



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Bianca Barbosa Abdala

**Variação no número de cópias no gene *MECP2* e sua relação com a
deficiência intelectual em homens**

Rio de Janeiro
2018

Bianca Barbosa Abdala

Variação no número de cópias no gene *MECP2* e sua relação com a deficiência intelectual em homens

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

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

Coorientadora: Prof^a. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

Rio de Janeiro

2018

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

A135 Abdala, Bianca Barbosa

Varição no número de cópias no gene MECP2 e sua relação com a deficiência intelectual em homens / Bianca Barbosa Abdala. 2018.

100 f.

Orientadora: Prof^{fa}. Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças
Coorientadora: Prof^{fa}. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel

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

1. Deficiência intelectual – Teses. 2. Genética – Expressão Teses. 3. Duplicação gênica. 4. Cromossomo X. 5. Ligação genética. I. Santos-Rebouças, Cíntia Barros. II. Pimentel, Márcia Mattos Gonçalves. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira. CRB7/5302

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

Assinatura

Data

Bianca Barbosa Abdala

Variação no número de cópias no gene *MECP2* e sua relação com a deficiência intelectual em homens

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

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

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

Coorientadora: Prof^a. Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dr^a. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Fernando Regla Vargas
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, que é a minha base. Sem eles nada disto seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Claudio e Mariza, e à minha irmã, Natalia, por todo o amor, carinho e, principalmente, por compreender e tolerar todos os meus momentos de estresse e nervosismo. Obrigada por participarem de cada momento da minha vida e de todas as minhas decisões, sempre me guiando e auxiliando da melhor forma. Vocês me tornaram a pessoa que sou hoje e são essenciais para a minha vida. Obrigada por serem os maiores incentivadores da minha carreira. Devo a vocês todas as minhas conquistas.

Aos meus avós, Helena e Paulo, e minha bisavó, Nadir, por cuidarem sempre de mim, serem a minha inspiração e meus exemplos de força e determinação.

À minha orientadora, professora Cíntia Barros Santos Rebouças, por acreditar em mim e ter me dado a oportunidade de desenvolver este projeto. Muito obrigada por todos os ensinamentos ao longo desses anos e por me guiar na minha trajetória, estando sempre presente e disposta a ouvir minhas ideias e discutí-las. Sou muito grata por todo o incentivo que me foi dado. Sua orientação e apoio foram essenciais para a minha formação.

À minha coorientadora, professora Márcia Mattos Gonçalves Pimentel, por todo o ensinamento e pelas palavras de carinho e de incentivo durante o mestrado, sempre nas horas que eu mais precisava ouvi-las.

Meus agradecimentos à Priscila, a irmã que a vida me deu. Obrigada por todo apoio, por estar sempre presente, pelas palavras de carinho, pelo ombro amigo e por ser a maior torcedora das minhas conquistas na ciência. Muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que me alegra, diverte e levanta o meu astral. Você foi o meu apoio durante a minha jornada de mestrado.

Ao Orlando que é meu amigo, confidente e meu parceiro das aulas da pós-graduação. Obrigada por sempre me impulsionar para dar o meu melhor e por estar ao meu lado em todos os momentos. Meus mais sinceros agradecimentos por ser o administrador da minha agenda e me falar o que eu devo fazer diariamente. Só nós entendemos as nossas altas discussões sobre ciência a qualquer hora do dia e a nossa sede pelo conhecimento.

À Andressa, por ser minha mentora, amiga e agora afilhada. Obrigada por estar junto comigo desde a iniciação científica, sendo a minha dupla de bancada e aquela pessoa a quem eu sempre recorro nos momentos difíceis. Por compartilhar todos os momentos comigo e pelo apoio incondicional! Você me guiou por todos esses anos e construiu junto comigo o meu caminho profissional. Obrigada por tirar todas as minhas dúvidas, literalmente, a qualquer hora e qualquer dia e por ter tido muita paciência. Por você sempre me ouvir, me dar os conselhos mais certos e pelo companheirismo, tanto na vida profissional quanto na vida pessoal, pois afinal, foi um reencontro! Sem você esse trabalho não teria sido realizado.

À Jussara, por ser o meu exemplo de como um profissional deve se portar e agir em seu ambiente de trabalho. Por me ensinar que além de pessoas, estamos lidando com grandes histórias de vida e é esse conjunto que torna nosso trabalho tão importante e valioso. Obrigada, principalmente, por topa fazer as coletas mais diferentes, sempre com bom humor e disposição para me ajudar. Não posso esquecer de lhe agradecer pelos ensinamentos, dicas e toda força que me foram dados durante todos esses anos.

À Veluma, por sempre me oferecer aquela ajuda nas horas que eu mais precisava. Obrigada por separar as maiores quantidades de DNA em tempo recorde, mesmo que para isso você precisasse parar o que estava fazendo. Um obrigado especial pelo seu apoio e torcida. Pelas dicas de série, pelas conversas, brincadeiras e risadas durante o café. Você é um exemplo de força e determinação.

À Prof.^a Dra Claudia Carvalho e sua equipe do Baylor College of Medicine, pela realização da metodologia de *array*-CGH.

Aos pacientes que se dispuseram a fazer parte deste estudo e que estavam sempre dispostos a colaborar, meus agradecimentos.

Aos geneticistas clínicos pela colaboração prestada e pela reavaliação clínica dos pacientes.

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo apoio financeiro.

Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o universo conspira a seu favor.

Johann Goethe

RESUMO

ABDALA, Bianca Barbosa. *Variação no número de cópias no gene MECP2 e sua relação com a deficiência intelectual em homens*. 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A deficiência intelectual (DI) é uma condição complexa, com uma prevalência de 1-3%. Embora muitos fatores etiológicos associados à DI ainda sejam desconhecidos, cerca de 25-50% dos casos ocorrem devido a contribuições genéticas. Assim sendo, variações do número de cópias (VNC) em Xq28, englobando o gene methyl-CpG-binding protein 2 (*MECP2*) são uma das causas mais comuns de DI severa em homens. O gene *MECP2* é altamente expresso nos neurônios e codifica uma proteína associada à cromatina, atuando como um regulador transcricional. Sendo assim, VNCs no *MECP2* podem afetar a expressão de diferentes genes no cérebro, levando a fenótipos neurológicos anormais. Neste sentido, neste estudo foi conduzido o rastreamento de VNCs no gene *MECP2* em uma amostra ampla de 920 indivíduos não aparentados portadores de DI idiopática. O DNA genômico foi isolado do sangue periférico e as sequências alvo no gene *MECP2* foram amplificadas pelo sistema de *TaqMan copy number assay*®. Ao todo, três indivíduos (0,33%) exibindo duplicações envolvendo o gene *MECP2* foram detectados. As duplicações variaram de 420 Kb a 2 Mb e a delimitação da região de sobreposição mínima demonstrou a presença de sete genes, além do *MECP2* (*IRAK1*, *OPN1LM*, *TEX28*, *OPN1MW*, *TKTL1*, *FLNA* e *EMD*). Posteriormente, a análise de segregação das duplicações demonstrou que o rearranjo é *de novo* no probando 565, enquanto que no paciente 4219 a duplicação foi herdada da mãe, a qual apresentou desvio extremo de inativação do cromossomo X. A avaliação da expressão nesses dois pacientes demonstrou que o paciente 565 apresentou aumento de expressão do gene *MECP2*, enquanto que o paciente 4219 exibiu níveis normais de expressão desse gene. Estudos anteriores realizados em populações norte-americanas e européias indicaram a prevalência de 1-2% de duplicações no gene *MECP2* em homens portadores de DI. No entanto, corroborando nossos resultados, análises em amostras amplas apresentaram uma taxa de detecção de 0,3-0,4%. Além disso, tais estudos mostraram que duplicações envolvendo o gene *MECP2* levaram ao aumento de expressão desse gene. Todavia, na análise funcional do paciente 4219 não foi verificado, aparentemente, um aumento de expressão, sugerindo que as duplicações envolvendo o gene *MECP2* podem levar ao desenvolvimento dos fenótipos através de outros mecanismos moleculares, além de dosagem gênica. Alternativamente, outros genes envolvidos nos rearranjos podem ter uma contribuição no comprometimento cognitivo. Em conjunto, esses dados sugerem que as duplicações no gene *MECP2* representam uma causa importante da DI idiopática em homens e ratificam que o sistema *TaqMan copy number assay*® é um método sensível para avaliar essas duplicações.

Palavras chave: Deficiência Intelectual. Duplicação. *MECP2*. Rastreamento de VNCs.

ABSTRACT

ABDALA, Bianca Barbosa. *Copy number variation in MECP2 gene and its relation with intellectual disability in males*. 2018. 100 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Intellectual disability (ID) is a complex condition, with a world-wide prevalence of 1-3%. Although many etiological factors associated with ID remain unclear, about 25-50% of the cases are due to genetic contributions. In this context, copy number variation (CNV) at Xq28 encompassing methyl-CpG-binding protein 2 gene (*MECP2*) is one of the most common cause of severe ID in males. *MECP2* is highly expressed in neurons and encodes a chromatin-associated protein, which functions as a transcriptional regulator. Therefore, copy number variation in *MECP2* can affect the expression of different genes in brain, leading to abnormal neurological phenotypes. In this view, in this study we conducted a CNV screening of *MECP2* gene in a large cohort of 920 unrelated males with idiopathic ID. Genomic DNA was isolated from peripheral blood and *MECP2* target sequences were amplified by TaqMan copy number assay®. A total of three individuals (0,33%) exhibiting duplications at *MECP2* locus were detected. The duplications ranged from 420 Kb to 2 Mb and delimitation of small region of overlap demonstrated the presence of *MECP2* and other seven genes (*IRAK1*, *OPN1LM*, *TEX28*, *OPN1MW*, *TKTL1*, *FLNA* and *EMD*). Subsequently, the segregation analysis of the duplications demonstrated that the rearrangement is *de novo* in the proband 565, whereas in 4219 patient the duplication was inherited from his mother, which presented an extreme skewed of X-inactivation pattern. Expression analysis in these two patients demonstrated that patient 565 has an increased expression of *MECP2* gene, whereas patient 4219 has normal expression levels of this gene. Previous studies conducted in North American and European populations indicate a prevalence of 1-2% of *MECP2* duplications among males with ID. Nonetheless, corroborating our results, large cohorts analysis had a lower detection rate of 0.3-0.4%. In addition, such studies indicated that duplications involving *MECP2* lead to increased expression of this gene. However, considering that apparently normal expression levels of *MECP2* were observed in patient 4219, our data suggests that duplications involving *MECP2* gene may lead to the development of the phenotypes through other molecular mechanisms in addition to gene dosage. Alternatively, other genes involved in the rearrangements may contribute to cognitive impairments. Taken together, these data suggest that *MECP2* duplications represent an important cause of idiopathic ID in males and confirms that TaqMan copy number assay® is a sensitive method to assess these duplications.

