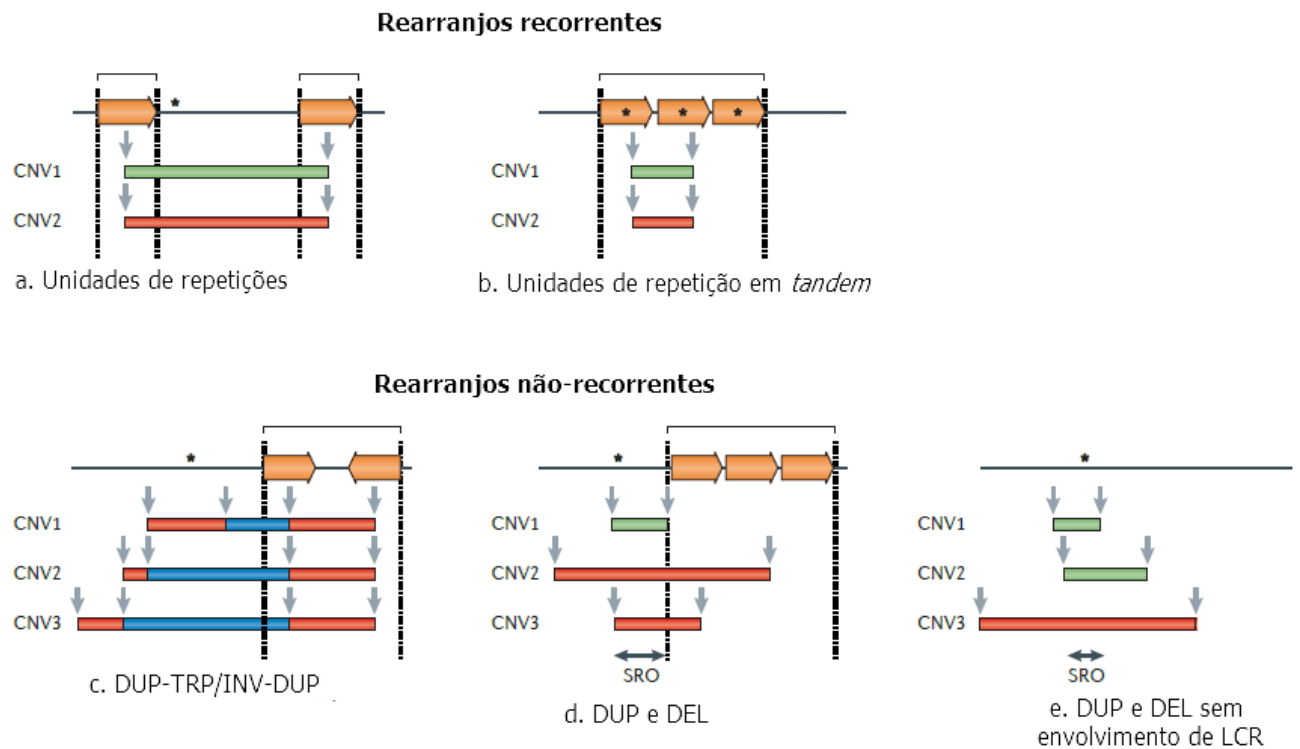


Fonte: Adaptado de Vissers e colaboradores (2015).

A expansão das regiões conhecidas permitiu a associação também de novas CNVs, além de novos genes associados à DI. As CNVs podem ser definidas como um segmento de DNA maior que 1kb que possui um número variável de cópias em relação ao genoma referência, sendo classificadas como recorrentes e não recorrentes (FREEMAN *et al.*, 2006). Em geral, as CNVs recorrentes encontram-se flanqueadas por regiões genômicas com baixo número de cópias (LCRs) que se recombina entre as cópias não alélicas em cromossomos homólogos. Por outro lado, as CNVs não recorrentes em geral não apresentam LCRs nas proximidades genômicas e estão envolvidas com a maioria das microdeleções ou microduplicações patogênicas ligadas à DI (Figura 11) (LUPSKI, 2015). Dessa forma, essas variações genômicas podem resultar em deleções, inversões, duplicações ou amplificações de uma cópia de um segmento genômico em apenas um cromossomo do par homólogo. Diferentes efeitos genômicos podem ocorrer através das CNVs e quanto maior a extensão da CNV, maior a probabilidade dela ser patogênica. As CNVs podem ocasionar uma dosagem gênica alterada, a síntese de uma proteína anormal ou até mesmo ausência do produto gênico (LUPSKI, 2010, 2015). Além disso, uma CNV pode desmascarar o

efeito de um alelo recessivo (LEE; IAFRATE; BROTHMAN, 2007). Em geral, deleções possuem uma chance maior de serem causais (LEE *et al.*, 2007).

Figura 11 - Representação de CNVs recorrentes e não recorrentes observadas nas condições genômicas



Legenda: (a) Pontos de duplicação ou deleção em intervalos longos e idênticos intercalados às repetições parálogas; (b) Rearranjos recorrentes ocorrendo em paralelo e afetando o número de cópias de um gene sensível à dosagem na repetição. (c) Duplicação-Triplicação/Inversão-Duplicação, as ampliações podem ser representadas por duplicações ou triplicações e, em alguns casos, os segmentos triplicados são invertidos em relação às duplicações; (d) Regiões que apresentam o mesmo ponto de quebra em repetições parálogas; (e) Rearranjos sem envolvimento de LCRs. SRO: região de sobreposição mínima comum (smallest region of overlapping).

Nota: As linhas em preto representam o segmento genômico de um *locus*, os asteriscos são os genes sensíveis à dosagem, as setas laranjas representam repetições parálogas e as repetições de baixo número de cópias (LCRs), as linhas tracejadas indicam as regiões de LCR e as CNVs são representadas pelos retângulos coloridos (verde – deleção, vermelho – duplicação, azul – triplicação). A localização dos pontos de quebra de cada CNV é representada por setas cinzas na vertical. Os rearranjos recorrentes possuem o mesmo tamanho e o mesmo conteúdo gênico em diferentes indivíduos. Nos rearranjos não recorrentes, as CNVs apresentam tamanhos únicos e conteúdo genômico variável entre indivíduos não relacionados.

Fonte: adaptada de Carvalho e Lupski (2016).

Embora muitos genes e CNVs tenham sido associados à DI com o avanço das tecnologias genômicas, um percentual expressivo continua subdiagnosticado clínica e/ou molecularmente. No estudo realizado por Hu e colaboradores (2015), foram

avaliadas 405 famílias sugestivas de DI ligada ao cromossomo X (DILX) através de sequenciamento de exoma completo e mais da metade dos casos permaneceu sem solução. Assim, o desafio para ampliar o conhecimento sobre as causas relacionadas à DI será interpretar os mecanismos envolvidos e genes não codificantes de proteínas nos próximos anos (HU *et al.*, 2015). Atualmente, há registro de mais de 700 genes associados à DI, sendo 140 genes somente no cromossomo X (VISSERS *et al.*, 2015; GREENWOOD GENETIC CENTER, 2018).

O cromossomo X de mamíferos é enriquecido em genes relacionados às funções neurológicas (NGUYEN; DISTECHE, 2006b). Assim, genes ligados ao cromossomo X são altamente expressos no cérebro, e quando comparado a outros tecidos, a proporção de genes ligados ao cromossomo X expressos no cérebro é significativamente maior. Portanto, as formas de DILX são 3,5 vezes mais comuns que as formas autossômicas de DI (DENG *et al.*, 2014).

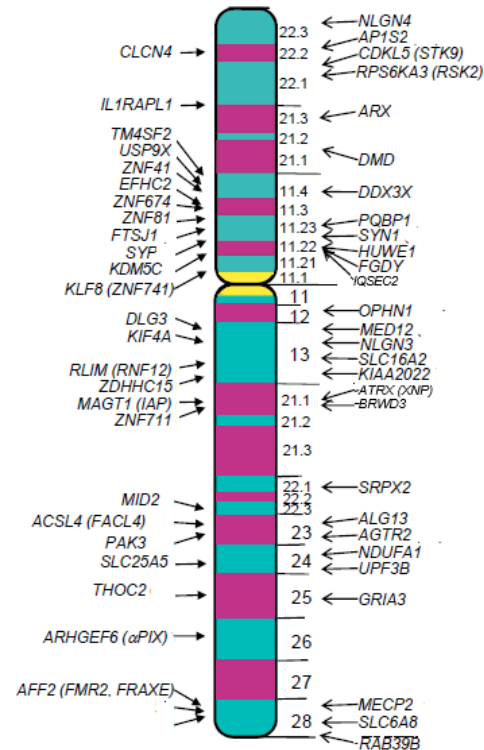
Deficiência intelectual ligada ao X

A identificação clínica de diversas síndromes relacionadas à DI, até a década de 60, já identificava um padrão genético ligado ao cromossomo X, pois havia um excesso de cerca de 30% de homens afetados em relação às mulheres, em todos os estudos. Assim, as evidências de segregação familiar da DI em homens e o número excedente de homens afetados na população contribuíram para a identificação da DILX (LUBS; STEVENSON; SCHWARTZ, 2012). A descrição de famílias com DILX e a identificação da síndrome X frágil, a forma mais comum de DILX, como uma condição monogênica, corroborou os dados do excesso de homens afetados em relação às mulheres (ROPERS, 2010). Como os homens apresentam apenas um cromossomo X, mutações que acometam esse cromossomo são mais aparentes em homens, como nos casos de DI.

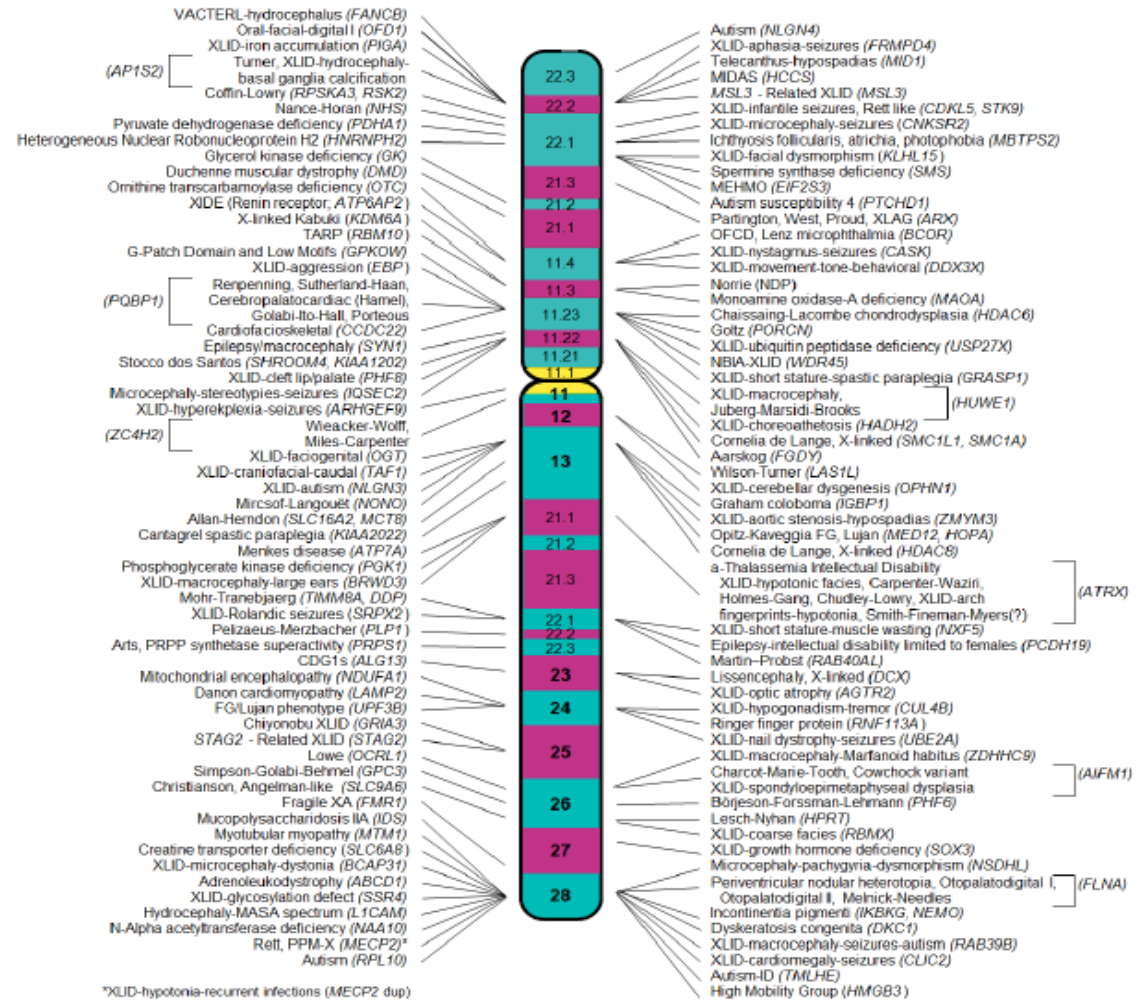
A DILX também pode ser dividida em DI ligada ao X síndrômica (DILX-S) e DI ligada ao X não síndrômica (DILX-NS), respeitando os mesmos aspectos citados para DI-S e DI-NS e caracterizada pela herança ligada ao cromossomo X (Figura 12) (ZECHNER *et al.*, 2001; MANDEL; CHELLY, 2004; GREENWOOD GENETIC CENTER, 2018).

Figura 12 - Genes no cromossomo X associados à DI

A



B



Legenda: (A) genes associados à DILX-NS; (B) os genes associados à DILX-S.

Fonte: Greenwood Genetic Center, dezembro de 2018.

Deficiência intelectual ligada ao X em mulheres

Como dito anteriormente, indivíduos do sexo masculino, por serem hemizigotos para genes localizados no cromossomo X, são mais suscetíveis a expressarem alterações genéticas nesse cromossomo. Por outro lado, mulheres portadoras de mutações no cromossomo X geralmente não são tão severamente afetadas, devido à ICX. Esse fato somado aos artefatos metodológicos faz com que, na maioria das vezes, mulheres com DI não sejam inseridas em estudos de rastreamento de mutações em genes do cromossomo X.

Por apresentarem o mecanismo de ICX, as mulheres portadoras de mutações no cromossomo X podem possuir uma compensação de dose a favor do cromossomo X normal, causando um desvio de ICX. Embora escassos, alguns estudos de famílias com possível DILX associam desvios extremos de ICX nas mulheres portadoras de mutações (PLENGE *et al.*, 2002; TZSCHACH *et al.*, 2015). No estudo realizado por Plenge e colaboradores, foi determinado o perfil de ICX em 155 mulheres de 24 famílias com 20 causas diferentes de DILX. Dentre essas mulheres portadoras, aproximadamente 50% apresentaram desvios de ICX ($\geq 80\%$) e nas 20 mulheres que foram informativas para a detecção da mutação, todas apresentaram desvio de ICX desfavorável ao cromossomo X portador da mutação (PLENGE *et al.* 2002). Recentemente, Tzschach e colaboradores (2015) avaliaram 150 homens com DI por sequenciamento de exoma total e incluíram a avaliação do perfil de ICX para as mães dos pacientes com herança sugestiva de DILX. Através dos resultados, verificaram que os desvios de ICX foram mais frequentes nas mães de pacientes com variantes patogênicas do cromossomo X (TZSCHACH *et al.*, 2015). Dessa forma, mutações no cromossomo X que possam causar DI em mulheres são muitas vezes silenciadas através de desvios de ICX, uma vez que podem ser fenotipicamente normais e segregar a mutação por gerações.

A maior causa de DI em mulheres é a síndrome de Rett (RTT- MIM#312750) com uma incidência de 1:15.000 nascimentos, causada na maioria dos casos por mutações no gene da proteína 2 de ligação a metil-citosinas (*Methyl-CpG binding protein 2 - MECP2*). As mulheres acometidas pela RTT possuem desenvolvimento normal até os 6 a 18 meses e depois iniciam uma regressão associada à microcefalia

adquirida, DI, ataxias e movimentos estereotipados. Mutações no gene *MECP2* também podem ser vistas em homens apresentando como característica clínica principal a encefalopatia epilética (ABDALA, 2018; VAN KARNEBEEK, 2018).

O gene *MECP2* atua como regulador da transcrição e a proteína por ele codificada é essencial para o desenvolvimento neurológico. O gene *MECP2* está localizado no braço longo do cromossomo X (Xq28) e, como desempenha um papel importante nas funções neuronais para os machos/homens, a deficiência da proteína MeCP2 é letal (NGUYEN *et al.*, 2012). Estudos recentes têm associado desvios de ICX nos casos mais severos de RTT, além de casos de mutações com herança materna em que as mães possuem desvios extremos de ICX desfavorável ao cromossomo X mutado (FIEREMANS *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2017).

No entanto, além da RTT, pouco se sabe a respeito dos genes responsáveis pela DI em mulheres e dos mecanismos moleculares envolvidos. Os estudos mais recentes com mulheres portadoras de DI foram realizados por um grupo belga em pacientes com DI, associando desvios de ICX a mulheres com DI severa (FIEREMANS *et al.*, 2015, 2016). No estudo de 2015, Fieremans e colaboradores associaram mutações nos genes *KDM5C* e *IQSEC* que escapam à ICX, em uma mulher com DI severa e características autistas, evidenciando uma preferência de ICX para o cromossomo X portador da mutação. No outro estudo, 288 mulheres belgas com DI severa e síndrômica foram avaliadas quanto ao perfil de ICX (FIEREMANS *et al.*, 2016). De acordo com Fieremans e colaboradores, das 19 pacientes com desvio de ICX, seis apresentaram variantes associadas à DILX nos genes *DDX3X*, *NHS*, *WDR45*, *MECP2* e *SMC1A*, sendo que os genes *DDX3X*, *SMC1A* escapam completamente à ICX e o gene *NHS* apresenta *status* de escape variável (TUKIAINEN *et al.*, 2017).

Ainda assim, há uma carência de estudos que visam identificar os genes que possam causar DI em mulheres e, sobretudo, em mulheres homozigotas para o polimorfismo presente no gene *AR*, que são excluídas das avaliações dos perfis de ICX por não serem informativas para esse gene.

1. OBJETIVOS

Com base na alta prevalência da DI na população mundial e na escassez de estudos voltados para a identificação de genes no cromossomo X relacionados à DI em mulheres, o trabalho desenvolvido teve como objetivo geral investigar desvios de ICX como ponto de partida para a identificação de alterações genéticas subdiagnosticadas relacionadas à DI em indivíduos do sexo feminino.

A partir dessa caracterização, tivemos como objetivos específicos:

- a) Investigar o perfil de ICX em mulheres com DI, utilizando-se uma nova abordagem através do gene *RP2*, a qual amplia a cobertura para as mulheres não informativas para o gene *AR*;
- b) Verificar se há seleção preferencial tecido-específico nos casos de desvios extremos de ICX, por meio do uso de dois tecidos com diferentes origens embrionárias (sangue e epitélio bucal);
- c) Analisar o padrão de ICX nas mães de mulheres com desvio de ICX extremo;
- d) Rastrear mutações de sequência no gene *XIST* nas mulheres com desvio de ICX, a fim de associar essas variantes no gene *XIST* com os desvios de ICX encontrados;
- e) Caracterizar a presença de CNVs (por *array*-CGH) e alterações de sequência (por análise de exoma completo) patogênicas nas mulheres com desvio extremo de ICX e os mecanismos moleculares envolvidos;
- f) Caracterizar a presença de CNVs patogênicas em outros cromossomos, além do cromossomo X, nas mulheres com DI;
- g) Correlacionar os dados obtidos com os fenótipos das pacientes e com os bancos de dados disponíveis.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

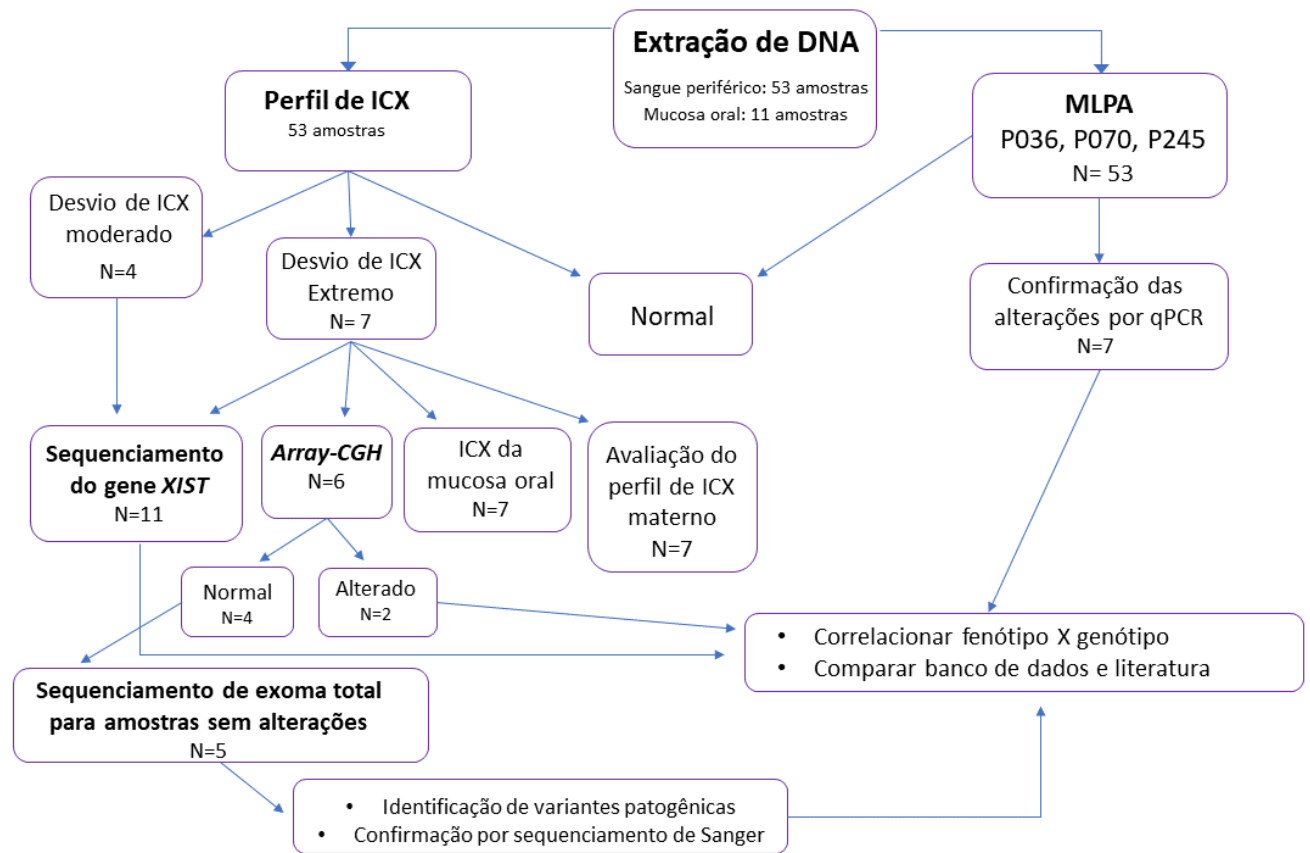
2.1. Considerações éticas

Este estudo integra um projeto maior, sob a coordenação da Prof^a Dr^a Cíntia Barros Santos-Rebouças, aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, através da Plataforma Brasil (CAAE 46769315.5.0000.5259). Todos os responsáveis pelos pacientes envolvidos no estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a participação, seguindo as condutas descritas na resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

2.2. Grupo Amostral

O grupo de estudo foi composto por 53 indivíduos do sexo feminino. Os critérios de inclusão foram portadoras de DI moderada/severa e esporádica, clinicamente bem documentadas, triadas a partir dos ambulatórios de Genética Clínica do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG-UNIRIO) e do Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG-UFRJ). Como a DI possui uma maior prevalência em homens e mulheres afetadas possuem formas de DI mais leves, a seleção de mulheres com DI moderada/severa e esporádica propicia a identificação de genes e/ou mecanismos relacionados ao cromossomo X que possam causar DI em mulheres. Um fluxograma representativo dos procedimentos adotados ao longo do estudo encontra-se esquematizado na figura 13.

Figura 13 - Fluxograma metodológico realizado no presente estudo



Fonte: A Autora, 2019.

2.3. Obtenção das amostras para as análises moleculares

2.3.1. Coleta de sangue periférico e de mucosa bucal

Os indivíduos participantes da pesquisa foram encaminhados para a coleta de amostras biológicas no Serviço de Genética Humana da UERJ (SERVGEN/UERJ). A coleta foi realizada por técnicos especializados, seguindo protocolos de assepsia e biossegurança.

2.3.2. Extração de DNA a partir de sangue periférico

As amostras de DNA genômico foram obtidas a partir de 5 mL de sangue periférico dos indivíduos selecionados, utilizando-se o *kit* comercial *Wizard Genomic DNA* (PROMEGA, EUA) e seguindo-se as recomendações do fabricante. Ao término da extração, uma alíquota de uso foi armazenada em geladeira à 4 °C e as demais em freezer à -20 °C.

2.3.3. Extração de DNA a partir de mucosa bucal

As amostras de mucosa foram coletadas a partir de um esfregaço do epitélio bucal. A coleta foi realizada esfregando o *swab* 20 vezes para baixo e 20 vezes para cima na mucosa bucal em cada lado interno da cavidade bucal. Após o procedimento, o *swab* foi cortado e colocado num tubo de 1,5 mL e a extração de DNA genômico foi realizada a partir do *kit* de extração *DNeasy* da *QIAGEN* (Alemanha). O *swab* permaneceu no tubo da extração até a etapa de uso da coluna do *kit*. As recomendações de extração do fabricante foram seguidas, com a adição de 25% do *Buffer AL* e da protease do *kit* para cada amostra. As amostras de DNA extraídas foram armazenadas em geladeira à 4 °C.

2.3.4. Quantificação das amostras

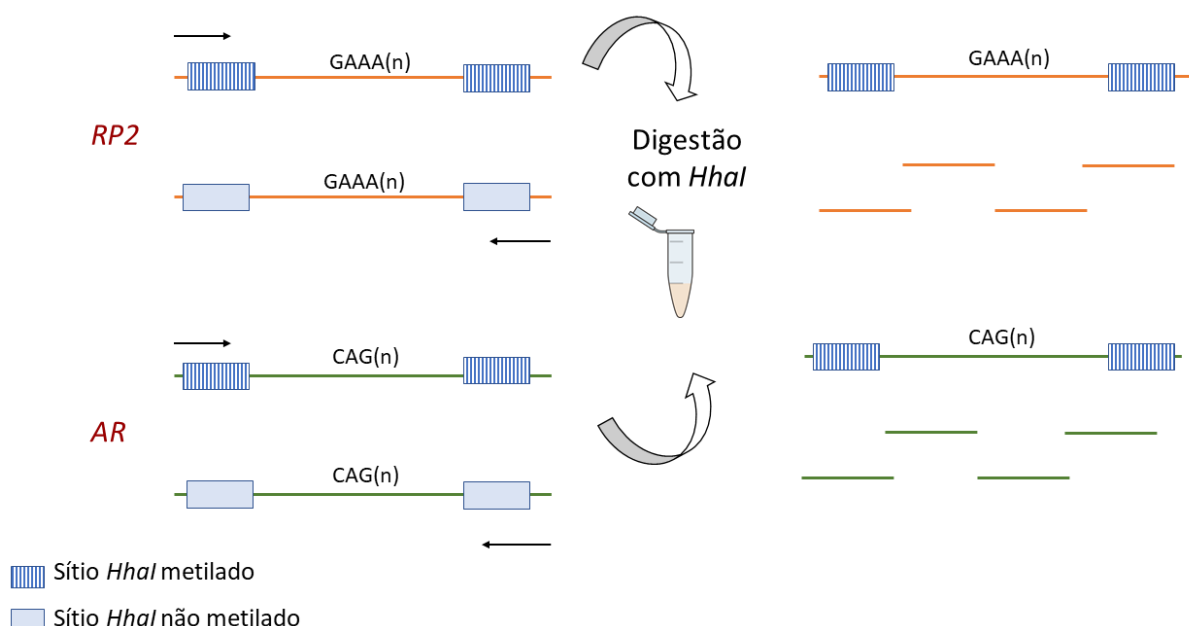
A concentração das amostras de DNA foi estimada através de espectrofotometria no equipamento *NanoDrop Lite* (UNISCIENCE – EUA). A concentração da amostra, assim como, seu grau de pureza (contaminação por proteínas, fenóis e carboidratos), foi estimada pelo equipamento com a configuração de quantificação de DNA de dupla fita.

Para análise da integridade das amostras de DNA extraídas, foi utilizada eletroforese em gel de agarose a 0,8% a uma voltagem de 60 volts por aproximadamente uma hora, numa cuba horizontal (MultiSUB Midi – Uniscience) com tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM – GE Healthcare; ácido bórico 89 mM - Merck; EDTA 2 mM - GE Healthcare). As amostras foram aplicadas no gel, adicionando-se 1 µL da amostra, 4 µL de água milliQ, 1 µL de corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (GE HEALTHCARE – Reino Unido), xileno cianol 0,25% (GE HEALTHCARE), glicerol 30% (ISO FAR – Brasil)] e 1 µL de GelRed (UNISCIENCE). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb plus *ladder* (THERMO FISHER SCIENTIFIC – EUA). A visualização das amostras de DNA no gel, após a eletroforese, foi realizada em um transiluminador de luz UV modelo L-Pix EX (Loccus Biotecnologia - Brasil), acoplado a um sistema de fotodocumentação.

2.4. Ensaio de inativação do cromossomo X

Para determinar o perfil de ICX das mulheres envolvidas no estudo, foram usados os genes *AR* e *RP2* num ensaio *biplex*, após digestão das amostras de DNA genômico com endonuclease de restrição sensível à metilação. O *locus* do receptor de androgênio humano (*AR*) e o *locus* da retinite pigmentosa 2 (*RP2*) possuem um padrão polimórfico de repetições (CAG e GAAA, respectivamente), localizadas próximas aos promotores desses genes que se encontram metilados no cromossomo X inativo (MACHADO *et al.*, 2014). A endonuclease utilizada (*HhaI*) possui um sítio de restrição nos genes *AR* e *RP2*, o que permite a clivagem dessa região quando a mesma não se encontra metilada (Figura 14). Assim, a região metilada dos genes permanecerá sem clivagem, permitindo a amplificação através de reação em cadeia da polimerase (PCR) *biplex* para os genes *AR* e *RP2* e cálculo do perfil de ICX da amostra. Os fragmentos polimórficos dos genes *AR* e *RP2* podem variar na população entre 200-250 pb para o gene *AR* e 350-391 pb para o gene *RP2* (MACHADO *et al.*, 2014) (Anexo I).

Figura 14 - Sítio de restrição da endonuclease *HhaI*



Nota: Os sítios da endonuclease antecedem as regiões repetitivas dos loci *AR* e *RP2*, usados para definir o perfil de inativação do cromossomo X das mulheres. Essas regiões repetitivas, ou STRs (do inglês *Short Tandem Repeats*), são polimórficas na população. Quando a região estiver metilada, como acontece nos genes que sofrem o processo de inativação no X inativo, os sítios da *HhaI* se encontram metilados, a endonuclease não realizará a clivagem e a região será amplificada através de PCR com os marcadores para os genes *AR* e *RP2*. Se a região estiver ativa, ela não se encontrará metilada e a enzima clivará o segmento mencionado.

Fonte: A Autora, 2019.

A reação de digestão foi realizada utilizando-se 300 ng/reação de DNA genômico, 0,3 µL (6 U) da endonuclease *HhaI* (NEW ENGLAND BIOLABS – EUA), tampão *CutSmart* (1X), em um volume final de 10,0 µL. Como controle da reação de digestão, uma reação sob as mesmas condições, mas sem a adição da enzima *HhaI*, foi realizada paralelamente para cada indivíduo. Para verificar a eficiência da enzima, foi utilizada uma amostra de DNA masculino, uma vez que homens, por apresentarem apenas um cromossomo X ativo, possuem os sítios de interesse clivados pela endonuclease, bem como uma amostra feminina com perfil de ICX já conhecido, em todas as reações. Os tubos com as reações foram colocados em um termociclador Veriti 9902 (THERMO FISHER SCIENTIFIC), por 2 horas a 37 °C. Ao término, as amostras foram armazenadas em freezer à -20°C. Após a digestão, as amostras de DNA genômico digeridas foram usadas para a reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores específicos para essas duas regiões simultaneamente (*biplex*), marcados na extremidade 5' com o fluoróforo FAM. As PCRs foram feitas nos equipamentos Veriti 9902 (THERMO FISHER SCIENTIFIC), com 1 µL de produto da

digestão com a endonuclease *HhaI* e sem a endonuclease, usando os reagentes da BIOTOOLS (Espanha) (Tabelas 3 e 4).

Para verificar a eficiência da endonuclease quanto à digestão, uma PCR foi realizada com um marcador para o gene autossômico *ESCO2* (8p21.1), paralelamente aos ensaios *biplex* (Apêndice I). O gene *ESCO2* é usado como controle da digestão, pois a região é totalmente clivada pela endonuclease *HhaI*. As condições da PCR para o gene *ESCO2* foram as mesmas usadas para os ensaios *biplex*.

Tabela 3 - Concentrações e reagentes usados para as PCRs *biplex*, visando a amplificação das regiões polimórficas de interesse nos genes *AR* e *RP2*

Reagentes	Concentrações usadas para uma reação
Tampão da reação (10 X)	1 X
dNTPs (5 mM)	200 mM
MgCl ₂ (50 mM)	62,5 mM
*Iniciador <i>Forward</i> (2 µM)	5 µM
*Iniciador <i>Reverse</i> (2 µM)	5 µM
Taq DNA polimerase (1 U/ µL)	1,0 U

Nota: O volume final das reações totaliza 25 µL. *Iniciadores descritos por Machado e colaboradores (2014), sequências específicas descritas no Anexo I.

Fonte: A Autora, 2019.

Tabela 4 - Ciclagens usadas para as PCRs *biplex*, *AR* e *RP2*

Ciclagem	Tempo
1ª - 95 °C	11 min
2ª - 94 °C	1 min
3ª - 59 °C	1 min
4ª - 72 °C	1 min
5ª - 60 °C	60 min

Fonte: A Autora, 2019.

A eficiência de amplificação foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% (THERMO FISHER SCIENTIFIC), diluída em tampão TBE 1X. As amostras foram aplicadas no gel, adicionando-se 3,0 µL do produto da PCR a 1,0 µL de corante de corrida e 1,0 µL de *Gel/Red* (UNISCIENCE). Como marcador de peso molecular foi utilizado o 1 kb plus *ladder* (THERMO FISHER SCIENTIFIC).

A corrida eletroforética foi realizada a 100 V por aproximadamente 40 minutos em cuba horizontal, utilizando a mesma solução de TBE 1X descrita anteriormente. Os géis foram visualizados e fotografados com o sistema de fotodocumentação L-Pix® Ex.

Uma amostra de cada produto de PCR foi submetida à eletroforese capilar no sistema de sequenciamento automático ABI 3130 (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Foram aplicados numa placa, 0,5 µL dos produtos da PCR juntamente com uma mistura composta de 9,35 µL de formamida *HiDi* (THERMO FISHER SCIENTIFIC) e 0,1 µL de LIZ 500 (THERMO FISHER SCIENTIFIC). A placa foi desnaturada a 95 °C por 5 minutos, colocada imediatamente no gelo e inserida no sequenciador automático. Os resultados foram analisados com o auxílio do programa GeneMarker V2.4.0 para genotipagem de microssatélites (SOFT GENETICS – EUA).

Para o cálculo da percentagem de ICX, foi utilizada a fórmula descrita por Busque e colaboradores (2009) (Figura 15). Os dados quanto aos limiares para se definir o desvio de ICX são adversos na literatura. Alguns autores consideram como desvio de ICX quando o perfil de inativação excede 65:35 (SATO; OGIKUBO; YOSHIZAWA-OGASAWARA, 2008), enquanto outros 70:30 (AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006) ou 80:20 (ØRSTAVIK, 2009). Assim, para este estudo, assumimos os pontos de corte de Fieremans e colaboradores (2016) e Amos-Landgraf e colaboradores (2006) considerando valores iguais ou acima de 80% a 89% como desvios de inativação moderados e acima de 90% como desvios extremos de ICX (BROWN; ROBINSON, 2000; AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006). A fim de descartar variações que pudessem ocorrer nas reações, foram realizadas no mínimo duas digestões diferentes para cada amostra que apresentou desvio de ICX em PCRs independentes, e ainda, para as amostras que apresentaram desvio extremo de ICX, utilizamos amostras de DNA extraídas a partir de mucosa bucal. Para as mulheres com DI que apresentaram desvios extremos de ICX, também verificamos o perfil de ICX da amostra de DNA materna e, nas mães que apresentaram desvios de ICX na amostra de sangue periférico, avaliamos também o perfil de ICX da amostra de DNA obtida de mucosa bucal.

Figura 15 - Fórmula para cálculo do desvio de ICX

$$\text{Padrão de ICX} = 1 - \left[\frac{\frac{(B/(B+A))}{(B'/(B'+A'))}}{\left(\frac{(B/(B+A))}{(B'/(B'+A'))} + \frac{(A/(B+A))}{(A'/(B'+A'))} \right)} \right]$$

Legenda: Na fórmula, “A” representa a área do alelo com menor número de repetições (CAG para *AR* ou GAAA para o *RP2*) e “B” representa a área do alelo com maior número de repetições. As letras acompanhadas com ‘ representam os alelos antes da digestão e as que não possuem são representadas pela área de amplificação, posteriormente à digestão com a endonuclease sensível à metilação.

Fonte: Adaptado de Busque e colaboradores (2009).

2.4.1. Testes estatísticos

A análise estatística usada para comparar a frequência de desvios na população de mulheres com DI e mulheres saudáveis do estudo de Borges (2018), foi feita através do cálculo de Qui-Quadrado (χ^2), sendo considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

2.5. ***Array-Comparative Genome Hybridization***

Para as mulheres que apresentaram desvio de ICX extremo (igual ou maior a 90%) para os genes *AR* e/ou *RP2*, foi realizada a investigação de CNVs por meio da técnica de *Array-Comparative Genomic Hybridization* (*array-CGH*). Essa técnica foi realizada por meio de uma colaboração estabelecida com o Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A avaliação das CNVs foi realizada através da plataforma CytoSNP 850K BeadChip (Illumina) que contém 850.000 sondas de SNPs distribuídas ao longo do genoma, com enriquecimento de sondas para 3,262 genes já associados a doenças constitucionais e câncer. Todos os procedimentos realizados durante a técnica, bem como a extração de dados do equipamento, foram feitos de acordo com o protocolo do fabricante (Illumina) e utilizando softwares específicos (iScan – Illumina e BluFuse Multi Software 3.2 - BlueGnome). As alterações de número de cópias foram consideradas seguindo os parâmetros de no mínimo cinco sondas

consecutivas com alterações e valores de $\log_2$ ultrapassando o limiar definido para ganho ou perda e tamanho mínimo de 100 kb. As CNVs identificadas foram comparadas às CNVs reportadas nos bancos de dados *Database of Genomic Variants* (DGV) e DECIPHER. O DGV possui informações a respeito de variações genômicas (CNVs) encontradas na população normal, consideradas como variantes benignas (MACDONALD *et al.*, 2014). O DECIPHER é um banco de dados formado por CNVs relacionadas a variantes possivelmente patogênicas (FIRTH *et al.*, 2009).

2.6. Sequenciamento de Exoma Total (WES)

As pacientes do estudo que exibiram desvios de ICX extremos (igual ou superior a 90%) e nas quais não foram identificadas alterações nos ensaios de *array-CGH* foram submetidas à técnica de sequenciamento de nova geração (WES-*Whole Exome Sequencing*), de forma terceirizada, através da plataforma ILLUMINA Hi-Seq2500.

Para sequenciamento de exoma completo (*Whole Exome Sequencing*, WES) de cada amostra, as bibliotecas de DNA foram preparadas utilizando o Nextera DNA Exome Kit (Illumina – EUA), seguindo recomendações do fabricante. O WES permite a leitura de regiões codificantes (exons), regiões reguladoras e regiões limítrofes (limites íntron/exon e regiões 3' UTR/5' UTR) de todo o genoma. As amostras de DNA genômico foram individualmente tagmentadas e fragmentadas em porções de cerca de 150 pb a 1,0 kb, para permitir a amplificação dos fragmentos por PCR nas etapas subsequentes. As amostras de DNA tagmentadas foram purificadas para remoção das enzimas de tagmentação e submetidas à PCR. Após a PCR, foram adicionadas sequências de identificação às amostras para permitir o reconhecimento das bibliotecas durante o processo de alinhamento das leituras (*reads*). Os fragmentos amplificados de menor tamanho (~150 pb a ~1,0 kb) foram capturados e separados dos demais, seguido de lavagem dos fragmentos de maior (> 1,0 kb) e menor (< 150 pb) tamanho.

Em seguida, as bibliotecas foram combinadas para verificar a distribuição de tamanho dos fragmentos gerados após a tagmentação. Após combinação das

bibliotecas, as amostras foram desnaturadas e submetidas à hibridização com sondas de biotina, que se ligam a regiões específicas do DNA para captura do exoma. As esferas magnéticas de estreptavidina foram utilizadas para capturar as sondas hibridizadas às regiões de interesse, etapa denominada “enriquecimento”, e o *pool* de bibliotecas foi eluído das esferas magnéticas e preparado para o sequenciamento.

O WES foi realizado em sequenciamento cíclico reversível por síntese. Nesse método, há repetição de três etapas cíclicas: a ligação competitiva dos nucleotídeos a uma fita nascente de DNA; a captura da imagem da fluorescência emitida por um fluoróforo ligado a cada um dos nucleotídeos incorporados; e a clivagem do grupamento inibitório da base nitrogenada ligada. O *pool* de bibliotecas foi sequenciado no modo *high output* com uma cobertura mínima de 100X.