Keywords: Intellectual disability. Duplication. *MECP2*. CNV screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Genes localizados no cromossomo X relacionados com a DILX sindrômica e não sindrômica.....	21
Figura 2 -	Formação da 5-metilcitosina.....	23
Figura 3 -	Estrutura do gene <i>MECP2</i> localizado em Xq28 e a proteína codificada com seus respectivos domínios funcionais.....	27
Figura 4 -	Mecanismos moleculares de atuação da proteína MeCP2.....	31
Figura 5 -	Rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes.....	35
Figura 6 -	Efeitos fenotípicos gerados pelas VNCs.....	37
Figura 7 -	Quantificação de variações no número de cópias envolvendo o gene <i>MECP2</i> pelo sistema TaqMan® Copy Number Assays.....	43
Figura 8 -	Resultados do rastreamento de VNCs no gene <i>MECP2</i>	56
Figura 9 -	Heredogramas das famílias 58, 565 e 4219.....	58
Figura 10 -	Resultado da análise de segregação das alterações nas mães dos pacientes portadores de duplicação do gene <i>MECP2</i>	59
Figura 11 -	Resultado do ensaio de inativação do cromossomo X.....	61
Figura 12 -	Representação da região genômica que compreende os rearranjos identificados em Xq28.....	62
Figura 13 -	Mapeamento da extensão e conteúdo gênico da duplicação identificada no paciente 58.....	64
Figura 14 -	Mapeamento da extensão e conteúdo gênico da duplicação identificada no paciente 565.....	66
Figura 15 -	Identificação da deleção presente no cromossomo y e o conteúdo gênico envolvido nesse rearranjo.....	67
Figura 16 -	Mapeamento da extensão e conteúdo gênico da duplicação identificada no paciente 4219.....	69
Figura 17 -	Mecanismos de formação de VNCs por FoSTeS e MMBIR.....	86

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Análise de expressão do gene *MECP2* pela técnica de RT-qPCR.. 70

Gráfico 2 - Análise de expressão do gene *GDI1* pela técnica de RT-qPCR 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fatores etiológicos da DI.....	18
Tabela 2 -	Condições reacionais para a PCR em tempo real quantitativa.....	44
Tabela 3 -	Condições reacionais utilizadas para a preparação do mix 1	48
Tabela 4 -	Condições reacionais utilizadas para a preparação do mix de síntese de cDNA.....	48
Tabela 5 -	Condições reacionais para o processo de qPCR por SYBR™ Green.....	49
Tabela 6 -	Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão de cDNA por qPCR.....	50
Tabela 7 -	Condições reacionais para a realização da QF-PCR.....	52
Tabela 8 -	Comparação entre as características clínicas observadas nos indivíduos portadores de duplicação.....	57
Tabela 9 -	Análise dos dados de inativação do cromossomo X.....	61
Tabela 10 -	Genes localizados na região de sobreposição mínima das duplicações identificadas nos pacientes 58, 565 e 421.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ACTB</i>	<i>Actin beta/Beta-actina</i>
<i>AR</i>	<i>Androgen receptor/Receptor de andrógeno</i>
<i>Array-CGH</i>	<i>Array Comparative Genome Hybridization/Hibridização Genômica Comparativa por arranjo</i>
<i>cDNA</i>	<i>DNA complementar</i>
<i>CpG</i>	<i>Sequência dinucleotídica constituída de uma citosina adjacente a uma guanina</i>
<i>CREBP1</i>	<i>cAMP responsive element binding protein 1/Proteína de Ligação ao Elemento de Resposta ao cAMP</i>
<i>Ct</i>	<i>Cycle threshold/Limiar de ciclo</i>
<i>CTD</i>	<i>C-terminal domains/Domínio C-terminal</i>
<i>DI</i>	<i>Deficiência intelectual</i>
<i>DILX</i>	<i>Deficiência intelectual ligada ao X</i>
<i>DILX-NS</i>	<i>DILX não-sindrômica</i>
<i>DILX-S</i>	<i>DILX síndrômica</i>
<i>DNA</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>DNMT</i>	<i>DNA metiltransferase</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Desoxirribonucleotídeos</i>
<i>EDTA</i>	<i>Ácido etilenodiamino tetra-acético</i>
<i>EMD</i>	<i>Emerin/Emerina</i>
<i>FLNA</i>	<i>Filamin A/Filamina A</i>
<i>FoSTeS</i>	<i>Fork stalling and template switching/Troca de forquilha de replicação</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase</i>
<i>GDI1</i>	<i>GDP dissociation inhibitor 1/Inibidor da dissociação 1 de GDP</i>
<i>GUSB</i>	<i>Glucuronidase beta/Beta-glucuronidase</i>
<i>HAT</i>	<i>Acetiltransferase</i>
<i>HDACs</i>	<i>Histonas desacetilases</i>
<i>Hhal</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>

HUGG	Hospital Universitário Gaffreé e Guinle
<i>HUMARA</i>	<i>Human androgen receptor assay/</i> Ensaio de receptor de androgénio humano
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
ID	<i>Intervening domain/</i> Domínio interveniente
IFF	Instituto Fernandes Figueira
IPPMG	Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira
<i>IRAK1</i>	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 1/</i> Quinase associada ao receptor de interleucina-1
KO	<i>Knockout</i>
<i>L1CAM</i>	<i>L1 cell adhesion molecule/</i> Molécula de adesão celular L1
LCR	Repetição de baixo número de cópias
MBD	<i>Methyl-CpG Binding Domain/</i> Domínio de ligação ao CpG metilado
MBP	<i>Methyl-CpG Binding Protein/</i> Proteína de ligação ao CpG metilado
MeCP2	<i>Methyl-CpG-binding protein 2/</i> Proteína de ligação ao CpG metilado 2
<i>MECP2</i>	<i>Methyl-CpG-binding protein 2/</i> Proteína de ligação ao CpG metilado 2
<i>MMBIR</i>	<i>Microhomology-Mediated Break-Induced Replication/</i> Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia
mRNP	Partículas de ribonucleoproteínas mensageiras
NAHR	Recombinação homóloga não alélica
NCOR	<i>Nuclear receptor co-repressor/</i> Receptor nuclear corepressor
NTD	<i>N-terminal domain/</i> Domínio N-terminal
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Men/</i> Herança Mendeliana em Homens Online
<i>OPN1LW</i>	<i>Opsin 1, long wave sensitive/</i> Opsin 1 sensível ao comprimento de onda longo
<i>OPN1MW</i>	<i>Opsin 1, medium wave sensitive/</i> Opsin 1 sensível ao comprimento de onda médio
PAR1	Região pseudoautosômica 1
QF-PCR	Ensaio quantitativo <i>multiplex</i> fluorescente da PCR

qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RP2</i>	<i>retinitis pigmentosa 2/Retinite pigmentosa tipo 2</i>
<i>RPL10</i>	<i>Ribosomal protein L10/Proteína ribossomal L10</i>
<i>RPPH1</i>	<i>Ribonuclease P RNA component H1/Componente H1 da Ribonuclease P</i>
RT-qPCR	PCR em tempo real quantitativo
SERVGEN	Serviço de Genética Humana da UERJ
<i>SHOX</i>	<i>Short stature homeobox/Homeobox da baixa estatura</i>
SMRT	<i>Silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor/</i> Mediador do silenciamento do receptor do ácido retinóico e do receptor do hormônio tireoideano
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
SRO	Região de sobreposição mínima
STR	<i>Short tandem repeat/Repetições curtas em tandem</i>
<i>TEX28</i>	<i>Testis expressed 28</i>
<i>TKTL1</i>	<i>Transketolase like 1/Proteína análoga à transcetolase (tipo 1)</i>
TRD	<i>Transcriptional repression domain/Domínio de repressão</i> transcricional
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VNC	Varição no número de cópias
XIC	Inativação do cromossomo X
$\Delta\Delta Ct$	Método Ct comparativo
5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mc	5-metilcitosina

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	39
2	METODOLOGIA	40
2.1	Considerações éticas	40
2.2	Amostra analisada	40
2.3	Coleta de material biológico e extração do DNA	41
2.4	Estimativa da concentração e integridade do DNA	41
2.5	Análise de variação no número de cópias no gene <i>MECP2</i>	42
2.6	Avaliação da expressão gênica	45
2.6.1	<u>Extração de RNA</u>	45
2.6.2	<u>Estimativa da concentração de RNA</u>	47
2.6.3	<u>Transcrição Reversa</u>	47
2.6.4	<u>Análise da expressão relativa por PCR em tempo real quantitativo</u>	48
2.7	Determinação do padrão de inativação do cromossomo X	50
2.8	Análise de extensão das duplicações identificadas	53
3	RESULTADOS	55
3.1	Análise de variação no número de cópias no gene <i>MECP2</i>	55
3.2	Descrição clínica dos pacientes afetados	56
3.3	Análise de segregação das duplicações nas mães dos pacientes alterados e inativação do cromossomo X	59
3.3.1	<u>Análise de segregação das duplicações</u>	59
3.3.2	<u>Determinação do padrão de inativação do cromossomo X</u>	60
3.4	Análise de extensão das duplicações identificadas	62
3.4.1	<u>Paciente 58</u>	63
3.4.2	<u>Paciente 565</u>	65
3.4.3	<u>Paciente 4219</u>	68

3.5	Análise de expressão	70
3.5.1	<u>Análise de expressão do gene <i>MECP2</i></u>	70
3.5.2	<u>Análise de expressão do gene <i>GDI1</i></u>	71
4	DISCUSSÃO	72
4.1	Rastreamento de VNCs no gene <i>MECP2</i>	73
4.2	Correlação fenotípica e análise de extensão das duplicações identificadas	75
4.2.1	<u>Delimitação da extensão das duplicações</u>	76
4.2.1.1	<u>Paciente 58</u>	78
4.2.1.2	<u>Paciente 565</u>	79
4.2.1.3	<u>Paciente 4219</u>	80
4.3	Análise de expressão	81
4.4	Análise das mães 565A e 4219A	83
4.4.1	<u>Análise de segregação das duplicações</u>	83
4.4.2	<u>Análise do padrão de inativação do cromossomo X e expressão do gene <i>MECP2</i></u>	83
4.5	Possíveis mecanismos envolvidos na formação das duplicações identificadas	84
	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com DI	100

INTRODUÇÃO

Deficiência Intelectual

A Deficiência Intelectual (DI) é uma das condições neurológicas humanas mais comuns e de grande impacto socioeconômico, tendo a prevalência estimada em 1-3% da população mundial (Ellison *et al.*, 2012). Tal condição é caracterizada por limitações significativas no funcionamento intelectual e no comportamento adaptativo, abrangendo as habilidades sociais, conceituais e práticas e se manifesta antes dos 18 anos de idade (*American Psychiatric Association*, 2018). De acordo com a severidade, a DI é subdividida em categorias (leve, moderada, severa e profunda), levando-se em consideração as habilidades adaptativas manifestadas (Ropers & Hamel, 2005).

A etiologia da DI está relacionada tanto com causas ambientais, tais como infecções pré-natais, traumas perinatais, uso de teratogênicos durante a gestação e pré-maturidade, quanto com causas genéticas (Tabela 1). Contudo, os fatores genéticos exercem uma importante contribuição na origem da condição, sendo responsáveis por 25-50% dos casos (Srouf & Shevell, 2014). Tais fatores estão diferencialmente relacionados com as categorias da DI. Enquanto que fatores genéticos e ambientais parecem exercer a mesma influência na origem da DI branda, os fatores genéticos são os principais agentes etiológicos na DI moderada a severa (Reichenberg *et al.*, 2016). Tipicamente, as causas genéticas são divididas em alterações cromossômicas microscopicamente visíveis, com prevalência estimada em 15%, e alterações submicroscópicas (monogênicas, epigenéticas e alterações no número de cópias gênicas) (Vissers *et al.*, 2016). Inicialmente, a análise de ligação e o cariótipo, foram fundamentais para a descoberta de componentes genéticos relacionados à DI (Vissers *et al.*, 2016; Coe *et al.*, 2012). No entanto, o advento de metodologias de alto rendimento, como o *Array Comparative Genome Hybridization* (*Array-CGH*) e o sequenciamento de nova geração, propiciou a identificação de uma vasta quantidade de genes ligados a esta condição (Vissers *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2014; Niranjan *et al.*, 2015). Atualmente, mais de 700 genes autossômicos e ligados ao X foram associados à DI (Vissers *et al.*, 2016).

Tabela 1 - Fatores etiológicos da DI.

<p>Causas ambientais</p> <p><i>(Causas Pré, Peri e Pós-natal)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Exposição pré-natal (ex.: uso de álcool, drogas) • Desnutrição na gravidez • Pré-maturidade • Infecção pré e pós-natal • Traumas peri e pós-natais (ex.: acidente vascular, asfixia)
<p>Causas genéticas</p> <p>Alterações cromossômicas microscopicamente visíveis</p> <ul style="list-style-type: none"> • Aneuploidias • Alterações estruturais: <ul style="list-style-type: none"> Deleção Duplicação Inserção Translocação <p>Alterações submicroscópicas <i>(Não detectadas por métodos de Citogenética clássica)</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • Alterações no número de cópias: <ul style="list-style-type: none"> Duplicação Deleção • Monogênicas • Epigenéticas (ex.: metilação do DNA, modificação pós-traducional de histonas, microRNA)

Fonte: Chelly *et al.*, 2006; Ellison *et al.*, 2013, com modificações.

Estudos epidemiológicos conduzidos em diferentes populações, demonstram um excesso de 30% de homens afetados pela DI em relação às mulheres (Lubs *et al.*, 2012). Corroborando esta observação, análises de segregação em grandes famílias evidenciaram a presença de um padrão de herança ligado ao cromossomo X (Crespi *et al.*, 2009). Tais descobertas forneceram evidências de que genes localizados no cromossomo X contribuem para o desenvolvimento da DI, principalmente em homens (Lubs *et al.*, 2012).

A maior prevalência da DI entre homens ocorre em virtude da presença de apenas um cromossomo X em indivíduos do sexo masculino, face a dois cromossomos no sexo feminino (Deng *et al.*, 2014). A hemizigose dos genes localizados no cromossomo X torna os homens mais vulneráveis às manifestações fenotípicas de alterações presentes nesse cromossomo (Lubs *et al.*, 2012). Como mecanismo de compensação de dose entre o sexo masculino (XY) e feminino (XX), o processo de inativação de um dos cromossomos X (XCI) ocorre em mulheres (Deng *et al.*, 2014). Tal mecanismo pode resultar na expressão preferencial do alelo normal, levando à ausência de DI ou a uma manifestação mais branda (Franco & Ballabio, 2006; Morleo & Franco, 2008).

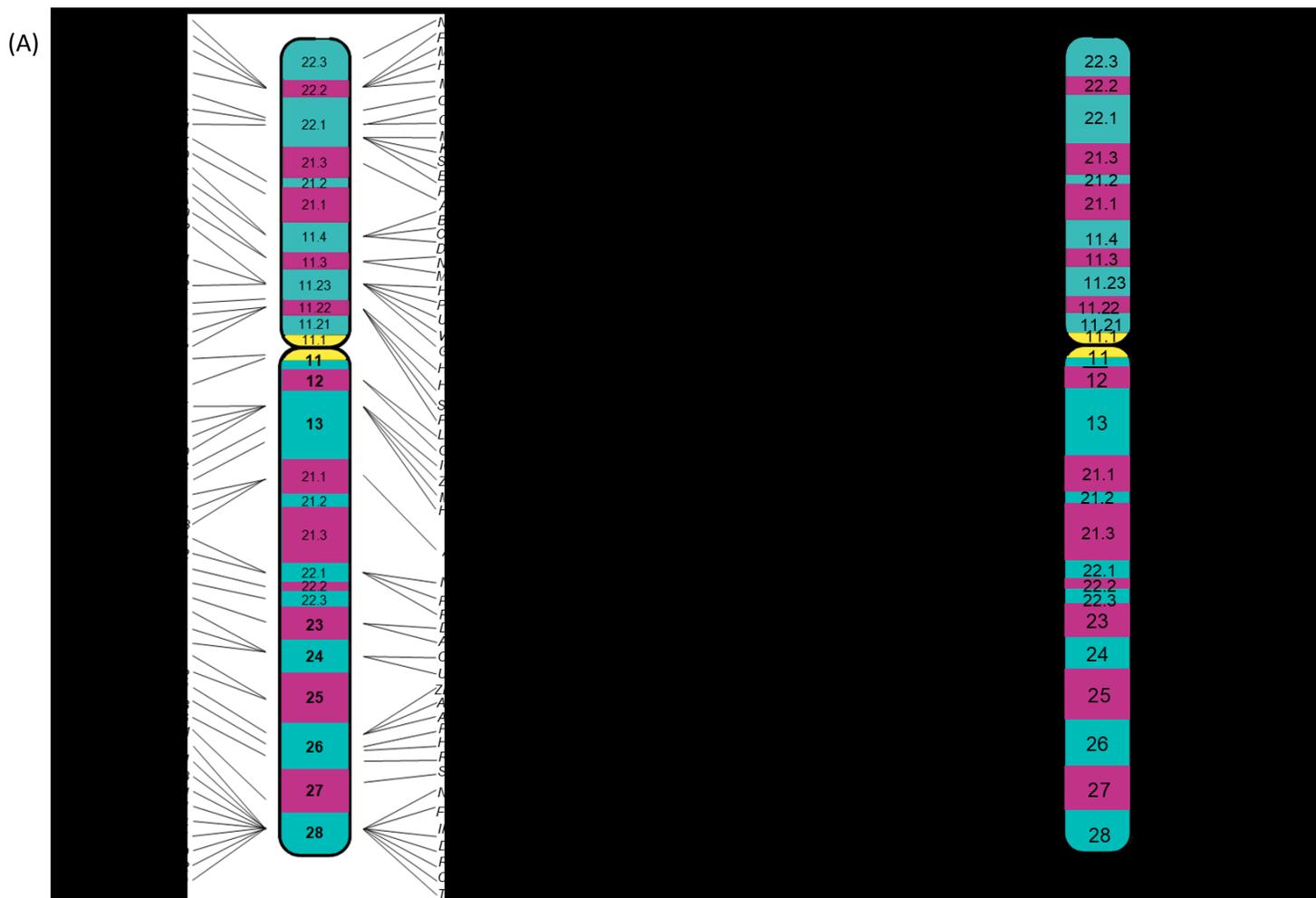
A Deficiência Intelectual Ligada ao X

A contribuição de genes localizados no cromossomo X tem sido considerada crucial para o desenvolvimento cerebral e da inteligência humana (Zhao & Gong, 2017). Até o momento, 841 genes codificadores de proteínas foram mapeados neste cromossomo, constituindo 4,13% do total de genes codificadores do genoma (*Ensembl*, versão 91). Análises mais detalhadas de expressão global do cromossomo X indicam um excesso de genes ligados ao X sendo expressos no tecido cerebral, principalmente na região do hipocampo, em comparação aos demais tecidos (Nguyen & Distèche, 2006). Deste modo, até o momento já foram descritos 126 genes envolvidos na DI ligada ao X (DILX), contribuindo para aproximadamente 10-15% dos casos. Uma elevada proporção destes genes se mostra necessária para o desenvolvimento e função do sistema nervoso, estando relacionados com o aprendizado e memória (Kemkemer *et al.*, 2009).

Os genes envolvidos na DILX desempenham funções em diferentes vias celulares abrangendo processos relacionados à neurogênese, conectividade neuronal, morfogênese de espinhas dendríticas e regulação da transcrição e tradução gênica (Srouf & Shevell, 2014). Mutações em genes ligados ao X afetam, principalmente, a formação e o processo de transmissões sinápticas, incluindo alterações da plasticidade neuronal, através da modificação da forma, tamanho e densidade das espinhas dendríticas (Bassani *et al.*, 2013).

Convencionalmente, segundo as características clínicas, a DILX é dividida em DILX síndrômica (DILX-S) e DILX não-síndrômica (DILX-NS) (Raymond, 2005). A DILX-S é caracterizada pela coocorrência da DI e de outras manifestações clínicas como dismorfias faciais, alterações metabólicas e radiológicas. Por outro lado, na DILX-NS, o comprometimento cognitivo é o único fenótipo observado (Vogel-Ciernia & Wood, 2013). Estimativas indicam que aproximadamente dois terços dos casos de DILX são atribuídos à DILX-NS (Fishburn *et al.*, 1983; Ropers & Hamel, 2005). No entanto, com a possibilidade de classificação por critérios moleculares, acredita-se que ocorra a diminuição dessa proporção, concomitantemente ao aumento dos casos de DILX-S. Além disso, mutações em diferentes genes implicados na DILX estão envolvidas em ambas as formas síndrômicas e não-síndrômicas, indicando que não há uma base molecular para a distinção entre as duas formas (Ropers & Hamel, 2005).

Figura 1 - Genes localizados no cromossomo X relacionados com a DILX sindrômica e não sindrômica.



Legenda: Genes relacionados à DILX e sua localização no cromossomo X. (A) Genes relacionados à DI sindrômica; (B) Genes relacionados à DI não sindrômica.

Fonte: *Greenwood Genetic Center, 2017.*

Mecanismos epigenéticos e a DI

Ao longo do processo de diferenciação celular, o perfil de expressão gênica é modificado dinamicamente, promovendo a geração dos diferentes tipos de linhagens celulares. No tecido cerebral, cerca de 30-50% dos ~20,338 genes codificadores de proteína são expressos (Naumova *et al.*, 2013) e o perfil de expressão gênica se faz fundamental para o crescimento e divisão celular durante os dois primeiros anos de vida e para a formação de novas sinapses. A regulação da expressão é promovida pela ação concomitante de fatores de transcrição gênica e de mecanismos epigenéticos (Urduingio *et al.*, 2009).