As leituras filtradas de cada exoma foram alinhadas com o genoma humano de referência GRCh37/hg19.

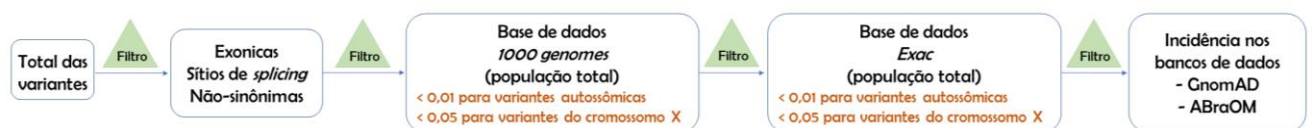
2.6.1. Seleção de Variantes para Validação

Variantes raras e potencialmente patogênicas foram selecionadas para validação por meio de sequenciamento de Sanger e predição *in silico* do impacto da variante na estrutura proteica. Essas variantes foram avaliadas quanto ao potencial patogênico pela base de dados ClinVar e por meio dos programas de predição *in silico* *MutationTaster*, *SIFT* (*Sorting Intolerant from Tolerant*) e *PolyPhen2* (*Prediction of Functional Effects of Human Non Synonymous SNPs*). Além disso, as variantes foram filtradas (Figura 16) e selecionadas obedecendo aos critérios abaixo relacionados, de acordo com o estabelecido por Fieremans e colaboradores (2016), com adaptações, excluindo variantes sinônimas e duplicações segmentares. Foram consideradas:

- a) variantes autossômicas com frequência menor que 1% em todas as populações combinadas (GMAF, *Global Minor Allele Frequency* < 1%) nas plataformas Exac e 1000 genomas;
- b) variantes ligadas ao cromossomo X com frequência menor que 5% em todas as populações combinadas (GMAF < 5%) nas plataformas Exac e 1000 genomas;

- c) variantes com frequência desconhecida na população (GMAF indefinido), sem registro em bancos de dados de variantes e/ou predita como deletéria e/ou possível/provavelmente patogênica;
- d) variantes sem sentido (*stop codon*) ou de mudança de fase de leitura (*frameshift*), com ou sem registro em bancos de dados, com baixa ou sem frequência definida na população (GMAF indefinido, < 1% para autossômicas ou < 5% para ligadas ao cromossomo X);
- e) Após a filtragem das variantes, buscas nas bases de dados *Genome Aggregation Database GnomAD* (GnomAD) e *Brazilian genomic variants* (ABraOM) também foram realizadas, a fim de verificar a incidência populacional da variante no banco de dados de projetos de larga escala e se havia registro de ocorrência da variante na população brasileira, respectivamente;
- f) As variantes filtradas foram comparadas à base de dados ClinVar para avaliar seu potencial.

Figura 16 - Etapas de filtragem das variantes obtidas por WES



Nota: Na primeira etapa, consideramos apenas as variantes exônicas, variantes em sítios de splicing e não sinônimas. Na segunda etapa, apenas as variantes as que possuíam registro de <0,05 na população geral na base de dados 1000 genomes permaneceram. Na terceira etapa, as inferiores a 5%, realizamos um filtro de incidência < 0,05 na população total da base de dados Exac. Consideramos ainda as variantes que possuíam reads com profundidade superior a 10. Dos dados de predições in silico, foram consideradas as variantes com valor de PolyPhen acima de 0,85 e SIFT abaixo de 0,15, bem como variantes sem valores agregados a essas ferramentas de predição de patogenicidade. Por fim, as variantes filtradas foram também comparadas às bases de dados ABraOM e GnomAD.

Fonte: A Autora, 2019.

2.7. Sequenciamento de Sanger

O sequenciamento de Sanger foi utilizado para confirmação de possíveis variantes causais encontradas no WES e para análise de mutações na região promotora e exon 1 do gene *XIST* nas amostras que apresentaram desvio de ICX superior a 80%.

2.7.1. Validação dos dados do WES

As mutações possivelmente patogênicas encontradas através do WES foram validadas através do Sequenciamento de Sanger, com oligonucleotídeos específicos (Apêndice I) desenhados para cada região alterada do cromossomo X, através do programa Primer 3 Plus. As concentrações e reagentes usados nas PCRs para o sequenciamento foram similares àsquelas usadas para a PCR bplex do Ensaio de ICX (Tabela 3), com uma concentração de DNA entre 100 e 200 ng por reação, volume final de cada reação de 25 µL e adaptações nas ciclagens (Tabela 5). A eficiência de amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, seguindo as mesmas condições estabelecidas no ensaio de ICX.

Tabela 5 - Ciclagens usadas para as PCRs do sequenciamento de confirmação do WES

Ciclagem		Tempo
1ª - 95 °C		5 min
2ª - 95 °C	1 min	
3ª - 60 °C	1 min	35 x
4ª - 72 °C	1 min	
5ª - 72 °C		7 min

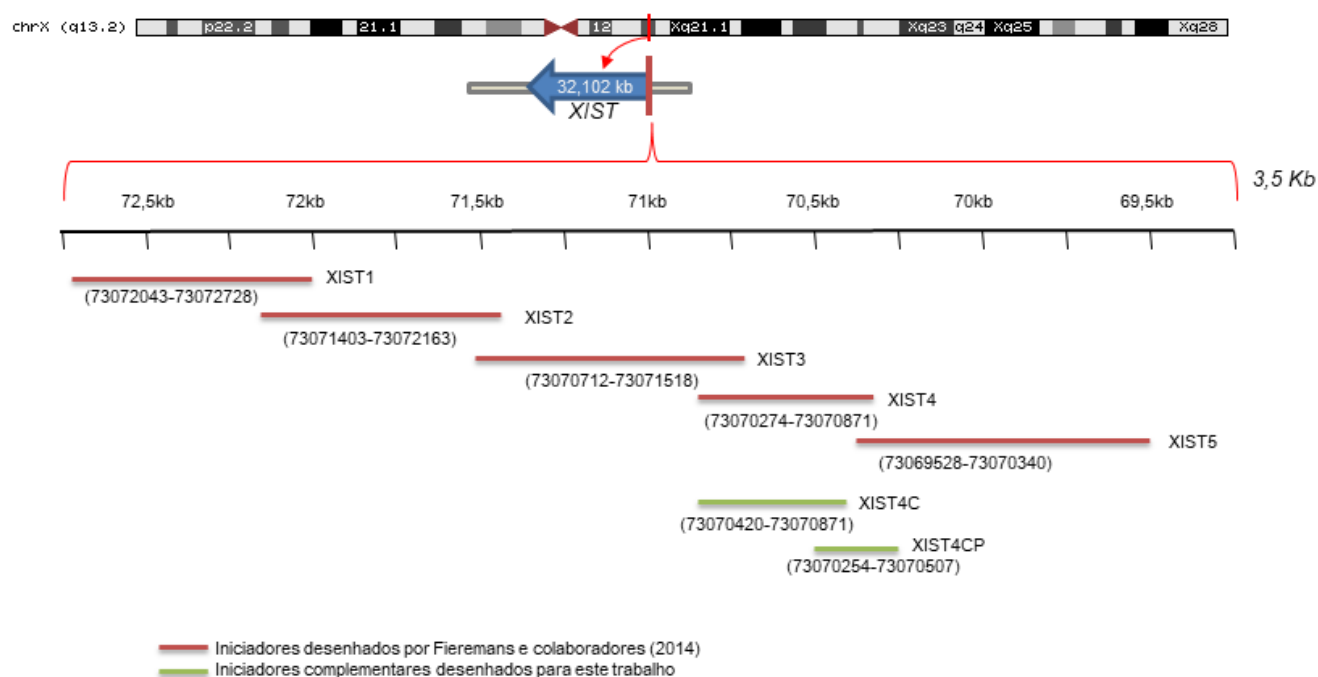
Fonte: A Autora, 2019.

2.7.2. Sequenciamento de Sanger para o gene *XIST*

As sequências dos iniciadores usados para as regiões do *XIST* foram extraídas de Fieremans e colaboradores (2014) e algumas foram redesenhadas para que se conseguisse cobrir trechos que não obtiveram sucesso na amplificação da região de interesse (Figura 17; Anexo I e Apêndice I). A seleção da região promotora e do início do primeiro éxon do gene *XIST* como alvos da amplificação se deu devido ao seu alto grau de conservação e a descrição prévia de mutações nessa região (PLENGE *et al.*, 1997; TOMKINS *et al.*, 2002).

As concentrações e reagentes usados nas PCRs para o sequenciamento do gene *XIST* obedeceram às mesmas condições do Sequenciamento de Sanger para mutações encontradas pelo WES, com adaptações apenas nas ciclagens (Tabela 6). A eficiência de amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%, seguindo as mesmas condições estabelecidas no ensaio de ICX.

Figura 17 - Região do gene *XIST* sequenciada e iniciadores



Fonte: A Autora, 2019.

Tabela 6 - Ciclagens usadas para as PCRs do sequenciamento do gene *XIST*

Ciclagem		Tempo
1ª - 95°C		5 min
2ª - 95°C	1 min	
3ª - Δ°C	1 min	35 x
4ª - 72°C	1 min	
5ª - 72°C		7 min

Nota: Cada marcador diferiu em relação à temperatura de pareamento (Δ - 3ª etapa). Para os iniciadores XIST1, XIST3 e XIST5, a temperatura na fase de pareamento foi de 57°C; para os iniciadores XIST2 e XIST4CP a temperatura na fase de pareamento foi de 58°C; para os iniciadores XIST4C a temperatura na fase de pareamento foi de 59°C.

Fonte: A Autora, 2019.

2.7.3. Purificação dos produtos da PCR e reação de sequenciamento

Antes de serem utilizados na reação de sequenciamento, os produtos da PCR foram purificados através das enzimas *ExoSap-IT* (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Foram utilizados 5,0 µL do produto da PCR e 2,0 µL das enzimas *ExoSap-IT*. As amostras foram colocadas em termociclador VERITI 9902 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) a 37°C por 15 minutos e posteriormente a 80°C por 15 minutos. Após a ciclagem, as amostras seguiram para a etapa de sequenciamento. Foram utilizados na reação de sequenciamento: 1,0 µL do produto purificado; 1,0 µL (3,2 µM) do oligonucleotídeo senso ou antisenso de cada marcador; 1,0 µL de tampão 5X (THERMO FISHER SCIENTIFIC); 0,5 µL do *Kit* BigDye Terminator v3.1 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) e água milliQ suficiente para um volume final de 20,0 µL. As reações de sequenciamento foram conduzidas em um termociclador VERITI 9902 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) (Tabela 7).

Tabela 7 - Ciclagem da reação de sequenciamento.

Ciclagem		Tempo
1º - 95 °C		1 minuto
2º - 96 °C	10 s	15 x
3º - 50 °C	15 s	
4º - 72 °C	4500 s	
5º - 96 °C	10 s	5 x
6º - 50 °C	15 s	
7º - 60 °C	5400 s	
8º - 96 °C	10 s	5 x
9º - 50 °C	15 s	
10º - 60 °C	120 s	
11º - 4 °C		10 min

Fonte: A Autora, 2019.

Após a ciclagem, o excesso de reagentes não incorporados na reação foi removido através da precipitação dos produtos do sequenciamento. Para isso, foram adicionados ao produto da reação 80 µL de isopropanol 75%, e a mistura permaneceu à temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a placa foi centrifugada a 4000 rpm por 40 minutos (SIGMA – UNISCIENCE, Modelo 2-16P), o sobrenadante foi descartado e a placa com o precipitado foi novamente centrifugada de forma invertida a 900 rpm por 1 minuto. A placa com as amostras foi levada ao termociclador VERITI 9902 por 5 minutos a 75 °C para a secagem. As amostras foram então conservadas a -20 °C até a aplicação no sistema de sequenciamento. Ao material precipitado, foram adicionados 10,0 µL de solução de formamida HiDi (THERMO FISHER SCIENTIFIC)

e a mistura foi submetida à desnaturação em termociclador VERITI 9902 por 5 minutos a 95 °C. Após essa etapa, as amostras foram colocadas no sistema de sequenciamento automático ABI 3130 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) para o sequenciamento. Os dados de sequenciamento obtidos foram analisados pelos programas de alinhamento de sequência BioEdit V.7.2.5® e SeqMan V7.1.0®.

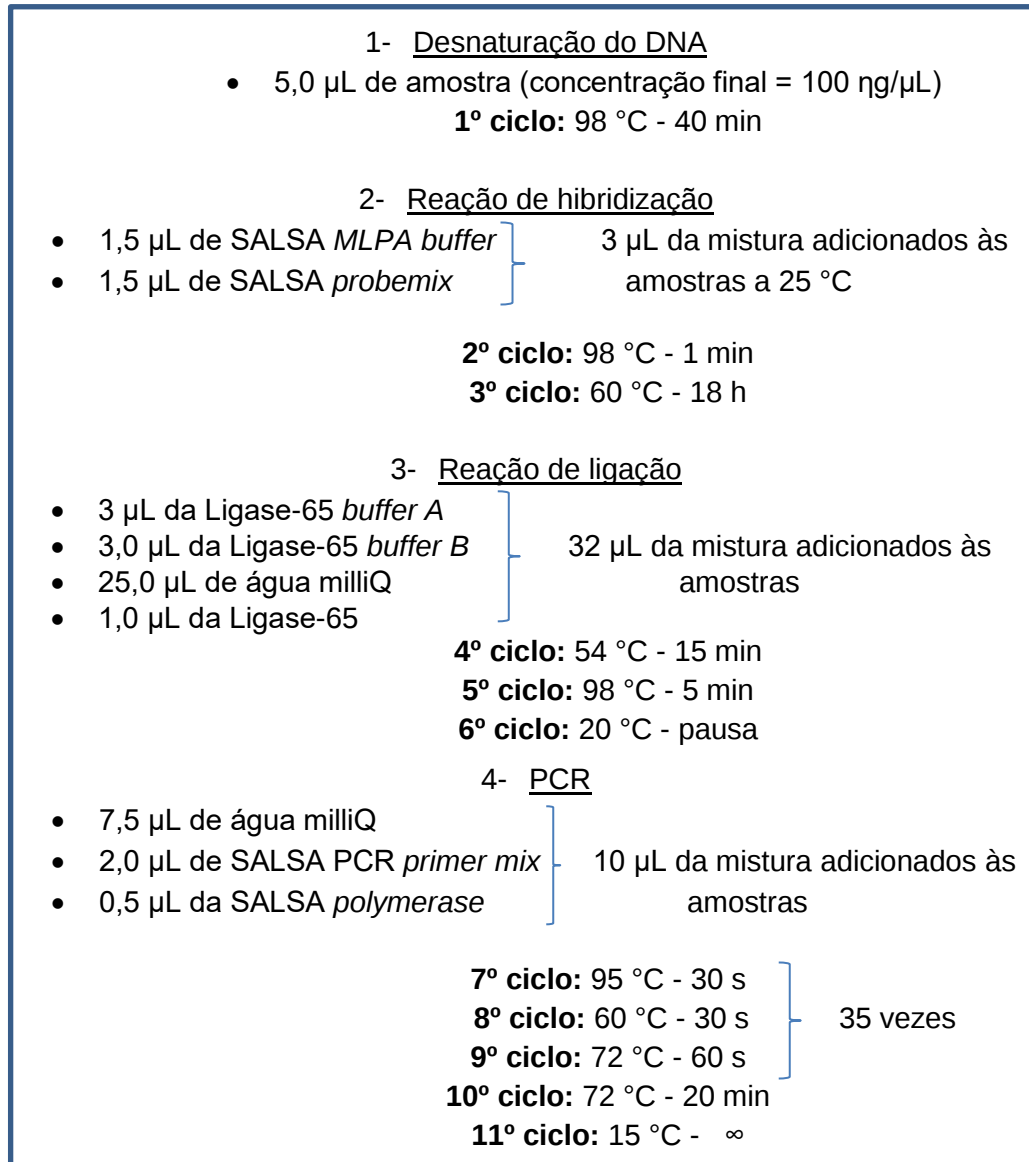
2.8. Detecção de variações no número de cópias gênicas a partir do *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification*

As amostras de DNA das mulheres inseridas no estudo foram submetidas à técnica de *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification* (MLPA) para a exclusão de CNVs que poderiam estar relacionadas à DI. Os kits comerciais da MRC-HOLLAND (Holanda), utilizados para o estudo nesse grupo selecionado de mulheres, foram: P036, P070 e P245 (Anexo II). Os kits P036 e P070 foram utilizados para detecção de microdeleções ou microduplicações comuns presentes em regiões subteloméricas e o P245 para microdeleções ou microduplicações comuns nas principais síndromes relacionadas a atraso no desenvolvimento e/ou DI.

A reação de MLPA é dividida nas etapas de desnaturação, hibridização, ligação e PCR. As reações foram realizadas de acordo com instruções do fabricante, no termociclador VERITI 9902 (THERMO FISHER SCIENTIFIC) (Figura 18). Após o término, 0,5 µL de cada reação foi distribuído em uma placa, para genotipagem de microsatélites no sistema de sequenciamento automático ABI 3130 (THERMO FISHER SCIENTIFIC), em uma mistura contendo 0,5 µL de LIZ e 9,0 µL de formamida HiDi (THERMO FISHER SCIENTIFIC) em cada poço da placa. Os dados foram analisados com auxílio do programa GENEMARKER V2.4.0 (SOFTGENETICS) e COFFALYSER.NET (MRC-HOLLAND).

As CNVs potencialmente patogênicas encontradas foram comparadas às CNVs depositadas nos bancos de dados online *Database of Genomic Variants* (DGV) e *DECIPHER*.

Figura 18 - Etapas da técnica de MLPA com os volumes, reagentes e ciclagens utilizadas nas reações para os kits P036, P070 e P245



Fonte: A Autora, 2019.

2.9. PCR em tempo real quantitativa

A técnica de PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi usada para confirmação das CNVs potencialmente patogênicas encontradas através do MLPA e análise da extensão das alterações encontradas no *array*-CGH.

Para cada CNV potencialmente patogênica, encontrada através da MLPA, foram desenhados pares de oligonucleotídeos flanqueadores, através do programa *Primer 3 Plus*. Todos os oligonucleotídeos foram validados quanto à sua eficiência, antes dos experimentos, através de curvas de diluição.

As qPCRs foram conduzidas em duplicatas, usando como referência os genes *ALB* (para as alterações autossômicas) e *PORCN* (para as alterações ligadas ao X), e dois controles de indivíduos saudáveis. Cada reação continha 10 ng de DNA; 5 µM de cada oligonucleotídeo (IDT – EUA) e *SYBR Green 2X* (THERMO FISHER SCIENTIFIC), totalizando um volume final de 15 µL. As reações foram processadas em um sistema de PCR em tempo real 7500 FAST (THERMO FISHER SCIENTIFIC), sendo submetidas à ciclagem padrão do equipamento.

Para a análise dos dados, utilizamos os Cts calculados pelo software 7500 - versão 2.0.6 (THERMO FISHER SCIENTIFIC). Os resultados foram transferidos para uma planilha do *Excel* (MICROSOFT – EUA). O número relativo de cópias gênicas foi calculado utilizando-se o método de $\Delta\Delta C_t$ (PFAFFL, 2001).

3. RESULTADOS

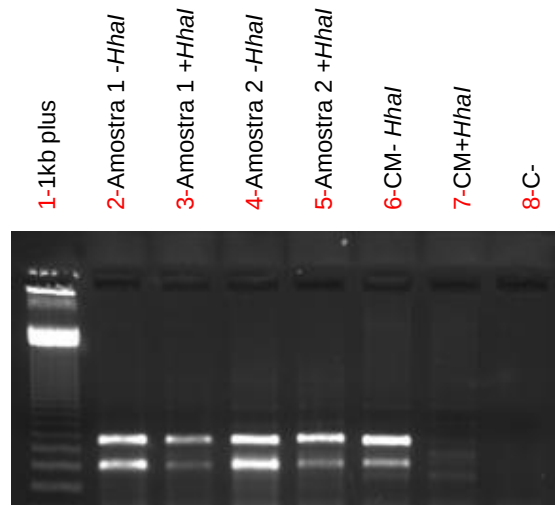
Através do estudo realizado, foram selecionadas 85 amostras de DNA obtidas a partir de sangue periférico (53 de mulheres com DI e 32 de familiares) e 24 amostras de DNA obtidas a partir de mucosa bucal (11 de mulheres com DI e 13 de familiares). A faixa etária das mulheres com DI analisadas variou entre 3-43 anos (média: 14,88 anos, desvio padrão: 8,59).

A seguir, serão abordados os perfis de ICX e as variantes encontradas na amostra de estudo. Cabe ressaltar que as posições genômicas informadas estão de acordo com o descrito no *UCSC Genome Browser* (GRCh37/hg19).

3.1 Ensaios de inativação do cromossomo X

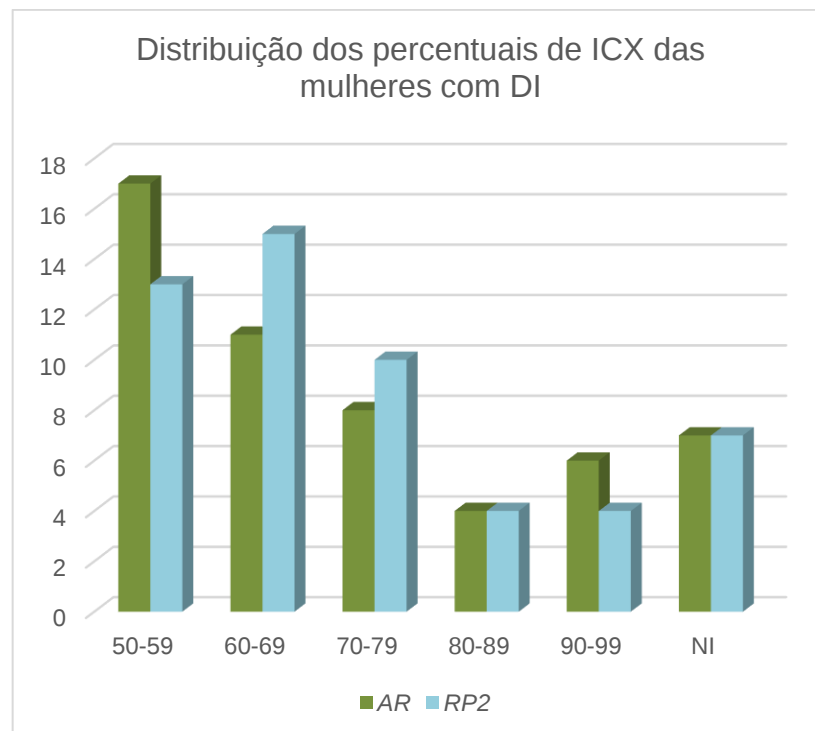
As reações de digestão e ensaios *biplex* para os genes *AR* e *RP2* foram realizadas com sucesso para todas as 53 amostras de mulheres do estudo (Figura 19 e 20; Apêndice II). Foram identificadas quatro mulheres com desvio moderado (Tabela 8 e Figura 21) e sete mulheres com desvio extremo de ICX (Figura 22 e Tabela 9). Seis mulheres apresentaram homozigose para o gene *AR* e oito mulheres para o gene *RP2*, sendo consideradas não informativas para esses genes (Apêndice II; Figura 23). Nenhuma mulher portadora de DI apresentou homozigose para os genes *AR* e *RP2* simultaneamente.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos da PCR *biplex* de amostras não digeridas (-*HhaI*) e digeridas (+*HhaI*)



Legenda: *CM – controle masculino da digestão, C- controle negativo da PCR.
Fonte: A Autora, 2019.

Figura 20 - Distribuição dos percentuais de ICX na amostra de mulheres com DI



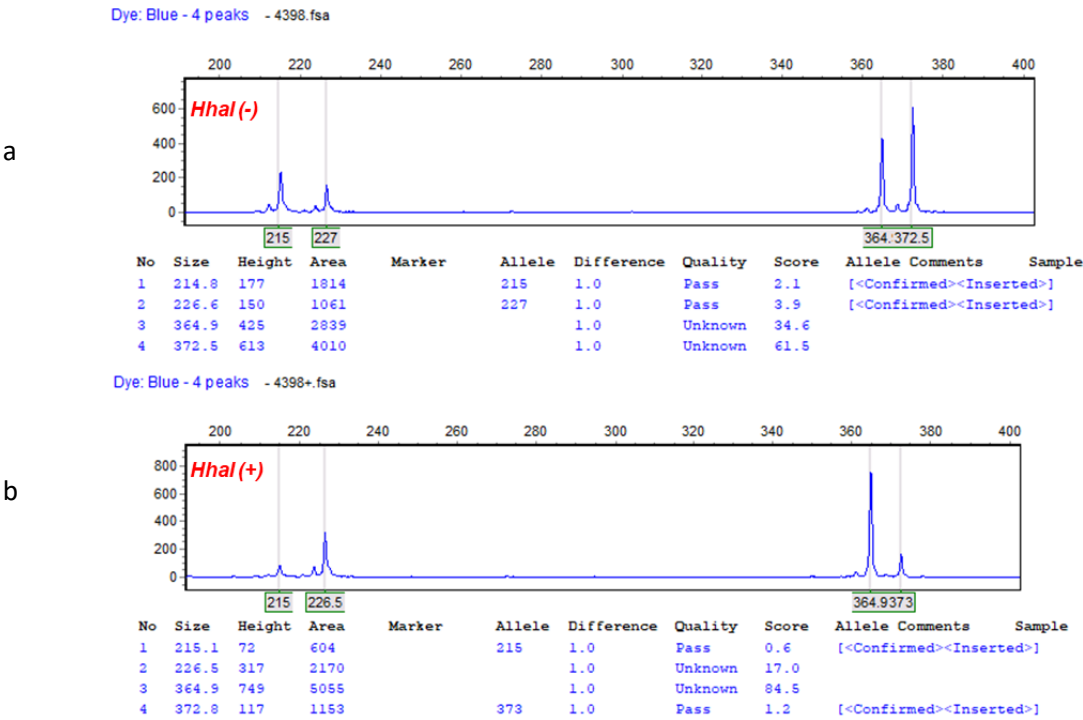
Legenda: *NI: Não informativa para o gene.
Fonte: A Autora, 2019.

Tabela 8 - Perfil de inativação das amostras com desvio de ICX moderado para ambos os genes *AR* e *RP2*

PERFIL DE ICX					
Amostras	AR		RP2		Idade (anos)
	Alelos	%	Alelos	%	
4308	206/ <u>221</u>	81:19	364/364	NI	30
4330	229/229	NI	358/ <u>371</u>	84:16	17
4350	<u>226</u> /258	82:18	<u>371</u> /371	NI	14
4398	215/ <u>227</u>	85:15	<u>364</u> /373	86:14	17

Legenda: NI: Não Informativo; Alelos sublinhados significam os que foram preferencialmente inativados.
Nota: A idade referida aos pacientes na tabela é respectiva ao momento da coleta da amostra de sangue periférico.
Fonte: A Autora, 2019.

Figura 21 - Eletroferograma da paciente 4398 com desvio de ICX moderado (acima de 80%)



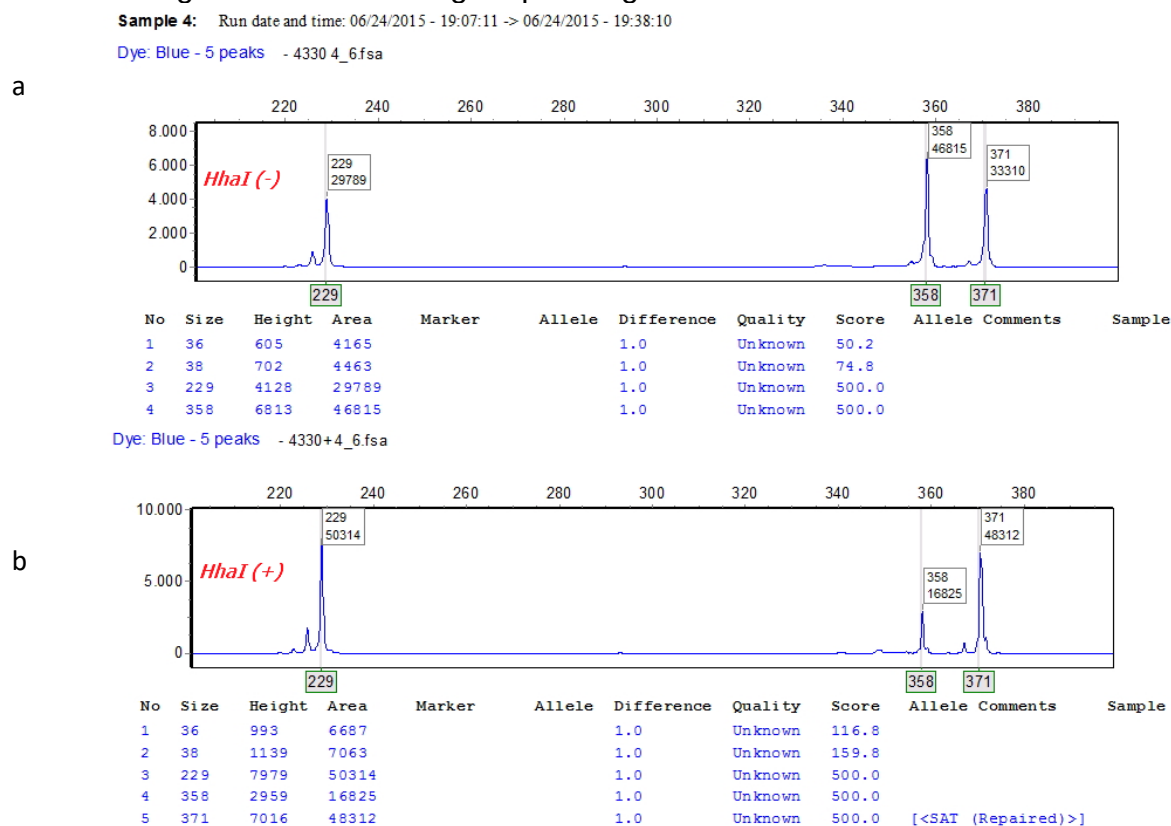
Legenda: (a) amostra não digerida com a endonuclease *HhaI*; (b) amostra digerida com a endonuclease *HhaI*, demonstrando inativação preferencial dos alelos de 227 pb (*AR*) e 364 pb (*RP2*).
Nota: Perfil de ICX da paciente - *AR*: 215- 86% ativo e 227- 14% ativo; *RP2*: 364 pb- 14% ativo e 373 pb- 86% ativo.
Fonte: A Autora, 2019.

Figura 22 - Eletroferograma da paciente 4329 com desvio extremo de ICX (acima de 90%)



Legenda: (a) amostra não digerida com a endonuclease HhaI; (b) amostra digerida com a endonuclease HhaI, demonstrando inativação preferencial dos alelos de 225 pb (AR) e 374 pb (RP2).
Nota: Perfil de ICX da paciente - AR: 225 pb- 1% ativo e 241 pb- 99% ativo; RP2 371 pb- 96% ativo e 374 pb- 4% ativo.
Fonte: A Autora, 2019.

Figura 23 - Eletroferograma da paciente 4330 homozigota para o polimorfismo do gene *AR* e heterozigota para o gene *RP2*



Legenda: (a) amostra não digerida com a endonuclease *HhaI*; (b) amostra digerida com a endonuclease *HhaI*, demonstrando inativação preferencial dos alelos, com a preferência em inativar o alelo de 371 pb (Perfil de inativação: 358 pb- 84% ativo e 371 pb- 16% ativo).

Fonte: A Autora, 2019.

Tabela 9 - Perfil de ICX (sangue e mucosa bucal) das amostras de mulheres com DI com desvio extremo ($\geq 90\%$) em ambos os genes *AR* e *RP2*

Amostra	PERFIL DE ICX						Idade (anos)
	Sangue				Mucosa bucal		
	AR		RP2		AR	RP2	
	Alelos	%	Alelos	%	%		
4311	235/238	81:19	363/371	98:2	80:20	95:5	29
4313	222/240	98:2	360/360	NI	92:18	NI	16
4329	226/241	99:1	371/374	96:4	56:44	56:44	13
4351	241/250	90:10	367/382	83:17	87:13	71:29	25
4488	219/243	93:7	359/366	95:5	91:9	93:7	27
4489	220/233	97:3	349/359	95:5	96:4	91:9	10
4517	229/235	99:1	371/375	86:14	72:28	61:49	19

Legenda: NI: Não Informativo; Alelos sublinhados significam os que foram preferencialmente inativados.

Nota: A idade referida aos pacientes na tabela é respectiva ao momento da coleta da amostra de sangue periférico.

Fonte: A Autora, 2019.

Das sete mulheres que apresentaram perfis de ICX com desvios extremos em pelo menos um dos genes analisados, duas não apresentaram desvio de ICX na mucosa. Para todas as amostras, os alelos preferencialmente silenciados foram os mesmos, tanto para amostra de DNA proveniente da mucosa bucal, como para a de sangue periférico.

Para as pacientes nas quais foram identificados desvios extremos de ICX, as amostras maternas também foram analisadas quanto ao perfil de ICX (Tabela 10). A mãe da paciente 4488 (4488A) apresentou desvio moderado de ICX para a amostra de sangue, com uma preferência em inativar o alelo de 240 pb. No entanto, a amostra de mucosa bucal, exibiu padrão de ICX aleatório. Para a amostra da mãe da paciente 4313 (4313A), foi identificado o mesmo perfil anteriormente observado no sangue, sendo evidenciado desvio de ICX somente para o *locus AR*.

A amostra da mãe da paciente 4489 (4489A) demonstrou homozigose para os genes *AR* e *RP2*, não sendo possível estabelecer o perfil de ICX da amostra. Por indisponibilidade da amostra de sangue, a amostra da mãe da paciente 4517 (4517A) foi testada apenas para a mucosa bucal.

Tabela 10 - Perfil de ICX (sangue e mucosa bucal) nas amostras das mães das pacientes com DI que apresentaram desvio extremo de ICX

PERFIL DE ICX											
Amostra	Sangue				Mucosa Bucal				Idade (anos)	% ICX filhas (sangue)	
	AR		RP2		AR		RP2			AR	RP2
	Alelos	%	Alelos	%	Alelos	%	Alelos	%			
4311A	216/235	63	363/382	55	-	-	-	-	52	81:19	98:2
4313A	231/240	91	360/371	74	231/240	92	360/371	66	36	98:2	NI
4329A	239/241	67	371/381	75	-	-	-	-	54	99:1	96:4
4351A	237/241	74	367/367	NI	237/241	-	367/367	-	50	90:10	83:17
4488A	237/243	80	366/366	NI	237/243	62	366/366	NI	55	93:7	95:5
4489A	233/233	NI	359/359	NI	-	-	-	-	30	97:3	96:4
4517A	-	-	-	-	229/250	52	371/371	NI	44	99:1	86:14

Legenda: NI: Não Informativo; Alelos sublinhados significam os que foram preferencialmente inativados.

Nota: A idade referida na tabela é respectiva ao momento da coleta da amostra de sangue periférico.

Fonte: A Autora, 2019.

3.2. Investigação das causas de desvios extremos de ICX nas mulheres com DI

Das sete pacientes com DI que possuíam desvio extremo de ICX, seis foram submetidas ao método de *array-CGH* (Tabela 11). Através desta análise, foi observado que as pacientes 4351 e 4488 (n= 2/6) possuíam CNVs patogênicas associadas à DI. Destas seis amostras, quatro não exibiram CNVs possivelmente causais e foram submetidas ao WES. Na análise dos dados gerados a partir do WES, foram identificadas quatro mutações no cromossomo X relacionadas à DI, localizadas nos genes *HDAC8*, *NLGN4X*, *TAF1* e *USP9X* (Tabela 11).

Tabela 11 - Resultados obtidos através do *array-CGH* e WES nas pacientes que apresentaram desvio extremo de ICX

Paciente	Desvio de ICX (%)		<i>Array-CGH</i>	Variante Identificada no <i>Array-CGH</i>	WES	Variante Identificada no WES	Variante
	AR	RP2					
4311	81:19	98:2	Sem alterações	-	<i>HDAC8</i>	Mutação <i>missense</i>	NM_018486:exon9: c.G958A;p.G320R
4313	98:2	NI	arr[GRCh37] 7p14.2(35,244,965-35,273,291)x3 (VUS)	-	<i>NLGN4X</i>	Mutação <i>missense</i>	NM_001282146:exon6: c.C2284G;p.L762V
4329	99:1	96:4	arr[GRCh37] Xp22.33(60,814-219,632)x2 (VUS) arr[GRCh37] 5p15.2(12,692,686-12,968,815)x1 (VUS)	-	<i>TAF1</i>	Mutação <i>missense</i>	NM_001286074:exon18: c.G2774A;p.G925D
4351	90:10	83:17	arr[GRCh37] 3q26.31q26.32(175,507,453-177,095,072)x1; arr[GRCh37] 2q21.1(130,650,828-131,082,639)x3 (VUS) arr[GRCh37] Xp22.33(829,150-990,180)x2 (VUS)	Deleção em 3q26	-	-	-
4488 ^A	96:4	98:2	arr[GRCh37] 2p25.3p16.1 (42444-55749307)x3 arr[GRCh37] Xq25q28(122,132,166-155,097,214)x1	Translocação 2:X ^Δ	-	-	-
4489	97:3	95:5	Sem alterações	-	<i>USP9X</i>	Inserção <i>frameshift</i>	NM_001039590:exon29: c.4290dupC;p.H1430fs
4517	99:1	86:14	-	-	-	-	-

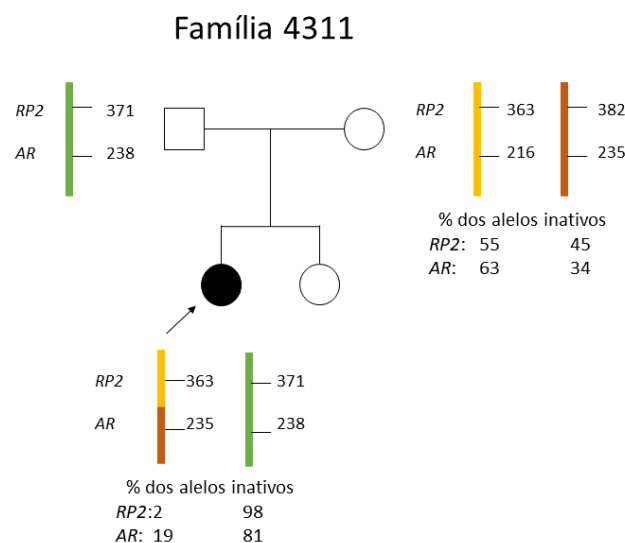
Legenda: *NI: Não Informativa; ^Δ amostra detalhada nos resultados da MLPA; VUS: Variante de significado desconhecido.

Fonte: A Autora, 2019.

3.2.1 Variante *missense* em *HDAC8* – Paciente 4311

A paciente 4311 apresentou desvio extremo de ICX apenas para o gene *RP2* (98:2), enquanto que para o gene *AR* apresentou desvio de ICX moderado (81:19) (Figura 24). Como a paciente não demonstrou nenhuma CNV sugestiva de patogenicidade através do *array*-CGH, a amostra foi encaminhada para WES. O WES identificou 569.039 SNPs e 103.545 Indels (inserções ou deleções) e, após a filtragem das variantes potencialmente patogênicas, foi identificada uma variante *missense* no éxon 9 do gene *HDAC8* (NM:018486/ENST00000373573 - c:958G>A, p.G320R) localizado em Xq13.1, confirmada através de sequenciamento de Sanger (Figura 25). A variante não foi encontrada na amostra materna e por inviabilidade de contato, a amostra paterna não pode ser testada.

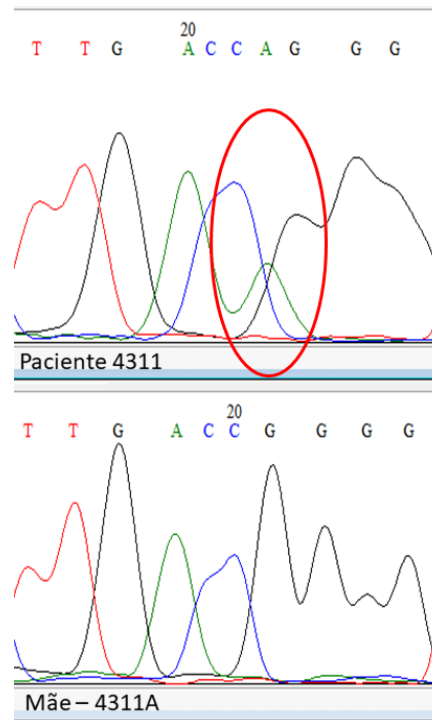
Figura 24 - Heredograma da família 4311 e perfil de ICX



Nota: De acordo com a herança, a paciente demonstra a preferência em inativar os alelos de origem paterna (AR 219 pb e RP2 359 pb).

Fonte: A Autora, 2019.

Figura 25 - Sequenciamento de Sanger para o gene *HDAC8*



Nota: O trecho superior exhibe o ponto da mutação missense presente na paciente, no exon 9 (NM:018486/ENST00000373573 - c:958G>A, p.G320R). Na parte inferior da imagem está o sequenciamento da amostra materna, sem alterações.

Fonte: A Autora, 2019.

A variante c:958G>A no gene *HDAC8* está depositada no dbSNP (*Current Build* 152) com número rs398122909 e é classificada como patogênica com significado clínico reportado para síndrome de Cornélia de Lange 5 (ClinVar: 39713). O programa de predição *in silico* PolyPhen não gerou resultados para a variante *HDAC8*, enquanto o MutationTaster e PROVEAN/SIFT classificaram a mutação como patogênica. Através da busca da variante nas bases de dados ABraOM, ExAC e GnomAD, não foi localizado nenhum registro envolvendo o ponto da mutação.