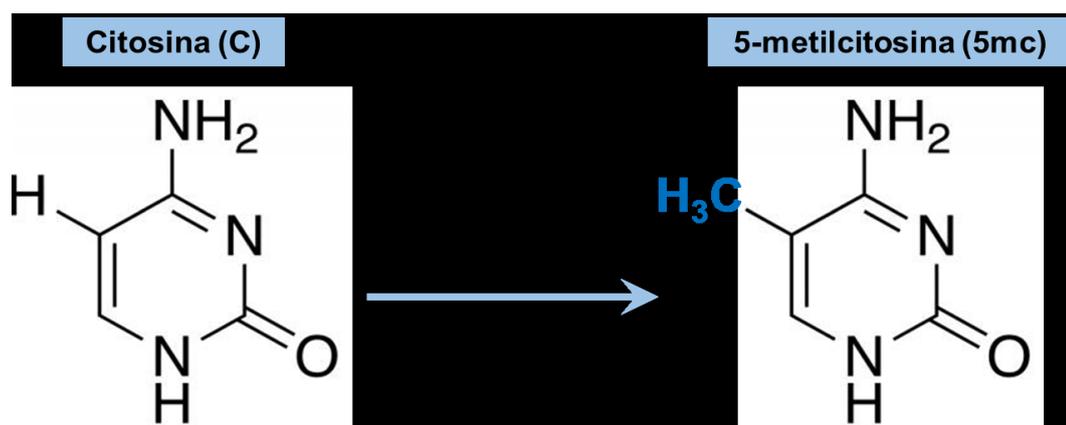
O termo epigenética pode ser definido como a forma de regulação gênica que envolve modificações no DNA estáveis e herdáveis que não incluem alterações na sequência de bases (Pimentel; Santos-rebouças; Gallo, 2013, p. 34). Evidências sugerem que a paisagem epigenética permanece dinâmica tanto nos períodos de desenvolvimento, quanto no amadurecimento cerebral, na qual a regulação ocorre mesmo em neurônios e outros constituintes pós-mitóticos do cérebro. Deste modo, a regulação da expressão gênica tem sido relacionada a vários distúrbios de desenvolvimento neurológico, tal como a DI (Naumova *et al.*, 2013).

Os mecanismos epigenéticos incluem a metilação e a hidroximetilação do DNA, modificações pós-traducionais e a incorporação de variantes em histonas, além da dinâmica dos nucleossomos (Sassone-Corsi, 2013; Landgrave-Gómez *et al.*, 2015). No entanto, dentre os tipos de modificações epigenéticas, a mais estudada e abundante é a metilação do DNA (Guibert & Weber, 2013). Em mamíferos, tal evento consiste na adição do grupamento metil ao carbono 5 de citosinas, formando a 5-metilcitosina (5mc), encontradas, predominantemente, adjacentes a guaninas (CpG) (Figura 2) (Kinde *et al.*, 2015). Os dinucleotídeos CpG possuem padrões de distribuição e metilação diferentes entre as diferentes regiões do genoma, estando em menor densidade e com maior nível de metilação ao longo de exons, introns e regiões intergênicas em comparação aos promotores gênicos, onde há elevada densidade de CpG, conhecidos como “Ilhas CpG” (Guibert & Weber, 2013), que estão hipometiladas. Em humanos, o tecido cerebral possui o maior nível de metilação comparado aos demais tecidos (Kobayashi *et al.*, 2012), apresentando 5mc em cerca de 59,7% dos sítios CpGs e constitui ~1,18% das citosinas (Wen *et al.*, 2014). Aproximadamente metade dos genes codificadores do genoma sofrem alterações no

padrão de metilação ao longo do processo de desenvolvimento cerebral, muitas das quais afetarão a expressão de genes neuronais e, portanto, as funções cognitivas e comportamentais (Siegmund *et al.*, 2007). Somado a isto, a metilação do DNA exerce um papel fundamental nos processos de inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, manutenção da estabilidade cromossômica e repressão de elementos transponíveis do DNA (Bird, 1980; Kato & Iwamoto, 2014).

O mecanismo de metilação das citosinas é catalisado por três enzimas da família de DNA metiltransferases (DNMT): DNMT1, DNMT3a e DNMT3b (Jaenisch & Bird, 2003; Cholewa-Waclaw *et al.*, 2016). Apesar de possuírem estrutura similar, as DNMTs se diferem quanto o padrão de expressão e função no processo de metilação do DNA (Liyanage *et al.*, 2014). A DNMT1, preferencialmente, promove a metilação de citosinas hemimetiladas dos dinucleotídeos CpGs. Esta enzima se liga à fita recém-sintetizada do DNA durante a replicação e copia o padrão de metilação presente na fita parental (Probst *et al.*, 2009; Sadakierska-Chudy *et al.*, 2015). Além disso, a DNMT1 possui a habilidade de reparar a metilação, sendo conhecida como DNMT de manutenção (Kimura & Shiota, 2003; Moore *et al.*, 2013). Em contrapartida, as DNMT3a e DNMT3b possuem função *de novo*, sendo capazes de promover a metilação de citosinas não metiladas (Okano *et al.*, 1999; Weng *et al.*, 2013).

Figura 2 - Formação da 5-metilcitosina.



Legenda: A 5-metilcitosina é formada a partir da adição de um grupamento metil (destacado em azul) no carbono 5 da citosina. A reação é catalisada pelas DNA metiltransferases. Enquanto a DNMT1 metila sítios hemimetilados após a replicação, a DNMT3a e DNMT3b, promovem a metilação de citosinas não metiladas.

Fonte: A autora, 2018.

A distribuição da metilação ao longo do DNA é capaz de influenciar diretamente a regulação da transcrição. A metilação por toda a extensão da sequência gênica e regiões intergênicas tem sido, alternativamente, associada com a ativação da transcrição e com o processo de *splicing* alternativo (Jones, 2012). Dois mecanismos foram propostos para explicar o efeito da metilação no processo de regulação gênica. O mais bem caracterizado é o bloqueio estérico, no qual a metilação impede fisicamente a ligação dos fatores de transcrição aos seus alvos na sequência promotora (Sadakierska-Chudy *et al.*, 2015). O segundo mecanismo está relacionado com a ligação de proteínas à região metilada, que vão mediar o recrutamento de enzimas modificadoras de histonas e, assim, promover a compactação da cromatina em uma estrutura transcricionalmente inativa. As proteínas de remodelagem da cromatina são recrutadas pelas proteínas conhecidas como *Methyl-CpG Binding Proteins* (MBPs) (Kim & Kaang, 2017).

Atuação de MBPs na regulação da expressão gênica

A informação estabelecida pela metilação do DNA é interpretada pelas proteínas MBPs com afinidade seletiva para os dinucleotídeos CpG metilados. Deste modo, três famílias de proteínas são conhecidas por desempenhar dada função: proteínas MBDs (*Methyl-CpG Binding Domain*), proteínas Kaiso e Kaiso-like, e proteínas com domínio SRA (Defossez & Stancheva, 2011). Dentre essas, as MBDs foram as primeiras a serem caracterizadas, por meio da identificação do domínio MBD como parte da proteína *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2), o qual é responsável pelo reconhecimento e ligação às regiões metiladas (Meehan *et al.*, 1989; Lewis *et al.*, 1992; Hendrich & Bird, 1998; Moore *et al.*, 2013). Subsequentemente, estudos de homologia de sequência desta região, possibilitaram a descoberta de outras quatro isoformas pertencentes à família; MBD1, MBD2, MBD3 e MBD4 (Clouaire & Stancheva, 2008). Dentre essas, somente a MBD3 se mostra incapaz de se ligar ao DNA metilado, por possuir dois aminoácidos a mais (His30 e Phe34) na sequência polipeptídica do domínio MBD (Liyanage *et al.*, 2014). As proteínas da família Kaiso e Kaiso-like, apesar de não apresentarem a região MBD, são capazes de se ligar à região metilada por intermédio dos domínios de dedo de zinco (Liyanage *et al.*, 2014).

O terceiro grupo é constituído pela proteína UHRF1, a qual possui cinco domínios proteicos reconhecidos, sendo o domínio SRA responsável pela função de ligação à região metilada (Defossez & Stancheva, 2011).

Previamente, estudos demonstraram que a metilação do DNA não exerce uma grande influência no padrão de expressão gênica, até que ocorra a compactação do genoma e a formação da cromatina (Clouaire & Stancheva, 2008). A elucidação da estrutura das MBDs possibilitou o entendimento sobre a atuação dessas proteínas no processo de regulação da transcrição gênica, que inicialmente foi relacionado com a repressão transcricional (Urduingio *et al.*, 2009). O domínio de repressão transcricional presente nas proteínas MBDs, a partir do momento que ocorre a ligação às regiões metiladas, possibilita a interação com histonas desacetilases e histonas metilases, modificando a cromatina e impedindo a transcrição gênica (Weng *et al.*, 2013).

O gene *MECP2* e a proteína MeCP2

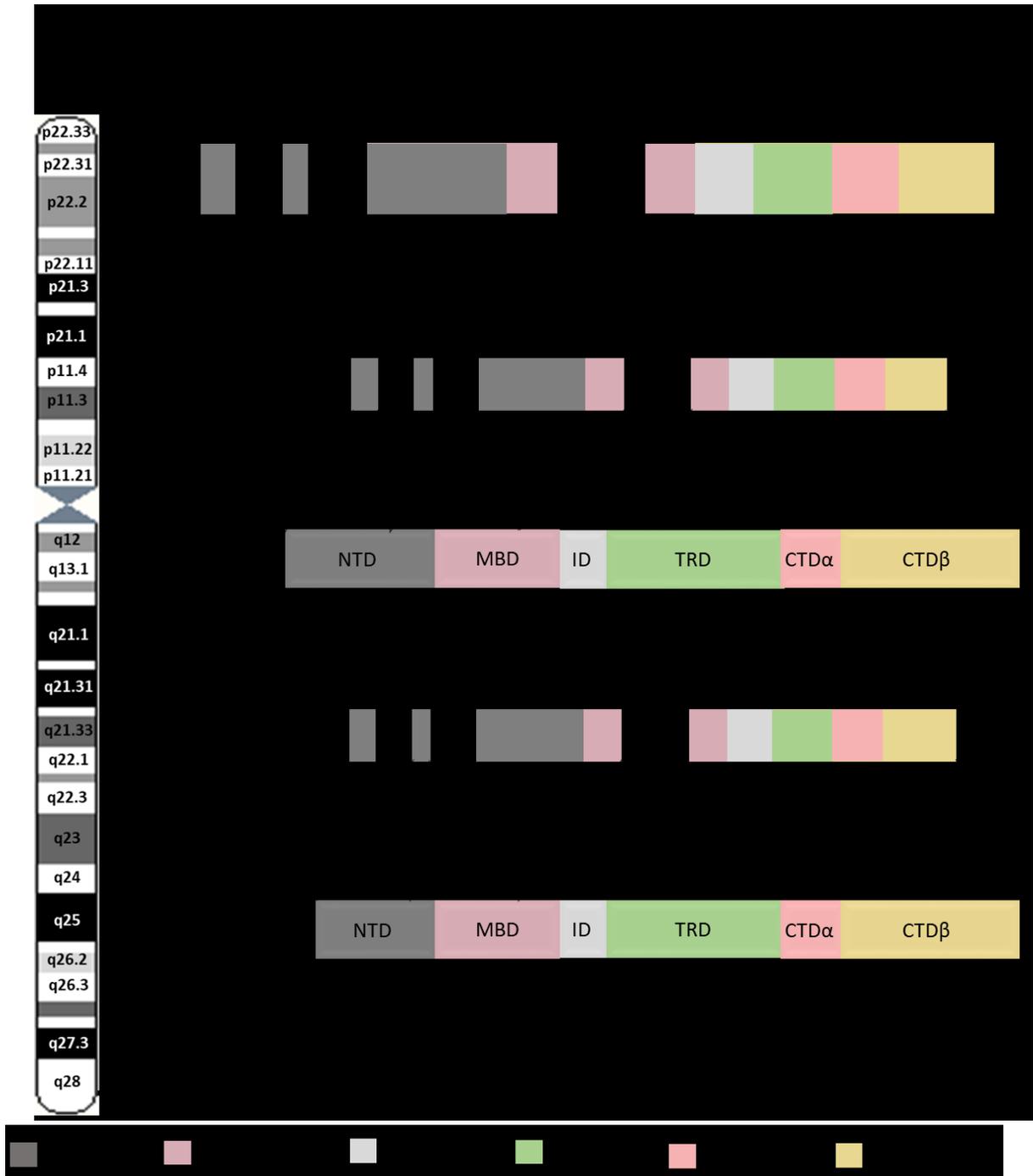
O gene *MECP2* (OMIM 300005) está situado em Xq28 e é constituído por 4 exons, os quais juntos constituem aproximadamente 76 Kb de extensão (Figura 3). Este gene é responsável por codificar a proteína nuclear MeCP2. A partir do processo de *splicing* alternativo do gene, duas isoformas da MeCP2 são produzidas (Kriaucionis & Bird, 2004; Mnatzakanian *et al.*, 2004). A isoforma E1 é gerada a partir da exclusão completa do exon 2, fazendo com que o exon 1 seja o único responsável por codificar os 24 aminoácidos da região N-terminal da proteína, a qual é composta por 486 aminoácidos (52,44 KDa), sendo essa a mais curta. Na isoforma E2, o exon 1 não é incluído e a sequência N-terminal é codificada pelo final do exon 2 com 498 aminoácidos (53,32 KDa) (Meehan *et al.*, 1992; Shahbazian *et al.*, 2002; Ausió *et al.*, 2014; UniProtKB, 2017). Embora ambas as isoformas sejam expressas no tecido cerebral, o nível de expressão difere, visto que a E1 é 10 vezes mais prevalente que a E2 (Shahbazian *et al.*, 2002).