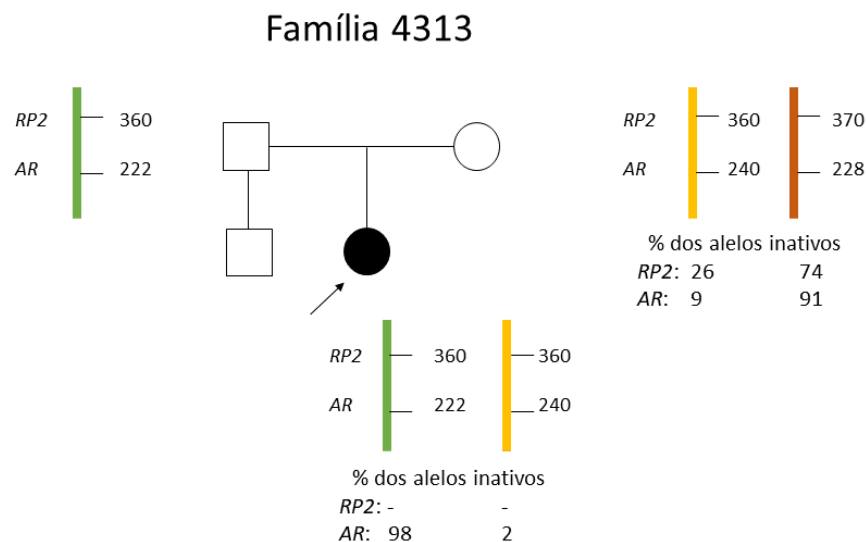
De acordo com aspectos clínicos, a paciente 4311 (33 anos) apresenta face síndrômica, DI severa e epilepsia.

3.2.2 Variante *missense* em *NLGN4X* – Paciente 4313

A paciente 4313 apresentou desvio extremo de ICX para o gene *AR* (98:2) e possui homozigose para o *RP2* (Figura 26). Não foram identificadas CNVs

patogênicas através do *array-CGH*, apresentando apenas uma CNV com significado desconhecido (VUS, do inglês *variant of unknown significance*) no cromossomo 7 (arr[GRCh37] 7p14.2(35,244,965-35,273,291)x3) (Apêndice II). A paciente 4313 foi submetida ao WES e dentre os 424.566 SNPs e 75.572 Indels, foi identificada uma variante *missense* no exon 6 do gene *NLGN4X* (NM:001282146/ENST00000275857 - c.2284C>G, p.L762V) localizado em Xp22.31-32, confirmada por sequenciamento de Sanger (Figura 27). A amostra materna foi submetida ao sequenciamento de Sanger e não foi evidenciada a presença da variante. Por inviabilidade de contato, a amostra paterna não pode ser testada.

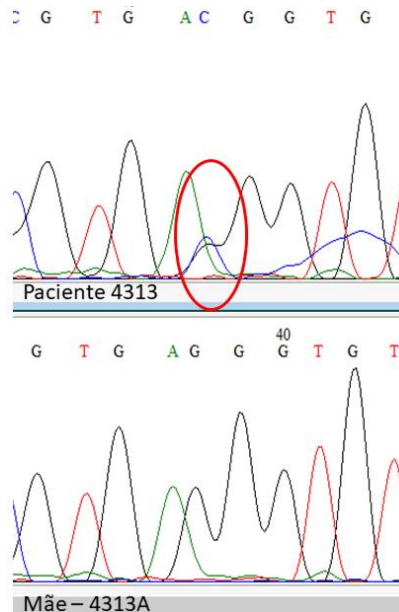
Figura 26 - Heredograma da família 4313 e perfil de ICX



Nota: De acordo com a herança, a paciente demonstra a preferência em inativar os alelos de origem paterna (AR – alelo 222 pb). No entanto, não conseguimos inferir o perfil de ICX para o gene *RP2* pois ela apresenta homozigose para o gene.

Fonte: A Autora, 2019.

Figura 27 - Sequenciamento de Sanger para o gene *NLGN4X*



Nota: O trecho superior está no ponto da mutação *missense* presente na paciente, no exon 6 (NM:001282146/ENST00000275857 - c.2284C>G, p.L762V). Na parte inferior da imagem, está o sequenciamento da amostra materna, sem alterações.

Fonte: A Autora, 2019.

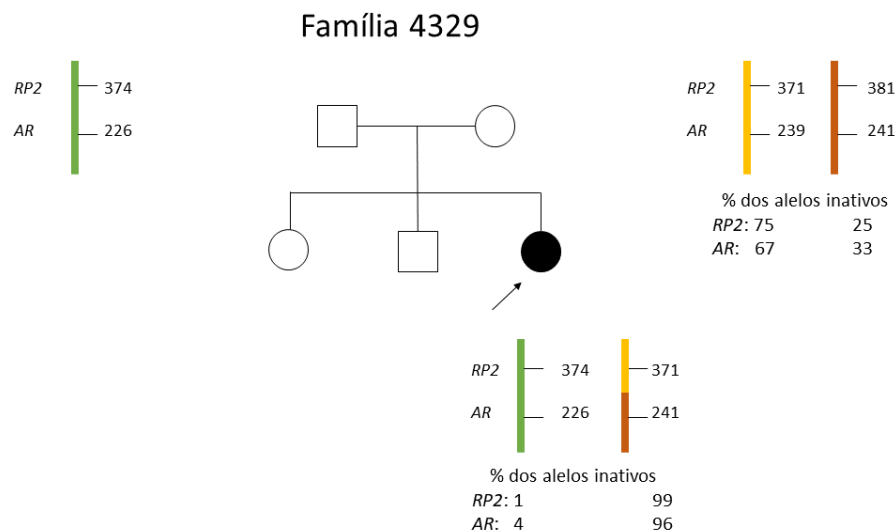
Através da busca da variante c.2284C>G no gene *NLGN4X* na base de dados ABraOM, não foi localizado registro desta mutação. Na base de dados *Exac* há registro dessa variante na população latina (variante: X:5811025 G/C), com uma frequência de 0.0001073. No GnomAD, há registro da variante em dois exomas (uma ocorrência na população latina e uma categorizada como outros; frequência alélica global = 0,00001090). Não há registro da variante no dbSNP e no ClinVar. Os programas de predição *in silico* classificaram a variante como patogênica.

Os aspectos clínicos da paciente 4313 (19 anos) são: DI severa, dismorfias faciais, atraso na fala, distúrbios psiquiátricos e epilepsia. A paciente faz uso de medicações (Carbamazepina, Aldol, Fenegan) e a mãe não possui histórico de abortos.

3.2.3 Variante *missense* em *TAF1* – Paciente 4329

A paciente 4329 apresentou desvio extremo de ICX para ambos os genes *AR/RP2* apenas na amostra sanguínea (*AR* -99:1; *RP2* – 96:4; Figura 28). Através do *array-CGH*, foram identificadas duas VUS (arr[GRCh37] Xp22.33 (60,814-219,632)x2; arr[GRCh37] 5p15.2(12,692,686-12,968,815)x1) (Apêndice II). Assim, a amostra da paciente 4329 seguiu para o WES e, dentre os 385.946 SNPs e 70.792 Indels, foi identificada uma mutação *missense* no exon 18 do gene *TAF1* (NM_001286074/ENST00000437147 - c.G2774A:p.G925D), localizado em Xq13.1. A variante foi confirmada por sequenciamento de Sanger e os pais da probanda não possuem a mutação, sendo a ocorrência comprovadamente *de novo* (Figura 29). As bases de dados populacionais ABraOM, ExAC e GnomAD não possuem registros da variante, bem como na base de dados ClinVar. Os programas de predição *in silico* classificaram a variante como patogênica.

Figura 28 - Heredograma da família 4329 e perfil de ICX



Nota: De acordo com a herança, a paciente demonstra a preferência em inativar os alelos de origem materna (*AR* 241 pb e *RP2* 371 pb).

Fonte: A Autora, 2019.

A paciente 4329 (17 anos) nasceu através de parto normal sem intercorrências gestacionais, de pais não consanguíneos saudáveis, no entanto, a mãe possuía idade avançada (40 anos), mas sem histórico de abortos. Ao nascer, apresentou icterícia,

microcefalia, hipotonia e cardiopatia congênita (estenose valvar aórtica grave, hipertrofia ventricular concêntrica esquerda e valva aórtica bicúspide). Possui ainda refluxo gastroesofágico, com vários episódios de bronquite e asma. Na infância, evoluiu com DI e atraso no desenvolvimento motor. Possuiu desenvolvimento puberal normal apesar de menstruações irregulares. Exames complementares de ultrassonografia abdominal apresentaram aspectos normais. Não há relatos de convulsões.

Figura 29 - Sequenciamento de Sanger para o gene *TAF1*



Nota: O trecho superior está no ponto da mutação *missense* presente na paciente, no exon 18 (NM_001286074/ ENST00000437147:exon18:c.G2774A:p.G925D). Na parte inferior da imagem, está o sequenciamento da amostra materna e paterna, sem alterações.

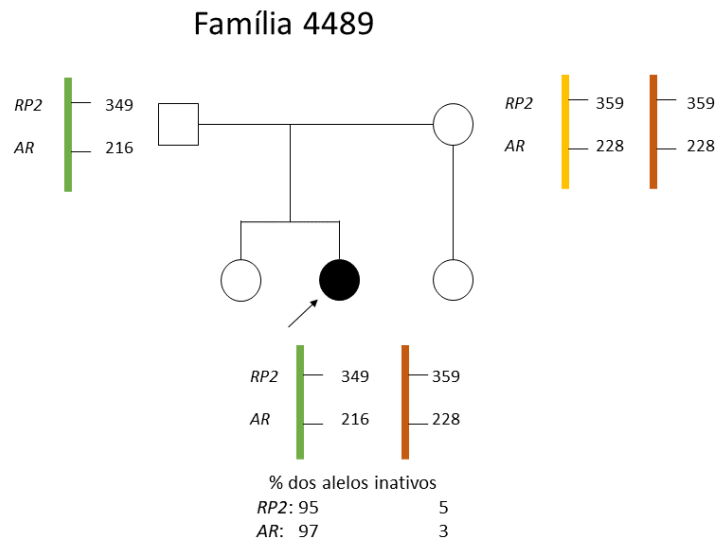
Fonte: A Autora, 2019.

3.2.4 Inserção frameshift em USP9X – Paciente 4489

A paciente 4489 apresentou desvio de ICX extremo para ambos os genes (*AR* – 97:3; *RP2* – 95:5; Figura 30). A amostra foi submetida ao *array-CGH* não tendo sido encontradas CNVs patogênicas. Dentre os 569.039 SNPs e 96.196 *InDels* encontrados através do WES, foi identificada uma inserção *frameshift* no exon 29 do gene *USP9X* (NM_001039590:exon29:c.4290dupC:p.H1430fs), localizado em Xp11.4. A variante foi confirmada através de sequenciamento de Sanger e não está presente nas amostras parentais, sendo de ocorrência comprovadamente *de novo* (Figura 31). Não há registro no ABraOM, ExAC, GnomAD e ClinVar para a variante encontrada. Como a variante é *frameshift*, os programas de predição *in silico* PolyPhen2 e PROVEAN/SIFT não puderam ser usados. Através da predição pelo MutationTaster, a variante foi considerada como patogênica.

A paciente possui atraso no desenvolvimento, DI, baixa estatura, dismorfias faciais e alterações pigmentares. O desenvolvimento infantil incluiu atraso motor (sentou-se sozinha com 16 meses, não engatinhou e andou sozinha aos 2 anos e 3 meses) e de linguagem. Não possui histórico de convulsões. O desenvolvimento puberal foi precoce, com menarca aos 9 anos de idade. Em seu último exame físico, verificou-se a estatura: 1,42 m (P3), peso: 50 Kg (P50) e perímetro cefálico: 52 cm (Mediana). As características faciais da paciente consistem em: testa proeminente com estreitamento bitemporal, sobrancelhas altas, fendas palpebrais curtas, nistagmo horizontal, nariz proeminente com narinas alargadas, orelhas baixas, lábio superior fino, filtro liso e longo, micrognatia, palato alto. Possui ainda assimetria mamária com hipomastia assimétrica (mama direita maior que a esquerda), mamilos hipoplásicos e escoliose. Em aspectos dermatológicos, apresenta mudanças de pigmento apenas nas linhas de Blaschko. Possui Hálux valgo, na mão direita tem polidactilia pós-axial e sindactilia cutânea entre 4-5º pododáctilos. Não apresenta assimetria corporal e hipertricose. A paciente tem anomalias congênitas como catarata, nistagmo horizontal, perda de audição e escoliose. Através de exames complementares foram observadas anormalidades cerebrais (ressonância magnética do cérebro), com aplasia do *vermis* cerebelar (variante de Dandy Walker) e tronco cerebral fino. Não apresentou anormalidades no ecocardiograma e em exames para hormônios tireoidianos. A mãe não possui histórico de abortos.

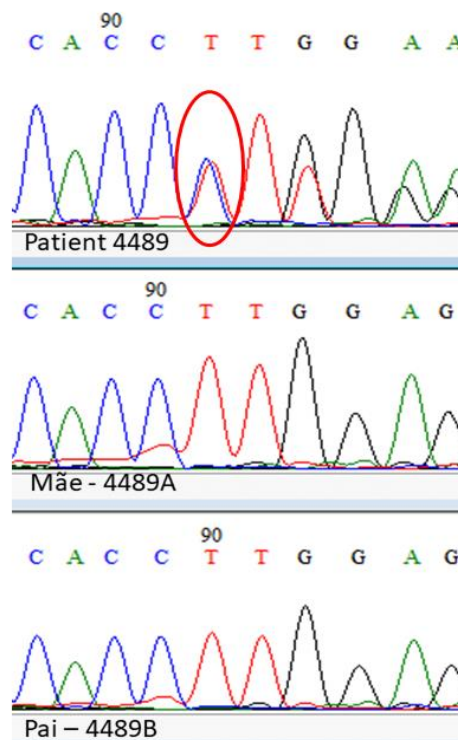
Figura 30 - Heredograma da família 4489 e perfil de ICX



Nota: De acordo com a herança, a paciente demonstra a preferência em inativar os alelos de origem paterna (AR 216 pb e RP2 349 pb).

Fonte: A Autora, 2019.

Figura 31 - Sequenciamento de Sanger para o gene *USP9X*



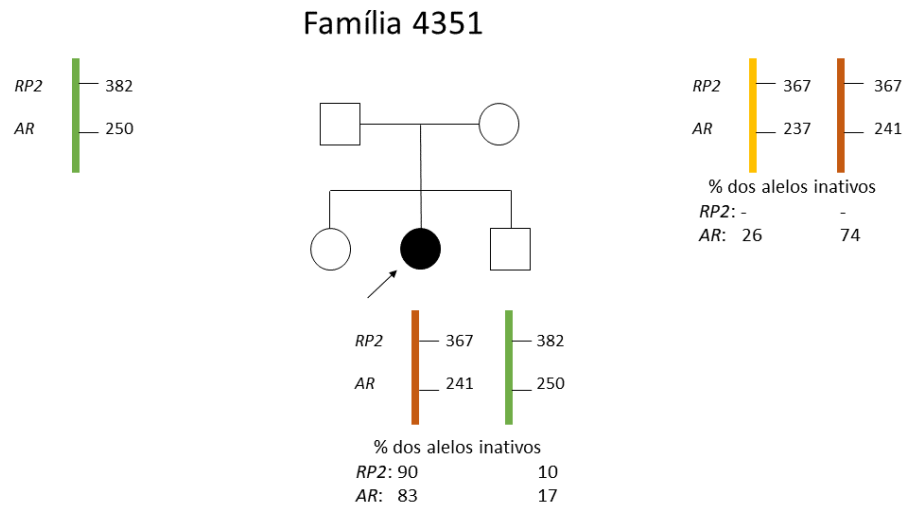
Legenda: O trecho superior está no ponto da mutação frameshift presente na paciente, no exon 29 (NM_001039590 e NM_001039591:exon29:c.4290dupC:p.H1430fs). Na parte inferior da imagem, está o sequenciamento da amostra materna e paterna, sem alterações.

Fonte: A Autora, 2019.

3.2.5 Deleção em 3q26 – Paciente 4351

A paciente 4351 apresentou desvio extremo para o gene *AR* (90:10) e desvio moderado para o gene *RP2* (83:17) (Figura 32). A paciente 4351 foi submetida ao *array-CGH* e foi identificada uma alteração patogênica em 3q26 (arr[GRCh37] 3q26.31q26.32(175,507,453-177,095,072)x1) com uma extensão de 1,5 Mb, além de duas VUS (Figura 33). Para um maior detalhamento da extensão desta alteração encontrada, as regiões adjacentes à deleção foram avaliadas por qPCR. Nesta avaliação, foi observado que o tamanho da deleção era maior (11.236 kb) que a região inicialmente detectada pelo *array-CGH* (Figura 34). Devido à presença de regiões adjacentes com grande conteúdo de elementos repetitivos, o detalhamento dos pontos de quebra dessa região foi inviável e, provavelmente por esse mesmo motivo essas regiões não estão cobertas nos ensaios de *array-CGH*. A região da deleção envolve o gene *TBL1XR1*, o último éxon do gene *NAALADL2*, três genes de ncRNA: *LINC00501*, *LINC01208*, *LINC01209* e o gene de miRNA *MIR7977*. Os pais da paciente 4351 foram submetidos à qPCR e não possuem a alteração, sendo, portanto, uma mutação *de novo*. De acordo com os registros depositados na base de dados DGV, não há ocorrências de deleções com a mesma extensão que a paciente 4351. Na base de dados DECIPHER, embora não haja registro de CNVs com a mesma extensão, há seis registros de deleções que envolvem algum trecho da deleção encontrada na paciente 4351 (DECIPHER: pacientes: 289477, 263688, 249559, 258003, 339850, 294056).

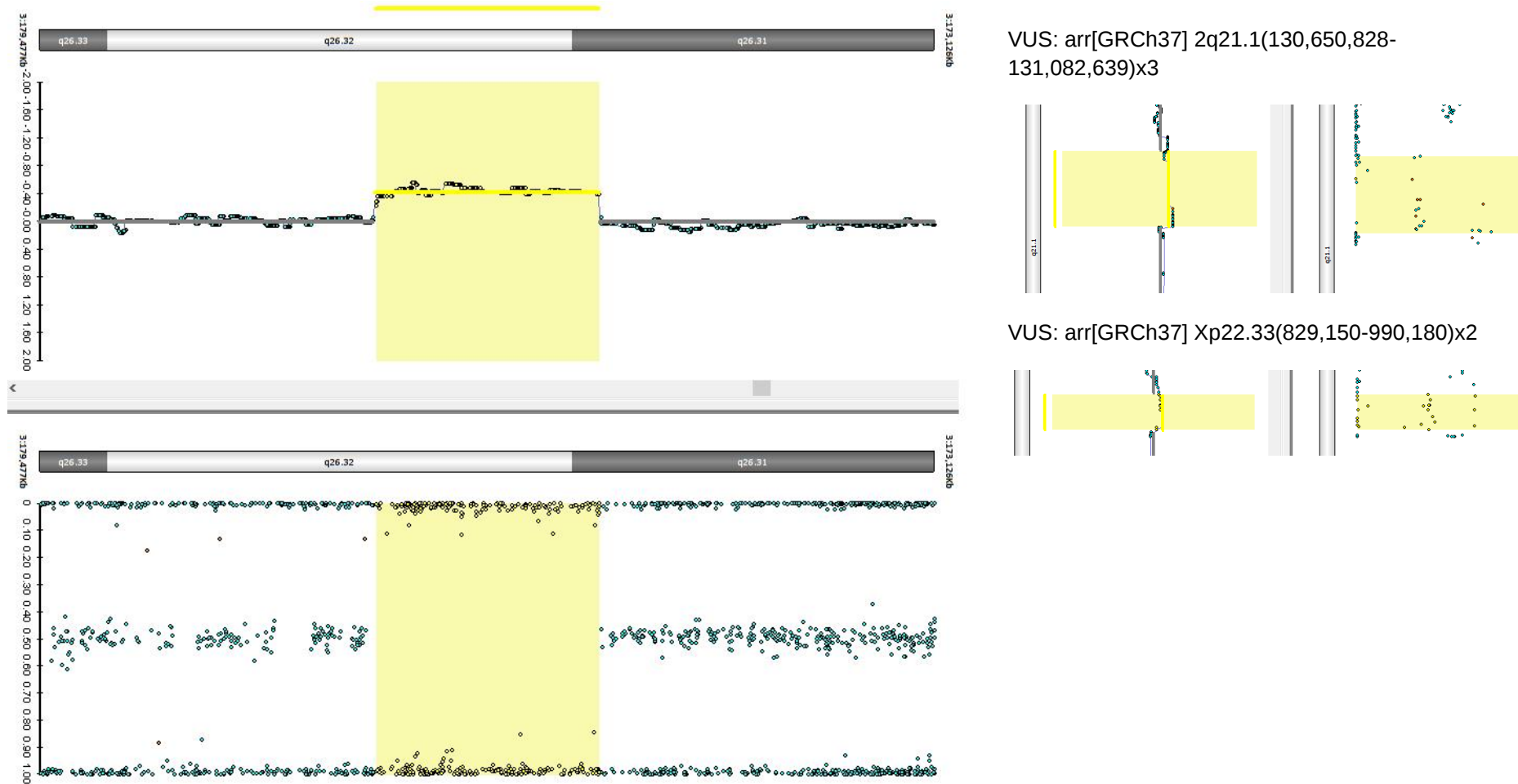
Figura 32 - Heredograma da paciente 4351 e perfil de ICX



Nota: De acordo com a herança, a paciente demonstra a preferência em inativar os alelos de origem materna (AR 241 pb e RP2 367 pb).

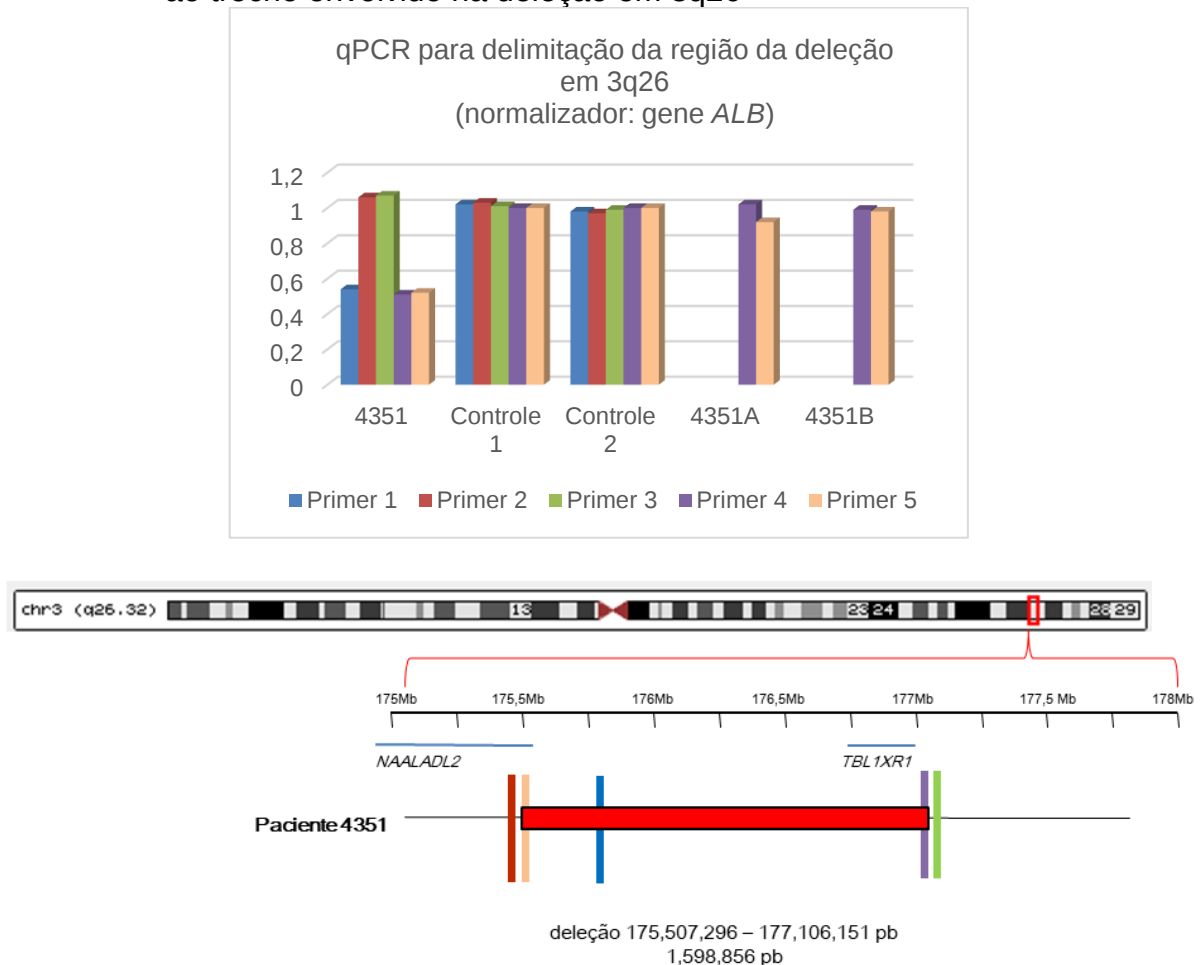
Fonte: A Autora, 2019.

Figura 33 - Resultado do *array*-CGH da paciente 4351. À esquerda o trecho da deleção patogênica (arr[GRCh37] 3q26.31q26.32(175,507,453-177,095,072)x1) e à direita, as duas VUS



Fonte: A Autora, 2019.

Figura 34 - Resultado da qPCR da paciente 4351 para as regiões distais e proximais ao trecho envolvido na deleção em 3q26



Nota: Na imagem abaixo do gráfico, os oligonucleotídeos usados para a qPCR estão esquematizados nas regiões cromossômicas de pareamento, identificando o trecho de deleção de 11.236 pb maior que o observado no *array*-CGH.

Fonte: A Autora, 2019.

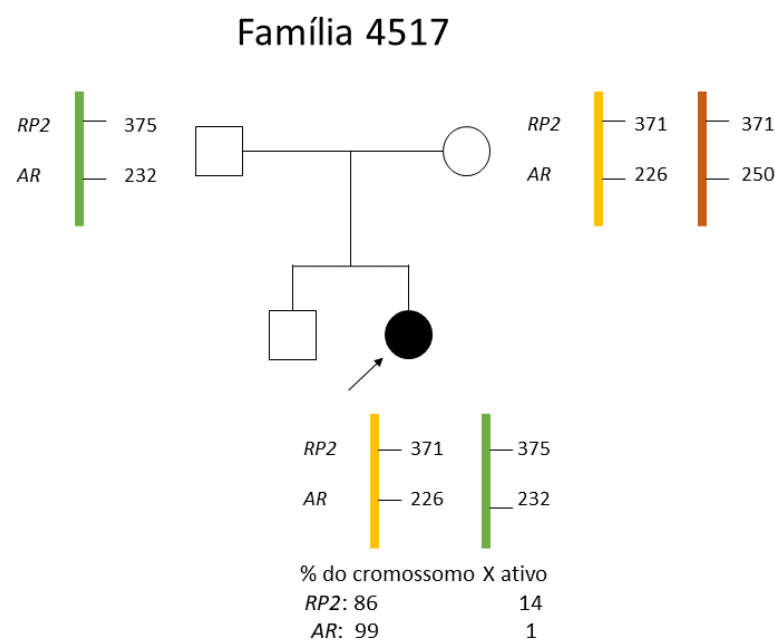
A paciente 4351 (28 anos) nasceu de parto normal a termo, com 2600 g e 46 cm, chorou logo ao nascer e teve obstrução de canal lacrimal. Ao nascer, teve alta com a mãe, mas houve desidratação com febre de 40 °C, sendo reinternada para tratamento com antibiótico. Apresentou atraso neuropsicomotor, firmou a cabeça com mais de 6 meses, andou sem apoio aos 15 meses e teve controle de esfínteres aos 2 anos. Possui hábitos de roer unhas, tirar casca de feridas, chupa o cabelo e fala sozinha. Teve bronquite de 1 a 7 anos. Fez terapia aos 9 anos para déficit de atenção, apresenta DI, déficit de atenção, ansiedade, distúrbio de comportamento, comorbidade opositiva-desafiador. Possui tomografia computadorizada de crânio e eletroencefalograma normais. Apresenta varizes nos membros inferiores desde os 9 anos, teve desenvolvimento puberal normal com menarca aos 11 anos. No exame

físico, apresentou 84,1 kg e 157 cm de altura, com perímetro cefálico de 55 cm. A paciente é hipotônica, hiperativa, possui fronte ampla, implantação baixa posterior do cabelo, pescoço curto, estrabismo, lábio superior fino, tórax largo, polegares e háluces largos, 2º pododáctilo D e E com desvio medial e mancha café com leite no abdome. Seus exames complementares não apresentaram anormalidades (ultrassonografia de abdome total, ecocardiograma, radiografia de seios da face), com exceções da radiografia de coluna que demonstrou escoliose lombar e exame oftamológico com uma baixa de sensibilidade à luz no olho esquerdo. A mãe não possui histórico de aborto.

3.2.6 Paciente 4517

A paciente 4517 apresentou desvio extremo de ICX na avaliação da amostra sanguínea para ambos genes (*AR* - 99:1, *RP2* – 86:14) e apresentou ICX randômico na avaliação do perfil de ICX a partir do material de mucosa bucal (*AR* - 72:28, *RP2* - 61:49) (Figura 35). A paciente teve sua amostra submetida ao WES recentemente, ainda sem resultados.

Figura 35 - Heredograma da paciente 4517 e perfil de ICX



Nota: De acordo com a herança, a paciente demonstra a preferência em inativar os alelos de origem paterna (*AR* 232 pb e *RP2* 375 pb).

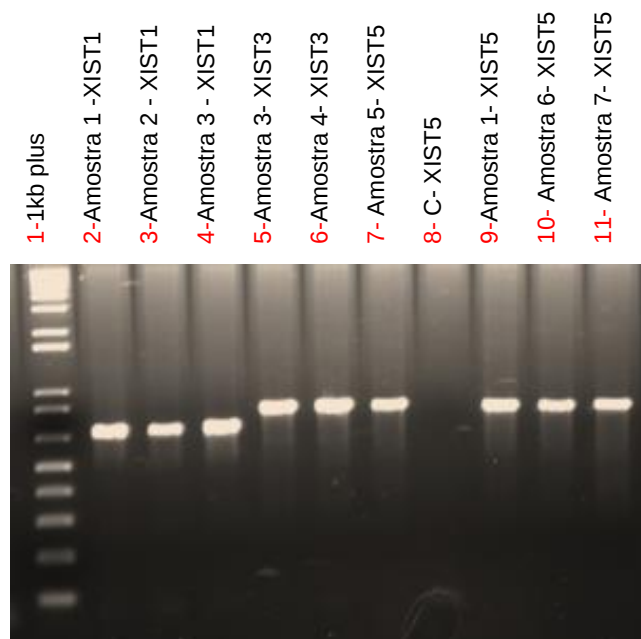
Fonte: A Autora, 2019.

A probanda teve convulsões nos primeiros meses de vida que não ocorreram mais ao longo do desenvolvimento. Faz uso de homeopatia para atraso intelectual (Glifage XR500). Apresentou pré-natal sem intercorrências, nascida de parto normal e a mãe possui histórico de aborto espontâneo no primeiro trimestre.

3.3 Sequenciamento do gene *XIST*

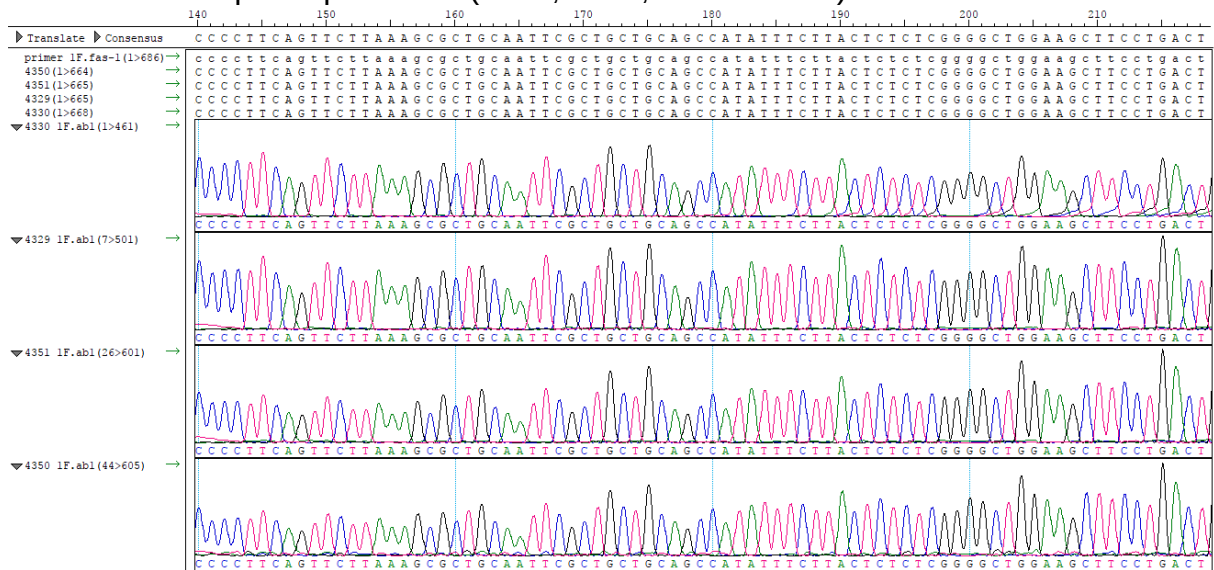
Todas as amostras que apresentaram desvio de ICX (moderado ou extremo) foram submetidas ao sequenciamento de Sanger para análise da região promotora mínima e início do primeiro éxon do gene *XIST* (Figura 36). As sequências geradas foram analisadas com sucesso (Figura 37).

Figura 36 - Eletroforese em gel de agarose 1% com produtos da PCR para sequenciamento do gene *XIST*



Fonte: A Autora, 2019.

Figura 37 - Análise do marcador XIST1 realizada através do programa SeqMan7.1.0 de quatro pacientes (4329, 4330, 4350 e 4351)



Fonte: A Autora, 2019.

De acordo com os resultados das análises do sequenciamento, um SNP (g.73071141C>G) foi comum às amostras 4308, 4311, 4351 e 4489 ($n = 4/11$) (Figura 38). O SNP está registrado sob o número rs41305409 na base de dados *online dbSNP*. A frequência da variante tem incidência maior que 5% (ExAC=0.0589; 1000 Genomes=0.0922, GnomAD=0.06153), inclusive nos dados disponíveis da população brasileira (ABraOM=0.075848), sendo caracterizada como um polimorfismo benigno.

Tabela 12 - Alterações encontradas através da metodologia de MLPA

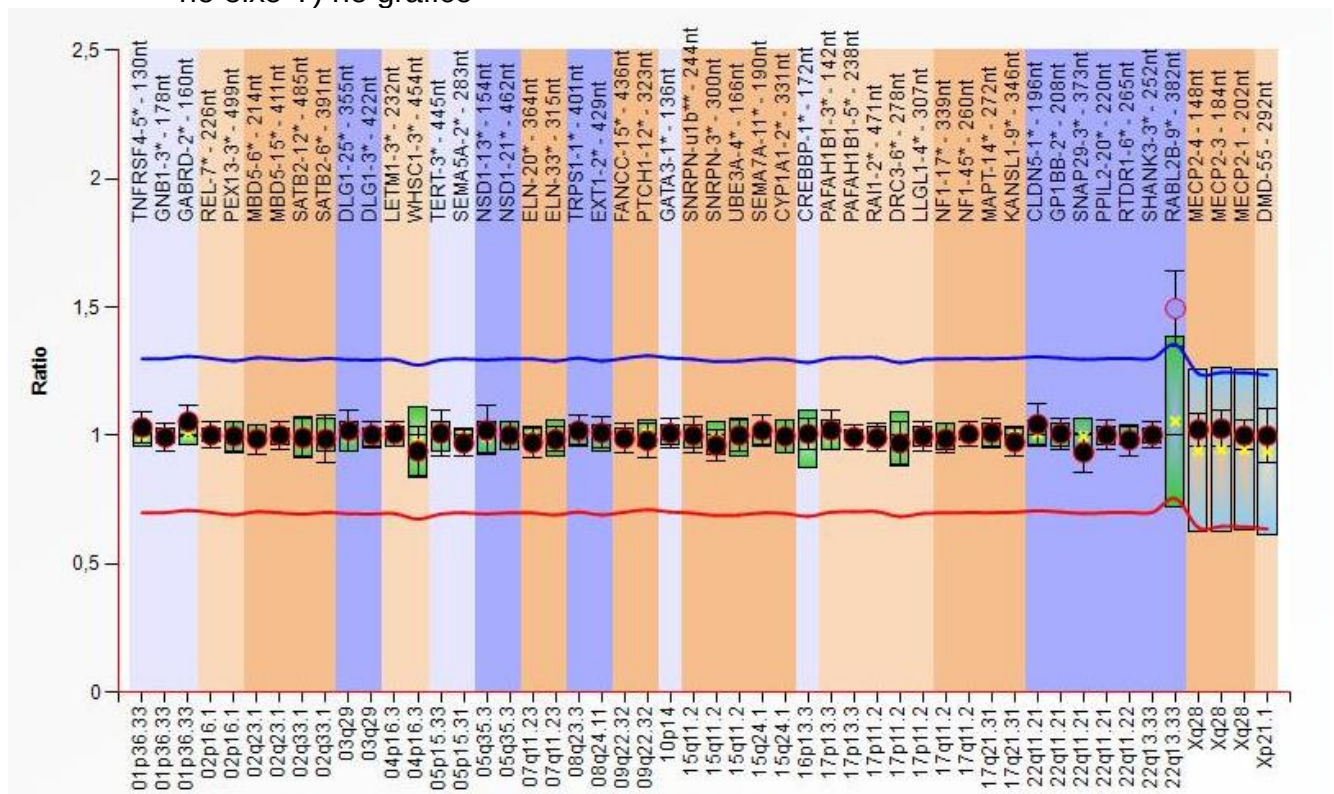
Paciente	KIT	Alteração	Sondas	Região cromossômica	qPCR	Cariótipo	Array-CGH	Classificação
4306	245	Duplicação	<i>RABL2B</i>	22q13.3	Genes adjacentes <i>SHANK3</i> e <i>ACR</i> sem alterações	46,XX	-	Amostra materna sem alteração, pai indisponível Provavelmente benigna
4327	070	Duplicação	<i>SHOX</i>	Xp/Yp (PAR1)	-	-	-	X
4390	245	Deleção	<i>CLDN5</i> , <i>GP1BB</i> , <i>SNAP29</i>	22q11.21	Confirmada deleção 22q11.21	-	arr[GRCh37] 22q11.21 (18,626,900-21,797,812)x1	<i>de novo</i> , patogênica
4487	036	Duplicação	<i>TERT</i>	5p15.33	Confirmada duplicação no gene <i>TERT</i>	46,XX	-	Herança paterna, Provavelmente Benigna
4488		Deleção	<i>MECP2</i>	Xq28	Confirmada deleção no gene <i>MECP2</i>	46,XX	arr[GRCh37] 2p25.3p16.1 (42,444-55,749,307)x3 arr[GRCh37] Xq25q28 (122,132,166-155,097,214)x1	<i>de novo</i> , Patogênica
4531	036	Deleção	<i>SOX12</i>	20p13	-	46,XX, t(2;20)(q33;p13)	-	Possivelmente patogênica
4545	036	Deleção	<i>RBFA</i>	18q23	Confirmada deleção no gene <i>RBFA</i>	46,XX,inv (9)(p12q13)	-	Possivelmente patogênica

Fonte: A Autora, 2019.

3.4.1 Duplicação em 22q13.3 – Paciente 4306

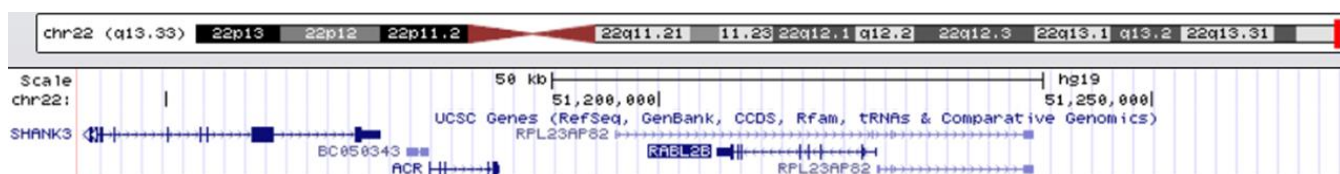
A duplicação encontrada na paciente 4306 (Figura 39) envolve o gene *RABL2B*. Por se tratar de uma região altamente repetitiva e haver paralogia do gene *RABL2B* com um gene no cromossomo 2 (*RABL2A*), não foi possível desenhar oligonucleotídeos para realização da qPCR. A amostra da paciente 4306 foi submetida à qPCR para avaliar se o gene *ACR*, adjacente ao *RABL2B*, também havia sido duplicado (Figura 40). No entanto, nenhuma alteração foi detectada, indicando que o ponto de junção proximal se encontra entre os genes *RABL2B* e *ACR*. Os pais não apresentam consanguinidade e a alteração não foi detectada na mãe da paciente (Apêndice II), não sendo possível testar a amostra paterna por falta de contato familiar.

Figura 39 - Resultado da MLPA da paciente 4306, indicando que a sonda para o gene *RABL2B* (22q13.33) está fora do limiar aceitável (faixas azul e vermelha no eixo Y) no gráfico



Fonte: A Autora, 2019.

Figura 40 - Genes situados na região subtelomérica 22q13.3



Nota: Representação da região envolvida obtida através do UCSC *Genome Browser*, 2019.

Fonte: A autora, 2019.

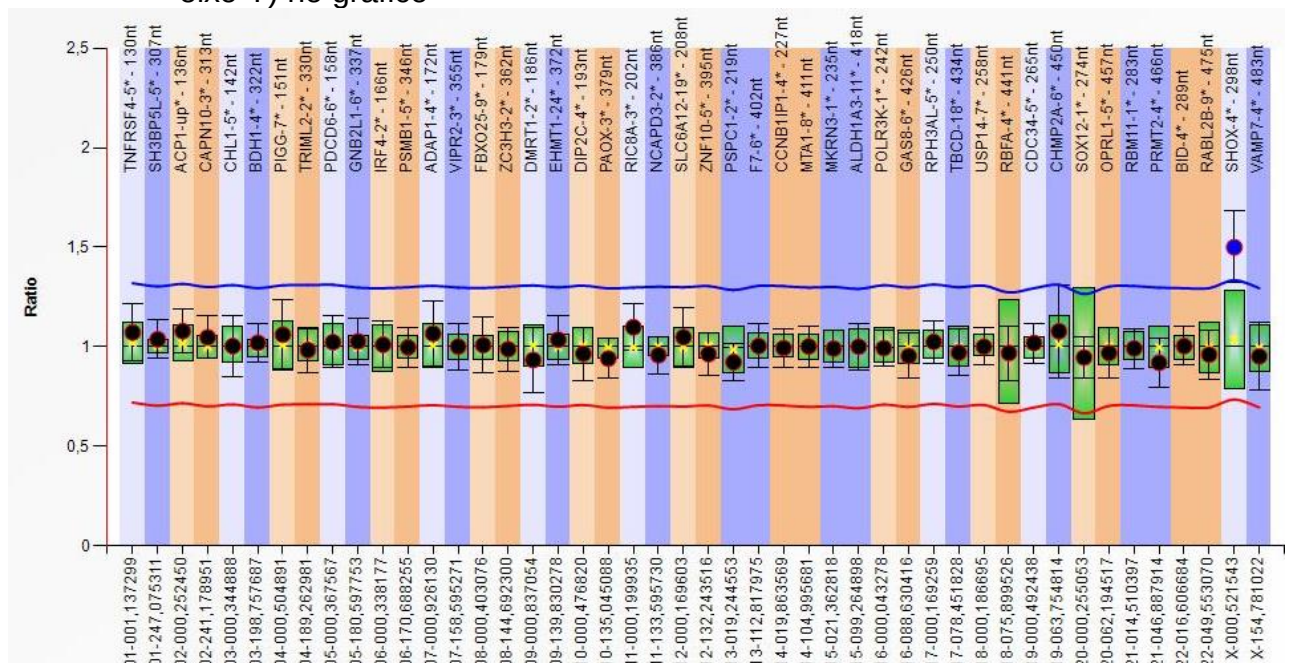
Na busca de variantes envolvendo o gene *RABL2B*, foram identificados dois registros de duplicação para o gene *RABL2B* no DGV (DGV: nsv966116 e nsv1160783). Na base de dados clínicos DECIPHER, o registro do menor fragmento duplicado envolve também o gene *ACR* (DECIPHER: paciente 288753). A paciente 4306 (33 anos) possui DI sindrômica e severa, epilepsia e em 2013 teve síndrome do pânico e crises de ausência, controladas desde então com uso de medicação (Carbamazepina, Gardenal, Rivotril). De acordo com as descrições clínicas, a paciente possui atraso severo na fala, hipotonia, dolicocefalia, queixo pontiagudo,

unhas dos pés displásicas e microcefalia com anomalias do sistema nervoso central (dilatação ventricular e atraso na mielinização). De acordo com a ocorrência de registro na plataforma DGV de variantes similares, bem como a ocorrência de duplicações que envolvem outros genes além de *RABL2B* no DECIPHER, a CNV foi categorizada como provavelmente benigna.

3.4.2 Duplicação em Xp22.33 – Paciente 4327

A paciente 4327 apresentou uma duplicação para a sonda referente ao gene *SHOX* presente na PAR1 do cromossomo X (Figura 41) de significado incerto. A análise do perfil de ICX da paciente 4327 não demonstrou desvios de ICX. Os pais da probanda não foram testados para o MLPA por indisponibilidade.

Figura 41 - Resultado da MLPA da paciente 4327, indicando que a sonda para o gene *SHOX* (Xp22.33) está fora do limiar aceitável (faixas azul e vermelha no eixo Y) no gráfico



Fonte: A Autora, 2019.

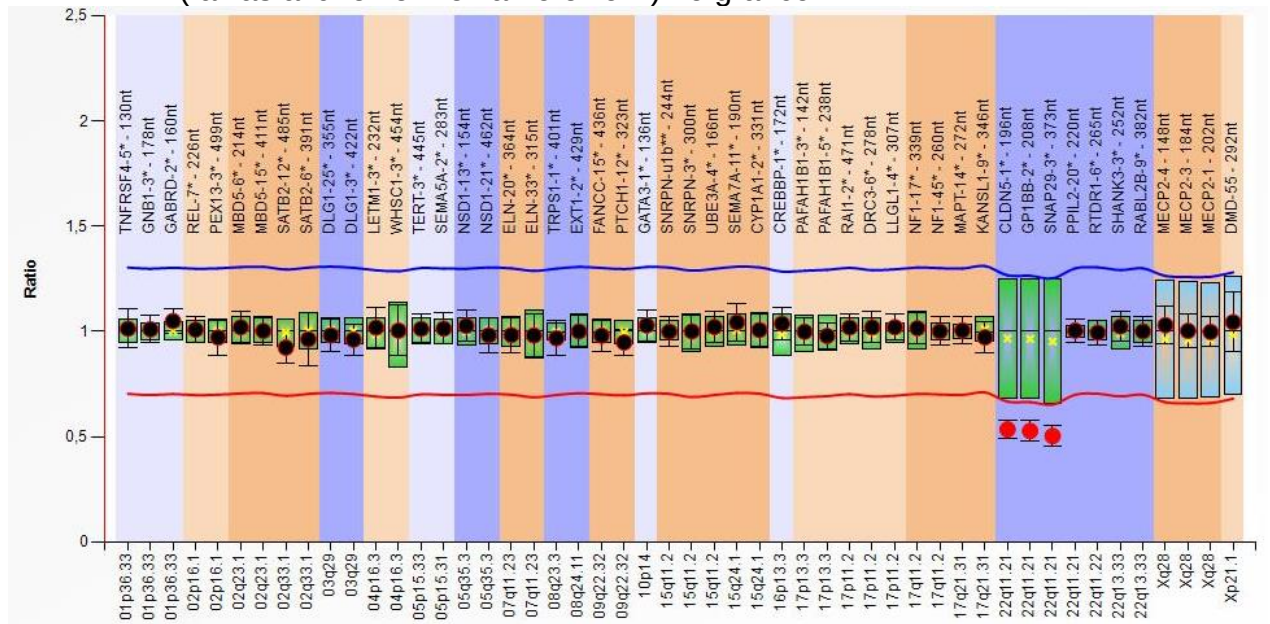
De acordo com a busca realizada na base de dados DGV, foi identificada uma duplicação que envolve o gene *SHOX* (dgv4555e59), depositada pelo consórcio 1000 genomas. Há registro também de duas CNVs de ganho, na base de dados DECIPHER envolvendo apenas o gene *SHOX* em mulheres (340380 e 284977) e outros 111

registros envolvendo algum segmento do gene *SHOX* e outros genes. Apenas 5% destes 113 registros possuem extensão inferior a 0,1 Mb. Além da DI, a paciente possui epilepsia e faz uso das medicações: Fenérgan, Tegretol, Gaballon. A mãe não possui histórico de abortos.

3.4.3 Deleção em 22q11.2 – Paciente 4390

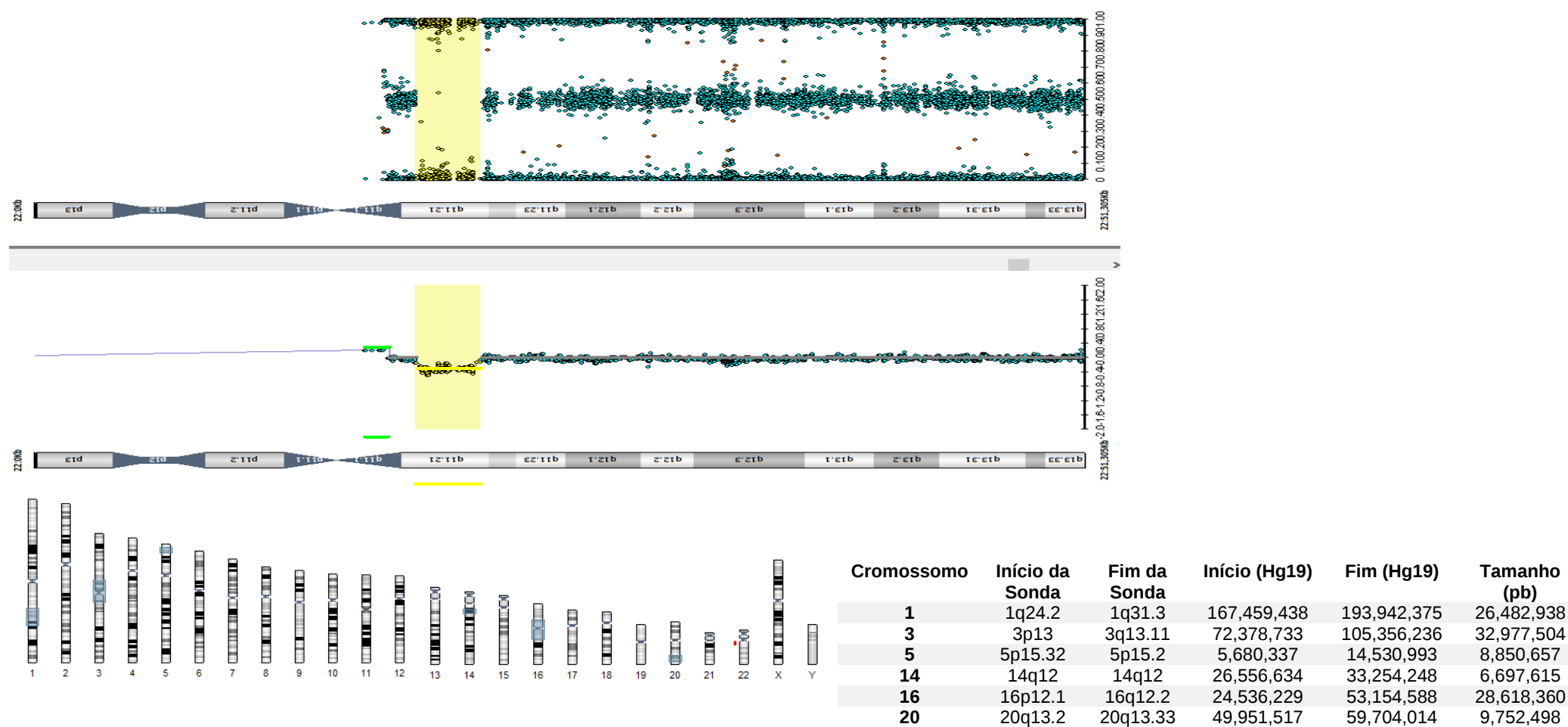
A deleção encontrada na paciente 4390 (Figura 42), através da MLPA, foi confirmada por *array-CGH*. Foi verificado que a deleção detectada possui uma extensão de aproximadamente 3,17 Mb (arr[GRCh37] 22q11.21(18,626,900-21,797,812)x1), abrangendo cerca de 90 genes e pseudogenes (Figura 43 e 44). Ela possui 19 anos e DI severa, atraso no desenvolvimento, microcefalia, baixa estatura, face alongada, hipotonia, prognatismo, clinodactilia nos pés, pobreza das pregas palmares, anomalias de sistema nervoso central (IV ventrículo proeminente, comunicação ampla com megacisterna, hipoplasia de vermis cerebelar) e defeito de soldadura em arco posterior L5 e S1. Os exames de imagens realizados (ressonância magnética cardíaca e ultrassonografia abdominal) estavam dentro da normalidade. Os pais são consanguíneos e, embora não soubessem informar o seu grau de parentesco, o *array-CGH* demonstrou seis blocos de homozigose na paciente nos cromossomos 1, 3, 5, 14, 16 e 20, indicando uma ancestralidade comum. As amostras parentais foram testadas para MLPA e nenhuma alteração foi encontrada (Apêndice II), demonstrando que a alteração patogênica é *de novo*. De acordo com a base de dados DECIPHER, há 367 registros de deleções que envolvem algum trecho da deleção encontrada na paciente de nosso estudo e desses, 78 registros apresentam DI.

Figura 42 - Resultado da MLPA da paciente 4390, indicando que as sondas para os genes *CLDN5*, *GP1BB*, *SNAP29* (22q11.21) estão fora do limiar aceitável (faixas azul e vermelha no eixo Y) no gráfico



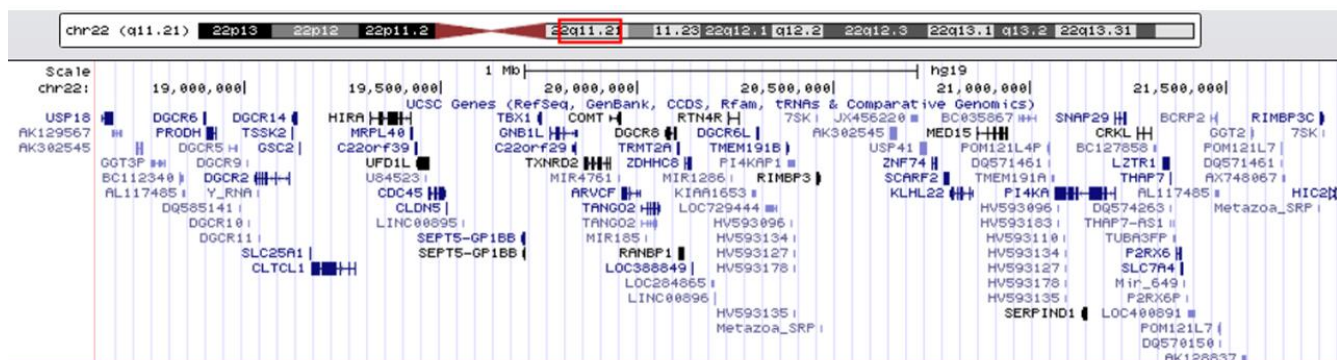
Fonte: A autora, 2019.

Figura 43 - Resultado da *array-CGH* da paciente 4390



Legenda: (a) CNV patogênica: $\text{arr}[\text{GRCh37}] 22\text{q}11.21(18,626,900-21,797,812)\times 1$; (b) blocos de homozigose encontrados na paciente > 5Mb (demarcações em cinza) indicando o grau de parentesco entre os pais.
Fonte: A autora, 2019.

Figura 44 - Genes envolvidos na deleção da paciente 4390



Nota: Representação da região envolvida obtida através do UCSC Genome Browser, 2019.

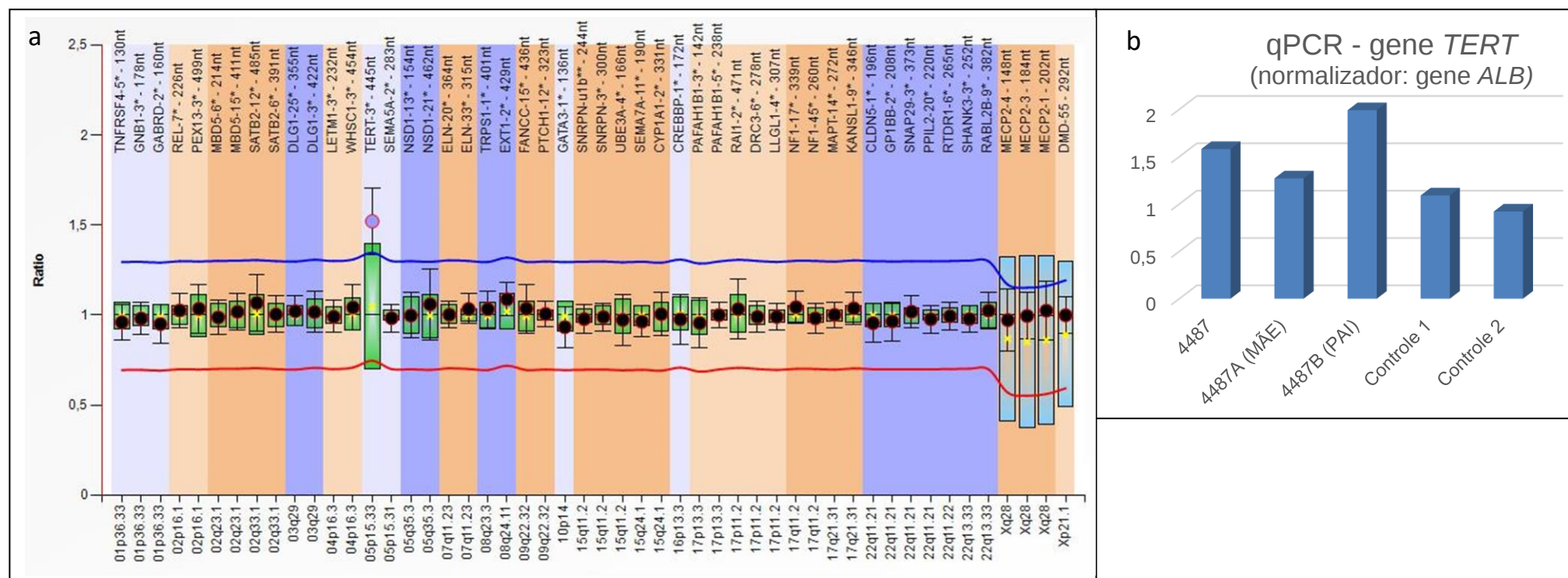
Fonte: A autora, 2019.

3.4.4 Duplicação em 5p15.33 – Paciente 4487

A duplicação no gene *TERT* (5p15.33) presente na paciente 4487 também foi detectada na amostra paterna (Figura 45). Algumas regiões próximas ao gene *TERT* estão presentes nos kits 245 (*SEMA5A* - 5p15.31) e 036 (*PDCD6* - 5p15.3), e apresentaram resultados dentro da normalidade (Figura 46). A busca online na plataforma DGV para o gene *TERT* detectou 11 registros de duplicações em estudos populacionais envolvendo o gene (nsv596629, esv3575810, esv3603797, esv3432543, esv1011324, nsv509045, nsv509044, nsv1024507, dgv3197e59, nsv822960, esv3603804); e na plataforma DECIPHER há 17 registros de CNVs de ganho para o gene *TERT*, dentre as quais a menor região engloba três outros genes (*SLC12A7*, *SLC6A18*, *SLC6A19*; paciente 256488).

A paciente 4487 (5 anos) possui atraso global do desenvolvimento, dismorfias, malformação da laringe (larigomalácia), dismorfias faciais, DI, baixa estatura e faz uso de medicação controlada (Clenil). Em sua última avaliação clínica, possuía estatura > P3 (1,02m), peso < P3 (15,18 Kg) e perímetro cefálico – 2 SD (49,5 cm). As características clínicas faciais atípicas consistem em sobrelanceadas, fendas palpebrais ascendentes, hipertelorismo, estrabismo, nariz proeminente, filtro labial curto, macrostomia, palato alto, orelhas posteriormente rotadas e displásicas. Em aspectos dermatológicos, foi observada mudanças de pigmento para linhas de Blaschko. Possui ainda Hálux valgo, sindactilia cutânea entre 4-5º pododáctilos e hipertricose.

Figura 45 - Resultado da MLPA e qPCR da paciente 4487



Legenda: Na imagem à esquerda (a) o resultado da MLPA da amostra 4487, indicando a sonda TERT (5p15.33) fora do limiar aceitável (faixas azul e vermelha no eixo Y) no gráfico; e à direita (b) gráfico representativo do qPCR para o gene *TERT* da probanda e amostras familiares.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 46 - Localização dos genes em 5p presentes nos kits de MLPA testados



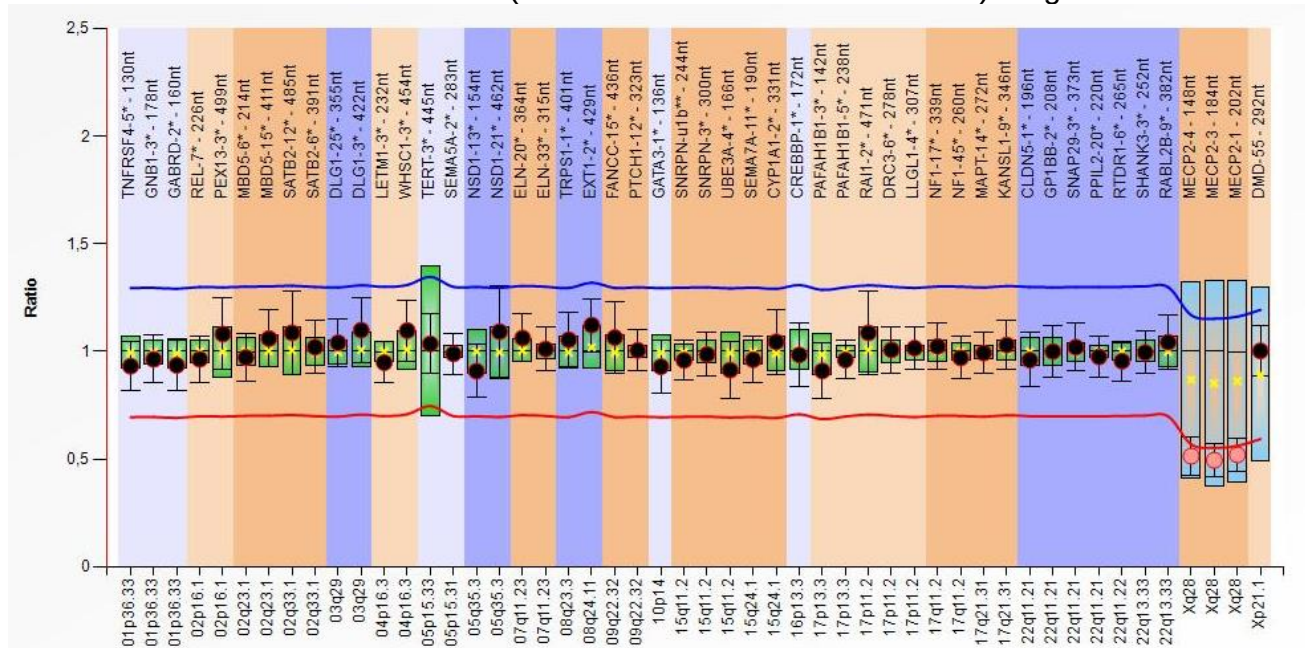
Fonte: A autora, 2019.

3.4.5 Deleção em Xq28 – Paciente 4488

A análise de MLPA detectou uma deleção para as três sondas referentes ao gene *MECP2* (Figura 47), na paciente 4488. Através da análise de *array-CGH*, foi verificado que a deleção no cromossomo X envolve mais de 250 genes e pseudogenes (arr[GRCh37] Xq25q28(122,132,166-155,097,214)x1) (Figura 48). Além disso, foi identificada também uma duplicação no cromossomo 2 (arr[GRCh37] 2p25.3p16.1 (42,444-55,749,307)x3) (Figura 49). A ocorrência simultânea de duplicação no cromossomo 2 sugere que possa ter ocorrido uma translocação 2:X t(2;X)-der(2) (Figura 50). A paciente 4488 possui desvio extremo de ICX. Na base de dados DGV não foram encontrados registros envolvendo toda extensão dos trechos identificados na paciente. Já na base de dados DECIPHER, há 196 registros de perdas envolvendo algum trecho em comum com a paciente no cromossomo X (variando entre 185 pb a 155,19 Mb) e 284 registros de ganhos envolvendo o trecho do cromossomo 2 (variando entre 10 pb a 89,01 Mb). As amostras parentais foram avaliadas através de citogenética convencional para as regiões envolvidas e não foram identificadas alterações.

De acordo com os aspectos clínicos, a paciente possui dismorfias faciais, baixa estatura, hipogonadismo, litíase biliar, EEG com moderadas alterações paroxísticas, DI, com histórico de importante atraso global no desenvolvimento na infância. A paciente apresentou convulsões nos primeiros meses de vida e faz uso de medicação controlada (Fluoxetina).

Figura 47 - Resultado da MLPA da paciente 4488, indicando que as sondas para o gene *MECP2* localizado em Xq28 (*MECP2-1*, *MECP2-3*, *MECP2-4*) estão fora do limiar aceitável (faixas azul e vermelha no eixo Y) no gráfico



Fonte: A autora, 2019.

Figura 48 - Genes envolvidos na deleção presente no cromossomo X da paciente 4488 (Xq25-28)

Genes do cromossomo X envolvidos na deleção																			
ABCD1	BC043223	CXORF40A	F8	G6PD	HPRT1	LINC00893	MAGEC1	MIR3202-1	MIR548	MTM1	PNMA5 Δ	SLC25A14	SPANXF1	TMEM185A	XPNIPEP2				
ACTRT1	BCAP31	CXORF40B	F8A1	GAB3	HS6ST2	LINC00894	MAGEC2	MIR3202-2	MIR-584	MTMR1	PNMA6A	SLC6A8	SPANX-L	TMEM187	ZDHH9				
AFF2	BCORL1	CXORF51A	F9	GABRA3	HSFX2	LOC100129520	MAGEC3	MIR320D2	MIR718	NAA10	PNMA6C	SLITRK2	SPANXN1	TMEM257	ZFP92				
AIFM1	BGN	CXORF51B	FAM223B	GABRE	HTATSF1	LOC286467	MAMLD1	MIR363	MIR767	NSDHL	PNMA6D	SLITRK4	SPANXN2	TMLHE	ZIC3				
AK054921	BRCC3	CXORF64	FAM3A	GABRQ	IDH3G	LOC389895	MAP7D3	MIR4330	MIR888	OCRL	PRRG3	SMARCA1	SPANXN3	TREX2	ZNF185				
AK095439	BRS3	CXORF66	FAM45B	GDI1	IDS	MAGEA1	MBNL3	MIR452	MIR890	OPN1LW	RAB33A	SMIM10	SPANXN4	U00684	ZNF275				
AK307233	CD40LG	DCAF12L1	FAM50A	GPC3	IDS2	MAGEA10	MCF2	MIR504	MIR890	OPN1MW	RAB39B	SMIM9	SPRY3	U6	ZNF280C				
APLN	CD99L2	DCAF12L2	FAM58A	GPR101	IGSF1	MAGEA11	MECP2	MIR505	MIR891A	OR13H1	RAP2C	SNORA36A	SRPK3	U7	ZNF75D				
ARHGAP36	CDR1	DDX26B	FATE1	GPR112	IKBKG	MAGEA12	MIR_105	MIR506	MIR891B	PASD1	RBMX	SNORA56	SSR4	UBE2NL					
ARHGAP4	CETN2	DKC1	FGF13	GPR119	IRAK1	MAGEA2	MIR105-1	MIR507	MIR892A	PDZD4	RBMX2	SNORA70	STAG2	UBL4A					
ARHGEF6	CLIC2	DL490658	FHL1	GPR50	JB158051	MAGEA3	MIR105-2	MIR508	MIR892B	PHF6	RENB	SNORD112	TAZ	USP26					
ATP11C	CMC4	DNASE1L1	FLNA	GRIA3	L1CAM	MAGEA4	MIR1184-3	MIR509-1	MIR934	PLAC1	RPL10	SNORD61	TENM1	UTP14A					
ATP2B3	CNGA2	DUSP9	FMR1	H2AFB3	LAGE3	MAGEA5	MIR18B	MIR510	MOSPD1	PLXNA3	SAGE1	SOX3	TEX28	VBP1					
ATP6AP1	CSAG1	ELF4	FMR1NB	HAUS7	LDLOC1	MAGEA6	MIR20B	MIR514A1	MPP1	PLXNB3	SASH3 Δ	SPANXA2	TFDP3	VGLL1					
AVPR2 Δ	CSAG2	EMD	FRMD7	HCFC1	LINC00632	MAGEA8	MIR2114	MIR514A2	MST4	PNCK	SH2D1A	SPANXC	THOC2	VMA21					
BC009467	CTAG2	ENOX2	FUNDCC2	HMGGB3	LINC00889	MAGEA9B	mir-220	MIR514B	MTCP1	PNMA3	SLC10A3	SPANXE	TKTL1	XIAP					

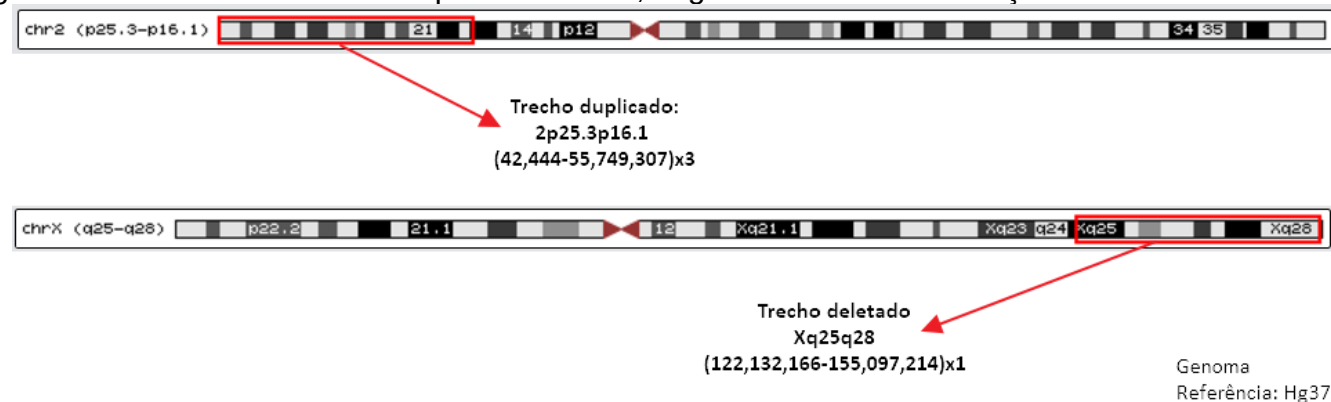
Fonte: A autora, 2019.

Figura 49 - Genes envolvidos na duplicação presente no cromossomo 2 da paciente 4488 (2p25.3p16.1)

Genes do cromossomo 2 envolvidos na duplicação																				
ABCG5	AK124439	AX747384	C2orf61	CENPA	DNAJC27 DNAJC27-AS1	EPT1	FSHR	HEATR5B	KIF3C	LOC100288911	LOC728819	Mir_652	MSH6	OST4	PRKCE	ROCK2	SLC5A6	SPTBN1	TPO	UCN
ABCG8	AK125769	AX747684	C2orf70	CENPO		ERLEC1	GALM	HNRPLL	KLF11	LOC100505716	LOC730811	MIR1301	MTA3	OTOF	PRKD3	RPL23AP32	SLC8A1	SRBD1	TRAPPC12	UBXN2A
ABHD1	ALK001558	BC031304	C2orf71	CGREF1	DNMT3A	FAM110C	GALNT14	HPCAL1	KLHL29	LOC100505876	LPIN1	MIR3125	MTIF2	OXER1	PRORS DIP	RPS27A	SLC8A1-AS1	SRD5A2	TRIB2	UNQ6975
ACP1	ALLC	BC035112	C2orf73	CHAC2	DPY30	FAM150B	GAREML	HS1BP3	KRTCAP3	LOC100505964	LRPPRC	MIR3682	MYADML	PDIA6	PSME4	RPS7	SMC6	SRSF7	TRMT61B	VIT
ACYP2	APOB	BC048132	C2orf91	CIB4	DPYSL5	FAM179A	GCKR	IAH1	L07266	LOC100506054	LTBP1	MIR4261	MYCN	PFN4	PTRHD1	RRM2	SNORA40	STON1- GTF2A1L	TRNA	VSNL1
ADAM17	ARHGEF33	BC048424	CAD	CLHC1	DRC1	FAM228A	GDF7	ID2	LAPTM4A	LOC100506274	MAP4K3	MIR4262	MYCNOS	PIGF	PUM2	RSAD2	SNORA80B	STRN	TRNA_A1a	WDR35
ADCY3	ASAP2	BC051708	CALM2	CLIP4	DTNB	FAM228B	GEMIN6	IFT172	LBH	LOC100506474	MAPRE3	MIR4263	MYT1L	PKDCC	PXDN	RTN4	SNORD18	SULT6B1	TRNA_I1e	WDR43
ADI1	ASB3	BC113076	CAMKMT	CMPK2	DYNC2L1	FAM49A	GEN1	ITGB1BP1	LCLAT1	LOC150622	MATN3	MIR4429	NBAS	PLB1	QPCT	SDC1	SNORD53	TMEM214	TRNA_Leu	XDH
AF086285	ASXL2	BIRC6	CAPN13	COLEC11	E2F6	FAM84A	GPATCH1	ITSN2	LHCGR	LOC339788	MBOAT2	MIR4757	NCOA1	PLEKHHE	RAB10	SF3B14	SNORD75	TAF1B	TRNA_Pseudo	XZNF512
AGBL5	ATAD2B	BRE	CAPN14	COX7A2L	EFR3B	FAM98A	GPN1	JA429818	LINC00299	LOC339822	MCFD2	MIR4765	NDUFAF7	POMC	RAD51AP2	SH3YL1	SNORD92	TCF23	TSPYL6	Y_RNA
AK055918	ATL2	C2orf16	CCDC1	CPSF3	EHD3	FBXO11	GPR113	KCNF1	LINC00486	LOC375196	MEMO1	MIR548AD	NLRC4	PPM1B	RASGRP3	SIX2	SNTG2	THADA	TSSC1	YIPF4
AK056077	ATP6V1C2	C2orf43	CCDC121	CRIM1	EIF2AK2	FEZ2	GPR75	KCNG3	LINC00487	LOC388942	Metazo_SRP	MIR558	NOL10	PPM1G	RBKS	SIX3	SNX17	THUMP2	TTC27	YPEL5
AK057187	ATP6V1E2	C2orf44	CCDC121	CRIPT	EMILIN1	FKBP1B	GREB1	KCNK12	LINC00570	LOC388948	MFSD2B	MIR559	NRXN1- NT5C1B- RDH14	PPP1CB	RHOB	SLC30A6	SOC5	TMEM178A	TTC32	YWHAQ
AK093525	ATRAID	C2orf44	CCDC88A	CYP1B1	EML4	FLJ33534	GRHL1	KCNK3	LINC00954	LOC400940	Mir_186	MORN2	PPP1R21	RHOQ	SLC3A1	SOS1	TMEM18	U2	ZFP36L2	
AK094343	AX746487	C2orf48	CDC42EP3	CYS1	EML6	FNDC4	HAAO	KCNS3	LOC100129726	LOC645949	Mir_544	MRPL33	NTSR2	PQLC3	RMDN2-AS1	SLC435F6	SOX11	TTC7A	U4	ZNF513
AK095310	AX746649	C2orf50	CDKL4	DDX1	EPAS1	FOSL2	HADHA	KHK	LOC100134259	LOC727982	Mir_548	MSGN1	ODC1	PREB	RNASEH1 RNF144A- AS1	SLC4A1AP	SUPT7L	TMEM247	U6	
AK123934	AX747197	C2orf53	CEBPZ	DHX57	EPCAM	FOXN2	HADHB	KIDINS220	LOC100271832	LOC728730	Mir_584	MSH2	OSR1	PREPL		SPAST	SPDYA	TP53I3	U7	

Fonte: A autora, 2019.

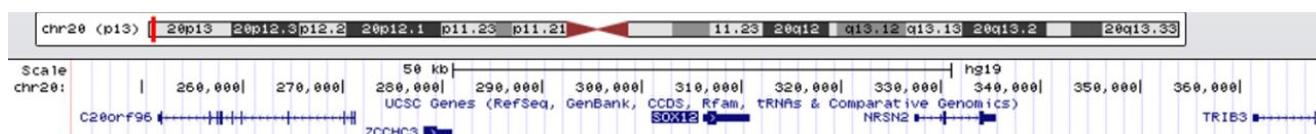
Figura 50 - CNVs encontrada na paciente 4488, sugerindo uma translocação 2:X.



Nota: Representação da região envolvida obtida através do UCSC *Genome Browser*, 2019.

Fonte: A autora, 2019.

Figura 52 - Localização dos genes presentes na região subtelomérica 20p13



Nota: Representação da região envolvida obtida através do UCSC *Genome Browser*, 2019.

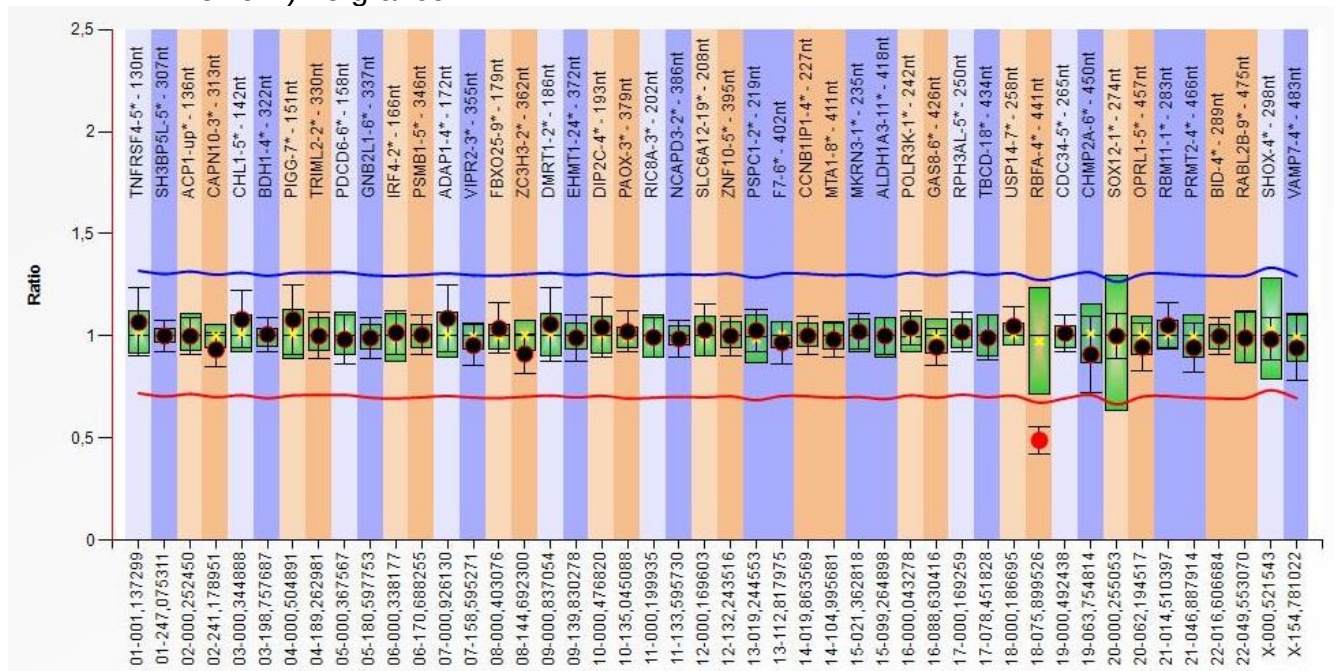
Fonte: A autora, 2019.

A paciente 4531 teve uma nova solicitação do cariótipo ao decorrer de nosso estudo e foi identificado como resultado: 46,XX, t(2;20)(q33;p13). Os pais possuem cariótipo normal. A deleção no gene *SOX12* identificada através do MLPA faz parte do trecho que envolve a translocação encontrada na paciente. De acordo com a avaliação clínica, a paciente foi encaminhada ao ambulatório de genética pela endocrinologia pediátrica por puberdade precoce, dificuldade leve no aprendizado, distúrbio no comportamento, obesidade e dismorfias. A probanda é a primeira filha de casal jovem, não consanguíneo. Nasceu a termo de parto cesáreo (Apgar 9/9) com peso adequado para idade gestacional, comprimento e perímetro cefálico também adequados. Necessitou de internação por uma semana por anomalia anorectal (ânus anteriorizado com fístula perineal, refluxo vescioureteral). Apresentou refluxo vesicoureteral que foi corrigido aos três anos de idade, evoluiu com dilatação renal grau III e incontinência urinária. Ao longo de seu desenvolvimento, apresentou atraso no desenvolvimento da linguagem, dificuldade de aprendizado escolar e comportamento agitado. Faz uso de medicações (Neuleptil e Cefalexina), possui intolerância a lactose e dermatite atópica. O estrabismo da paciente foi corrigido aos cinco anos e 10 meses de vida. Em sua última avaliação clínica, apresentou peso e estatura em P50, dismorfias caracterizadas por face arredondada, olhos amendoados, manchas hiperocrômicas em escleras oculares bochechas salientes, lábios finos, palato ogival, implantação baixa de orelhas, implantação posterior baixa de cabelos. Possui ainda: Cubitus valgum, genu valgo, quirodáctilos afilados e anus anteriorizado. Em aspectos dermatológicos, possui pele seca com áreas de eczema e descamação em mãos e pés.

3.4.7 Deleção em 18q23 – Paciente 4545

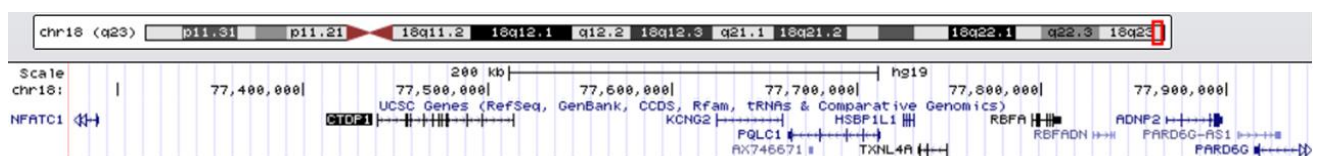
A deleção em 18q23 encontrada na paciente 4545 inicialmente através da MLPA (Figura 53) para a região *RBFA* foi confirmada através de qPCR com marcadores específicos (Apêndice I). Através do resultado do outro *kit* de MLPA (070), verificamos que a região proximal próxima à *RBFA*, referente ao gene *CTDP1* (Figura 54), não está envolvida na deleção. As amostras parentais não puderam ser testadas para a deleção.