A proteína MeCP2 é um membro da família das proteínas intrinsecamente desordenadas. Tais macromoléculas possuem um nível muito baixo de estrutura secundária, o que possibilita que a MeCP2 interaja com diferentes moléculas e adote

uma estrutura secundária a partir do estabelecimento das interações intermoleculares, tal como ocorre após a interação com a molécula de DNA (Ausió *et al.*, 2014). A estrutura proteica da MeCP2 é formada por seis domínios funcionais que viabilizam sua atuação na remodelagem da cromatina e na regulação transcricional (Figura 3) (Hansen *et al.*, 2010). São eles:

- Domínio MBD (*methyl binding domain*; resíduos 78-163): Situado na região N-terminal da proteína. Além de sua função já estabelecida de ligação à metilação, também atua na ligação às regiões não metiladas do DNA e na manutenção da organização estrutural da MeCP2.
- Domínio TRD (*transcriptional repression domain*; resíduos 207-310): Responsável pela repressão transcricional. A participação deste domínio no processo de repressão transcricional ainda não foi completamente elucidado. No entanto, o principal mecanismo proposto está relacionado com a ligação de fatores co-repressores nesse sítio, tal como o mSin3A, os quais promovem o recrutamento de histonas desacetilases.
- Domínio ID (*intervening domain*; resíduos 164-206): A função deste domínio foi recentemente associada ao aumento da estabilidade estrutural do domínio MBD e da formação de um sítio adicional para a interação da MeCP2 com a dupla fita de DNA (Claveria-Gimeno *et al.*, 2017).
- Domínio NTD (*N-terminal domain*; resíduos 1-77): Em conjunto com o domínio ID, aumenta a afinidade de ligação da região MBD às regiões metiladas e não metiladas do DNA (Claveria-Gimeno *et al.*, 2017).
- Dois domínios CTD (*C-terminal domains*), sendo um CTD- α (resíduos 311-355) e outro CTD β (resíduos 356-486): Os domínios CTD estão relacionados com a interação da MeCP2 com outras proteínas, sendo necessários para mediar a compactação da cromatina (Hite *et al.*, 2009).

Figura 3 - Estrutura do gene *MECP2* localizado em Xq28 e a proteína codificada com seus respectivos domínios funcionais.



Legenda: Gene *MECP2* contendo 4 exons e as respectivas sequências codificadoras dos domínios funcionais da proteína MeCP2. Proteína MeCP2 formada pelos seus 6 domínios funcionais. Estrutura de transcrição para as isoformas MeCP2_E1 (gerada a partir da exclusão do exon 2 e a sequência N-terminal é codificada pelo exon 1) e isoforma MeCP2_E2 (exon 1 não é incluído e a sequência N-terminal é codificada pelo final do exon 2).

Fonte: A autora, 2018.

A expressão da proteína MeCP2 se dá em diferentes tecidos, estando altamente expressa no cérebro (NCBI GEO database, 2017), principalmente em neurônios pós-mitóticos (Skene *et al.*, 2010). Evidências sugerem que a MeCP2 seja necessária para a função neuronal normal ao longo da vida (Nguyen *et al.*, 2012). Tanto o aumento, quanto a diminuição da expressão do gene *MECP2* têm efeitos deletérios sobre a formação dendrítica, promovendo o desencadeamento de efeitos opostos na transmissão sináptica. Tal evidência demonstra a importância da manutenção dos níveis de *MECP2* para a homeostase neuronal (Na *et al.*, 2013). Diferentes mecanismos de ação e interação da MeCP2 com outras proteínas já foram elucidados. A princípio, a MeCP2 foi isolada a partir de regiões com alta densidade de 5-metilcitosina, estando em abundância na heterocromatina (Claveria-Gimeno *et al.*, 2017). No entanto, mais recentemente estudos demonstraram sua capacidade de ligação ao DNA não metilado, sendo verificado que a afinidade por regiões metiladas é aproximadamente três vezes maior que por regiões não metiladas (Hansen *et al.*, 2010).

A atuação da MeCP2 na regulação transcricional de genes ocorre por diferentes mecanismos (Figura 4). Inicialmente, a atuação da MeCP2 foi relacionada com a repressão gênica (Nan *et al.*, 1997; Chahrour, *et al.*, 2007) (Figura 4A). Neste sentido, a MeCP2 se liga ao DNA metilado através de seu domínio MBD e interage com histonas desacetilases (HDACs) e componentes dos complexos co-repressor SIN3A (*Paired amphipathic helix protein Sin3a*), NCOR (*nuclear receptor co-repressor*) e SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) (Kokura *et al.*, 2001; Stancheva *et al.*, 2003; Lyst *et al.*, 2013; Lyst & Bird, 2015). O recrutamento do complexo NCOR–SMRT, que se liga ao domínio TRD da MeCP2, é necessário para a ativação das enzimas HDACs (Bienvenu & Chelly, 2006). Desta maneira, as HDACs removem os grupamentos acetil dos resíduos de lisina das histonas, o que aumenta a afinidade dessas pelo DNA, promovendo a condensação da cromatina. Sendo assim, este processo impede o acesso dos fatores de transcrição às respectivas regiões promotoras, levando, conseqüentemente, ao silenciamento gênico (Delcuve *et al.*, 2012).

Posteriormente, a identificação de novos genes alvos da MeCP2 demonstrou sua atuação nos eventos de ativação da transcrição gênica (Figura 4B) (Yasui *et al.*, 2007; Chahrour *et al.*, 2008) e processamento do RNA (Figura 4C) (Young *et al.*, 2005).

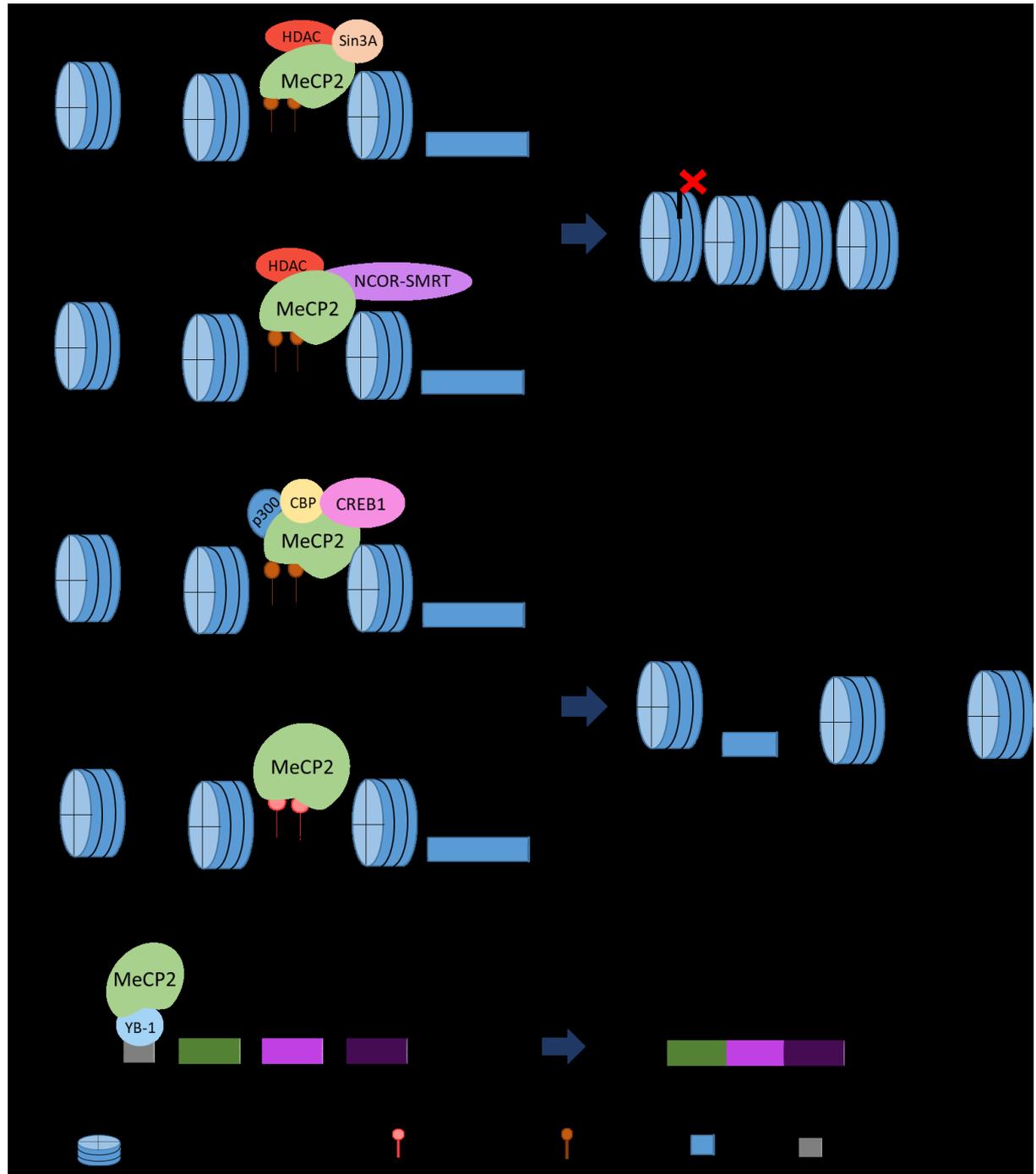
Quanto à ativação gênica (Figura 4B), foi verificado que em aproximadamente 69% dos promotores, nos quais a MeCP2 estava ligada, havia aumento da transcrição gênica (Chahrour *et al.*, 2008). Em adição, os sítios CpGs dos genes ativados pela MeCP2 possuíam um menor nível de metilação e evidências indicaram que o maior ativador transcricional associado à MeCP2 é o CREB1 (*cAMP responsive element binding protein 1*) (Chahrour *et al.*, 2008). Acredita-se que a proteína MeCP2 ative o CREB1 nos promotores, recrutando os coativadores CBP (*CREB-binding protein*) e p300, que possuem atividade histona acetiltransferase (HAT). Tal processo promove a abertura da cromatina através da acetilação das histonas, o que diminui sua afinidade pelo DNA e possibilita o acesso dos fatores de transcrição. O complexo formado pelos coativadores está associado à RNA polimerase II, promovendo assim a ativação da transcrição dos genes alvos (Asahara *et al.*, 2001).

A via alternativa para a ativação gênica pela MeCP2 está relacionada com a 5-hidroximetilcitosina (5hmc). A formação da 5hmc se dá a partir da oxidação da 5-metilcitosina pela proteína *Ten Eleven Translocation* (TET). Os níveis globais de 5hmc variam de acordo com o tecido em questão, sendo aproximadamente 10 vezes mais abundante nos neurônios do que em alguns tecidos periféricos (Kriaucionis and Heintz, 2009; Munzel *et al.*, 2010; Szulwach *et al.*, 2011). A 5hmc é encontrada em maior concentração ao longo do corpo de genes que estão altamente expressos e o principal ligante destes marcos epigenéticos no cérebro é a proteína MeCP2 (Mellen *et al.*, 2012). Sugere-se que a interação entre a MeCP2 e a 5hmc facilite a ativação da expressão gênica, através da modulação da estrutura da cromatina, tornando-a mais acessível aos fatores de transcrição (Mellen *et al.*, 2012).

Estudos de interação indicaram a ligação da MeCP2 com proteínas envolvidas no *splicing* alternativo, incluindo a proteína ligadora de Y-box 1 (YB-1), que é o principal componente das partículas de ribonucleoproteínas mensageiras (mRNP) (Young *et al.*, 2005) (Figura 4C). No sistema nervoso central (SNC), o *splicing* alternativo se mostra fundamental, sendo necessário para a formação da maior parte dos receptores e dos canais de neurotransmissores (O'Donovan & Darnell, 2001). Além disso, a depleção da MeCP2 em cultura de neurônios corticais é capaz de promover grandes mudanças no *splicing*, confirmando seu papel neste processo (Cheng *et al.*, 2017).

Estudos mais recentes demonstraram que a metilação do DNA é capaz de recrutar a MeCP2 para os exons, promovendo o reconhecimento e a inclusão desses (Maunakea *et al.*, 2013). Em adição ao processo de metilação, a MeCP2 é crucial para o processo de inclusão e exclusão dos exons mediado pelas modificações de histonas H3K4me3 e H3K36me3, que promovem respectivamente a inclusão e a exclusão de exons, tendo em vista que a H3K4me3 mostrou-se altamente enriquecida em exons reprimidos, enquanto que a H3K36me3 foi enriquecida em exons induzidos pela MeCP2 (Cheng *et al.*, 2017). A associação da MeCP2 com importantes proteínas reguladoras de *splicing* (YB-1, FBP11 e HYPC), com fatores de transcrição e marcas epigenéticas indicam que a MeCP2 poderia atuar na tradução das modificações epigenéticas, guiando os fatores reguladores de *splicing* durante o processo (Young *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2017).

Figura 4 – Mecanismos moleculares de atuação da proteína MeCP2.



Legenda: Resumo das funções da proteína MeCP2. (A) O processo de repressão transcricional pela MeCP2 ocorre através da compactação da cromatina, por meio do recrutamento dos complexos correpressores NCOR–SMRT e Sin3a que interagem com histonas desacetilases. (B) A proteína MeCP2 promove a ativação gênica por meio da ativação do CREB1 nos promotores, recrutando os coativadores CBP e p300, que possuem atividade de HAT. Tal processo promove a abertura da cromatina através da acetilação das histonas. O outro mecanismo está relacionado à ligação da MeCP2 à 5hmc. Tal ligação facilita a ativação da expressão gênica, através da modulação da estrutura da cromatina, tornando-a mais acessível aos fatores de transcrição. (C) A atuação no processo de *splicing* alternativo através da interação com proteínas envolvidas no processo, incluindo a proteína YB-1, que é o principal componente das partículas de ribonucleoproteínas mensageiras.

Fonte: A autora, 2018.

Mutações no gene *MECP2*

Mutações no gene *MECP2* foram primeiramente relacionadas com o desenvolvimento da síndrome de Rett. Esta condição ocorre quase que exclusivamente em mulheres, tendo uma prevalência estimada em 1/10.000 dos nascimentos vivos entre indivíduos do sexo feminino (Trappe *et al.*, 2001). A síndrome é caracterizada pelo desenvolvimento normal da criança até os 6 a 18 meses de idade seguido da desaceleração do crescimento craniano e regressão da linguagem e das habilidades cognitivas, sociais e motoras adquiridas (Lombardi *et al.*, 2015). Mutações no gene *MECP2* são responsáveis por mais de 95% dos casos clássicos da síndrome, entre as quais a maioria é *de novo*, ocorrendo na linhagem germinativa paterna (Chahrour & Zoghbi, 2007).

Inicialmente, foi postulado que a síndrome de Rett acometia exclusivamente as mulheres, sendo as mutações recorrentes no gene *MECP2*, letais em homens, devido à sua hemizigose para genes do cromossomo X (Trappe *et al.*, 2001). No entanto, estudos subsequentes demonstraram que homens portadores de mutações no gene *MECP2* eram viáveis (Orrico *et al.*, 2000). Esses indivíduos apresentam uma grande diversidade fenotípica decorrente de um amplo espectro de distúrbios do desenvolvimento neurológico, incluindo a DI e encefalopatias (Van Esch *et al.*, 2005). Diferente do que ocorre no sexo feminino, as mutações identificadas no gene *MECP2* em homens, não promovem a perda total de função da proteína e ocorrem em raras circunstâncias como mosaïcismo somático e em co-ocorrência com a síndrome de Klinefelter (47,XXY) (Lyst & Bird, 2015).

Nesse contexto, a análise de segregação da mutação p.A140V no gene *MECP2* em uma família portadora de DI severa possibilitou a identificação dessa alteração em mulheres e homens, indicando o *MECP2* como um gene envolvido na DILX em ambos os sexos (Orrico *et al.*, 2000). Tal estudo, foi o primeiro a demonstrar que mutações no gene *MECP2* são capazes de gerar comprometimento neurológico em homens adultos. O perfil clínico dos homens portadores de mutações no gene *MECP2* é complexo e compreende a forma de DI grave associada à epilepsia, ataxia, tremor, hiperatividade, autismo e bipolaridade ou esquizofrenia juvenil (Chahrour & Zoghbi, 2007). A identificação de outras mutações de sequência responsáveis pelo desenvolvimento da DI em indivíduos do sexo masculino fez com que alterações

nesse gene fossem consideradas causas frequentes da doença, sendo estimadas em aproximadamente 2% dos casos de DI idiopática (Couvert *et al.*, 2001). No entanto, estudos posteriores revelaram que tais mutações são menos comuns do que havia sido postulado (Yntema *et al.*, 2002; Bourdon *et al.*, 2003). Tal como ocorre na síndrome de Rett, a maior parte das mutações patogênicas no gene *MECP2* identificadas em homens portadores de DI ocorrem dentro ou perto da sequência codificadora do domínio MBD e CTD (RettBASE, 2017). Tais alterações geram a perda ou comprometimento da função da MeCP2, através de seu truncamento, dobramento anormal ou pela redução da afinidade de ligação aos seus alvos (Bienvenu & Chelly, 2006).

Variação do número de cópias e o gene *MECP2*

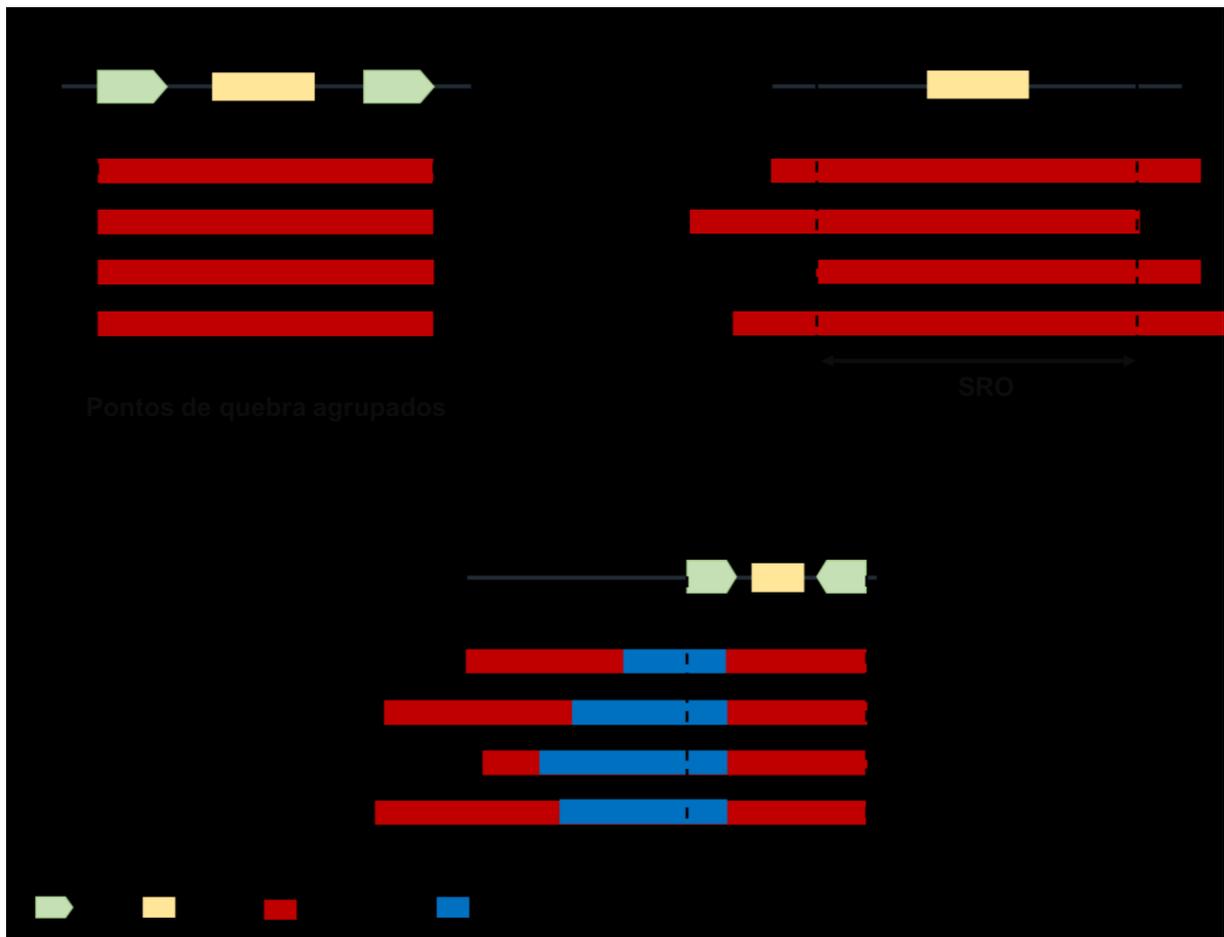
Durante a última década, o advento da tecnologia de *array*-CGH, possibilitou a identificação de microdeleções e microduplicações (alterações numéricas submicroscópicas) como a causa genética de diferentes condições do neurodesenvolvimento. Tais alterações são conhecidas como variação no número de cópias (VNC) e diferem quanto ao tamanho, envolvendo desde aproximadamente 100 pb até segmentos de DNA de megabases, podendo ser herdadas ou *de novo* (novas mutações) (Carvalho & Lupski, 2016).