Figura 53 - Resultado da MLPA da paciente 4545, indicando a sonda para o gene *RBFA* (20p13) está fora do limiar aceitável (faixas azul e vermelha no eixo Y) no gráfico



Fonte: A autora, 2019.

Figura 54 - Localização dos genes presentes na região subtelomérica 18q23



Nota: Representação da região envolvida obtida através do UCSC Genome Browser, 2019.

Fonte: A autora, 2019.

Na base de dados DGV há quatro registros envolvendo a região do gene *RBFA*, dois deles localizados a partir do estudo 1000 genomas (nsv470437, esv3643326, esv3643328, nsv1072826). Já no DECIPHER, foram depositados 90 registros de deleções envolvendo o gene *RBFA*. O registro que possui a menor extensão (paciente 255106) envolve cinco outros genes, além do gene *RBFA*, sendo três codificantes de proteínas (*ADNP2*, *PARD6G*, *TXNL4A*), e ainda apresenta uma duplicação simultânea no cromossomo 2 de 4,89 Mb.

A paciente 4545 foi avaliada pelo ambulatório de Genética aos 15 anos de idade, por queixa de DI e artrite reumatoide. Trata-se de primeira filha de casal jovem, não consanguíneo. A mãe possui histórico de um aborto no primeiro trimestre e perda de gemelar intautero. O pré-natal foi sem intercorrências com uso social de álcool na gestação. A paciente nasceu a termo de parto normal (Apgar 7/8), com peso ao nascimento (AIG), comprimento e PC adequados. O desenvolvimento psicomotor evoluiu sem atraso mas a paciente apresentou diversas quedas por deformidade dos pés, possuía hábitos de andar na ponta dos pés e usou gesso nos primeiros meses de vida. Apresentou dificuldade de aprendizado escolar. Desenvolvimento puberal normal, menarca aos 12 anos com ciclos regulares. Faz uso de óculos desde os primeiros meses de vida, diagnóstico de coloboma no olho direito. Teve quadro de incontinência urinária diurna e noturna até os seis anos e atualmente possui enurese noturna, estando sob avaliação urológica. Foi diagnosticada aos 14 anos de idade com artrite reumatoide juvenil, sob tratamento medicamentoso. Nega cirurgias, convulsões ou internações. Ao último exame clínico, apresentou peso em P50, Estatura em P10-P25 e perímetro cefálico na média. Possui dismorfias caracterizadas por fonte proeminente, hipertelorismo ocular com fendas oculares oblíquas, orelhas pequenas, raiz nasal plana, cavidade oral sem alterações. Tronco sem assimetrias, membros sem assimetrias. Quirodáctilos e pododáctilos fusiformes e prega palmar de Sidney bilateral. Possui radiografia de coluna, ultrassonografia abdominal total e de vias urinárias sem alterações.

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foram investigados fatores genéticos associados à DI em mulheres a partir de desvios extremos de ICX e de CNVs patogênicas em regiões comuns a síndromes/condições previamente associadas à função neurocognitiva. Os resultados obtidos deram origem a dois manuscritos em fase de elaboração. O primeiro é voltado para a descrição das variantes patogênicas, duas delas inéditas, encontradas a partir dos desvios extremos de ICX e sequenciamento de exoma total. O segundo aborda as variantes encontradas a partir da metodologia de MLPA, algumas das quais vinculadas a fenótipos atípicos. A seguir serão discutidos detalhadamente os resultados obtidos, sob a forma de tópicos.

4.1 Aplicação de nova metodologia para estudo de ICX em mulheres com DI

Para o estudo da ICX, foi utilizada uma ferramenta molecular descrita em 2014 ainda pouco explorada, que combina a análise do perfil de metilação do gene *AR* com a do gene *RP2* (MACHADO *et al.*, 2014). Não há registros na literatura deste tipo de abordagem para avaliar o perfil de ICX em mulheres com DI. Embora o ensaio para o gene *AR* seja considerado um padrão ouro, cerca de 20% da população de mulheres não é informativa por apresentarem homozigose para repetições de nucleotídeos nesse *locus* (AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006). A avaliação de ambos os genes permitiu uma cobertura de 100% das mulheres com DI. Através da inclusão do gene *RP2*, foi possível determinar o perfil de ICX em 13% das mulheres homozigotas para o gene *AR* (7/53). Além disso, o uso do gene *RP2* foi imprescindível para a identificação de desvio de ICX não observado para o gene *AR* em duas amostras (paciente 4330 – desvio moderado; paciente 4311 – desvio extremo). Na maioria das amostras do estudo, os desvios de ICX apresentaram concordância entre os *loci* *AR* e *RP2*. Entretanto, cinco pacientes (4311, 4322, 4364, 4390 e 4423) e uma das mães das pacientes (4313A) apresentaram discrepâncias de mais de 15% entre os genes *AR* e *RP2* (Apêndice III).

Alguns outros marcadores que possuem sítios para endonucleases de restrição sensíveis à metilação como *PGK1* e *PCSK1N* já foram usados para complementar

estudos de ICX em mulheres não informativas para o gene *AR* (BERLETCH *et al.*, 2011; FIEREMANS *et al.*, 2016). No entanto, não há registro de marcadores para uso simultâneo. Assim, com o uso de apenas uma reação foi possível definir o perfil de ICX para cada paciente, diminuindo os custos das reações e o tempo dispensado.

4.2 Desvios de inativação do cromossomo X

Dentre as 53 mulheres com DI avaliadas, sete apresentaram desvio extremo (13,2%) e quatro apresentaram desvio moderado (7,5%) de ICX. Como abordado anteriormente, sabe-se que os desvios de ICX podem ocorrer no estágio primário do desenvolvimento embrionário, quando as células ainda não sofreram processo de diferenciação, ou no estágio secundário, quando um grupo de células já diferenciadas sofre uma vantagem proliferativa (GENDREL; HEARD, 2011). Não foram identificadas mutações no gene *XIST* que pudessem caracterizar um desvio de ICX primário (BROWN; ROBINSON, 2000). Assim, as pacientes que apresentaram desvios de ICX neste estudo provavelmente sofreram uma seleção preferencial caracterizada por ICX não randômica secundária, caracterizando uma priorização proliferativa de um grupo celular portando um cromossomo X em relação ao outro.

A etiologia dos desvios de ICX em uma população de mulheres saudáveis tem sido objeto de estudo em diversos grupos étnicos e faixas etárias (AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006; BOLDUC *et al.*, 2008; SANDOVICI *et al.*, 2004). Os desvios de ICX numa população normal de neonatos, na qual ainda não há uma seleção tecido específica relacionada à idade, são atribuídos a uma combinação de efeitos estocásticos e uma seleção preferencial após a ICX primária (BOLDUC *et al.*, 2008). Já num estudo realizado com 1.005 mulheres americanas, finlandesas e judias asquenazim fenotipicamente normais, 8,8% apresentaram desvio de ICX a partir de 80%, 1,8% a partir de 90% e 0,8% acima de 95%, totalizando uma proporção de 11,4% de mulheres com desvio de ICX. Essa proporção tende a aumentar de acordo com a idade (recém-nascidos: 5,6% versus mulheres: 19,5%) e pode estar relacionada também a uma preferência celular de um cromossomo X em relação ao outro no sangue, o tecido mais usualmente estudado (AMOS-LANDGRAF *et al.*, 2006).

Um trabalho recente foi realizado pelo nosso grupo utilizando o mesmo ensaio *biplex AR/RP2* em 118 mulheres saudáveis numa faixa etária média de 26,5 anos (idade mínima: 18 anos, idade máxima: 35 anos). Destas, 2,54% apresentaram desvio moderado e não foram identificadas amostras com desvio extremo de ICX (BORGES, 2018). A porcentagem de desvio de ICX moderado e extremo observada nas mulheres com DI no presente estudo foi de 20,7% (n=11/53). Comparado à amostra de mulheres saudáveis do RJ exibida no estudo de Borges (2018), o percentual de desvios nas mulheres com DI é significativamente superior àquela esperada na população normal ($p < 0,001$, $\chi^2 = 18,61$). No estudo realizado por Fieremans e colaboradores (2016), com 288 mulheres com DI, a proporção de mulheres com desvio extremo de ICX foi de 7,6% e destas 31,5% (n=6/19) tiveram mutações associadas à DI. Embora nosso grupo amostral tenha sido menor em relação ao de Fieremans e colaboradores (2016), o número de mulheres com desvio extremo de ICX foi maior e ambos os estudos demonstram uma alta prevalência de desvios de ICX dentre mulheres com DI, quando comparados aos estudos controles (Tabela 13). Isto demonstra que os desvios de ICX funcionam como uma excelente ferramenta molecular para a identificação de (novas) causas genéticas envolvidas na DI em mulheres.

Tabela 13 - Comparação da prevalência de desvio de ICX entre diferentes estudos

Estudos	Perfil das mulheres estudadas	País	Idade (anos)	N	% da amostra com desvio moderado de ICX	% da amostra com desvio extremo de ICX
Amos-Landgraf e colaboradores (2006)	Fenotipicamente normal	EUA; Finlândia e Israel	0-ND	1.005	8,8	2,6
Bolduc e colaboradores (2008)	Fenotipicamente normais	Canadá	0-43	894	21	3,5
Borges (2018)	Fenotipicamente normais	Brasil (Rio de Janeiro)	18-35	115	2,6	0
Fieremans e colaboradores (2016)	DI	Bélgica	≤ 35	288	ND	7,6
Plenge e colaboradores (2002)	DILX	EUA	ND	94	48	30
Tzschach e colaboradores (2015)	DILX	Alemanha	ND	95	23	
Presente estudo	DI	Brasil (Rio de Janeiro)	3-43	53	7,5	13,2

Legenda: ND - não disponível; DILX – deficiência intelectual ligada ao cromossomo X.

Fonte: A autora, 2019.

Os dados sobre os desvios extremos de ICX deste estudo, quando associados às causas da DI identificadas nas pacientes, representam uma alta taxa de rendimento e sucesso. Em estudos envolvendo sequenciamento em larga escala, com centenas e milhares de amostras (DDD, 2015; GILISSEN *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2015; TZSCHACH *et al.*, 2015), e até mesmo com o estudo de Fieremans e colaboradores (2016), o percentual de causas atribuídas à DI varia de 10 a 59%. Neste estudo, seis dos setes casos (85,7%) de desvio extremo de ICX tiveram mutações atribuídas à DI. Esses dados revelam um alto rendimento na caracterização de causas associadas à DI, quando comparado aos demais estudos de larga escala e também quando comparado ao percentual das causas genéticas atribuídas à DI, que atinge uma proporção de 50% dos casos (MARRUS; HALL, 2017). Esta alta taxa poderia ser explicada pela avaliação clínica minuciosa das pacientes inserida no estudo, afastando causas ambientais e genéticas comuns relacionadas à DI.

Uma vez que a ICX pode ser tecido-específica, a análise do perfil de ICX a partir de células de mucosa bucal demonstra ser um método eficiente para verificar o perfil de ICX em tecidos inacessíveis que possam ter origem embrionária semelhante à do sistema nervoso central (ectoderma). Um estudo realizado com autópsia de 12 mulheres avaliou o perfil de ICX entre diferentes tecidos, verificando que entre sangue periférico e o epitélio bucal, este último possui uma melhor correlação com o perfil de ICX de tecidos inacessíveis (DE HOON *et al.*, 2015). Como não seria possível realizar biópsias do tecido cerebral em nosso estudo, o uso da mucosa bucal para confirmação do perfil de ICX encontrado no material sanguíneo foi eficaz em cinco amostras com desvios extremos de ICX no sangue (n=5/7). Cabe ressaltar que o uso da mucosa bucal como material biológico de partida para todas as análises moleculares não seria possível, tendo em vista que a extração de DNA a partir de mucosa bucal gera uma concentração e qualidade inferior, quando comparada às amostras provenientes de sangue, e este fator possui um papel relevante para o uso dessas amostras nas técnicas de *array-CGH* e WES, principalmente.

Através das análises de mucosa bucal nas mulheres com DI que apresentaram desvio extremo de ICX, dois casos não apresentaram concordância com o *status* obtido a partir do material proveniente de sangue (4329 e 4517). No entanto, na paciente 4329 foi identificada uma variante *missense* patogênica através do WES para o gene *TAF1*, localizado no cromossomo X. Como a paciente não apresentou desvio

de ICX para a mucosa bucal (4329) e não se sabe o padrão de ICX no tecido cerebral, ela pode ter sofrido uma seleção preferencial favorável a um determinado cromossomo X. Sabe-se que durante o processo de ICX pode ocorrer uma seleção preferencial tecido- ou célula-específica para o cromossomo X (GENDREL; HEARD, 2011).

Há estudos que explicam o desvio de ICX como uma vantagem seletiva da população celular com um cromossomo X normal em mulheres integrantes de famílias com DILX (PLENGE *et al.*, 2002; TZSCHACH *et al.*, 2015). Em contraposição, no estudo realizado por Fieremans e colaboradores (2016), os desvios de ICX em mulheres com DI estavam favorecendo o cromossomo X mutado. Das 22 pacientes com DI e desvio extremo de ICX deste estudo prévio, 19 foram submetidas ao sequenciamento de exoma (WES) e foram identificadas 11 variantes patogênicas, sendo 9 no cromossomo X e 2 autossômicas (FIEREMANS *et al.*, 2016). Embora nosso estudo ainda não possua dados de expressão que permitam indicar que cromossomo X foi preferencialmente inativado (mutado ou normal), os desvios de ICX foram de extrema relevância para dar prosseguimento às demais análises moleculares.

Fieremans e colaboradores (2016) descreveram uma categorização de eventos que possivelmente contribuíram para o desvio de ICX nos pacientes, cujas variantes identificadas através de WES foram associadas à DI. A primeira hipótese é a de que somente um gene ligado ao X foi afetado, denominado “modelo de um *hit*”. O modelo de um *hit* permite três diferentes condições: na primeira, uma mutação causando a DI também influenciou o processo de ICX, levando ao desvio de ICX; na segunda, as células só são viáveis em caso de desvio secundário extremo (mas não completo) contra o X portador da mutação; e na terceira, uma mutação é responsável pela DI e um desvio de ICX ocorreu ao acaso. A segunda hipótese é que dois genes possuam mutações, denominado de “modelo de dois *hits*”. Os eventos desse modelo de dois *hits* podem ocorrer independentemente, como por exemplo, um gene autossômico causar a DI e uma mutação no cromossomo X causar o desvio de ICX. Ainda assim, uma mutação pode ter influência na expressão da outra mutação (FIEREMANS *et al.*, 2016). As mutações encontradas em nosso estudo estão de acordo com o modelo de um ou de dois *hits*, o que será discutido a seguir caso a caso.

4.2.1 Avaliação das mães das mulheres com desvio extremo de ICX

Bolduc e colaboradores (2008) avaliaram 500 mães e suas filhas recém-nascidas e não encontraram correlações entre o perfil de ICX de mães e filhas. Neste estudo, foi verificado que 77% das mães (4/6) não possuíam desvios extremos de ICX e uma não foi informativa para ambos os genes (4489A). Isto indica que o perfil de ICX, pelo menos na maioria dos casos, não é herdado, não havendo associação com alelos determinantes de uma preferência de ICX, como ocorre em camundongos para os alelos *Xce* (BOLDUC *et al.*, 2008).

Duas mães avaliadas ($n = 2/7$) também apresentaram desvios de ICX (4313A e 4488A), não podendo ser desconsiderada a interferência da idade neste processo. A mãe 4313A apresentou desvio de ICX extremo apenas para o gene *AR* (91% - alelo 240), enquanto o gene *RP2* teve um perfil de ICX aleatório (74% - alelo 360). O desvio de ICX extremo somente para o gene *AR* também foi observado na amostra a partir de mucosa bucal da mãe 4313A (92%). O gene *AR* se encontra no braço longo do cromossomo X (Xq12), mais próximo à região XIC do que o gene *RP2*, que se encontra no braço curto do cromossomo X (Xp11.3). Como diferentes mecanismos epigenéticos mantêm o estado inativo do cromossomo X, pode-se supor que a regulação entre braço curto e braço longo do cromossomo X são variáveis, assim como os achados recentes de diferenças entre tecidos e indivíduos dos genes de escape da ICX (TUKIAINEN *et al.*, 2017). Além disso, é sabido que a maior parcela dos genes de escape à ICX e que possuem ICX heterogênea entre tecidos e indivíduos estão situados no braço curto do cromossomo X (BALATON; BROWN, 2016).

A mãe da paciente 4488 (4488A) exibiu desvio de ICX moderado na amostra de sangue periférico (*AR* - 80:20), enquanto que a amostra de mucosa bucal demonstrou um perfil de ICX randômico ($\leq 75\%$). No entanto, o alelo que estava preferencialmente ativo nas células sanguíneas foi desfavorecido na amostra de mucosa (alelo 246: 38% ativo na mucosa *versus* 80% no sangue). De acordo com Hatakeyama e colaboradores (2004), após os 30 anos de idade, os desvios de ICX são mais comuns em células sanguíneas, como consequência da senescência das células tronco hematopoiéticas. Isto estaria de acordo com a preferência da ICX

presente somente nas células sanguíneas e, por isso, a diferença no alelo preferencialmente ativo nas células de mucosa bucal.

4.3 Variantes detectadas a partir dos desvios extremos de inativação do cromossomo X

O desvio de ICX em nosso estudo atuou como um sinalizador para posteriores investigações de fatores genéticos que pudessem estar associados à DI. Assim, seis pacientes que possuíam desvio extremo de ICX apresentaram variantes patogênicas como responsáveis pela DI, uma autossômica (4351) e as demais ligadas ao cromossomo X (4311, 4313, 4329, 4488, 4489). Desta forma, verificamos que a análise de desvio de ICX constitui uma metodologia rápida e de baixo custo que possui grande valia na caracterização de (novas) alterações genéticas ligadas ao X em mulheres com DI, muitas das quais já adultas e sem um aconselhamento genético apropriado.

Dentre as mutações identificadas através do WES, duas estão presentes em genes submetidos completamente à ICX (paciente 4311: *HDAC8* e paciente 4329: *TAF1*) e duas localizam-se em genes que escapam completamente à ICX (paciente 4313: *NLGN4X* e paciente 4489: *USP9X*). As mutações envolvendo os genes de escape à ICX supostamente afetam a dosagem gênica, gerando haploinsuficiência, tendo em vista que ambos os alelos deveriam ser expressos a partir dos cromossomos X ativo e inativo (MIYAKE et al., 2013).

4.3.1 Variante *missense* no gene *HDAC8* – Paciente 4311

A mutação *missense* identificada na paciente 4311 envolve o exon 9 do gene *HDAC8* (NM:018486/ENST00000373573 - c:958G>A, p.G320R, rs398122909), localizado em Xq13.1. Este gene possui 16 exons, 60 transcritos alternativos, sendo que a mutação presente na paciente 4311 compromete quatro deles (ENST00000373573, ENST00000373583, ENST00000373589, ENST00000429103).

De acordo com as predições *in silico* geradas pelo MutationTaster, a mutação causa efeitos nos sítios de *splicing* (aumento doador – g. 111050, score: wt: 0,64 / mu: 0,72; ganho doador – g. 111048, score: 0,46; g. 111053, score: 0,63), troca de aminoácido de glicina para arginina e a região é conservada entre diferentes espécies (PhastCons = 1, PhyloP = 0,835; 4,893; 2,048).

O gene *HDAC8* não escapa à ICX em nenhum grau (CARREL; WILLARD, 2005; COTTON *et al.*, 2013; TUKIAINEN *et al.*, 2017), possuindo expressão em todos os tecidos humanos (tecidos cerebrais - córtex e hipocampo: expressão média; cerebelo: expressão baixa) e desempenhando um importante papel na regulação da transcrição gênica, por pertencer à família das histonas desacetilases (HDAC) (PROTEIN ATLAS, 2018). As HDACs estão associadas com altos níveis de expressão gênica (WADE, 2001) e compreendem onze categorias, classificadas segundo domínios catalíticos evolutivamente conservados de classes de I a IV (DE RUIJTER *et al.*, 2003). Diversos processos celulares podem ser afetados pela HDACs, já que suas funções são catalisar a remoção de grupos acetila de resíduos de lisina de substratos nucleares e citoplasmáticos. Sua depleção ou inibição também prejudicam os mecanismos de reparo do dano ao DNA, uma vez que uma das funções das HDACs também é atuar contra os danos do DNA (YANG; SETO, 2008; LI; ZHU, 2014). A HDAC8 faz parte da classe I das HDAC juntamente com *HDAC1*, *HDAC2* e *HDAC3* (DE RUIJTER *et al.*, 2003).

O primeiro relato da associação de mutações no gene *HDAC8* com a DI foi em uma família com a forma sindrômica de DILX segregando uma mutação no éxon 2 do gene (c.164+5G>A) (Harakalova *et al.*, 2012). As mulheres da família portadoras da mutação exibiram um desvio extremo do perfil de ICX, indicando uma seleção contra o alelo mutado (HARAKALOVA *et al.*, 2012). No presente estudo, a mutação identificada foi responsável pela DI na paciente 4311, e supostamente está associada também ao desvio de ICX. A mutação está relacionada à síndrome de Cornélia de Lange do tipo 5 e embora a amostra paterna não esteja disponível, como o *HDAC8* é um gene associado à DILX (Harakalova *et al.*, 2012), provavelmente, o pai cognitivamente normal da paciente 4311 não carrega mutação somática no gene *HDAC8*.

A síndrome de Cornélia de Lange (MIM # 122470, 300590, 610759, 614701, 300882, sinônimo para síndrome de Brachmann-de Lange) é uma síndrome de

herança dominante ligada ao X e teve seu primeiro relato clínico em 1849; possui uma rara incidência (0,5-10/100.000 nascimentos) e alguns casos mais leves são subdiagnosticados (BOYLE *et al.*, 2015). A síndrome de Cornélia de Lange é uma condição clínica e geneticamente heterogênea, com características faciais típicas, retardo de crescimento, DI, anomalias de membros e possui cinco genes associados à condição (*NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*, *RAD21* e *HDAC8*) (KAISER *et al.*, 2014; BOYLE *et al.*, 2015).

As mutações em *HDAC8* compreendem cerca de 4% das mutações em indivíduos com características sugestivas da síndrome de Cornélia de Lange e, às vezes, resultam em um fenótipo clínico atípico (KAISER *et al.*, 2014). Os pacientes com a síndrome de Cornélia de Lange que possuem mutações em *HDAC8* têm fenótipos que se sobrepõem aos casos de mutações no gene *NIPBL*. No entanto, Kaiser e colaboradores (2014) sugeriram que o desenvolvimento embrionário anômalo ocasiona o desenvolvimento tardio das estruturas da linha média da face que resultam em hipertelorismo, telecanto e/ou *nevus flammeus* e várias características faciais adicionais que são particulares aos casos que possuem mutações no gene *HDAC8*.

Dois outros estudos identificaram a variante (NM:018486:c.958G>A:p.G320R) encontrada na paciente 4311 (DEARDORFF *et al.*, 2012; FIEREMANS *et al.*, 2016). No estudo realizado por Deardoff e colaboradores (2012), a mutação foi identificada em um homem severamente afetado pela DI e, através de estudos de *imunoblotting*, foi observado que a mutação em p.G320R em hemizigose causava instabilidade da proteína HDAC8, sendo consistente com o alto grau de conservação do complexo substrato-HDAC8. Já no estudo de Fieremans e colaboradores, a mutação c:958G>A em *HDAC8* foi identificada em uma paciente que não possuía características típicas da síndrome de Cornélia de Lange e, através da avaliação de cDNA, foi observado que apenas o alelo G era expresso no sangue, indicando que o cromossomo X portador da mutação foi preferencialmente inativado. Dessa forma, atribuímos que a mutação *missense* foi a responsável pela DI e também pode estar associada ao desvio extremo de ICX na paciente 4311. De acordo com as hipóteses definidas por Fieremans e colaboradores (2016), os achados da paciente 4311 são compatíveis com o modelo de um *hit* (primeira ou terceira hipóteses), cujo desvio de ICX pode ter ocorrido ao acaso, inativando preferencialmente o X normal, e isso pode ter sido

responsável pelo fenótipo mais severo na paciente, ou ainda, o desvio de ICX ter sido causado pela mutação.

4.3.2 Variante *missense* no gene *NLGN4X* - Paciente 4313

A mutação *missense* identificada na paciente 4313 envolve o éxon 6 do gene *NLGN4X* (NM_001282146/ ENST00000275857:exon6:c.C2284G:p.L762V, rs764361221), localizado em Xp22.31-32. O gene *NLGN4X* possui 13 exons, oito transcritos alternativos, sendo que a mutação presente na paciente 4313 compromete cinco deles (ENST00000381095, ENST00000275857, ENST00000381092, ENST00000381093, ENST00000538097). De acordo com as predições *in silico* geradas pelo MutationTaster, a mutação causa efeitos nos sítios de *splicing* (aumento marginal do acceptor: g.335870, score: wt: 0,7145/mu: 0,7558; aumento do doador: g.335879, score: wt: 0,71/mu: 0,99, aumento marginal do doador g. 335884, score: wt: 0,9486 /mu: 0,9523), troca de aminoácido de leucina para valina e a região é altamente conservada entre diferentes espécies (PhastCons = 0,975; 0,974; 0,848, PhyloP = 4.002; 2.286; -0,594). A expressão da proteína *NLGN4X* é maior nos tecidos cerebrais (expressão média no córtex e baixa no hipocampo, zona caudal e cerebelo) e foi detectada em baixos níveis nos músculos da boca, mama, placenta e cólon. Sua expressão em outros tecidos não foi detectada (Protein Atlas, 2018).

Mutações no gene *NLGN4X* foram associadas com condições neurocognitivas em um estudo relacionado ao autismo, juntamente com seu homólogo *NGLN3* (JAMAIN *et al.*, 2003). Jamain e colaboradores (2003) identificaram uma mutação *frameshift* no éxon 5 do gene *NLGN4X* (c.1186insT), em dois irmãos afetados com autismo e Síndrome de Asperger. Este gene pertence a uma categoria funcional de genes que codificam moléculas sinápticas de adesão celular (SCAMs). Os SCAMs estão localizados nos terminais sinápticos, nos quais conectam pré e pós-sinapses durante o processo de formação, maturação e modificação de sinapses por interação homofílica ou heterofílica, através de seus domínios de adesão celular extracelular. Sua função não se restringe à adesão física das sinapses, mas também envolve a indução da sinalização intracelular (BAIG; YANAGAWA; TABUCHI, 2016). Apenas 15 a 25% dos casos de transtornos do espectro do autismo são sindrômicos. No entanto,

os efeitos das variantes comuns geralmente são mais leves (BAIG; YANAGAWA; TABUCHI, 2016; BOURGERON, 2015). No estudo realizado por Laumonnier e colaboradores (2004), foi identificada uma mutação no éxon 5 de *NLGN4X* (g.1253delAG), em uma grande família francesa com DILX sugestiva, que gerou um códon de parada prematuro. Na família portadora da mutação, alguns membros apresentavam características autistas e outros apenas a DI, sugerindo uma heterogeneidade fenotípica e que os efeitos de mutações no gene *NLGN4X* também estão associados à DI (LAUMONNIER *et al.*, 2004).

A paciente 4313 tem atraso de fala e possui face síndrômica. O gene *NLGN4X* apresenta escape variável à ICX (CARREL; WILLARD, 2005; COTTON *et al.*, 2013; TUKIAINEN *et al.*, 2017) e possui um importante parálogo no cromossomo Y, o gene *NLGN4Y*, que também já teve mutações associadas ao fenótipo de autismo (JAMAIN *et al.*, 2003; YLISAUKKO-OJA *et al.*, 2005; YAN *et al.*, 2008; ROSS *et al.*, 2015). Pelo fato do gene *NLGN4X* ser expresso a partir de ambos os cromossomos sexuais, uma mutação neste gene associada a um desvio de ICX poderia comprometer o desenvolvimento intelectual. Assim, consideramos que a mutação em *NLGN4X* encontrada na paciente possui contribuição no fenótipo de DI e com o desvio de ICX. Ao comparar com as hipóteses atribuídas por Fieremans e colaboradores para explicar o desvio de ICX, genes que escapam à ICX podem estar associados com o modelo de um hit ou de dois hits. No modelo de um *hit*, o gene *NLGN4X* poderia ser responsável pela DI e pelo desvio de ICX, visto que há uma expressão menor do alelo mutado, independente se está no Xi ou Xa. Alternativamente, a mutação no gene *NLGN4X* poderia explicar a DI e uma mutação não identificada em outro gene teria sido responsável pelo desvio extremo de ICX (FIEREMANS *et al.*, 2016).

4.3.3 Variante *missense* no gene *TAF1* – Paciente 4329

A mutação *missense* identificada na paciente 4329 envolve o éxon 18 do gene *TAF1* (NM_001286074:exon18:c.G2774A:p.G925D), localizado em Xp11.4. O gene *TAF1* possui 45 exons, 20 transcritos alternativos, sendo que a mutação presente na paciente 4329 compromete quatro deles (ENST00000373790, ENST00000276072,

ENST00000449580, ENST00000423759). De acordo com as predições *in silico* geradas pelo MutationTaster, a mutação causa efeitos nos sítios de *splicing* (aumento do doador: g. 23333, *score* wt: 0.81 / mu: 0.92 e g.23338, *score* wt: 0.25 / mu: 0.53; aumento marginal do doador: g. 23328, *score*: wt: 0.6580 / mu: 0.6641 e g. 23336, *score*: wt: 0.9877 / mu: 0.9916), troca de aminoácido de glicina para ácido aspártico e a região é conservada entre diferentes espécies (PhastCons = 1; 0,917, PhyloP = 5.196; .5271; - 0,619). A proteína TAF1 é expressa em todos os tecidos e altamente expressa nos tecidos cerebrais (expressão alta no córtex, hipocampo, zona caudal e cerebelo) (Protein Atlas, 2018). O gene *TAF1* não escapa à ICX em nenhum grau (CARREL; WILLARD, 2005; COTTON *et al.*, 2013; TUKIAINEN *et al.*, 2017).

O gene *TAF1* foi recentemente adicionado à lista de genes envolvidos na DILX (Greenwood Genetic Center, 2018). A primeira associação de mutações no gene *TAF1* com a DI foi no estudo desenvolvido por Hu e colaboradores (2015) com 405 famílias não resolvidas com DILX sugestiva. Neste estudo, foram identificadas duas variantes *missense* do gene *TAF1* (p.Asn493Asp, p.Arg1190Cys) em duas famílias distintas, nas quais os homens afetados apresentavam DI moderada ou severa e características faciais típicas (HU *et al.*, 2015). No mesmo ano, O'Rawe e colaboradores (2015) descreveram alterações no gene *TAF1* (c.2419T>C [p.Cys807Arg], c.2926G>C [p.Asp976His], c.3736C>T [p.Arg1246Trp], c.3708A>G [p.Arg1228Ilefs*16]), em indivíduos do sexo masculino com atraso global do desenvolvimento, DI, dismorfias faciais características, hipotonia generalizada e características neurológicas variáveis.

No início da transcrição, a RNA polimerase II necessita da atividade de diversos fatores transcrpcionais. A proteína que coordena a atividade destes polipeptídeos é denominada fator de transcrição basal (TFIID). Assim, TFIID se liga ao promotor central para posicionar a polimerase adequadamente e atua como arcabouço para a montagem do restante do complexo de transcrição e como um canal para sinais regulatórios. O TFIID é composto pela proteína de ligação à TATA (TBP) e por um grupo de proteínas evolutivamente conservadas conhecidas como fatores associados a TBP ou TAFs. Dessa maneira, os TAFs podem participar da transcrição basal atuando como coativadores. Eles atuam no reconhecimento do promotor ou modificam os fatores gerais de transcrição para facilitar a montagem complexa e o início da transcrição. O gene *TAF1* codifica a maior subunidade do TFIID que se liga

às sequências promotoras nucleares que abrangem o local de início da transcrição. Também se liga a ativadores e outros reguladores transcricionais, e essas interações afetam a taxa de início da transcrição (PAPAI *et al.*, 2011). Mutações em genes que codificam subunidades de TFIID também tem sido associadas com doenças neurodegenerativas ou atraso no desenvolvimento, quando estas são interrompidas, como na distonia parkinsonismo ligada ao X e DI (ROOMS *et al.*, 2006; MAKINO *et al.*, 2007; NAJMABADI *et al.*, 2011; JAMBALDORJ *et al.*, 2012).

A mutação *missense* em *TAF1* encontrada na paciente 4329 é *de novo* e inédita. Intrigantemente, a paciente apresentou desvio extremo de ICX (99:1) exclusivamente para o material proveniente de sangue periférico. Como discutido anteriormente, a paciente 4329 pode ter sofrido uma seleção preferencial a favor de um cromossomo X para apenas um determinado grupamento de células, durante o desenvolvimento embrionário. Embora saibamos que o tecido da mucosa bucal possui uma maior similaridade quanto ao perfil de ICX dos tecidos inacessíveis (DE HOON *et al.*, 2015), como o tecido nervoso, e ambos possuem origem embrionária ectodérmica, não é possível afirmar o padrão de ICX no cérebro da paciente. A mutação detectada pode ter ocasionado implicações severas no desenvolvimento e funções neurológicas. Dessa forma, tendo em vista o importante papel de *TAF1* na regulação da expressão gênica, é possível que a mutação na paciente 4329 esteja relacionada com o desvio de ICX e a DI. Quanto ao desvio de ICX identificado na paciente 4329, pode ser hipotetizado que a causa do desvio está de acordo com o modelo de dois *hits*. Assim, *TAF1* é responsável pela DI e outro gene foi responsável pelo desvio de ICX (FIEREMANS *et al.*, 2016).

5.3.4. Inserção *frameshift* no gene *USP9X* – Paciente 4489

A mutação *frameshift* identificada na paciente 4489 envolve o exon 29 do gene *USP9X* (NM_001039590/ENST00000324545:exon29:c.4290dupC:p.H1430fs), localizado em Xp11.4. Essa mutação é de ocorrência *de novo*, inédita e gera um códon de parada prematuro. O gene *USP9X* possui 45 exons e 8 transcritos. De acordo com as predições *in silico* geradas pelo MutationTaster, a mutação presente na paciente 4489 compromete apenas o transcrito ENST00000324545, não causando efeitos nos sítios de *splicing*, mas a região envolvida é conservada entre diferentes espécies

(PhastCons = 1, PhyloP = 4.004; 4,73). A proteína USP9X é expressa em todos os tecidos e possui expressão média a alta nos tecidos cerebrais (expressão alta no córtex e hipocampo, expressão média na zona caudal e cerebelo) (Protein Atlas, 2018). O gene *USP9X* é classificado como um gene de escape pleno à ICX, na maioria dos relatos (COTTON *et al.*, 2013; TUKIAINEN *et al.*, 2017), exceto para o estudo de Carrel e Willard (2005) que categorizaram o gene como de escape variável. Cabe ressaltar que o gene *USP9X* possui um homólogo no cromossomo Y, o gene *USP9Y*.

A primeira associação de mutações envolvendo o gene *USP9X* (MIM*300072) com a DI foi no estudo realizado por Homan e colaboradores (2014) que identificou três variantes do gene dentre 208 famílias com DILX-NS avaliadas (c.6278T>A p.Leu2093His, c.6469C>A p.Leu2157Ile, c.7574delA p.Gln2525fs*18), com herança recessiva ligada ao X (MIM#300919). Em 2016, Reijnders e colaboradores (2016) associaram mutações em *USP9X* com a DI de herança dominante ligada ao X restrita a mulheres (MIM #300968) (REIJNDERS *et al.*, 2016; AU *et al.*, 2017). Neste último estudo, foram identificadas 17 mutações e CNVs *de novo* envolvendo o gene *USP9X* (c.2554C>T; c.3804T>A; c.3028-2A>G; c.2644_2645insA; c.1986-1G>T; c.5078T>G; c.4082delTinsTGG, c.7492_7507delCAAGATGCTCCAGATGinsC; c.3763C>T; c.1111C>T; c.1154_1155delGAinsG; c.3709del; c.4055dup).

O gene *USP9X* codifica uma proteína que atua como uma desubiquitilase altamente conservada estruturalmente e funcionalmente. As enzimas desubiquitilases atuam à jusante da ubiquitilação, que por sua vez trata-se de um processo reversível no qual há a separação da ubiquitina. Além de atuar no processo de desubiquitilação, a proteína USP9X possui um papel de grande importância no desenvolvimento neuronal de humanos e camundongos, sendo requisitada durante o período de desenvolvimento embrionário (MURTAZA *et al.*, 2015).

Uma vez que o gene *USP9X* escapa à ICX, possui um homólogo no cromossomo Y e desempenha funções de grande importância no desenvolvimento, é essencial que haja conservação do gene. Assim, consideramos que o desvio extremo de ICX pode estar associado à DI da paciente 4489. Como discutido anteriormente para a paciente 4313, o desvio de ICX pode estar de acordo com o modelo de um *hit* ou de dois *hits* (Fieremans *et al.*, 2016), mas independente se a mutação de *USP9X* estiver presente no Xi ou Xa, uma dosagem gênica menor de *USP9X* seria o suficiente para causar a DI.

5.3.5. CNVs patogênicas - Translocação 2:X – Paciente 4488

Na paciente 4488, a presença concomitante da deleção no cromossomo X e da duplicação no cromossomo 2 sugere uma translocação t(2;X)-der(2). O trecho do cromossomo X compreendido na deleção engloba o importante gene *MECP2*, cujas mutações são associadas à Síndrome de Rett em mulheres (LEONARD; COBB; DOWNS, 2016). Como abordado anteriormente, o gene *MECP2* possui um papel fundamental para o desenvolvimento neurológico e atua na regulação epigenética. A proteína MECP2 atua no reconhecimento e ligação a dinucleotídeos CpG metilados no genoma, promovendo a desacetilação de histonas e compactação da cromatina, reprimindo assim genes alvo (JONES *et al.*, 1998). O gene *MECP2* possui sua maior expressão no cérebro, com níveis de proteína MECP2 sete vezes maior nos neurônios do que o encontrado na glia. Possui ainda um importante papel na função glial, além de possuir grande importância para a maturação da sinapse (FASOLINO; ZHOU, 2017). As principais características clínicas em mulheres com a Síndrome de Rett são: a perda de habilidades adquiridas e da fala após os seis meses de vida, anormalidades da marcha e movimentos estereotipados das mãos (NEUL *et al.*, 2010). Entretanto, curiosamente as características clínicas observadas na paciente 4488 não se assemelham ao fenótipo observado na síndrome de Rett, uma vez que a paciente possui a fala e movimentos preservados aos 27 anos de idade.

De acordo com as hipóteses desenvolvidas por Fieremans e colaboradores (2016), no modelo de um *hit* (primeira condição), é citada a possibilidade de ocorrer uma translocação X:autossômica com um ponto de quebra num gene associado à DILX. Nesse caso, o desvio de ICX ocorreria contra o cromossomo X normal em 95% dos casos para que o mecanismo de ICX não afete a região autossômica translocada (FIEREMANS *et al.*, 2016). Nos casos de translocação X:autossomo, caso o cromossomo X derivado sofra a inativação, os genes da região autossômica translocada também podem ser inativados (WHITE *et al.*, 1998; SHARP *et al.*, 2002). Como a paciente 4488 possui uma grande duplicação autossômica (55,7 Mb) e parte do cromossomo X deletado (33 Mb), sugerindo uma translocação t(2;X)-der(2), importantes genes foram afetados. Como exemplo, no trecho duplicado do cromossomo 2 está o proto-oncogene *MYCN*, responsável pelo desenvolvimento de neuroblastomas (HUANG; WEISS, 2013) que também possui registro de associação

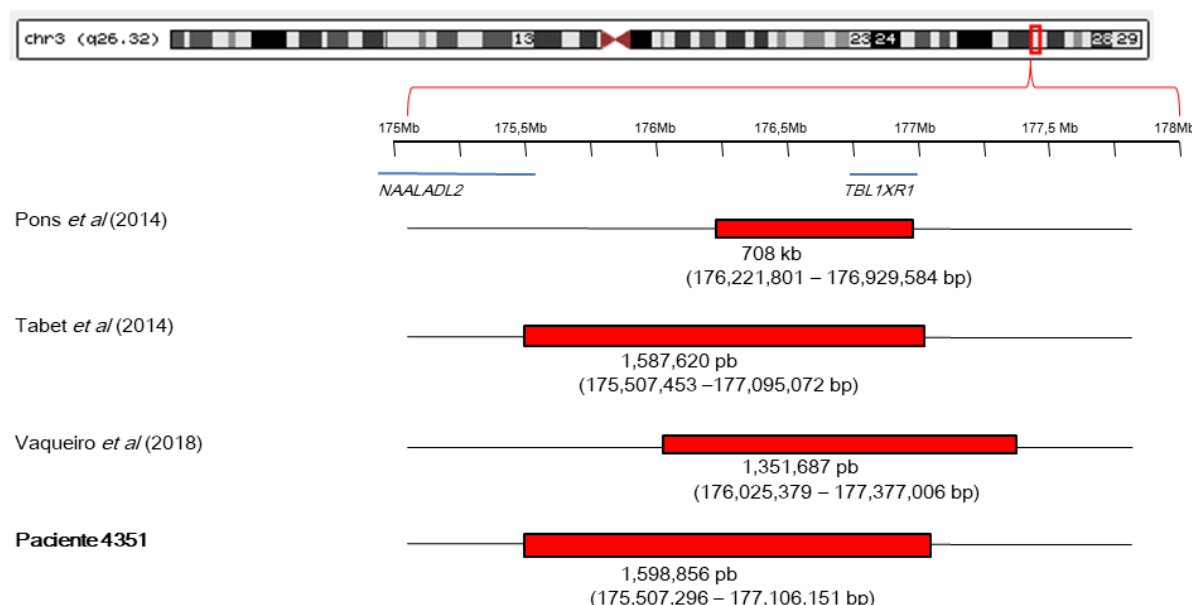
à DI, além de outros genes presentes no cromossomo 2 já associados com a DI (herança dominante: *DNTM3A*, *MYCN*, *MYT1L*, *SIX3*, *SOS1*, *SOX11*; herança recessiva: *IFT172*, *COLEC11*, *NRXN1*, *LRPPRC*) (VISSERS *et al.*, 2015). A paciente perdeu importantes genes na deleção, incluindo genes que escapam à ICX e também estão associados à DILX como os genes *IKBKG* e *L1CAM* (VISSERS *et al.*, 2015). Somados, estes fatores podem ter contribuído para a DI. Dessa forma, é suposto que a deleção do cromossomo X foi a responsável pela DI na paciente, bem como pelo desvio de ICX.