Por meio da técnica de PCR em tempo real quantitativo, Meins e colaboradores (2005) foram os primeiros a caracterizar uma duplicação submicroscópica envolvendo todo o gene *MECP2* em um menino portador de DI severa. A partir desse trabalho, através da técnica de *array*-CGH, outros relatos na literatura confirmaram a relação de VNCs do gene *MECP2* com o desenvolvimento da DI (Van esch *et al.*, 2005; del Gaudio *et al.*, 2006; Lugtenberg *et al.*, 2009). Ademais, foi demonstrado que essas duplicações no sexo masculino levam a fenótipos progressivos de distúrbios neurológicos severos (Chahrour & Zoghbi, 2007).

As VNCs em Xq28 envolvendo o gene *MECP2* são classificadas como não-recorrentes por possuírem pontos de quebra (local em que a sequência se difere ao genoma de referência) em regiões distintas (Figura 5B e C), apresentando assim tamanho e conteúdo gênico únicos entre indivíduos não aparentados (Bauters *et al.*,

2008). As VNCs não recorrentes associadas a desordens genômicas apresentam sítios de microhomologia nos pontos de junção. Além disso, alguns rearranjos desse tipo são delimitados por repetições de baixo número de cópias (LCRs) que se encontram invertidas e medeiam a formação de rearranjos constituídos por um segmento triplicado invertido entre dois segmentos duplicados (DUP–TRP/INV–DUP) (Carvalho *et al.*, 2011). Tais rearranjos, quando alinhados, demonstram uma região de sobreposição mínima (SRO) entre indivíduos, levando a fenótipos em comum (Carvalho *et al.*, 2009). Por outro lado, os rearranjos recorrentes (Figura 5A) possuem pontos de quebra agrupados, onde em suas imediações são observados LCRs que levam à formação de VNCs pelo mecanismo de recombinação homóloga não alélica (NAHR) (Harel & Lupski, 2017).

Figura 5 - Rearranjos genômicos recorrentes e não recorrentes.



Legenda: Configuração estrutural dos rearranjos recorrentes e não recorrentes. (A) Rearranjos recorrentes com tamanhos em comum, apresentando os mesmos pontos de quebra. (B) Rearranjos não recorrentes apresentando tamanhos únicos, mas possuem uma região de sobreposição mínima (SRO) delimitada pelas linhas tracejadas. (C) Rearranjos não recorrentes delimitados por regiões de baixo número de cópias (LCR), representados por uma duplicação seguida de um segmento triplicado inserido em orientação invertida e de um outro segmento duplicado (DUP-TRP/INV-DUP). Tais rearranjos possuem uma sobreposição limitada aos pontos de quebra referentes aos pares de LCRs invertidas

Fonte: A autora, 2018.

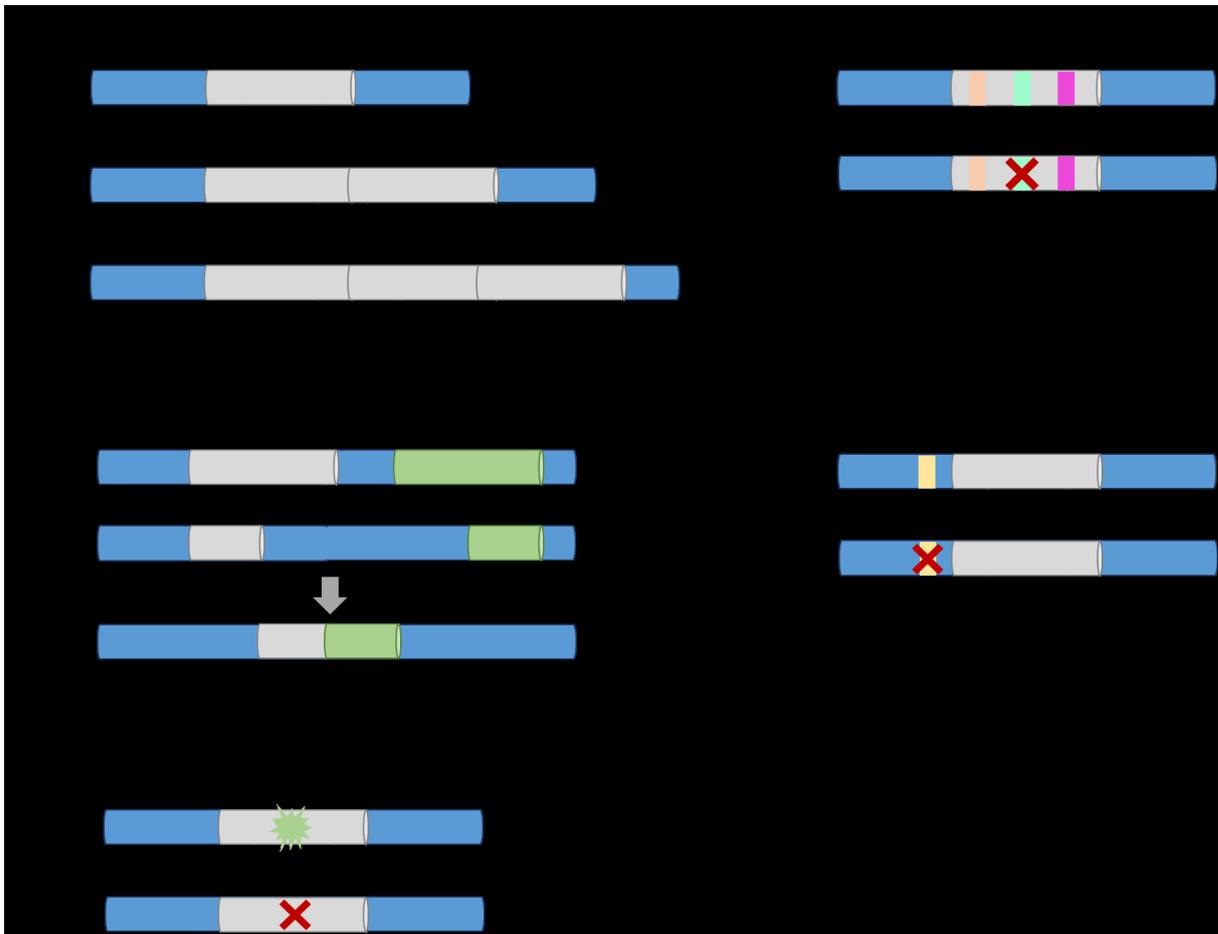
Estudos de análise de sequência, demonstraram que os rearranjos envolvendo o gene *MECP2* são complexos (rearranjos com múltiplos pontos de quebra que se justapõem à segmentos genômicos discretos), apresentando, na maior parte dos casos, a arquitetura DUP-TRP/INV-DUP (Carvalho *et al.*, 2009). A região onde o gene *MECP2* está localizado possui uma grande quantidade de sítios de microhomologia (2–15pb) e LCRs invertidas em suas proximidades, propiciando a geração de VNCs por mecanismos de replicação (Carvalho *et al.*, 2011). Tais observações permitiram a geração da hipótese de que os rearranjos envolvendo o gene *MECP2* surjam a partir

de mecanismos de replicação mediados por microhomologia, sendo eles o FoSTeS (troca de forquilha de replicação) e o MMBIR (Replicação induzida por quebra mediada por microhomologia) (Carvalho *et al.*, 2009).

As consequências fenotípicas geradas pelas VNCs se sucedem por meio de diferentes mecanismos moleculares (Figura 6) (Carvalho & Lupski, 2016). No entanto, o principal efeito gerado por esses rearranjos no gene *MECP2* está relacionado com a dosagem gênica, no qual a alteração de cópias promove a desregulação da expressão, sendo o *MECP2* um gene sensível a dosagem (genes que apresentam expressão estritamente controlada). Nesse mecanismo, as microduplicações observadas em indivíduos portadores de DI, promovem o aumento de expressão da proteína MeCP2 (Rice & McLysaght, 2016).

Alternativamente, mecanismos adicionais podem ser gerados pelas VNCs. Primeiramente, a VNC pode promover a interrupção gênica através da perda de função ou inativação do gene (Harel & Lupski, 2017). Além disso, uma VNC pode levar a fusão de genes contidos nos pontos de quebra, gerando um novo gene funcional. Outro mecanismo está relacionado com o efeito de posição, em que os elementos de regulação a montante e a jusante devem estar posicionados de forma adequada para a regulação gênica apropriada. No entanto, a formação de VNCs é capaz de alterar essas sequências, gerando o rompimento do gene (Rice & McLysaght, 2016). O último mecanismo conhecido envolve o desmascaramento de uma mutação recessiva ou polimorfismos adicionais presentes no cromossomo homólogo (Harel & Lupski, 2017).

Figura 6 - Efeitos fenotípicos gerados pelas VNCs.



Legenda: (A) VNCs em genes sensíveis a dosagem promovem a geração dos fenótipos a partir do aumento do número de cópias. (B) A interrupção gênica pode levar a perda de função ou inativação completa desse gene, provocando a sua perda de expressão. (C) O processo de fusão gênica pode ocorrer quando pontos de quebra de VNCs se encontram em parálogos de famílias gênicas ou entre famílias gênicas, caso o quadro de leitura não tenha sido alterado. (D) O efeito de posição está relacionado à presença de VNCs que levam à exclusão de elementos regulatórios dos genes, tal como os promotores e motivos reguladores de *splicing*. (E) O desmascaramento de uma mutação ocorre a partir da deleção de elementos necessários para a comunicação entre os alelos, que acaba por desmascarar uma mutação recessiva ou polimorfismos adicionais presentes no cromossomo homólogo.

Fonte: Baseado em Harel & Lupski, 2017.

Considerando que a DI apresenta uma elevada heterogeneidade genética, atribuída à grande gama de genes ligados à neuropatologia, uma parcela substancial dos casos ainda permanece sem diagnóstico molecular estabelecido, revelando que muitos mecanismos moleculares continuam desconhecidos. Por conseguinte, é de extrema valia a caracterização da real contribuição de VNCs no gene *MECP2* e os respectivos mecanismos de formação de tais rearranjos, para o desenvolvimento da DI em nossa população.

1 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Avaliar a frequência de VNCs no gene *MECP2* em uma amostra ampla de indivíduos do sexo masculino não aparentados portadores de DI idiopática.

Objetivos específicos

- Avaliar a extensão das VNCs identificadas e a segregação das mutações encontradas, bem como o padrão de inativação do cromossomo X nas mães dos portadores de VNCs, de modo a caracterizar o papel de microduplicações no gene *MECP2* nos casos de DI;
- Determinar os níveis de expressão do gene *MECP2* nos pacientes que exibiram alteração do número de cópias gênicas;
- Correlacionar as VNCs encontradas com o fenótipo dos indivíduos avaliados.