5.3.6. CNVs patogênicas - deleção em 3q26 – Paciente 4351

A deleção patogênica detectada na paciente 4351 engloba dois genes codificantes de proteínas (*TBL1XR1*, *NAALADL2*), três genes de ncRNAs (*LINC00501*, *LINC01208*, *LINC01209*) e um gene de miRNA (*MIR7977*).

Em dois trabalhos realizados por O’Roak e colaboradores (2012a; 2012b), o gene *TBL1XR1* é citado como um dos responsáveis pela DI e transtornos do espectro autista. Outros dois estudos sugerem que a sua haploinsuficiência é suficiente para causar DI leve ou moderada (Figura 55; TABET *et al.*, 2014; PONS *et al.*, 2015). No estudo realizado por Pons e colaboradores (2015), a deleção no *TBL1XR1* encontrada em uma paciente foi herdada de sua mãe, que compartilha com ela distúrbios faciais, DI leve a moderada e atraso na fala. Recentemente, Vaqueiro e colaboradores (2018) relatam uma paciente com uma CNV envolvendo o gene *TBL1XR1* que possui malformações cardíacas e cerebrais, além de características dismórficas. Mutações pontuais no gene *TBL1XR1* causam a síndrome de Pierpont, no entanto, foi proposto que há diferenças marcantes dos fenótipos de indivíduos com síndrome de Pierpont comparados àqueles que possuem deleções do gene inteiro ou outras mutações pontuais (HEINEN *et al.*, 2016).

Figura 55 - Região da deleção em 3q26 encontrada em nosso estudo em comparação com as deleções relatadas por Tabet e colaboradores (2014), Pons e colaboradores (2015) e Vaqueiro e colaboradores (2018)



Fonte: A autora, 2019

O gene *TBL1XR1* é um membro da família gênica de repetições WD40, apresenta 21 éxons, 36 transcritos e possui como parálogos os genes *TBL1X* (*transducin beta-like 1X-linked*) e *TBL1Y* (*transducin beta-like 1Y-linked*), localizados nos cromossomos X e Y, respectivamente (RefSeq, 2016).

A proteína TBL1XR1 é expressa em todos os tecidos e possui uma alta expressão nos tecidos cerebrais (córtex, hipocampo, zona caudal e cerebelo). Embora a deleção tenha sido no cromossomo 3, a proteína TBL1XR1 atua como um ativador transcricional e atua como um co-repressor do receptor nuclear (N-CoR) e dos complexos de histonas desacetilases 3 (HDAC 3) (PERISSI *et al.*, 2004). Além disso, ela também interage com as histonas H2B e H4. A metilação de histonas atua como um importante papel na regulação da expressão gênica. A acetilação de histonas H4 está envolvida no processo de ICX, bem como outras modificações epigenéticas da cromatina incluindo a metilação das histonas H3, enriquecimento das variantes de histona macroH2A e metilação do DNA (PLATH, 2003). O gene *TBL1XR1* foi identificado como um componente do co-repressor SMRT/N-CoR que regula múltiplas vias de transdução de sinal e transcrições de genes (ZHANG *et al.*, 2002). A proteína TBL1XR1, de 515 aminoácidos, contém sete domínios WD40 e um domínio LisH

(homologia lis) que medeia a dimerização e tetramerização de proteínas (LI *et al.*, 2015).

De acordo com os mecanismos propostos por Fieremans e colaboradores (2016), o modelo de um *hit* (terceira condição) poderia ser associado ao caso da paciente 4351, de modo que a variante seria a responsável por causar a DI, tendo o desvio de inativação ocorrido ao acaso. Como o gene *TBL1XR1* possui uma função associada à regulação epigenética através das interações com as histonas, o desvio de ICX encontrado na paciente pode estar relacionado aos mecanismos reguladores, nos quais o *TBL1XR1* está envolvido.

Num trabalho realizado por Millson e colaboradores (2012), é relatado ainda um paciente com microcefalia, epilepsia e DI severa envolvendo uma deleção parcial dos genes *NLGN1* e *NAALADL2* (3q26.3-3q26.32). No entanto, o fenótipo é atribuído ao gene *NLGN1*, por ser expresso predominantemente no sistema nervoso central e ser um dos cinco genes da família de neuroliginas. Um estudo de autismo realizado na população de Taiwan colocou o gene *NAALADL2* como uma região potencialmente de risco para o desenvolvimento de transtornos do espectro autista (ASD) (KUO *et al.*, 2015). O gene *NAALADL2* possui uma grande extensão com 14 exons e 1,3 Mb e está envolvido com a doença de Kawasaki e a síndrome de Cornélia de Lange (TONKIN *et al.*, 2004). Sendo assim, consideramos que a deleção em 3q26 tem relação com a DI, causada pela deleção no gene *TBL1XR1*, mas não podemos desconsiderar que a alteração no gene *TBL1XR1* não tenha tido envolvimento com o desvio extremo de ICX.

5.4. Sequenciamento do gene *XIST*

Dentre as pacientes com desvio moderado ou extremo de ICX, não foram identificadas mutações no gene *XIST* que pudessem explicar a DI (n = 5/11) ou o desvio de ICX.

O alelo G identificado no éxon 1 do gene *XIST* em quatro das onze amostras (g.73071141C>G, rs41305409) é considerado um polimorfismo comum (MAF: G=0,05847/165509 – GnomAD; G=0,0589/4748 – Exac; G=0,092/348 – 1000 Genomas). Interessantemente, no estudo realizado por Radic e colaboradores (2015)

este SNP foi identificado em famílias portadoras de hemofilia A e o alelo G foi correlacionado com uma maior expressão em relação ao alelo C nestas famílias. Com a interpretação dos dados da análise de RNA do *XIST*, foi relacionado que o alelo C nas portadoras da mutação relacionada à hemofilia (tia materna e mãe do probando) possuía algum envolvimento com a incapacidade de tornar o cromossomo X inativo (*in cis*) nestas mulheres (RADIC *et al.*, 2015). No entanto, não há relatos na literatura que o alelo G tenha um efeito causal direto no desvio de ICX, pois há registros do SNP na população controle sem desvios no perfil de ICX. Dentre as mulheres que apresentaram esse SNP, apenas a paciente 4308 apresentou desvio moderado de ICX. Dentre as demais pacientes que possuíam o alelo G, identificamos as alterações em *HDAC8*, 3q26 e *USP9X* (4311, 4351 e 4489, respectivamente) que estão associadas à DI e possivelmente ao desvio de ICX.

As mutações encontradas no gene *XIST* são raras, devido à alta conservação do gene. Há apenas dois estudos que relatam duas variantes na mesma posição da região promotora do gene *XIST* (-43C>A e -43C>G) e que relacionam aos desvios de extremos de ICX em estudos familiares (PLENGE *et al.*, 1997; TOMKINS *et al.*, 2002). No estudo realizado por Fieremans e colaboradores (2014) foi identificada uma variante de A>T no éxon 1 (g: 73.072.402 A>T) em mãe e filha que possuíam desvio extremo de ICX, no entanto, ambas possuíam mutações no gene *ATRX* que também estão frequentemente associadas à desvios extremos de ICX.

5.5. Alterações no número de cópias gênicas

Com o avanço tecnológico e a massiva quantidade de dados genéticos gerados nos últimos anos, caracterizar a patogenicidade das CNVs tem sido um grande desafio (LEE; IAFRATE; BROTHMAN, 2007). Neste trabalho, foram encontradas oito CNVs, sendo destas: três patogênicas envolvendo os cromossomos 3 (deleção em 3q26), X (t(2;X)-der(2) e 22 (deleção em 22q11.21); duas provavelmente benignas envolvendo os cromossomos 5 (duplicação em 5p15.33) e 22 (duplicação 22q13.3); e três VUS envolvendo os cromossomos X (duplicação em Xp22.33), 20 (deleção em 20p13) e 18 (18q23).

Girirajan e colaboradores (2012) avaliaram um grupo de 32.587 crianças com atraso no desenvolvimento, com ou sem malformações congênitas, e investigaram o genoma de 2.312 crianças com CNVs associadas à DI ou anomalias congênitas, através de *array*-CGH. Dentre as CNVs encontradas, foi observado que os indivíduos do sexo masculino apresentam mais variações fenotípicas em relação às mulheres e, frequentemente, as CNVs deletérias herdadas eram de mães não afetadas (GIRIRAJAN *et al.*, 2012). Um “modelo protetor feminino” tem sido proposto por Jacquemont e colaboradores (2014), após um estudo com transtornos do espectro autista (ASD) em 762 famílias. No estudo realizado, foi observado um excesso de CNVs deletérias em mulheres, quando comparado aos homens ($p = 0,03$), assim como SNPs autossômicos deletérios em probandas ($p = 0,0006$). Nesse modelo, associa-se também a maior taxa de herança materna de CNVs autossômicas (57%), além da maior frequência de herança materna em CNVs que possuem tamanhos maiores que 400 kb e CNVs deletérias ($p = 2 \times 10^{-4}$). Assim, nota-se uma maior prevalência de homens afetados nos distúrbios de desenvolvimento neurológico e uma proporção maior de CNVs de herança materna associada aos distúrbios neurológicos (JACQUEMONT *et al.*, 2014). Dessa forma, as mulheres acabam mascarando os fenótipos causados por alterações que são fenotipicamente mais perceptíveis em homens, e as mulheres que possuem comprometimento do desenvolvimento neurológico, desenvolvendo distúrbios neurológicos como a DI, são geralmente afetadas por possuírem CNVs mais extensas ou mais complexas.

Em nosso estudo, além das pacientes identificadas com desvio extremo de ICX e alterações patogênicas detectadas a partir destes, que possuem relação com a DI, foram detectadas CNVs intersticiais e subteloméricas em mais sete pacientes. Sendo assim, a MLPA se mostrou uma técnica eficaz para complementar o estudo do perfil de ICX nas mulheres com DI, pois os *kits* selecionados para avaliação das amostras possuíam regiões comumente associadas à DI. Das sete alterações detectadas, uma também foi associada ao desvio extremo de ICX (4488), conforme discutido anteriormente. Dentre as seis restantes, duas foram identificadas como CNVs provavelmente benignas (pacientes: 4306, 4487), uma patogênica (4390) e três VUS (4327, 4531 e 4545).

5.5.1. Duplicação em 22q13.3 – Paciente 4306

Na paciente 4306, foi detectada uma duplicação localizada na região 22q13, envolvendo o gene *RABL2B*. Não foi possível avaliar se o rearranjo é *de novo* ou se tem origem paterna, devido à indisponibilidade do pai.

O gene *RABL2B* (MIM*605413) é um membro da família de RAS GTPases e possui um parálogo no cromossomo 2 (2q13). A proteína codificada por este parálogo difere daquela codificada pelo *RABL2B* apenas por uma mudança de três aminoácidos conservados entre os 228 resíduos. O *RABL2A* surgiu após um evento de fusão telomérica, sugerindo que esse também tenha sido um gene subtelomérico como o *RABL2B* (WONG *et al.*, 1999). Uma análise realizada através de pirosequenciamento para ambos os genes demonstrou que *RABL2B* é preferencialmente expresso no cérebro e na placenta, podendo apresentar por si só um papel no comprometimento neurológico como observado na Síndrome de Phelan-McDermid (KRAMER *et al.*, 2010). Devido à região paráloga, o gene *RABL2B* não pôde ser testado através de PCR convencional ou qPCR.

Num estudo prévio realizado por nosso grupo em homens com DI foi identificada uma deleção patogênica envolvendo exclusivamente o gene *RABL2B* (GONÇALVES, 2012). Em geral, as CNVs que englobam o gene *RABL2B* envolvem também os genes *SHANK3* e *ACR*, e estão associadas à síndrome de Phelan-McDermid (MIM#606232). As características fenotípicas da síndrome de Phelan-McDermid são DI, comprometimento da fala e linguagem e comportamento autista (PHELAN; MCDERMID, 2011). De acordo com a literatura, a síndrome é associada à haploinsuficiência do gene *SHANK3* localizado à montante de *RABL2B* (YI *et al.*, 2016). O gene *SHANK3* codifica a proteína SHANK3 de densidade pós-sináptica (do inglês *postsynaptic density*, PSD), que atua nas sinapses excitatórias, funcionando como uma proteína mestre para o comando da rede na construção do complexo PSD. No complexo PSD, SHANK3 se liga às neuroliginas e neuroxinas para formar um complexo de sinapses glutamatérgicas (MOESSNER *et al.*, 2007; PHELAN; MCDERMID, 2011). Contudo, no trabalho de Disciglio e colaboradores (2014), a avaliação de nove pacientes com DI através de *array-CGH* sugere uma nova síndrome de genes contíguos envolvendo genes próximos à *SHANK3*. O trabalho associa a

haploinsuficiência dos genes ao atraso do desenvolvimento cognitivo e fala, sem incluir a região de *SHANK3* (DISCIGLIO *et al.*, 2014). Apesar disso, a variante encontrada na paciente 4306 em *RABL2B* trata-se de uma duplicação. Uma vez que há registro de dados no DGV de duplicações envolvendo apenas o *RABL2B* (nsv966116 e nsv1160783) e que no DECIPHER a menor região envolvendo o *RABL2B* também abrange o gene *ACR* (paciente: 288753), consideramos que a duplicação em *RABL2B* na paciente 4306 não seja a responsável pela DI na paciente.

5.5.2. Duplicação em Xp22.33 – Paciente 4327

Na paciente 4327, foi identificada uma duplicação envolvendo o gene *SHOX* (MIM*312865), localizado em Xp22.33. Por estar presente na região PAR1, o gene *SHOX* possui escape completo à ICX (TUKIAINEN *et al.*, 2017). A paciente 4327 apresentou perfil de ICX randômico (*AR* - 72:28 *RP2* - 64:36; Apêndice III). O gene *SHOX* é altamente conservado entre as espécies e alterações nesta região são associadas com baixa estatura e atraso idiopático de crescimento nas pacientes com Síndrome de Turner (RefSeq release 30 - PRUITT *et al.*, 2009). A haploinsuficiência do gene *SHOX* causa ainda discondrosteose de Léri-Weill (LWD – MIM 127300) causando deformações ósseas com desproporções como deformidade de Madelung (AUGER *et al.*, 2016). Ambas as condições estão associadas à baixa estatura, devido à atuação de *SHOX* como ativador transcricional, suprimindo a proliferação e diferenciação de condrócitos na placa de crescimento. Assim, uma falha da expressão de *SHOX* leva à desorganização da placa de crescimento (MARCHINI *et al.*, 2004).

Foi identificado um registro de duplicação envolvendo a região na base de dados DGV (dgv555e59) e dois registros de duplicações na base de dados DECIPHER envolvendo apenas o gene *SHOX* em mulheres (340380 e 284977). Sabe-se que a paciente possui baixa estatura. Contudo, devido à inviabilidade de contato com a paciente, uma reavaliação clínica mais detalhada a respeito dos fenótipos que ela apresenta não foi viável, bem como a coleta do material biológico dos familiares para avaliar se a duplicação é *de novo*. Assim, classificamos a CNV como possivelmente patogênica.

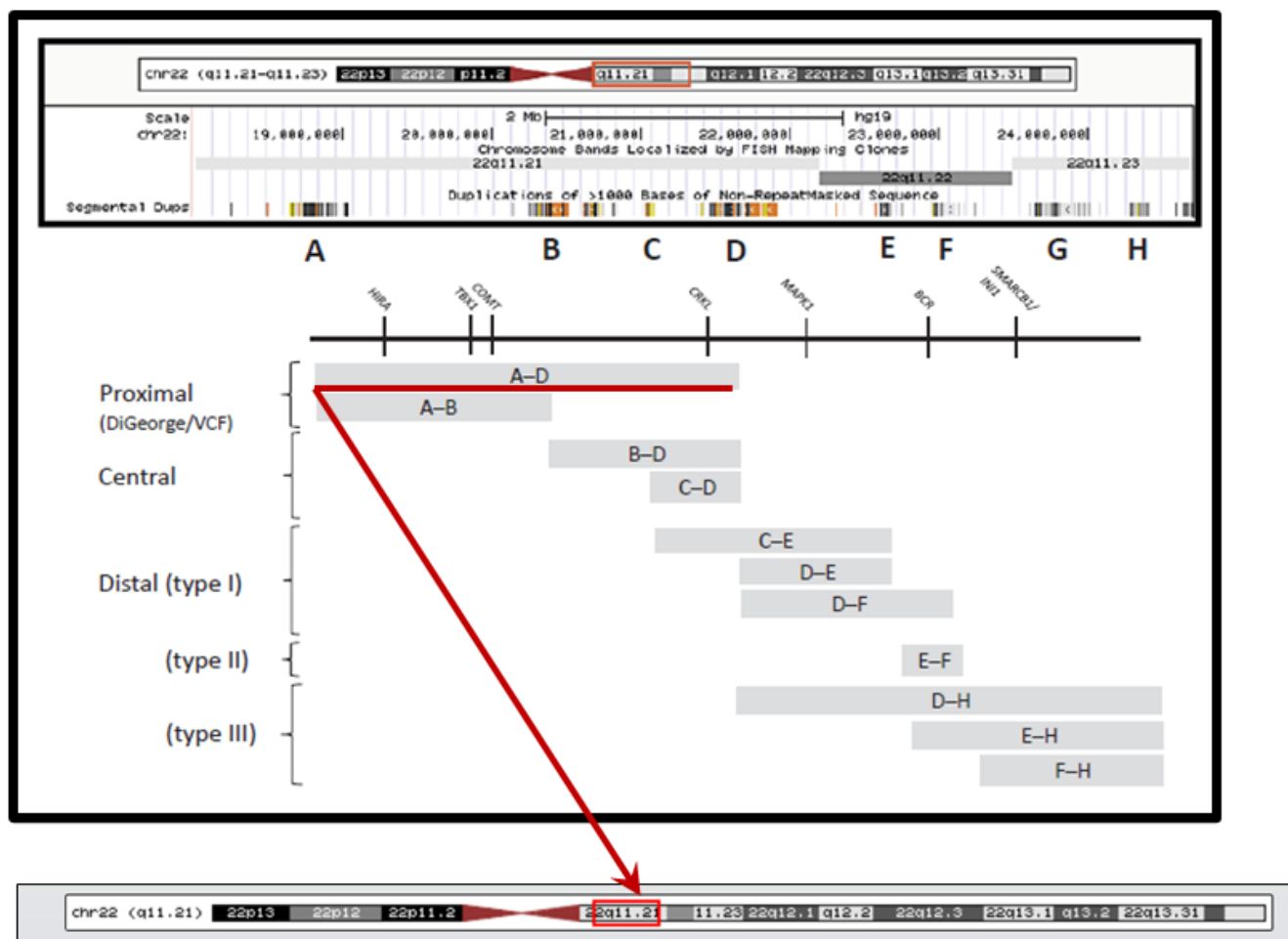
5.5.3. Deleção em 22q11.21 – Paciente 4390

A deleção encontrada na paciente 4390 envolvendo a região 22q11.21 está associada à Síndrome de DiGeorge (MIM#188400) / Velocardiofacial (MIM#192430), também atualmente conhecida como Síndrome da deleção 22q11.21. A Síndrome de deleção 22q11.21 é a microdeleção mais recorrente na população, com uma incidência de 1 a cada 4.000 nascimentos com herança autossômica dominante (BURNSIDE, 2015). As características fenotípicas principais associadas são defeitos cardíacos, insuficiência velofaríngea, deficiência imune e hipocalcemia devido à hipoplasia da paratireoide (MCDONALD-MCGINN; EMANUEL; ZACKAI, 1993). De acordo com a avaliação clínica e exames complementares, a paciente não exibe sinais clínicos característicos da Síndrome de Deleção em 22q11.21, como as complicações cardíacas (74%), problemas psiquiátricos e de comportamento ($\cong$ 60%), anomalias no palato (70%), dentre outras (BURNSIDE, 2015), o que contribuiu para que o diagnóstico somente fosse realizado tardiamente, aos 19 anos de idade.

De acordo com a literatura, as LCR22s são categorizadas de A-H e podem contribuir para o desenvolvimento da Síndrome de Deleção em 22q11 (Figura 56). As LCR22s de A-B e A-D são as que estão relacionadas com a síndrome e cada ponto de quebra está atrelado a fenótipos clínicos distintos (BURNSIDE, 2015; GUO *et al.*, 2018). A deleção da paciente do nosso estudo aparentemente envolve a região proximal de A-D, que é a mais comum nos casos da Síndrome de Deleção em 22q11.21. Embora a paciente não apresente as características fenotípicas mais clássicas envolvidas na síndrome, ela compartilha características clínicas com os fenótipos clínicos encontrados nos pacientes com LCR22A-D como: microcefalia (mais de 50% dos casos das LCRs A-D), anomalias esqueléticas (> 15% dos casos das LCRs A-D), DI (70-90% dos casos) e hipotonia. Como trata-se de um “hotspot genômico” e os pais são consanguíneos, supomos que a consanguinidade identificada entre os pais possa ter contribuído para o mecanismo de recombinação homóloga não-alélica (NAHR). Os pais da paciente não apresentam a deleção em 22q11.2, tratando-se de uma variação *de novo*. Curiosamente, o pai da paciente possui esquizofrenia e a região envolvida na deleção é considerada um *hotspot* para esquizofrenia (MARSHALL *et al.*, 2016; BASSETT *et al.*, 2017). De acordo com o

banco de dados *geneimprint*, a região da deleção envolve dois genes de *imprinting* randômico *DGCR6* e *DGCR6L*.

Figura 56 - Comparativo das repetições de baixo número de cópias (LCRs) encontradas em paciente com a Síndrome de Deleção de 22q11.21. A paciente 4390 exibe uma LCR similar aos casos categorizados de A-D



Fonte: Adaptado de Burnside (2015).

5.5.4. Duplicação em 5p15.33 – Paciente 4487

Na paciente 4487, foi identificada uma duplicação envolvendo o gene *TERT* (MIM*187270), que possui 16 éxons e 6 diferentes transcritos. O *kit* usado para o MLPA inclui o gene *TERT*, cuja haploinsuficiência está associada à Síndrome de Cri-du Chat (MIM#123450), assim como as sondas para os genes *SEMA5A* e *PDCD6*,

também associados à síndrome. Não houveram alterações envolvendo outras sondas além de *TERT* no MLPA.

O gene *TERT* codifica uma ribonucleoproteína com função de polimerase que mantém as terminações teloméricas através da adição de repetições teloméricas TTAGGG (LINGNER *et al.*, 1997). A única duplicação no DGV que envolve por completo o gene *TERT* possui uma extensão de 1 Mb e envolve pelo menos 15 genes, além do *TERT*. A referência dos dados é do trabalho desenvolvido por Cooper e colaboradores (2011), com crianças com DI e defeitos congênitos. No DECIPHER, há registros de 17 casos de ganho envolvendo o gene *TERT*, que variam entre 169 kb à 42 Mb, com fenótipos diversificados que incluem DI, autismo e atraso no desenvolvimento. Curiosamente, dentre as variantes de ganho localizadas no DECIPHER envolvendo o gene *TERT* (n=17), 18% são de herança paterna e não há registro de herança materna.

A duplicação do gene *TERT* foi confirmada através de qPCR, no entanto, a variante foi classificada como provavelmente benigna por estar presente no pai assintomático. Como a CNV foi herdada e não sabemos a extensão da CNV da paciente, pode ser que a CNV encontrada no pai da paciente possua um perfil diferenciado e a duplicação da paciente tenha envolvido genes vizinhos ao *TERT*. Caso isso tenha ocorrido, o gene *SLC6A18* pode ter alguma contribuição no quadro da DI, pois pertence à família de genes *SLC6*, cujas proteínas atuam como transportadoras específicas de neurotransmissores, aminoácidos e osmólitos como betaína, taurina e creatina (HÖGLUND *et al.*, 2005). Alguns genes da família *SLC6* já foram associados à DI: *SLC6A3*, *SLC6A8*, *SLC6A17* (VISSERS *et al.*, 2015).

5.5.5. Deleção em 20p13 – Paciente 4531

A paciente 4531 foi identificada com uma deleção envolvendo o gene *SOX12* (MIM*601947). Após o início das análises deste estudo, a paciente 4531 foi submetida novamente a uma avaliação do cariótipo e foi identificada uma translocação envolvendo o cromossomo 20 (t(2;20)(q33;p13). Assim, a deleção detectada pelo MLPA em *SOX12*, que está localizado em 20p13, provavelmente faz parte da região

deletada envolvida na translocação da paciente. Sabe-se ainda que a translocação não afetou o gene *ZCCHC3*, também localizado em 20p13, distal ao gene *SOX12*, pois a sonda referente a esta região no MLPA não demonstrou alterações.

Dentre os registros depositados na base de dados DECIPHER, a sobreposição dos fenótipos dos pacientes com deleções envolvendo a região de *SOX12*, a DI é uma característica comum a 11 casos (n=11/40). De acordo com a literatura, casos de deleção em 20p13 são recorrentes em pacientes com atraso no desenvolvimento, no entanto, não há atribuições de que genes podem estar associados (AN *et al.*, 2013). Um estudo realizado por Ravnan e colaboradores (2006) avaliou 11.688 pacientes, através de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) para regiões subteloméricas, e verificou que a deleção de 20p estava entre os desequilíbrios clinicamente mais significativos e mais comuns. Há uma série de estudos que descrevem deleções envolvendo a região 20p13 e as associam com DI, doenças de espectro autista, atraso no desenvolvimento, mas alguns não sinalizam quais genes estão envolvidos nestas CNVs (BAKER *et al.*, 2002; RAVNAN *et al.*, 2006; SEBAT *et al.*, 2007; MCGILL *et al.*, 2010; MOUTTON *et al.*, 2012).

O gene *SOX12* possui um exon apenas, codifica um transcrito e faz parte do grupo C de fatores de transcrição do grupo de alta mobilidade relacionados a *SRY* (*SOX*). Também conhecido como *SOX22*, *SOX12* é abundantemente expresso no sistema nervoso central de embriões humanos e poderia ser um gene candidato para DI associado a múltiplas malformações, baseado em seus níveis de expressão significativos em tecidos neuronais e mesenquimais (JAY *et al.*, 1997; DY *et al.*, 2008). Todavia, não há dados que suportem o envolvimento de *SOX12* em distúrbios do desenvolvimento humano. De acordo com os dados de An e colaboradores (2013), a perda gênica dessa região afetaria o desenvolvimento humano normal, sugerindo assim que o gene *SOX12* pode estar associado à DI/atraso no desenvolvimento.

Com base nisso, classificamos a CNV encontrada na paciente 4531 como possivelmente patogênica, considerando que há uma grande importância no papel de *SOX12* no desenvolvimento da deleção presente na paciente 4531. Entretanto, como trata-se de uma translocação e não se sabe que genes estão incluídos no rearranjo, outros genes envolvidos na translocação podem ter contribuído para o fenótipo da paciente.

5.5.6. Deleção em 18q23 – Paciente 4545

Na paciente 4545, foi identificada uma deleção envolvendo o gene *RBFA* que está localizado em 18q23. O gene *RBFA* possui sete exons, codifica cinco transcritos e atua como um fator A de ligação ao ribossomo, também é conhecido como *C18orf22*. A literatura é escassa quanto ao impacto de deleções envolvendo o gene *RBFA* e sua relação com a DI. O gene *RBFA* é um gene altamente conservado e sua proteína possui envolvimento na ligação ao ribossomo, desde organismos como as bactérias até em humanos, desempenhando papéis distintos (JEGANATHAN *et al.*, 2015; ROZANSKA *et al.*, 2017). De acordo com Rozanska e colaboradores (2017), a proteína RBFA controla a qualidade da biogênese do ribossomo na mitocôndria humana, enquanto a ortóloga bacteriana se associa a pequenas subunidades mitoribossômicas para promover dimetilação de adeninas conservadas. Um estudo realizado com 245 membros de 73 famílias austríacas com casos de autismo inclui o envolvimento do gene *RBFA* em dois casos (EGGER *et al.*, 2014). Dois outros estudos em larga escala, envolvendo mais de mil casos de autismo e familiares, identificaram CNVs, incluindo o gene *RBFA* (PINTO *et al.*, 2010; LEVY *et al.*, 2011).

Embora haja quatro registros no DGV de alterações envolvendo o gene *RBFA* (nsv470437, esv3643326, esv3643328, nsv1072826), entre os registros que incluem *RBFA* depositados na base de dados DECIPHER, 23 demonstram a presença de DI (n=23/90), seis de atraso global do desenvolvimento (n=6/90) e cinco ocorrências associam autismo ou comportamento autista (n=5/90). Pela análise do MLPA, verificamos que o gene *CTDP1*, à montante de *RBFA*, se encontra íntegro. Entretanto, isso não exclui a possibilidade de outros genes próximos à *RBFA* terem sido afetados na deleção. Tendo em vista esses dados e a confirmação da deleção através de qPCR, consideramos a CNV envolvendo *RBFA* na paciente 4545 como possivelmente patogênica.

Concluindo, o presente estudo contribuiu para o esclarecimento de condições genéticas associadas à DI em mulheres, possibilitando a compreensão do papel de mecanismos genéticos que possam estar colaborando para a DI em mulheres, além da importância para o aconselhamento genético familiar (Tabela 14). Com o avanço das metodologias moleculares de sequenciamento massivo do DNA, como o CHIP-

seq (do inglês, *chromatin immunoprecipitation sequencing technique*), o qual realiza uma combinação da imunoprecipitação da cromatina com a análise de *array*-CGH, haverá oportunidades de observar um panorama mais completo sobre os desdobramentos epigenéticos de mutações que possam ter envolvimento com a ICX e a DI, principalmente relacionados aos genes que escapam à ICX.

Tabela 14 - Síntese das alterações encontradas neste estudo

Amostra	% ICX		% ICX materna		Cariótipo	Alterações no MLPA	Sequenciamento da região promotora do <i>XIST</i>	Array-CGH	WES			De novo
	AR	RP2	AR	RP2					Nome do gene	Tipo de variante	Variante	
4306	58:42 (230/245)	55:45 (371/374)	NS	NS	46,XX	Duplicação em <i>RABL2B</i>	-	-				Ausente na mãe
4308	81:19 (206/221)	- (364/364)	NS	NS	46,XX		Polimorfismo no éxon 1 - rs41305409					
4311	81:19 (235/238)	98:2 (363/371)	63:37 (216/235)	55:45 (363/382)	46,XX	-	Polimorfismo no éxon 1 - rs41305409	-	<i>HDAC8</i>	Missense	NM_018486: exon9:c.G958A:p.G320R	Ausente na mãe
4313	98:2 (222/240)	- (360/360)	94:6 (231/240)	78:22 (360/371)	46,XX	-	-	-	<i>NLGN4X</i>	Missense	NM_001282146: exon6:c.C2284G:p.L762V	Ausente na mãe
4327	28:72 (231/240)	64:36 (364/382)	NS	NS	46,XX	Duplicação em <i>SHOX</i>	-	-	-	-	-	SI
4329	99:1 (226/241)	96:4 (371/374)	67:32 (239/241)	75:25 (371/381)	46,XX	-	-	-	<i>TAF1</i>	Missense	NM_001286074: exon18:c.G2774A:p.G925D	Sim
4330	- (229/229)	84:16 (358/371)	NS	NS	46,XX				-	-	-	
4350	82:18 (226/258)	- (371/371)	NS	NS	46,XX			-	-	-	-	
4351	90:10 (241/250)	83:17 (367/382)	74:26 (237/241)	- (367/367)	46,XX	-	Polimorfismo no éxon 1 - rs41305409	Deleção em 3q26	-	-	-	Sim
4390	54:46 (225/243)	79:21 (367/374)	NS	NS	46,XX	Duplicação em <i>CLDN5, GP1BB, SNAP29</i>	-	Deleção em 22q11.21	-	-	-	Sim
4398	85:15 (215/227)	86:14 (364/373)	NS	NS	46,XX			-	-	-	-	
4487	71:29 (218/231)	63:37 (377/381)	NS	NS	46,XX	Duplicação em <i>TERT</i>	-	-	-	-	-	Herança paterna
4488	93:7 (219/243)	95:5 (359/366)	80:20 (237/243)	- (366/366)	46,XX,t(2;X)-der2	Deleção em <i>MECP2</i>	-	-	-	-	-	Sim
4489	97:3 (220/233)	95:5 (349/359)	- (233/233)	- (359/359)	46,XX	-	Polimorfismo no éxon 1 - rs41305409	-	<i>USP9X</i>	Inserção frameshift	NM_001039590: exon29:c.4290dupC:p.H1430fs; NM_001039591: exon29:c.4290dupC:p.H1430fs	Sim
4517	99:1 (229/235)	86:14 (371/375)	52:48 (229/250)	- (371/371)	46,XX	-	-	-	SR	SR	SR	SI
4531	59:41 (237/243)	61:39 (360/387)	NS	NS	46, XX,t(2;20)(q33;p13)	Deleção em <i>SOX12</i>	-	-	-	-	-	Sim
4545	54:46 (225/231)	55:45 (360/378)	NS	NS	46,XX,inv(9)(p12q13)	Deleção em <i>RBFA</i>	-	-	-	-	-	Sim

Legenda: Alelos sublinhados são respectivos aos alelos presentes no X inativo. NS: não se aplica ; SI: Sem informação; SR: sem resultados.

CONCLUSÕES

Com a realização desse estudo, conclui-se que:

- a) O perfil de ICX em mulheres com DI através do estudo de microssatélites nos genes *AR/RP2* permitiu a caracterização do perfil de ICX em todo o grupo de estudo, incluindo as mulheres homozigotas para o polimorfismo do gene *AR*;
- b) Com a análise dos tecidos de diferentes origens embrionárias (sangue e epitélio bucal) quanto ao perfil de ICX, verificou-se uma seleção preferencial tecido-específico em duas mulheres avaliadas pelo nosso estudo (pacientes: 4329 e 4517);
- c) Através da avaliação do padrão de ICX nas mães de mulheres com desvio extremo de ICX não foi observada herança dos desvios de ICX na maioria dos casos;
- d) Por meio da avaliação da sequência no gene *XIST* nas mulheres com desvio de ICX, foi identificado o polimorfismo rs41305409 no exon 1 do gene em quatro das onze amostras (pacientes: 4308, 4311, 4351 e 4489), embora este polimorfismo não tenha sido associado a desvios de ICX;
- e) Os desvios extremos de ICX permitiram identificar seis alterações patogênicas responsáveis pela DI nas pacientes do estudo que podem estar associadas também ao desvio de ICX, sendo: duas CNVs nos cromossomos 3 (3q26 – paciente 4351) e X (Xq25-28 – paciente 4488); e quatro mutações pontuais no cromossomo X (duas inéditas). Dentre as mutações pontuais no cromossomo X, duas envolvem genes que escapam à ICX: *NLGN4X* (paciente 4313) e *USP9X* (paciente 4489), e outras duas mutações envolvem genes que estão sujeitos à ICX: *HDAC8* (paciente 4308) e *TAF1* (paciente 4329);
- f) O estudo das CNVs através do MLPA em paralelo à avaliação dos desvios de ICX permitiu a identificação de uma CNV patogênica no cromossomo 22 (22q11.21), duas CNVs provavelmente benignas (duplicações em *RABL2B* – paciente 4306, e *TERT* – paciente 4487) e três CNVs possivelmente patogênicas nos cromossomos 18 (18q23 – paciente 4545), 20 (20p13 – paciente 4531) e X (Xp22.33 – paciente 4327) que podem estar associadas à DI.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Intellectual Disability (Intellectual Developmental Disorder). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. **AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION**. (Ed), Arlington, VA, Fifth Edition, 33p, 2013.
- ABDALA, B. B. Variação no número de cópias no gene MECP2 e sua relação com a deficiência intelectual em homens. **Dissertação de Mestrado, UERJ, Rio de Janeiro, RJ**, p. 102, 2018.
- AMOS-LANDGRAF, J. M. et al. X Chromosome–Inactivation Patterns of 1,005 Phenotypically Unaffected Females. **The American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 3, p. 493–499, 2006.
- AN, Y. et al. SOX12 and NRSN2 are candidate genes for 20p13 subtelomeric deletions associated with developmental delay. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 162, n. 8, p. 832–840, 2013.
- AU, P. Y. B. et al. Two females with mutations in USP9X highlight the variable expressivity of the intellectual disability syndrome. **European Journal of Medical Genetics**, v. 60, n. 7, p. 359–364, 2017.
- AUGER, J. et al. Genotype-Phenotype Relationship in Patients and Relatives with SHOX Region Anomalies in the French Population. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 86, n. 5, p. 309–318, 2016.
- AUGUI, S.; NORA, E. P.; HEARD, E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 6, p. 429–42, jun. 2011.
- AVNER, P.; HEARD, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 1, p. 59–67, 2001.
- BAIG, D. N.; YANAGAWA, T.; TABUCHI, K. Distortion of the normal function of synaptic cell adhesion molecules by genetic variants as a risk for autism spectrum disorders. **Brain Research Bulletin**, v. 129, p. 82–90, mar. 2016.
- BAKER, E. et al. Study of 250 children with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. **American journal of medical genetics**, v. 107, n. 4, p. 285–93, 1 fev. 2002.
- BALATON, B. P. et al. The eXceptional nature of the X chromosome. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. R2, p. R242–R249, 2018.
- BALATON, B. P.; BROWN, C. J. Escape Artists of the X Chromosome. **Trends in Genetics**, v. 32, n. 6, p. 348–359, 2016.
- BALATON, B. P.; COTTON, A. M.; BROWN, C. J. Derivation of consensus inactivation status for X-linked genes from genome-wide studies. **Biology of Sex Differences**, v. 6, p. 35, 2015.
- BARAKAT, T. S. et al. RNF12 Activates Xist and Is Essential for X Chromosome Inactivation. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 1, p. e1002001, 27 jan. 2011.

BARUTCU, A. R. et al. A TAD boundary is preserved upon deletion of the CTCF-rich Firre locus. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

BASE DE DADOS *ClinVar*. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/> - Último acesso em 22/12/2018.

BASE DE DADOS *Exome Aggregation Consortium*. Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org/about> - Último acesso em 22/12/2018.

BASE DE DADOS NHLBI Exome Sequencing Project (ESP). Disponível em <http://evs.gs.washington.edu/EVS/> - Último acesso em 03/11/2018.

BASE DE DADOS *IGSR and 1000 genomes*. Disponível em: <http://www.internationalgenome.org/> - Último acesso em 03/11/2018.

BASE DE DADOS *GREENWOOD GENETIC CENTER*. Disponível em: <http://www.ggc.org/research/molecular-studies/xlid.html> - atualização 2018. Acessado em 22/12/2018.

BASE DE DADOS *Genecards*. Disponível em: <http://www.genecards.org/> . Último acesso em 22/12/2018.

BASE DE DADOS NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> . Último acesso em 22/12/2018.

BASE DE DADOS ABraOM. Disponível em: <http://abraom.ib.usp.br> . Último acesso em 22/12/2018.

BASE DE DADOS OMIM. Disponível em: <https://www.omim.org/entry/> . Último acesso em 22/12/2018.

BASSETT, A. S. et al. Rare Genome-Wide Copy Number Variation and Expression of Schizophrenia in 22q11.2 Deletion Syndrome. **American Journal of Psychiatry**, n. 6, p. appi.ajp.2017.1, 28 jul. 2017.

BERLETCH, J. B. et al. Genes that escape from X inactivation. **Human Genetics**, v. 130, n. 2, p. 237–245, 2011.

BOLDUC, V. et al. No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 1, p. 333–341, 2 jan. 2008.

BORENSZTEIN, M. et al. Xist-dependent imprinted X inactivation and the early developmental consequences of its failure. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 24, n. 3, p. 226–233, 2017.

BORGES, B.P.C.N. Investigação dos padrões de Inativação do Cromossomo X em mulheres saudáveis residentes no Estado do Rio de Janeiro. **Monografia de conclusão de curso, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.**, p.62, 2018. BOURGERON, T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 9, p. 551–563, 2015.

BOYLE, M. I. et al. Cornelia de Lange syndrome. **Clinical Genetics**, v. 88, n. 1, p. 1–

12, jul. 2015.

BROCKDORFF, N. et al. The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. **Cell**, v. 71, n. 3, p. 515–526, 1992.

BROWN, C. J. et al. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, v. 349, n. 6304, p. 38–44, 3 jan. 1991.

BROWN, C.; ROBINSON, W. The causes and consequences of random and non-random X chromosome inactivation in humans. **Clinical Genetics**, v. 58, n. 5, p. 353–363, 2000.

BURNSIDE, R. D. 22q11.21 Deletion Syndromes: A Review of Proximal, Central, and Distal Deletions and Their Associated Features. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 146, n. 2, p. 89–99, 2015.

BUSQUE, L. et al. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. **Blood**, v. 88, n. 1, p. 59–65, 1996.

BUSQUE, L. et al. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. **Blood**, v. 113, n. 15, p. 3472–3474, 2009.

CARL COSTANZI & JOHN R. PEHRSON. Histone macroH2A1 is concentrated in the inactive X chromosome. **Nature**, v. 393, p. 599–601, 1998.

CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**, v. 434, n. 7031, p. 400–404, 2005.

CARVALHO, C. M. B.; LUPSKI, J. R. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 4, p. 224–238, 2016.

CAVALLI, G. Chromosome kissing. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 17, n. 5, p. 443–450, out. 2007.

CERASE, A. et al. Xist localization and function: new insights from multiple levels. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 166, 2015.

CHIURAZZI, P. et al. XLMR genes: update 2007. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 16, n. 4, p. 422–34, abr. 2008.

CHIURAZZI, P.; PIROZZI, F. Advances in understanding – genetic basis of intellectual disability. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 599, 2016.

CHU, C. et al. Systematic discovery of Xist RNA binding proteins. **Cell**, v. 161, n. 2, p. 404–416, 2015.

CHUREAU, C. et al. Ftx is a non-coding RNA which affects Xist expression and chromatin structure within the X-inactivation center region. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 4, p. 705–718, 15 fev. 2011.

COLLIER, A. J. et al. Comprehensive Cell Surface Protein Profiling Identifies Specific Markers of Human Naive and Primed Pluripotent States. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 6, p. 874–890.e7, jun. 2017.

COOPER, G. M. et al. A copy number variation morbidity map of developmental delay. **Nature genetics**, v. 43, n. 9, p. 838–46, 2011.

CORTEZ D, MARIN R, TOLEDO-FLORES D, FROIDEVAUX L, LIECHTI A, WATERS PD. Origins and functional evolution of Y chromosomes across mammals. **Nature**, p. 488-93, 2014.

COTTON, A. M. et al. Analysis of expressed SNPs identifies variable extents of expression from the human inactive X chromosome. **Genome Biology**, v. 14, n. 11, 2013.

CURRY, C. J. et al. Evaluation of mental retardation - recommendations of a consensus conference. v. 477, n. March 1977, p. 468–477, 1997.

CUTLER ALLEN, R. et al. Methylation of HpaII and HhaI Sites Near the Polymorphic CAG Repeat in the Human Androgen-Receptor Gene Correlates with X Chromosome Inactivation. **Am. J. Hum. Genet**, v. 51, p. 1229–1239, 1992.

DA ROCHA, S. T.; HEARD, E. Novel players in X inactivation: insights into Xist-mediated gene silencing and chromosome conformation. **Nature Structural & Molecular Biology**, 2017.

DDD. Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. v. 519, n. 7542, p. 223–228, 2015.

DE HOON, B. et al. Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 11, p. 784–790, 2015.

DE RUIJTER, A. J. M. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **The Biochemical journal**, v. 370, n. Pt 3, p. 737–49, 15 mar. 2003.

DEARDORFF, M. A. et al. HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. **Nature**, v. 489, n. 7415, p. 313–317, 2012.

DENG, X. et al. X chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. **Nature reviews. Genetics**, v. 15, n. 6, p. 367–78, 2014.

DEVRIENDT, K. et al. Skewed X-chromosome inactivation in female carriers of dyskeratosis congenita. **American journal of human genetics**, 1997.

DISCIGLIO, V. et al. Interstitial 22q13 deletions not involving SHANK3 gene: A new contiguous gene syndrome. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 164, n. 7, p. 1666–1676, jul. 2014.

DISTECHE, C. M. **Dosage compensation of the sex chromosomes and autosomes Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2016.

DIXON, J. R. et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. **Nature**, v. 485, n. 7398, p. 376–380, 2012.

DY, P. et al. The three SoxC proteins—Sox4, Sox11 and Sox12—exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 9, p. 3101–3117, maio 2008.

EGGER, G. et al. Identification of risk genes for autism spectrum disorder through copy number variation analysis in Austrian families. **Neurogenetics**, v. 15, n. 2, p. 117–127, 2014.

FASOLINO, M.; ZHOU, Z. The Crucial Role of DNA Methylation and MeCP2 in Neuronal Function. **Genes**, v. 8, n. 5, p. 141, 13 maio 2017.

FIEREMANS, N. et al. De novo MECP2 duplications in two females with intellectual

disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. **Human Genetics**, v. 133, n. 11, p. 1359–1367, 19 nov. 2014.

FIEREMANS, N. et al. Microdeletion of the escape genes KDM5C and IQSEC2 in a girl with severe intellectual disability and autistic features. **European Journal of Medical Genetics**, v. 58, n. 5, p. 324–327, 2015.

FIEREMANS, N. et al. Identification of Intellectual Disability Genes in Female Patients with a Skewed X-Inactivation Pattern. **Human Mutation**, v. 37, n. 8, p. 804–811, ago. 2016.

FIRTH, H. V et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. **American journal of human genetics**, v. 84, n. 4, p. 524–33, 10 abr. 2009.

FREEMAN, J. L. et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. **Genome research**, v. 16, n. 8, p. 949–61, ago. 2006.

FURLAN, G. et al. The Ftx Noncoding Locus Controls X Chromosome Inactivation Independently of Its RNA Products. **Molecular Cell**, v. 70, n. 3, p. 462–472.e8, maio 2018.

GAYEN, S. et al. A Primary Role for the Tsix lncRNA in Maintaining Random X-Chromosome Inactivation. **Cell Reports**, v. 11, n. 8, p. 1251–1265, 2015.

GENDREL, A.-V.; HEARD, E. Fifty years of X-inactivation research. **Development**, v. 138, n. 23, p. 5049–5055, 1 dez. 2011.

GILISSEN, C. et al. Genome sequencing identifies major causes of severe intellectual disability. **Nature**, 2014.

GIRIRAJAN, S. et al. Phenotypic heterogeneity of genomic disorders and rare copy-number variants. **The New England journal of medicine**, v. 367, n. 14, p. 1321–31, 2012.

GONÇALVES, A. P. Mutações no gene JARID1C e rearranjos subteloméricos como causas de deficiência intelectual familiar de etiologia idiopática. **Dissertação de Mestrado, UERJ, Rio de Janeiro, RJ.**, p. 188, 2012.

GONÇALVES, T. F. et al. KDM5C mutational screening among males with intellectual disability suggestive of X-Linked inheritance and review of the literature. **European Journal of Medical Genetics**, v. 57, n. 4, p. 138–144, 27 mar. 2014.

GOODRICH, L.; PANNING, B.; LEUNG, K. N. Activators and repressors: A balancing act for X-inactivation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 56, p. 3–8, ago. 2016.

GRAVES, J. A. M.; KOINA, E.; SANKOVIC, N. How the gene content of human sex chromosomes evolved. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, n. 3, p. 219–224, 2006.

GREGG, C. et al. Sex-Specific Parent-of-Origin Allelic Expression in the Mouse Brain. **Science**, v. 329, n. 5992, p. 682–685, 6 ago. 2010.

GUO, T. et al. Deletion size analysis of 1680 22q11.2DS subjects identifies a new recombination hotspot on chromosome 22q11.2. **Human Molecular Genetics**, v. 27, n. 7, p. 1150–1163, 1 abr. 2018.

HALL, H.; HUNT, P.; HASSOLD, T. Meiosis and sex chromosome aneuploidy: how

meiotic errors cause aneuploidy; how aneuploidy causes meiotic errors. **Current Opinion in Genetics and Development**, 2006.

HAMADA, H. et al. Allele-Specific Methylome and Transcriptome Analysis Reveals Widespread Imprinting in the Human Placenta. **American Journal of Human Genetics**, v. 99, n. 5, p. 1045–1058, 2016.

HARAKALOVA, M. 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. **Journal of Medical Genetics**, v. 49, n. 8, p. 539–543, 2012.

HARRISON, K. B.; WARBURTON, D. Preferential X-chromosome activity in human female placental tissues. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 41, p. 163–168, 1986.

HATAKEYAMA, C. et al. The dynamics of X-inactivation skewing as women age. **Clinical Genetics**, v. 66, n. 4, p. 327–332, 2004.

HEINEN, C. A. et al. A specific mutation in *TBL1XR1* causes Pierpont syndrome. **Journal of Medical Genetics**, v. 53, n. 5, p. 330–337, 2016.

HÖGLUND, P. J. et al. The repertoire of solute carriers of family 6: Identification of new human and rodent genes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 336, n. 1, p. 175–189, 2005.

HOMAN, C. C. et al. Mutations in USP9X Are Associated with X-Linked Intellectual Disability and Disrupt Neuronal Cell Migration and Growth. **The American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 3, p. 470–478, 6 mar. 2014.

HU, H. et al. X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. **Molecular psychiatry**, v. 21, n. 1, p. 133–48, 3 jan. 2015.

HUANG, M.; WEISS, W. A. Neuroblastoma and MYCN. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 10, p. a014415–a014415, 1 out. 2013.

HUYNH, K. D.; LEE, J. T. Imprinted X inactivation in eutherians: a model of gametic execution and zygotic relaxation. **Current opinion in cell biology**, v. 13, n. 6, p. 690–7, dez. 2001.

JACQUEMONT, S. et al. A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. **American Journal of Human Genetics**, v. 94, n. 3, p. 415–425, 2014.

JAMAIN, S. et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. **Nature Genetics**, v. 34, n. 1, p. 27–29, 2003.

JAMBALDORJ, J. et al. Sustained expression of a neuron-specific isoform of the Taf1 gene in development stages and aging in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 425, n. 2, p. 273–277, 24 ago. 2012.

JAY, P. et al. SOX22 is a new member of the SOX gene family, mainly expressed in human nervous tissue. **Human molecular genetics**, v. 6, n. 7, p. 1069–77, jul. 1997.

JEGANATHAN, A. et al. The C-terminal helix in the YjeQ zinc-finger domain catalyzes the release of RbfA during 30S ribosome subunit assembly. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 21, n. 6, p. 1203–1216, 2015.

JONES, P. L. et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to

- repress transcription. **Nature Genetics**, v. 19, n. 2, p. 187–191, 1 jun. 1998.
- JONKERS, I. et al. RNF12 Is an X-Encoded Dose-Dependent Activator of X Chromosome Inactivation. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 999–1011, 2009.
- KAISER, F. J. et al. Loss-of-function HDAC8 mutations cause a phenotypic spectrum of Cornelia de Lange syndrome-like features, ocular hypertelorism, large fontanelle and X-linked inheritance. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 11, p. 2888–2900, 2014.
- KANAAN, S. B. et al. Evaluation of X chromosome inactivation with respect to HLA genetic susceptibility in rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2016.
- KEOHANE, A. M. et al. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. **Developmental biology**, v. 180, n. 2, p. 618–30, 15 dez. 1996.
- KIDO, T.; FAI, Y.; LAU, C. Roles of the Y chromosome genes in human cancers. **Asian Journal of Andrology**, v. 17, n. January, p. 373–380, 2015.
- KRAMER, M. et al. Analysis of relative gene dosage and expression differences of the paralogs RABL2A and RABL2B by Pyrosequencing. **Gene**, v. 455, n. 1–2, p. 1–7, 2010.
- KUO, P.-H. et al. Genome-Wide Association Study for Autism Spectrum Disorder in Taiwanese Han Population. **Plos One**, v. 10, n. 9, p. e0138695, 2015.
- LAUMONNIER, F. et al. X-Linked Mental Retardation and Autism Are Associated with a Mutation in the NLGN4 Gene, a Member of the Neuroligin Family. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, n. 3, p. 552–557, 2004.
- LEE, C.; IAFRATE, A J.; BROTHMAN, A. R. Copy number variations and clinical cytogenetic diagnosis of constitutional disorders. **Nature genetics**, v. 39, n. 7 Suppl, p. S48–S54, 2007.
- LEE, J. T. Regulation of X-chromosome counting by Tsix and Xite sequences. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5735, p. 768–71, 29 jul. 2005.
- LEE, J. T.; BARTOLOMEI, M. S. X-Inactivation, Imprinting, and Long Noncoding RNAs in Health and Disease. **Cell**, v. 152, n. 6, p. 1308–1323, mar. 2013.
- LEE, J. T.; LU, N. Targeted Mutagenesis of Tsix Leads to Nonrandom X Inactivation one X from inactivation through a " blocking factor " (neg- ative factor). Finally, the choice of active and inactive X may involve purposeful selection of each through both. **Cell**, v. 99, p. 47–57, 1999.
- LEONARD, H.; COBB, S.; DOWNS, J. Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 1, p. 37–51, 2016.
- LEVIN, J. H.; KALER, S. G. Non-random maternal X-chromosome inactivation associated with PHACES. **Clinical Genetics**, 2007.
- LEVY, D. et al. Rare De Novo and Transmitted Copy-Number Variation in Autistic Spectrum Disorders. **Neuron**, v. 70, n. 5, p. 886–897, 2011.
- LI, C. et al. A self-enhanced transport mechanism through long noncoding RNAs for X chromosome inactivation. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31517, 2016.
- LI, J. Y. et al. TBL1XR1 in physiological and pathological states. **American journal of clinical and experimental urology**, v. 3, n. 1, p. 13–23, 2015.

- LI, Z.; ZHU, W.-G. Targeting Histone Deacetylases for Cancer Therapy: From Molecular Mechanisms to Clinical Implications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 10, n. 7, p. 757–770, 2014.
- LINGNER, J. et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5312, p. 561–7, 25 abr. 1997.
- LOOS, F. et al. Xist and Tsix Transcription Dynamics Is Regulated by the X-to-Autosome Ratio and Semistable Transcriptional States. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n. 21, p. 2656–2667, 1 nov. 2016.
- LUBS, H. A.; STEVENSON, R. E.; SCHWARTZ, C. E. Fragile X and X-linked intellectual disability: Four decades of discovery. **American Journal of Human Genetics**, v. 90, n. 4, p. 579–590, 2012.
- LUPSKI, J. R. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 5, p. 419–36, jun. 2015.
- LYON, M. F. Gene Action in the X-chromosome of the Mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v. 190, n. 4773, p. 372–373, 22 abr. 1961.
- LYON, M. F. Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. **American Journal of Human Genetics**, v. 14, p. 135–148, 1962.
- MACDONALD, J. R. et al. The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome. **Nucleic acids research**, v. 42, n. Database issue, p. D986–92, jan. 2014.
- MACHADO, F. B. et al. 5meCpG epigenetic marks neighboring a primate-conserved core promoter short tandem repeat indicate X-chromosome inactivation. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e103714, jan. 2014.
- MAKINO, S. et al. Reduced Neuron-Specific Expression of the TAF1 Gene Is Associated with X-Linked Dystonia-Parkinsonism. **The American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 3, p. 393–406, 1 mar. 2007.
- MALTA, D. C. et al. Prevalência autorreferida de deficiência no Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, n. 10, p. 3253–3264, 2016.
- MANDEL, J.-L.; CHELLY, J. Monogenic X-linked mental retardation: Is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. **European Journal of Human Genetics**, v. 12, p. 689–693, 2004.
- MANGS, A.; MORRIS, B. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. **Current Genomics**, v. 8, n. 2, p. 129–136, 1 abr. 2007.
- MARCHINI, A. et al. The Short Stature Homeodomain Protein SHOX Induces Cellular Growth Arrest and Apoptosis and Is Expressed in Human Growth Plate Chondrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 35, p. 37103–37114, 27 ago. 2004.
- MARRUS, N.; HALL, L. Intellectual Disability and Language Disorder. **Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America**, v. 26, n. 3, p. 539–554, jul. 2017.
- MARSHALL, C. R. et al. Contribution of copy number variants to schizophrenia from

- a genome-wide study of 41,321 subjects. **Nature Genetics**, v. 49, n. 1, p. 27–35, 21 nov. 2016.
- MCCARREY, J. R. et al. X-chromosome inactivation during spermatogenesis is regulated by an Xist/Tsix-independent mechanism in the mouse. **Genesis**, 2002.
- MCDONALD-MCGINN, D. M.; EMANUEL, B. S.; ZACKAI, E. H. **22q11.2 Deletion Syndrome**. [s.l: s.n.].
- MCGILL, A. K. et al. A tale of two deletions: a report of two novel 20p13 --> pter deletions. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 152A, n. 4, p. 1000–7, abr. 2010.
- MENSAH, M. A. et al. Pseudoautosomal Region 1 Length Polymorphism in the Human Population. **PLoS Genetics**, 2014.
- MERMOUD, J. E. et al. Histone macroH2A1.2 relocates to the inactive X chromosome after initiation and propagation of X-inactivation. **The Journal of cell biology**, v. 147, n. 7, p. 1399–408, 27 dez. 1999.
- MIETTON, F. et al. Weak but uniform enrichment of the histone variant macroH2A1 along the inactive X chromosome. **Molecular and cellular biology**, v. 29, n. 1, p. 150–6, 1 jan. 2009.
- MIGEON, B. R. Choosing the Active X: The Human Version of X Inactivation. **Trends in Genetics**, v. 33, n. 12, p. 899–909, 2017.
- MIGEON, B. R.; DO, T. T. In search of non-random X inactivation: studies of fetal membranes heterozygous for glucose-6-phosphate dehydrogenase. **American journal of human genetics**, 1979.
- MILLSON, A. et al. Chromosomal loss of 3q26.3-3q26.32, involving a partial neuroligin 1 deletion, identified by genomic microarray in a child with microcephaly, seizure disorder, and severe intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 158 A, n. 1, p. 159–165, 2012.
- MIRANDA-FURTADO, C. L. et al. Skewed X-chromosome inactivation and shorter telomeres associate with idiopathic premature ovarian insufficiency. **Fertility and Sterility**, 2018.
- MIYAKE, N. et al. MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 161, n. 9, p. 2234–2243, set. 2013.
- MOESSNER, R. et al. Contribution of SHANK3 Mutations to Autism Spectrum Disorder. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 6, p. 1289–1297, 2007.
- MOINDROT, B. et al. A Pooled shRNA Screen Identifies Rbm15, Spen, and Wtap as Factors Required for Xist RNA-Mediated Silencing. **Cell reports**, v. 12, n. 4, p. 562–72, 28 jul. 2015.
- MOINDROT, B.; BROCKDORFF, N. RNA binding proteins implicated in Xist-mediated chromosome silencing. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 56, p. 58–70, 2016.
- MOREIRA DE MELLO, J. C. et al. Random X inactivation and extensive mosaicism in human placenta revealed by analysis of allele-specific gene expression along the

X chromosome. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–8, 2010.

MOREIRA DE MELLO, J. C. et al. Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 10794, 7 dez. 2017.

MOUTTON, S. et al. Dysmorphic features in subtelomeric 20p13 deletion excluding JAG1: A recognizable microdeletion phenotype? **European Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 2, p. 151–155, fev. 2012.

MURTAZA, M. et al. La FAM fatale : USP9X in development and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 11, p. 2075–2089, 2015.

MUSALKOVA, D. et al. Identification of novel informative loci for DNA-based X-inactivation analysis. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 54, n. 2, p. 210–216, 2015.

NAJMABADI, H. et al. Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 57–63, 21 out. 2011.

NAVARRO, P. et al. Molecular Coupling of Xist Regulation and Pluripotency. **Science**, v. 321, n. 5896, p. 1693–1695, 19 set. 2008.

NAVARRO, P. et al. Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. **Nature**, v. 468, n. 7322, p. 457–460, 18 nov. 2010.

NEUL, J. L. et al. Rett syndrome: Revised diagnostic criteria and nomenclature. **Annals of Neurology**, v. 68, n. 6, p. 944–950, 2010.

NGUYEN, D. K.; DISTECHE, C. M. High expression of the mammalian X chromosome in brain. **Brain Research**, v. 1126, n. 1, p. 46–49, 2006a.

NGUYEN, D. K.; DISTECHE, C. M. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. **Nature genetics**, v. 38, n. 1, p. 47–53, jan. 2006b.

NGUYEN, M. V. C. et al. MeCP2 Is Critical for Maintaining Mature Neuronal Networks and Global Brain Anatomy during Late Stages of Postnatal Brain Development and in the Mature Adult Brain. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 29, p. 10021–10034, 2012.

NORA, E. P. et al. Spatial partitioning of the regulatory landscape of the X-inactivation centre. **Nature**, v. 485, n. 7398, p. 381–385, 11 abr. 2012.

NORTON, H. K.; PHILLIPS-CREMINS, J. E. **Crossed wires: 3D genome misfolding in human disease** *Journal of Cell Biology*, 2017.

O'ROAK, B. J. et al. Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. **Nature Genetics**, v. 44, n. 4, p. 471–471, 2012a.

O'ROAK, B. J. et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. **Nature**, v. 485, n. 7397, p. 246–250, 2012b.

OHATA, T. et al. Lineage-specific function of the noncoding Tsix RNA for Xist repression and Xi reactivation in mice. **Genes & Development**, v. 25, n. 16, p. 1702–1715, 15 ago. 2011.

OHNO, S. SEX-LINKED Compensation Mechanism for Sex-Linked GENES. By. **TERATOLOGY**, v. 4, p. 111–118, 1967.

- OKAMOTO, I. et al. Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development. **Nature**, 2011.
- OKUMURA, K. et al. Skewed X chromosome inactivation in fraternal female twins results in moderately severe and mild haemophilia B. **Haemophilia**, 2008.
- ØRSTAVIK, K. H. X chromosome inactivation in clinical practice. **Human Genetics**, v. 126, n. 3, p. 363–373, 25 set. 2009.
- PAPAI, G.; WEIL, P. A.; SCHULTZ, P. New insights into the function of transcription factor TFIID from recent structural studies. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 21, n. 2, p. 219–224, 2011.
- PATEL, S. et al. Human Embryonic Stem Cells Do Not Change Their X Inactivation Status during Differentiation. **Cell Reports**, v. 18, n. 1, p. 54–67, jan. 2017.
- PAYER, B. Developmental regulation of X-chromosome inactivation. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 56, p. 88–99, 2016.
- PAYER, B.; LEE, J. T. X Chromosome Dosage Compensation: How Mammals Keep the Balance. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 733–772, 2008.
- PERISSI, V. et al. A Corepressor/Coactivator Exchange Complex Required for Transcriptional Activation by Nuclear Receptors and Other Regulated Transcription Factors. **Cell**, v. 116, n. 4, p. 511–526, 2004.
- PETROPOULOS, S. et al. Single-Cell RNA-Seq Reveals Lineage and X Chromosome Dynamics in Human Preimplantation Embryos. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 1012–1026, maio 2016.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45, 1 maio 2001.
- PHELAN, K.; MCDERMID, H. E. The 22q13.3 deletion syndrome (Phelan-McDermid syndrome). **Molecular Syndromology**, v. 2, n. 3–5, p. 186–201, 2011.
- PINHEIRO, I.; HEARD, E. X chromosome inactivation: new players in the initiation of gene silencing. **F1000Research**, v. 6, n. 0, p. 344, 27 mar. 2017.
- PINTER, S. F. et al. Spreading of X chromosome inactivation via a hierarchy of defined Polycomb stations. **Genome Research**, v. 22, n. 10, p. 1864–1876, 1 out. 2012.
- PINTO, D. et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. **Nature**, v. 466, n. 7304, p. 368–372, 2010.
- PLATH, K. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 131–135, 4 abr. 2003.
- PLENGE, R. M. et al. A promoter mutation in the XIST gene in two unrelated families with skewed X-chromosome inactivation. **Nature Genetics**, v. 17, n. 3, p. 353–356, 1 nov. 1997.
- PLENGE, R. M. et al. Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. **American journal of human genetics**, v. 71, n. 1, p. 168–73, 2002.
- PONS, L. et al. A new syndrome of intellectual disability with dysmorphism due to TBL1XR1 deletion. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 167, n. 1, p. 164–168, 2015.

PORISWANISH, N. et al. Recombination hotspots in an extended human pseudoautosomal domain predicted from double-strand break maps and characterized by sperm-based crossover analysis. **PLoS Genetics**, p. 1–20, 2018.

PROGRAMA DE PREDIÇÃO *in silico* Mutation Taster. Disponível em: <http://www.mutationtaster.org/> - Último acesso em 22/12/2018.

PROGRAMA DE PREDIÇÃO *in silico* PolyPhen-2. Disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> - Último acesso em 22/12/2018.

PROGRAMA DE PREDIÇÃO *in silico* SIFT. Disponível em: <http://sift.bii.a-star.edu.sg/> - Último acesso em 22/12/2018.

PRUDHOMME, J. et al. A rapid passage through a two-active-X-chromosome state accompanies the switch of imprinted X-inactivation patterns in mouse trophoblast stem cells. **Epigenetics and Chromatin**, 2015.

PRUITT, K. D. et al. NCBI Reference Sequences: current status, policy and new initiatives. **Nucleic acids research**, v. 37, n. Database issue, p. D32-6, jan. 2009.

RADIC, C. P. et al. Phenotype-genotype correlations in hemophilia A carriers are consistent with the binary role of the phase between F8 and X-chromosome inactivation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 13, n. 4, p. 530–539, 2015.

RASMUSSEN, T. P. et al. Dynamic relocalization of histone MacroH2A1 from centrosomes to inactive X chromosomes during X inactivation. **The Journal of cell biology**, v. 150, n. 5, p. 1189–98, 4 set. 2000.

RAVNAN, J. B. et al. Subtelomere FISH analysis of 11 688 cases: An evaluation of the frequency and pattern of subtelomere rearrangements in individuals with developmental disabilities. **Journal of Medical Genetics**, v. 43, n. 6, p. 478–489, 2006.

REIJNDERS, M. R. F. et al. De Novo Loss-of-Function Mutations in USP9X Cause a Female-Specific Recognizable Syndrome with Developmental Delay and Congenital Malformations. **American Journal of Human Genetics**, v. 98, n. 2, p. 373–381, 2016.

RINČIĆ, M.; IOUROV, I. Y.; LIEHR, T. Thoughts about SLC16A2, TSIX and XIST gene like sites in the human genome and a potential role in cellular chromosome counting. **Molecular cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 56, 8 dez. 2016.

ROOMS, L. et al. TBP as a candidate gene for mental retardation in patients with subtelomeric 6q deletions. **European Journal of Human Genetics**, v. 14, n. 10, p. 1090–1096, 14 out. 2006.

ROPER, H. H. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 11, n. 1, p. 161–187, set. 2010.

ROSS, J. L. et al. Behavioral phenotypes in males with XYY and possible role of increased NLGN4Y expression in autism features. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 2, p. 137–144, 2015.

ROZANSKA, A. et al. The human RNA-binding protein RBFA promotes the maturation of the mitochondrial ribosome. **Biochemical Journal**, v. 474, n. 13, p.

2145–2158, 2017.

SADO, T. et al. X inactivation in the mouse embryo deficient for Dnmt1: distinct effect of hypomethylation on imprinted and random X inactivation. **Developmental biology**, v. 225, n. 2, p. 294–303, 15 set. 2000.

SADO, T. et al. De novo DNA methylation is dispensable for the initiation and propagation of X chromosome inactivation. **Development (Cambridge, England)**, v. 131, n. 5, p. 975–82, 1 mar. 2004.

SAHAKYAN, A. et al. Human Naive Pluripotent Stem Cells Model X Chromosome Dampening and X Inactivation. **Cell Stem Cell**, 2017.

SAHAKYAN, A.; YANG, Y.; PLATH, K. The Role of Xist in X-Chromosome Dosage Compensation. **Trends in Cell Biology**, v. 90, n. 6, p. 409–413, jun. 2018.

SANDOVICI, I. et al. A longitudinal study of X-inactivation ratio in human females. **Human Genetics**, v. 115, n. 5, p. 387–92, 28 out. 2004.

SANSOVIĆ, I. et al. Chromosomal microarray in clinical diagnosis: a study of 337 patients with congenital anomalies and developmental delays or intellectual disability. **Croatian medical journal**, v. 58, n. 3, p. 231–238, 14 jun. 2017.

SATOH, M.; OGIKUBO, S.; YOSHIZAWA-OGASAWARA, A. Correlation between Clinical Phenotypes and X-inactivation Patterns in Six Female Carriers with Heterozygote Vasopressin Type 2 Receptor Gene Mutations. **Endocrine Journal**, v. 55, n. 5, p. 277–284, 2008.

SEBAT, J. et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. **Science (New York, N.Y.)**, v. 316, n. 5823, p. 445–9, 20 abr. 2007.

SHARP, A. J. et al. Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X;autosome translocations. **Human molecular genetics**, v. 11, n. 25, p. 3145–56, 1 dez. 2002.

SHARP, A.; ROBINSON, D.; JACOBS, P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. **Human Genetics**, v. 107, n. 4, p. 343–349, 27 out. 2000.

SHI, Q. et al. Single sperm typing demonstrates that reduced recombination is associated with the production of aneuploid 24,XY human sperm. **American Journal of Medical Genetics**, 2001.

SILVA, J. et al. Establishment of histone H3 methylation on the inactive X chromosome requires transient recruitment of Eed-Enx1 polycomb group complexes. **Developmental Cell**, v. 4, n. 4, p. 481–495, 2003.

SMOLA, M. J. et al. SHAPE reveals transcript-wide interactions, complex structural domains, and protein interactions across the Xist lncRNA in living cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 37, p. 10322–10327, 13 set. 2016.

SOMA, M. et al. Ftx is dispensable for imprinted X-chromosome inactivation in preimplantation mouse embryos. **Scientific reports**, v. 4, n. 1, p. 5181, 5 jun. 2014.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Structural variation in the human genome and its role in disease. **Annu Rev Med**, v. 61, p. 437–455, 2010.

STEVENSON, R. E. et al. Holmes-Gang syndrome is allelic with XLMR-hypotonic face syndrome. **American journal of medical genetics**, v. 94, n. 5, p. 383–5, 23

out. 2000.

SUN, S. et al. Jpx RNA Activates Xist by Evicting CTCF. **Cell**, v. 153, n. 7, p. 1537–1551, jun. 2013.

TABET, A. C. et al. De novo deletion of TBL1XR1 in a child with non-specific developmental delay supports its implication in intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 164, n. 9, p. 2335–2337, 2014.

TOMKINS, D. J. et al. Lack of expression of XIST from a small ring X chromosome containing the XIST locus in a girl with short stature, facial dysmorphism and developmental delay. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 10, n. 1, p. 44–51, jan. 2002.

TONKIN, E. T. et al. A giant novel gene undergoing extensive alternative splicing is severed by a Cornelia de Lange-associated translocation breakpoint at 3q26.3. **Human genetics**, v. 115, n. 2, p. 139–48, jul. 2004.

TOTH K, DE LACY N, K. B. Intellectual disability. **Dulcan MK, editor. Dulcan's textbook of child and adolescent psychiatry.**, v. 2nd editio, 2016.

TUKIAINEN, T. et al. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. **Nature**, v. 550, n. 7675, p. 244–248, 11 out. 2017.

TZSCHACH, A. et al. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. **European Journal of Human Genetics**, v. 23, n. 11, p. 1513–1518, 2015.

VACCA, M. et al. X inactivation and reactivation in X-linked diseases. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 56, p. 78–87, 2016.

VALLOT, C. et al. XACT, a long noncoding transcript coating the active X chromosome in human pluripotent cells. **Nature Genetics**, v. 45, n. 3, p. 239–241, 2013.

VALLOT, C. et al. XACT Noncoding RNA Competes with XIST in the Control of X Chromosome Activity during Human Early Development. **Cell Stem Cell**, v. 20, n. 1, p. 102–111, 2017.

VALLOT, C.; ROUGEULLE, C. Inactivation du chromosome X chez l'humain. **médecine/sciences**, v. 29, n. 2, p. 223–225, 28 fev. 2013.

VAN DEN BERG, I. M. et al. X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos. **American Journal of Human Genetics**, v. 84, n. 6, p. 771–779, 2009.

VAN KARNEBEEK, C. D. M. Evaluation of the Child with Developmental Impairments. **CONTINUUM Lifelong Learning in Neurology**, v. 24, n. 1, Child Neurology, p. 228–247, 2018.

VICTORINO KREPISCHI, A. C.; KOK, F.; GUIMARÃES OTTO, P. X chromosome-inactivation patterns in patients with Rett syndrome. **Human Genetics**, v. 102, n. 3, p. 319–321, 16 mar. 1998.

VIGGIANO, E. et al. Determining the role of skewed X-chromosome inactivation in developing muscle symptoms in carriers of Duchenne muscular dystrophy. **Human Genetics**, v. 135, n. 7, p. 685–698, 2016.

VIGGIANO, E. et al. Skewed X-chromosome inactivation plays a crucial role in the onset of symptoms in carriers of Becker muscular dystrophy. **The Journal of Gene**

Medicine, v. 19, n. 4, p. e2952, abr. 2017.

VISSERS, L. E. L. M. et al. Vissers 2015 Nature Review Genetics Intellectual disability. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. CCI, p. 9–18, 2015.

VOGELSTEIN, B. et al. Use of restriction fragment length polymorphisms to determine the clonal origin of human tumors. **Science (New York, N.Y.)**, v. 227, n. 4687, p. 642–5, 8 fev. 1985.

VOGELSTEIN, B. et al. Clonal Analysis Using Recombinant DNA Probes from the X-Chromosome. **Cancer Research**, v. 47, n. 18, p. 4806–4813, 1987.

WADE, P. A. Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin. **Human molecular genetics**, v. 10, n. 7, p. 693–8, abr. 2001.

WANG, M. et al. Random X-chromosome inactivation dynamics in vivo by single-cell RNA sequencing. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2017.

WANG, X.; SOLOWAY, P. D.; CLARK, A. G. Paternally biased X inactivation in mouse neonatal brain. **Genome biology**, v. 11, n. 7, p. R79, jan. 2010.

WHITE, W. M. et al. The Spreading of X Inactivation into Autosomal Material of an X;autosome Translocation: Evidence for a Difference between Autosomal and X-Chromosomal DNA. **The American Journal of Human Genetics**, v. 63, n. 1, p. 20–28, jul. 1998.

WIJCHERS, P. J.; FESTENSTEIN, R. J. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. **Trends in Genetics**, v. 27, n. 4, p. 132–140, 2011.

WOLF, S. F. et al. Methylation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase locus on the human X chromosome: implications for X-chromosome inactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 9, p. 2806–10, maio 1984.

WONG, A C. et al. Two novel human RAB genes with near identical sequence each map to a telomere-associated region: the subtelomeric region of 22q13.3 and the ancestral telomere band 2q13. **Genomics**, v. 59, n. 3, p. 326–34, 1999.

YAN, J. et al. Analysis of the neuroligin 4Y gene in patients with autism. **Psychiatric Genetics**, v. 18, n. 4, p. 204–207, 2008.

YANG, F. et al. The lncRNA Firre anchors the inactive X chromosome to the nucleolus by binding CTCF and maintains H3K27me3 methylation. **Genome Biology**, v. 16, n. 1, p. 52, 12 dez. 2015.

YANG, X. J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: From bacteria and yeast to mice and men. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 206–218, 2008.

YEN, P. H. et al. Differential methylation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase genes on active and inactive human X chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 81, n. 6, p. 1759–63, 1984.

YI, F. et al. Autism-associated SHANK3 haploinsufficiency causes Ih channelopathy in human neurons. **Science**, v. 352, n. 6286, p. aaf2669–aaf2669, 2016.

YLISAUKKO-OJA, T. et al. Analysis of four neuroligin genes as candidates for

autism. **European Journal of Human Genetics**, v. 13, n. 12, p. 1285–1292, 2005.

ZECHNER, U. et al. A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? **Trends in genetics : TIG**, v. 17, n. 12, p. 697–701, dez. 2001.

ZENG, S. M.; YANKOWITZ, J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. **Placenta**, v. 24, n. 2–3, p. 270–275, 2003.

ZHANG, J. et al. The N-CoR-HDAC3 Nuclear Receptor Corepressor Complex Inhibits the JNK Pathway through the Integral Subunit GPS2. **Molecular Cell**, v. 9, n. 3, p. 611–623, 1 mar. 2002.

ZHANG, Q. et al. Familial cases and male cases with MECP2 mutations. **American Journal of Medical Genetics, Part B: Neuropsychiatric Genetics**, v. 174, n. 4, p. 451–457, 2017.

ZHAO, J. et al. Polycomb Proteins Targeted by a Short Repeat RNA to the Mouse X Chromosome. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 750–756, 31 out. 2008.

ANEXO A – Sequência dos iniciadores usados de outros trabalhos

- Sequência dos iniciadores descrita por Fieremans e colaboradores (2014).

Região cromossômica	Iniciador	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho dos fragmentos (pb)
Xq13.2	<i>XIST1</i>	F- CTTTCTGGTATGTCTTTGCT R- CAGAGGGGAAGGGAATCA	686
Xq13.2	<i>XIST2</i>	F- CGTGGATACCTGCCTTTT R- CTGCACCTTAGTCTTTCCT	761
Xq13.2	<i>XIST3</i>	F- ATTTGGGGCTTGTTAGGA R- GGGGACAAATAAGAGGGGA	807
Xq13.2	<i>XIST4</i>	F- GGGTGAATTAGCATGGCACT R- GCAAACCACAAAATCAGACTGT	598
Xq13.2	<i>XIST5</i>	F- TGGGGTCGGATTTTGATTTA R- TGAAGATCAGCAATGCCAAG	813

- Sequência dos iniciadores descrita em Machado e colaboradores (2014).

Região cromossômica	Iniciador	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho dos fragmentos (pb)
Xq12	<i>AR</i>	F- GTGCGCGAAGTGATCCAGAA R- CCAGGACCAGGTAGCCTGTG	244
Xp11.23	<i>RP2</i>	F- TGACATAGCGAGACCCTGTG R-GTGGTGGGTTCTCTAGCTGG	383

ANEXO B – Sondas dos Kits de MLPA

Tabela 1: Representação das sondas e regiões analisadas por MLPA - *Kit P036*.

Tamanho do fragmento (pb)	Posição cromossômica	Sonda Respectiva
64-70-76-82	<i>Q-fragments:</i> Quantidade de DNA; visível somente quando a amostra de DNA está menor que 100 ng	
88-92-96	<i>D-fragments:</i> Sinal abaixo de 88 ou 96 pb indica incompleta desnaturação	
100	<i>X-fragment:</i> Marcador específico para o cromossomo X (<i>AMOT</i>)	
105	<i>Y-fragment:</i> Marcador específico para o cromossomo Y (<i>UTY</i>)	
118	<i>Y-fragment:</i> Marcador específico para o cromossomo Y (<i>ZFY</i>)	
130	1p	<i>TNFRSF4</i>
136	2p	<i>ACP1</i>
142	3p	<i>CHL1</i>
151	4p	<i>PIGG (FLJ20265)</i>
158	5p	<i>PDCD6</i>
166	6p	<i>IRF4</i>
172	7p	<i>ADAP1 (CENTA1)</i>
179	8p	<i>FBXO25</i>
186	9p	<i>DMRT1</i>
193	10p	<i>DIP2C(KIAA0934)</i>
202	11p	<i>RIC8A (RIC-8)</i>
208	12p	<i>SLC6A12</i>
219	13q-cen	<i>PSPC1</i>
227	14q-cen	<i>CCNB1IP1 (HEI10)</i>
235	15q-cen	<i>MKRN3</i>
242	16p	<i>POLR3K</i>
250	17p	<i>RPH3AL</i>
258	18p	<i>USP14</i>
265	19p	<i>CDC34</i>
274	20p	<i>SOX12</i>
283	21q-cen	<i>RBM11</i>
289	22q- cen	<i>BID</i>
298	Xp/Yp(PAR1)	<i>SHOX</i>
307	1q	<i>SH3BP5L (KIAA1720)</i>
313	2q	<i>CAPN10</i>
322	3q	<i>BDH1</i>
330	4q	<i>TRIML2</i>
337	5q	<i>GNB2L1</i>
346	6q	<i>PSMB1</i>
355	7q	<i>VIPR2</i>
361	8q	<i>ZC3H3 (KIAA0150)</i>
372	9q	<i>EHMT1</i>
379	10q	<i>PAOX (PAO)</i>
386	11q	<i>NCAPD3(KIAA0056)</i>
395	12q	<i>ZNF10</i>
402	13q	<i>F7</i>
411	14q	<i>MTA1</i>
418	15q	<i>ALDH1A3</i>
426	16q	<i>GAS8 (GAS11)</i>
434	17q	<i>TBCD</i>
441	18q	<i>RBFA (C18orf22)</i>
450	19q	<i>CHMP2A (BC-2)</i>
458	20q	<i>OPRL1</i>
466	21q	<i>PRMT2 (HMT1)</i>
475	22q	<i>RABL2B</i>
483	Xq/Yq (PAR2)	<i>VAMP7 (SYBL1)</i>

Tabela 2: Representação das sondas e regiões analisadas por MLPA - Kit P070.

Tamanho do fragmento (pb)	Posição cromossômica	Sonda Respectiva
64-70-76-82	<i>Q-fragments</i> : Quantidade de DNA; visível somente quando a amostra de DNA está menor que 100 ng	
88-92-96	<i>D-fragments</i> : Sinal abaixo de 88 ou 96 pb indica incompleta desnaturação	
100 X-fragment	<i>X-fragment</i> : Marcador específico para o cromossomo X (gene <i>AMOT</i>)	
105 Y-fragment	<i>Y-fragment</i> : Marcador específico para o cromossomo Y (gene <i>UTY</i>)	
121 Y-fragment	<i>Y-fragment</i> : Marcador específico para o cromossomo Y (gene <i>ZFY</i>)	
132	1q	<i>SH3BP5L</i>
139	2q	<i>ATG4B</i>
145	3q	<i>KIAA0226</i>
152	4q	<i>FRG1</i>
160	5q	<i>GNB2L1</i>
166	6q	<i>TBP</i>
172	7q	<i>VIPR2</i>
179	8q	<i>RECQL4</i>
186	9q	<i>EHMT1</i>
193	10q	<i>ECHS1</i>
202	11q	<i>IGSF9B</i>
211	12q	<i>ZNF10</i>
218	13q	<i>CDC16</i>
226	14q	<i>MTA1</i>
233	15q	<i>TM2D3</i>
241	16q	<i>GAS8</i>
250	17q	<i>SECTM1</i>
258	18q	<i>CTDP1</i>
265	19q	<i>CHMP2A</i>
274	20q	<i>UCKL1</i>
281	21q	<i>S100B</i>
290	22q	<i>ARSA</i>
298	X/Yq (PAR2)	<i>VAMP7</i>
306	1p	<i>TNFRSF18</i>
315	2p	<i>ACP1</i>
323	3p	<i>CHL1</i>
329	4p	<i>PIGG</i>
337	5p	<i>CCDC127</i>
346	6p	<i>IRF4</i>
355	7p	<i>SUN1</i>
362	8p	<i>FBXO25</i>
370	9p	<i>DOCK8</i>
379	10p	<i>ZMYND11</i>
387	11p	<i>BET1L</i>
393	12p	<i>KDM5A</i>
402	13p	<i>PSPC1</i>
409	14p	<i>PARP2</i>
418	15p	<i>NDN</i>
427	16p	<i>DECR2</i>
436	17p	<i>RPH3AL</i>
444	18p	<i>THOC1</i>
451	19p	<i>PPAP2C</i>
459	20p	<i>ZCCHC3</i>
466	21p	<i>HSPA13</i>
479	22p	<i>IL17RA</i>
490	X/Yp (PAR1)	<i>SHOX</i>

Tabela 3: Representação das sondas e regiões analisadas por MLPA - Kit P245.

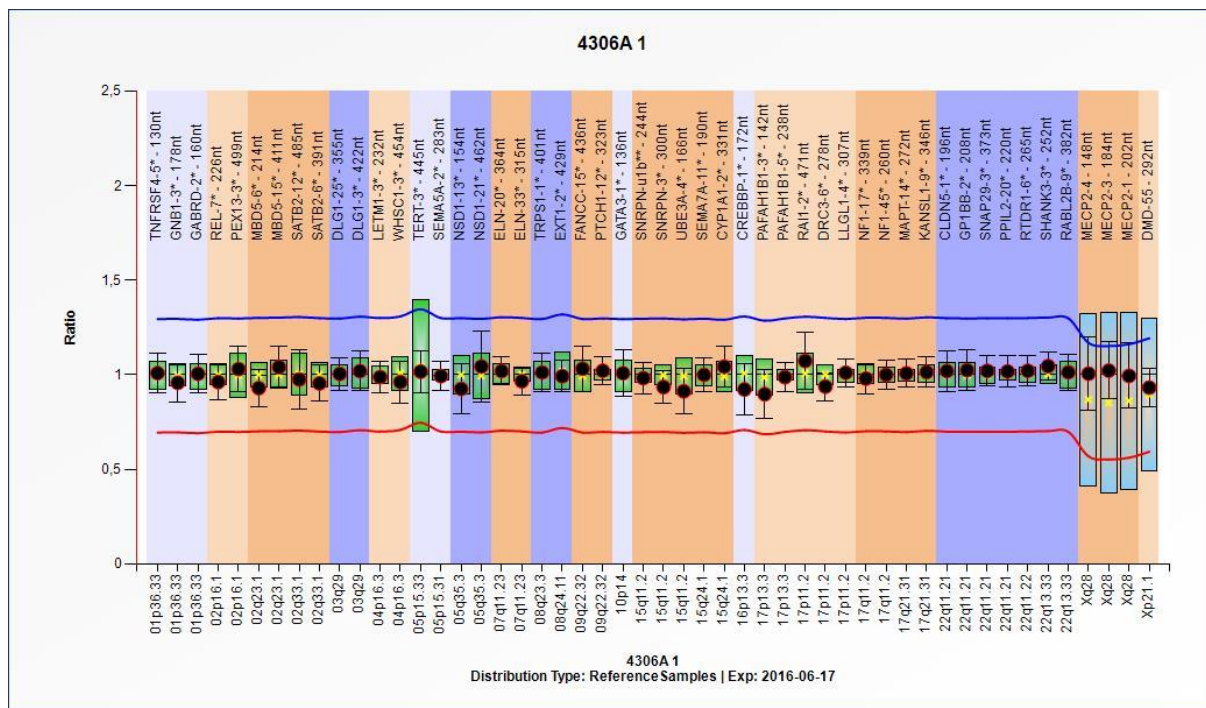
Tamanho do fragmento (pb)	Posição cromossômica	Sonda Respectiva	Síndrome associada
64-70-76-82	<i>Q-fragments:</i> Quantidade de DNA; visível somente quando a amostra de DNA está menor que 100 ng		
88-92-96	<i>D-fragments:</i> Sinal abaixo de 88 ou 96 pb indica incompleta desnaturação		
100	<i>X-fragment:</i> Marcador específico para o cromossomo X		
105	<i>Y-fragment:</i> Marcador específico para o cromossomo Y		
118	<i>Y-fragment:</i> Marcador específico para o cromossomo Y		
130	1p36.33	<i>TNFRSF4</i>	síndrome da deleção 1p36
136	10p14	<i>GATA3</i>	Região 2 DiGeorge
142	17p13.3	<i>PAFAH1B1</i>	Síndrome de Miller-Dieker
148	Xq28	<i>MECP2</i>	Síndrome de RETT
154	5q35.3	<i>NSD1</i>	Síndrome de Sotos
160	1p36.33	<i>GABRD</i>	síndrome da deleção 1p36
166	15q11.2	<i>UBE3A</i>	Síndrome de Prader-Willi-Angelman
172	16p13.3	<i>CREBBP</i>	Síndrome de Rubinstein-Taybi
178	1p36.33	<i>GNB1</i>	Síndrome da deleção 1p36
184	Xq28	<i>MECP2</i>	Síndrome de RETT
190	15q24	<i>SEMA7A</i>	Síndrome de Microdeleção em 15q24
196	22q11.21	<i>CLDN5</i>	Síndrome de DiGeorge
202	Xq28	<i>MECP2</i>	Síndrome de RETT
208	22q11.21	<i>GP1BB</i>	Síndrome de DiGeorge
214	2q23.1	<i>MBD5</i>	Síndrome de Microdeleção em 2q23.1
220	22q11.21	<i>PPIL2</i>	Síndrome 22q11 Distal
226	2p16.1	<i>REL</i>	Síndrome de Microdeleção em 2p16.1
232	4p16.3	<i>LETM1</i>	Síndrome de Wolf-Hirschhorn
238	17p13.3	<i>PAFAH1B1</i>	Síndrome de Miller-Dieker/ Lisencefalia
244	15q11.2	<i>SNRPN</i>	Síndrome de Prader-Willi-Angelman
252	22q13.33	<i>SHANK3</i>	Síndrome de Phelan-McDermid
260	17q11.2	<i>NF1</i>	Síndrome de microdeleção NF1
265	22q11.22	<i>RTDR1</i>	Síndrome de 22q11 Distal
272	17q21.31	<i>MAPT</i>	Síndrome de microdeleção 17q21.31
278	17p11.2	<i>LRRC48</i>	Síndrome de Smith-Magenis
283	5p15.31	<i>SEMA5A</i>	Síndrome de Cri du Chat
292	Xp21.1	<i>DMD</i>	Marcador para nº de cópias do cromossomo X
300	15q11.2	<i>SNRPN</i>	Síndrome de Prader-Willi-Angelman
307	17p11.2	<i>LLGL1</i>	Síndrome de Smith-Magenis
315	7q11.23	<i>ELN</i>	Síndrome Williams-Beuren
323	9q22.32	<i>PTCH1</i>	Síndrome de microdeleção 9q22.3
331	15q24.1	<i>CYP1A1</i>	Síndrome de microdeleção 15q24
339	17q11.2	<i>NF1</i>	Síndrome de microdeleção NF1
346	17q21.31	<i>KANSL1</i>	Síndrome de microdeleção 17q21.31
355	3q29	<i>DLG1</i>	Síndrome de microdeleção 3q29
364	7q11.23	<i>ELN</i>	Síndrome de Williams-Beuren
373	22q11.21	<i>SNAP29</i>	Síndrome de DiGeorge
382	22q13.33	<i>RABL2B</i>	Síndrome de Phelan-McDermid
391	2q33.1	<i>SATB2</i>	Síndrome de microdeleção 2q33.1
401	8q23.3	<i>TRPS1</i>	Síndrome de Langer-Giedion
411	2q23.1	<i>MBD5</i>	Síndrome de microdeleção 2q23.1
422	3q29	<i>DLG1</i>	Síndrome de microdeleção 3q29
429	8q24.11	<i>EXT1</i>	Síndrome de Langer-Giedion
436	9q22.32	<i>FANCC</i>	Síndrome de microdeleção 9q22.3
445	5p15.33	<i>TERT</i>	Síndrome de Cri du Chat
454	4p16.3	<i>WHSC1</i>	Síndrome de Wolf-Hirschhorn
462	5q35.3	<i>NSD1</i>	Síndrome de Sotos
471	17p11.2	<i>RAI1</i>	Síndrome de Smith-Magenis
485	2q33.1	<i>SATB2</i>	Síndrome de microdeleção 2q33.1
499	2p16.1	<i>PEX13</i>	Síndrome de microdeleção 2p16.1

APÊNDICE A – Iniciadores desenhados para este trabalho

Região cromossômica	Iniciador	Sequência (5'-3')	Tamanho dos fragmentos (pb)
3q26	Primer 1 (268)	F- ttgtcacgtaggcaggaaaag R- tgccacagtggtgagaaaag	81
3q26	Primer 2 (288)	F- gctatgtgttccttgcccttg R - ttaccattaatctctcatgtgc	81
3q26	Primer 3 (276)	F- gaaatatgcagcctggaagg R- ttgtcatctttgccctggag	120
3q26	Primer 4 (292)	F- gaattccatgccatcaaagg R- gagccaggctgacataatcac	75
3q26	Primer 5 (290)	F- cttggctttgtatggctcag R- ttctggcaggcatgctaatac	74
4q13.3	ALB	F- aatgtgcacagaatccttgg R- tcatcgacttcagagctgaaa	61
5p15	TERT	F- gacaccgcataatccagtcac R-tgtgctgtatccagatgggtg	-
8p21.1	ESCO2	F- cagcgggcttcctcctagc R- ggagaacgagtcagtggttc	253
18q23	RBFA	F- actggaagacaacgctctctg R- caaaggctcatcacctcatgtgc	89
20p13	SOX12	F- acgatgaagacgacgacgag R- ggaccatcctccacagctc	78
22q13.33	ACR	F- aagataacgccacgtgtgag R- ttagggatgcagcctccttttc	121
22q13.33	SHANK3-Primer 1	F - aggcgggtgatgttcagatg R - aacaccggccgtcagtc	59
22q13.33	SHANK3-Primer 2	F- cctgcgcacgccatgt R- gagaccatccgagcacaaca	60
22q13.33	SHANK3-Primer 3	F- cagcgggagcaaacg R- cacattagaaccaagtgcagtc	61
22q13.33	SHANK3-Primer 5	F- gacacacggcctgtgagt R- atttagcaccaagagagaacaagg	95
22q13.33	SHANK3-Primer 6	F- cgcctcgtcatgaaggtgt R- cgagccccgtcctcttct	56
22q13.33	SHANK3-Primer 7	F- gctgtctctgcccctaaatg R- gcacaaaagctacaagagcaa	67
Xp11.4	USP9X	F- cctcccttcataagctagaca R- gcacctccttttcacaacc	199
Xp22.32-p22.31	NLGN4X	F- ttggaatcatggtgatgggtg R- tatcgctcacatccagaacg	191
Xq13.1	TAF1	F- tggaatccatctatgcaaat R- tcattttcttctctggagca	167
Xq13.1	HDAC8	F- aatgactcagctcttcccctt R- ggaggctataaccttgccaac	150
Xq13.2	XIST4C	F- ggggtgaattagcatggcact R- tgatccattctgtccttgc	452
Xq13.2	XIST4CP	F- cctgcactgcactgttgc R- agacttaaattcaaacactagcaaacc	254

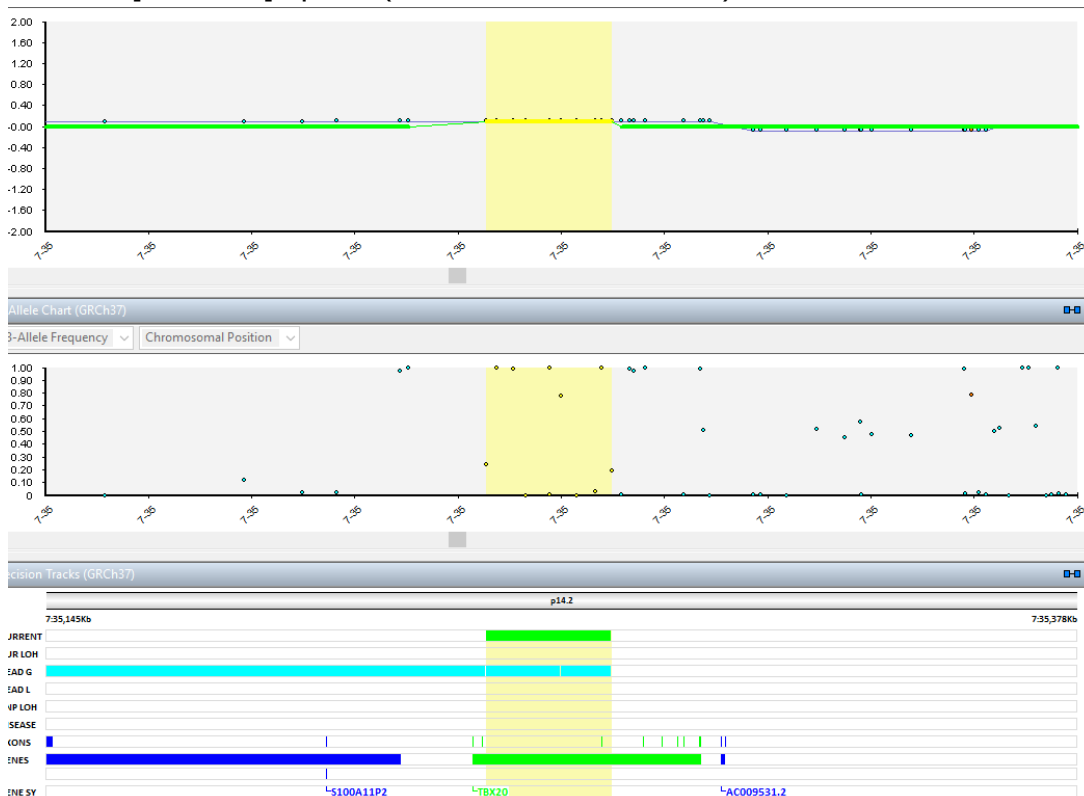
APÊNDICE B - Resultados individuais Array-CGH e MLPA

- Resultado do MLPA da amostra da mãe da paciente 4306.

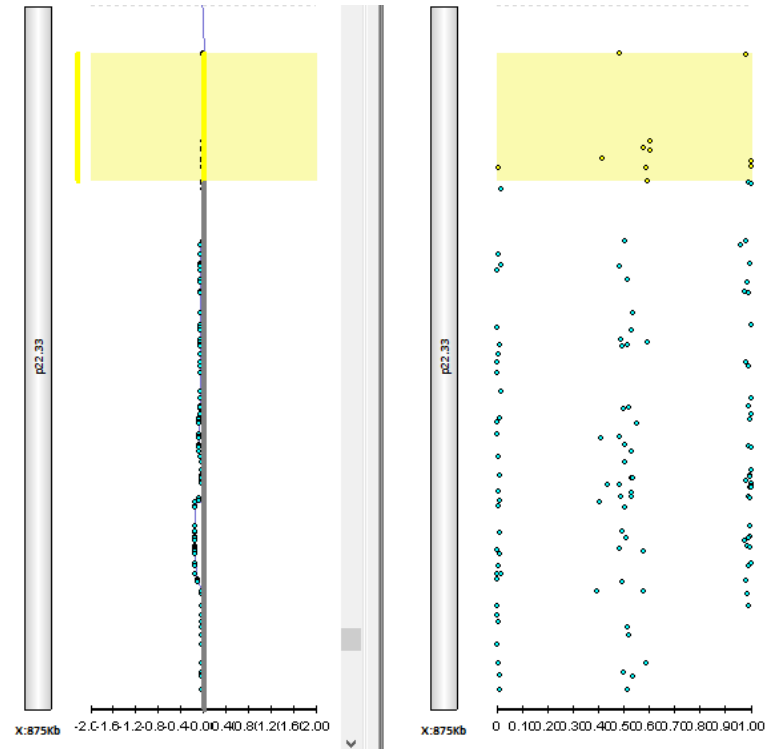


- Resultado do array-CGH da paciente 4313

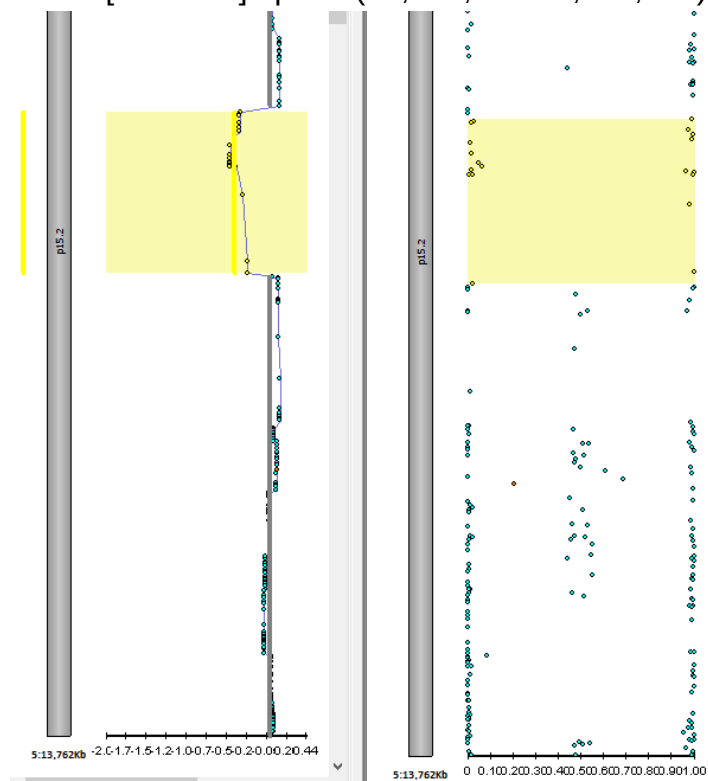
VUS: arr[GRCh37] 7p14.2(35,244,965-35,273,291)x3



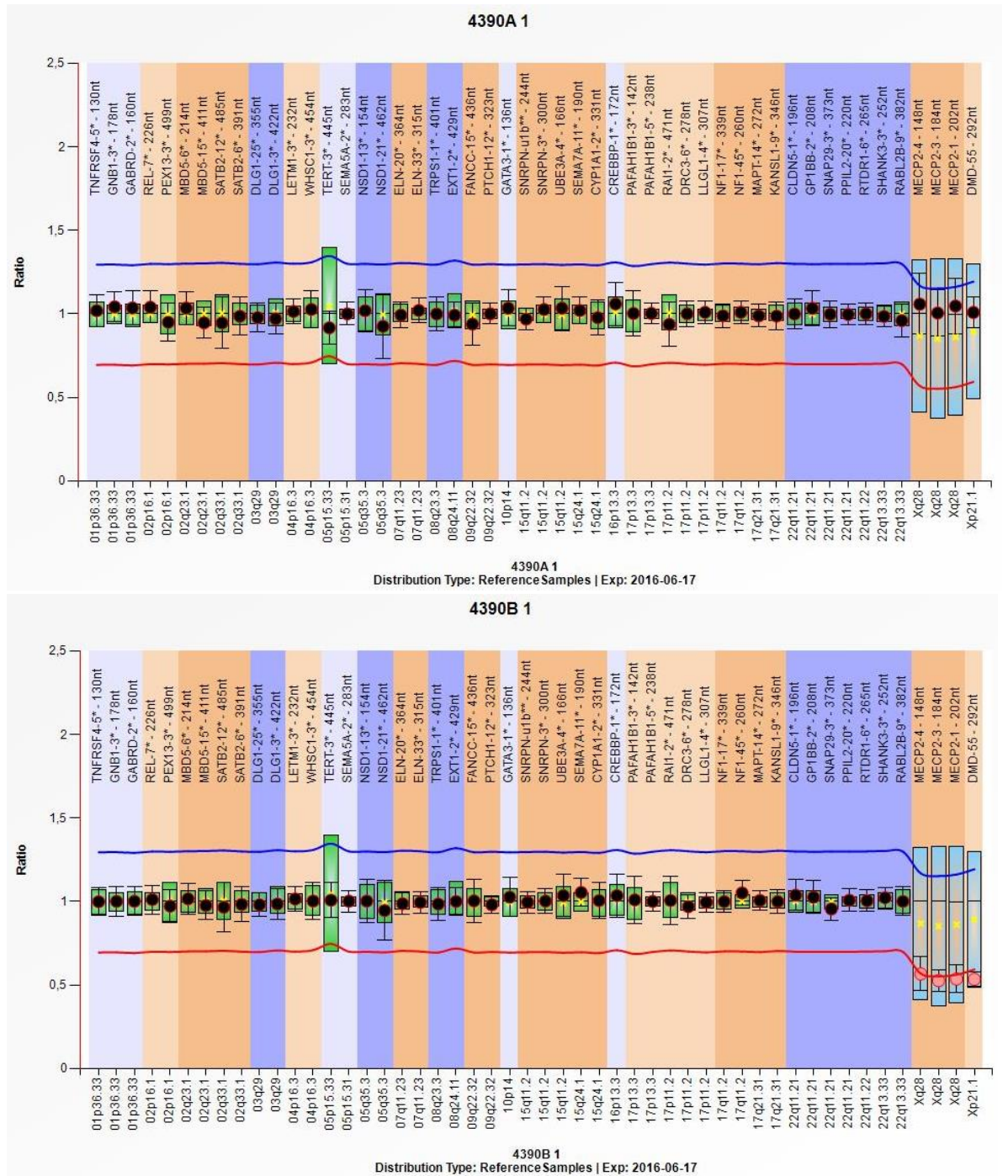
- Resultado do *array-CGH* da paciente 4329
 - VUS: arr[GRCh37] Xp22.33(60,814-219,632)x2



- VUS: arr[GRCh37] 5p15.2(12,692,686-12,968,815)x1



- Resultado da MLPA dos pais da paciente 4390.



APÊNDICE C – Perfil de ICX para das mulheres com DI

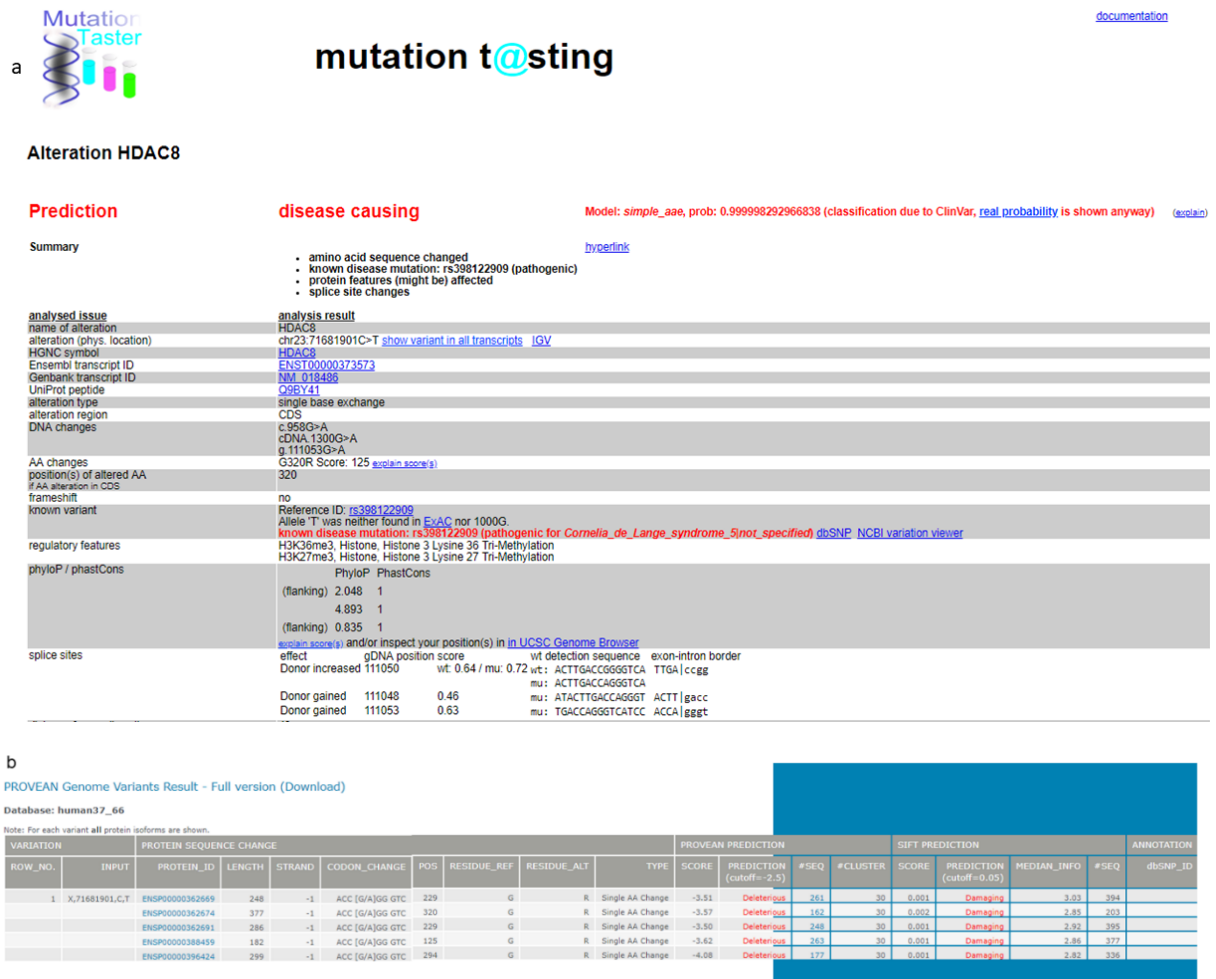
Tabela 1: Perfil de ICX das amostras mulheres com DI. Os valores percentuais são referentes ao percentual de atividade de cada alelo representado.

Amostra	Registro SERGEN	Alelos AR		Alelos RP2		Perfil de ICX (DNA sangue periférico)				Desvio de ICX	Perfil de ICX (DNA - mucosa bucal)			
		A	B	A	B	AR (% alelo A)	AR (% alelo B)	RP2 (% alelo A)	RP2 (% alelo B)		AR (% alelo A)	AR (% alelo B)	RP2 (% alelo A)	RP2 (% alelo B)
1	P4306	230	245	371	374	58	42	55	45	N	ND	ND	ND	ND
2	P4307	218	227	360	371	35	65	61	39	N	ND	ND	ND	ND
3	P4308	206	221	363	363	81	19	x	x	M	57	43	ND	ND
4	P4309	235	244	364	367	21	79	76	24	N	ND	ND	ND	ND
5	P4310	214	238	364	371	44	56	54	46	N	ND	ND	ND	ND
6	P4311	235	238	363	371	81	19	98	2	E	80	20	95	5
7	P4312	241	241	371	374	x	x	45	55	N	ND	ND	ND	ND
8	P4313	222	240	360	360	2	98	x	x	E	8	92	x	x
9	P4314	227	239	378	378	47	53	x	x	N	ND	ND	ND	ND
10	P4322	211	241	367	374	70	30	44	56	N	ND	ND	ND	ND
11	P4325	220	235	371	375	27	73	28	72	N	ND	ND	ND	ND
12	P4326	232	232	371	382	x	x	24	76	N	ND	ND	ND	ND
13	P4327	231	240	364	382	28	72	64	36	N	ND	ND	ND	ND
14	P4329	226	241	371	374	1	99	96	4	E	44	56	56	44
15	P4330	229	229	358	371	x	x	81	19	M	ND	ND	ND	ND
16	P4331	226	238	367	374	48	52	62	38	N	ND	ND	ND	ND
17	P4350	226	258	371	371	20	80	x	x	M	ND	ND	ND	ND
18	P4351	241	250	367	382	10	90	17	83	E	13	87	29	71
19	P4352	235	235	374	385	x	x	46	54	N	ND	ND	ND	ND
20	P4353	220	241	356	374	31	69	33	67	N	ND	ND	ND	ND
21	P3387A	229	238	367	371	54	46	54	46	N	ND	ND	ND	ND
22	P4361	226	229	367	371	66	34	58	42	N	ND	ND	ND	ND
23	P4363	222	222	349	367	x	x	28	72	N	ND	ND	ND	ND
24	P4364	235	238	363	367	70	30	54	46	N	ND	ND	ND	ND
25	P4370	229	232	367	371	53	47	39	61	N	ND	ND	ND	ND
26	P4371	231	231	364	367	x	x	28	72	N	ND	ND	ND	ND
27	P4388	216	228	364	375	55	45	65	35	N	ND	ND	ND	ND
28	P4389	233	233	374	378	x	x	41	59	N	ND	ND	ND	ND
29	P4390	225	243	367	374	46	54	21	79	N	ND	ND	ND	ND
30	P4398	215	227	364	373	86	14	14	86	M	ND	ND	ND	ND
31	P4399	232	244	375	375	42	58	x	x	N	ND	ND	ND	ND
32	P4400	220	232	367	371	46	54	50	50	N	ND	ND	ND	ND

Amostra	Registro SERVGEN	Alelos AR				Alelos RP2				Desvio de ICX	Perfil de ICX (DNA - mucosa bucal)			
		A	B	A	B	AR (% alelo A)	AR (% alelo B)	RP2 (% alelo A)	RP2 (% alelo B)		AR (% alelo A)	AR (% alelo B)	RP2 (% alelo A)	RP2 (% alelo B)
33	P4401	232	241	360	360	67	33	x	x	N	ND	ND	ND	ND
34	P4405	223	241	375	382	21	79	67	33	N	ND	ND	ND	ND
35	P4423	235	238	371	376	46	54	25	75	N	ND	ND	ND	ND
36	P4450	209	251	349	360	38	62	66	34	N	ND	ND	ND	ND
37	P4458	230	239	370	381	57	43	69	31	N	ND	ND	ND	ND
38	P4474	217	220	363	377	45	55	39	61	N	ND	ND	ND	ND
39	P4483	236	248	360	370	35	65	51	49	N	47	53	54	46
40	P4487	218	231	377	381	29	71	37	63	N	ND	ND	ND	ND
41	P4488	219	243	359	366	7	93	5	95	E	9	91	7	93
42	P4489	220	233	349	359	3	97	5	95	M	4	96	9	91
43	P4506	223	241	356	367	27	73	25	75	N	ND	ND	ND	ND
44	P4507	226	241	371	374	69	31	29	71	N	ND	ND	ND	ND
45	P4512	216	226	374	374	61	39	x	x	N	ND	ND	ND	ND
46	P4513	228	240	370	385	38	62	43	57	N	ND	ND	ND	ND
47	P4517	229	235	371	375	99	1	86	14	E	72	28	61	39
48	P4526	231	234	360	371	60	40	49	51	N	ND	ND	ND	ND
49	P4531	237	243	360	387	41	59	39	61	N	ND	ND	ND	ND
50	P4540	222	231	374	378	33	67	77	26	N	ND	ND	ND	ND
51	P4545	225	231	360	378	54	46	45	55	N	ND	ND	ND	ND
52	P4579	224	242	371	375	57	43	60	40	N	ND	ND	ND	ND
53	P4587	212	224	371	374	58	42	32	68	N	ND	ND	ND	ND

APÊNDICE D – Predições *in silico* das variantes encontradas por WES

Predições *in silico* da variante encontrada em *HDAC8* – paciente 4311.



Legenda: A variante encontrada na paciente 4313 foi predita como patogênica pelos programas MutationTaster (a), PolyPhen-2 (b) e Proveen/SIFT (c), conforme as imagens dispostas acima, respectivamente.

Predições *in silico* da variante encontrada em *NLGN4X* – paciente 4313.



mutation t@sting

Alteration missenseNlg4x

Prediction

disease causing

Model: simple_aae, prob: 0.99485043941445 [\(explain\)](#)

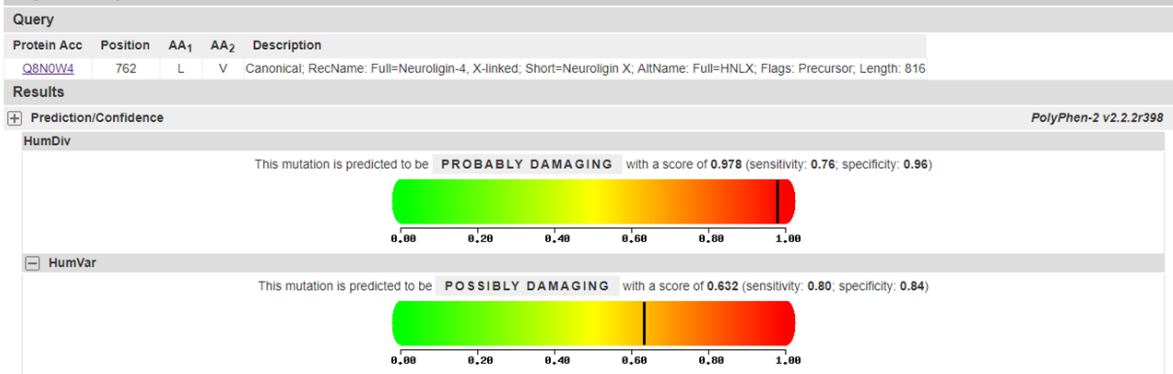
Summary

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	missenseNlg4x
alteration (phys. location)	chr23:5811025G>C show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	NLGN4X
Ensembl transcript ID	ENST00000275857
UniProt peptide	Q8N0W4
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
DNA changes	c.2284C>G cDNA.2748C>G g.335880C>G L762V Score: 32 (explain score(s))
AA changes	762
position(s) of altered AA	
# AA alteration in CDS	
frameshift	no
known variant	
regulatory features	Allele 'C' was neither found in ExAC nor 1000G. H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation H3K27me3, Histone, Histone 3 Lysine 27 Tri-Methylation
PhyloP / PhastCons	PhyloP PhastCons (flanking) 4.002 0.975 2.286 0.974 (flanking) -0.594 0.848 (explain score(s)) and/or inspect your position(s) in UCSC Genome Browser
splice sites	effect gDNA position score wt detection sequence exon-intron border
	Acc marginally increased 335870 wt: 0.7145 / mu: 0.7558 (marginal change - not scored) CTGAGGCTCACCTGCCCGCAGACTACACCTCACGCTGCG gcca GACT
	Donor increased 335879 wt: 0.71 / mu: 0.99 CTGAGGCTCACCTGCCCGCAGACTACACCTCACGCTGCG CACC ctca
	Donor marginally increased 335884 wt: 0.9486 / mu: 0.9523 (marginal change - not scored) mu: TACACCGTCACGCTG mu: TACACCGTCACGCTG TCAC gctg
	mu: CCTCACGCTGCGCCG mu: CGTCACGCTGCGCCG

b PolyPhen-2 report for Q8N0W4 L762V



c

PROVEAN Genome Variants Result - Full version (Download)

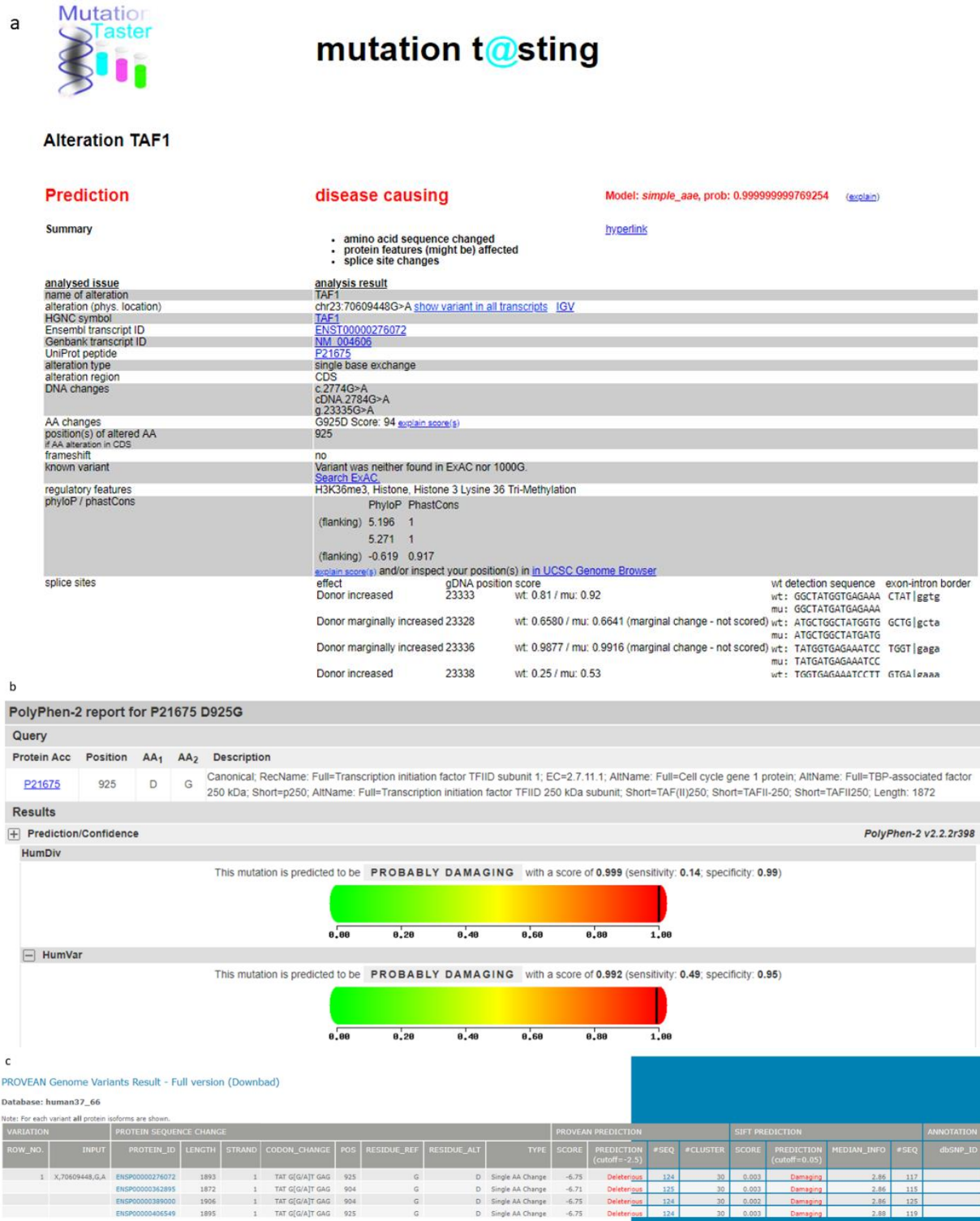
Database: human37_66

Note: For each variant all protein isoforms are shown.

VARIATION		PROTEIN SEQUENCE CHANGE								PROVEAN PREDICTION				SIFT PREDICTION				ANNOTATION
ROW_NO.	INPUT	PROTEIN_ID	LENGTH	STRAND	CODON_CHANGE	POS	RESIDUE_REF	RESIDUE_ALT	TYPE	SCORE	PREDICTION (cutoff = -2.5)	#SEQ	#CLUSTER	SCORE	PREDICTION (cutoff = 0.05)	MEDIAN_INFO	#SEQ	dbSNP_ID
1	X_5811025.G.C	ENSP00000275857	816	-1	ACC [C/G]TC ACG	762	L	V	Single AA Change	-1.69	Neutral	335	30	0.001	Damaging	3.47	256	
		ENSP00000275862	816	-1	ACC [C/G]TC ACG	762	L	V	Single AA Change	-1.69	Neutral	335	30	0.001	Damaging	3.47	256	
		ENSP00000370483	816	-1	ACC [C/G]TC ACG	762	L	V	Single AA Change	-1.69	Neutral	335	30	0.001	Damaging	3.47	256	
		ENSP00000370485	816	-1	ACC [C/G]TC ACG	762	L	V	Single AA Change	-1.69	Neutral	335	30	0.001	Damaging	3.47	256	
		ENSP00000439203	816	-1	ACC [C/G]TC ACG	762	L	V	Single AA Change	-1.69	Neutral	335	30	0.001	Damaging	3.47	256	

Legenda: A variante encontrada na paciente 4313 foi predita como patogênica pelos programas MutationTaster (a), PolyPhen-2 (b) e Provean/SIFT (c), conforme as imagens dispostas acima, respectivamente.

Predições *in silico* da variante encontrada em *TAF1* – paciente 4329.



Legenda: A variante encontrada na paciente 4329 foi predita como patogênica pelos programas MutationTaster (a) PolyPhen-2 (b) e PROVEAN/SIFT (c), conforme as imagens dispostas acima, respectivamente.

Predição *in silico* da variante encontrada em *USP9X* - paciente 4489



mutation t@sting

Alteration usp9x

Prediction disease causing

Model: *complex_aae*, prob: 1 (classification due to NMD, [real probability](#) is shown anyway) ([explain](#))

Summary

- NMD
- amino acid sequence changed
- frameshift
- protein features (might be) affected

[hyperlink](#)

analysed issue	analysis result
name of alteration	usp9x
alteration (phys. location)	chr23:41056674_41056675insC
HGNC symbol	USP9X
Ensembl transcript ID	ENST00000324545
Genbank transcript ID	NM_001039590
UniProt peptide	Q93008
alteration type	insertion
alteration region	CDS
DNA changes	c.4291_4292insC cDNA.4924_4925insC g.111787_111788insC
AA changes	L1431Pfs*14
position(s) of altered AA if AA alteration in CDS	1431 (frameshift or PTC - further changes downstream)
frameshift	yes
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation
phyloP / phastCons	PhyloP PhastCons (flanking) 4.004 1 (flanking) 4.73 1
splice sites	snp sites and/or inspect your position(s) in in UCSC Genome Browser no abrogation of potential splice sites

Legenda: A variante encontrada na paciente 4489 foi predita como patogênica pelo programa MutationTaster.