2 METODOLOGIA

2.1 Considerações éticas

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CAAE 46769315.5.0000.5259) e todos os procedimentos adotados seguiram as normas éticas da resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. Neste contexto, todos os responsáveis pelos pacientes envolvidos assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando formalmente a coleta do material biológico para o estudo em questão. As amostras de DNA utilizadas estão armazenadas no banco de amostras biológicas localizado no Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SERVGEN - Regimento interno IBRAG no 001/2008), sob a responsabilidade da Prof^a Dr^a Cíntia Barros Santos Rebouças.

2.2 Amostra analisada

Neste estudo, foram analisados 920 indivíduos do sexo masculino não aparentados portadores de DI idiopática (faixa etária no momento da coleta: 1-48 anos). O recrutamento dos pacientes ocorreu através de diferentes instituições públicas de saúde, entre elas o Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE/UERJ), Hospital Universitário Gaffreé e Guinle (HUGG/UNIRIO), Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG/UFRJ) e o Instituto Fernandes Figueira (IFF/FIOCRUZ). Os pacientes selecionados apresentaram resultados normais para alterações cromossômicas (bandeamento cromossômico GTG), com exceção de alguns pacientes que não realizaram cariótipo, e para expansões de trinucleotídeos CGG na região 5' UTR do gene *FMR1*. Além disto, parte da amostra foi analisada para outros genes relacionados à DI, tais como: *AFF2*, *ARX*, *KDM5C*, *HUWE1*, *OPHN1*, não tendo sido identificadas alterações patogênicas.

2.3 Coleta de material biológico e extração do DNA

A coleta do sangue periférico foi conduzida por um técnico em análises clínicas, seguindo condições de plena assepsia. Foram coletados 5 mL de sangue periférico acondicionados em tubos *vacutainer* contendo anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).

Tendo em vista que a coleta do material biológico ocorreu entre os anos de 1994 até 2016, diferentes metodologias foram empregadas para a extração do DNA genômico. Tais metodologias incluíram o processo de *salting out* (Miller *et al.*, 1988) e kits comerciais (QIAamp Mini kit, Qiagen; Genra Puregene Blood kit, Qiagen; Blood Extraction kit, GE Healthcare; Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega), seguindo o protocolo estabelecido pelas respectivas empresas.

2.4 Estimativa da concentração e integridade do DNA

A avaliação da integridade do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose na concentração de 0,8% (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC., USA) em solução tampão TBE 1X [Tris 89 mM (GE HEALTHCARE, GBR), ácido bórico 89 mM (MERCK, GER), EDTA 2 mM (GE HEALTHCARE)]. As amostras foram preparadas adicionando-se uma alíquota de 1,0 µL de DNA genômico a 1,0 µL de *loading buffer* [azul de bromofenol 0,25% (GE HEALTHCARE), xileno cianol 0,25% (GE HEALTHCARE), glicerol 30% (ISOFAR, BRA)], 1,0 µL de GelRed™ (UNISCIENCE, USA) e 8,0 µL de água MilliQ. Após o preparo, as amostras foram submetidas à eletroforese por 1 hora a 60 V, em uma cuba horizontal [MultiSUB (UNISCIENCE)], empregando-se como tampão de corrida TBE 1X [Tris 89 mM (GE HEALTHCARE), ácido bórico 89 mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE HEALTHCARE)]. A visualização do DNA genômico foi realizada em um fotodocumentador de luz ultravioleta (L-PIX ex, LOCCUS BIOTECNOLOGIA, BRA). A intensidade e a integridade das amostras de DNA foram comparadas com o padrão de DNA de Bacteriófago λ de 100 ηg/µL (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.).

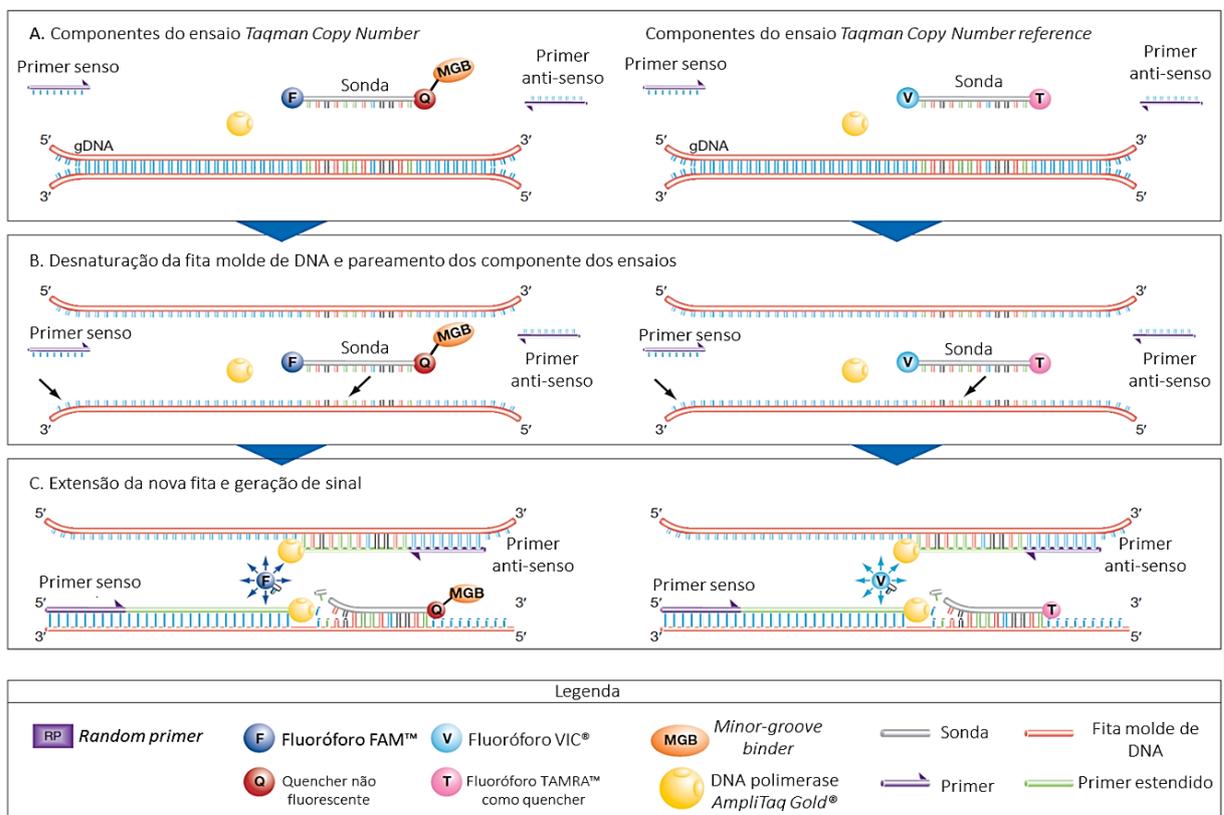
A concentração estimada das amostras de DNA foi executada no espectrofotômetro modelo NanoDrop Lite (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). Para a realização da quantificação, o equipamento foi configurado para DNA, ensaio *double strand*. Anteriormente ao início do processo, foi realizada a calibração do equipamento utilizando-se como branco 1,0 µL de tampão TE [Tris 10 mM (GE HEALTHCARE), HCl (MERCK), EDTA 1mM (GE HEALTHCARE), pH 7,4] ou os respectivos tampões de eluição dos kits utilizados na extração de DNA das amostras. Posteriormente, 1,0 µL da amostra foi colocado no pedestal do equipamento para a quantificação do DNA. O cálculo da concentração da amostra, assim como, o grau de pureza (relação A260/A280; contaminação por proteínas, fenóis e carboidratos) foram estimados pelo equipamento.

2.5 Análise de variação no número de cópias no gene *MECP2*

A detecção e a quantificação de VNCs envolvendo o gene *MECP2* foi realizada através da metodologia de PCR em Tempo Real quantitativo pelo sistema *TaqMan® Copy Number Assay* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). Esta metodologia, consiste em uma reação duplex, na qual dois ensaios são utilizados: *TaqMan® Copy Number Assay* e *TaqMan® Copy Number Reference Assay* (figura 7). Cada ensaio é composto por um par de oligonucleotídeo e uma sonda marcada com fluoróforo, específica para a sequência de interesse. Nesse sentido, o ensaio *TaqMan® Copy Number* detecta VNCs no gene *MECP2*; no qual os oligonucleotídeos pareiam em uma região comum às duplicações já encontradas e a sonda *TaqMan® MGB* marcada com fluoróforo FAM™ é complementar ao segmento do exon 4 do gene *MECP2* (sequência: 5'-AGGGTCCTGGAGAAAAGTCCTGGGAAG-3').

O ensaio *RNase P Copy Number Reference* (sonda *TaqMan® TAMRA™* marcada com fluoróforo VIC®) detecta a sequência do gene referência *RPPH1*. O gene *RPPH1* (situado em 14q11.2) é responsável por codificar o *ribonuclease P RNA component H1*, sendo esse um gene constitutivo e altamente conservado, que é utilizado como gene de referência para as análises de quantificação de números de cópias gênicas.

Figura 7 - Quantificação de variações no número de cópias envolvendo o gene *MECP2* pelo sistema *TaqMan*® *Copy Number Assays*.



Legenda: (A) Os ensaios via sondas *TaqMan*® são compostos pelos oligonucleotídeos senso e anti-senso e pelas sondas complementares aos respectivos alvos, marcadas com *quencher* (captador de fluorescência) na extremidade 3' e com o fluoróforo *reporter* na extremidade 5'. Enquanto o ensaio *TaqMan*® *Copy Number* detecta o gene *MECP2* (sonda *TaqMan*® MGB marcada com fluoróforo FAM™), o ensaio *TaqMan*® *Copy Number Reference Assay* detecta o gene *RNase P* (sonda *TaqMan*® TAMRA™ marcada com fluoróforo VIC®). (B) A fita molde de DNA é desnaturada e cada oligonucleotídeo e sonda se hibridizam em suas seqüências complementares. Enquanto a sonda está intacta, o *quencher* presente na região 3' é capaz de captar a fluorescência emitida. (C) Durante cada ciclo de PCR, as seqüências alvo e referência são amplificadas simultaneamente pela DNA polimerase *AmpliTaq*® *Gold*, que por meio da sua atividade exonucleásica 5'→3' degrada as sondas hibridizadas. Tal processo fará com que o fluoróforo *reporter* se distancie do *quencher* e a fluorescência poderá ser detectada pelo equipamento. A medida que há o acúmulo do *amplicon* ao longo dos ciclos da PCR, há o aumento de fluorescência emitida.

Fonte: Thermo Fisher Scientific, 2010; com modificações.

Ao longo da PCR, ocorre o crescimento da emissão de fluorescência devido ao acúmulo de produto específico formado. O processo é monitorado em tempo real e a emissão do sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de produto formado em cada ciclo, permitindo a geração de curvas de amplificação. A comparação entre as curvas de amplificação detectadas, é realizada para a quantificação relativa do número de cópias gênicas nas amostras, para a qual se utiliza os valores do ciclo em que a reação atinge o limiar da fase exponencial, conhecido como *cycle threshold* (Ct).

Para a realização da técnica de PCR em tempo real quantitativa, todas as amostras de DNA genômico utilizadas foram diluídas à uma concentração de 5 ng. As reações de amplificação foram conduzidas em duplicatas em placas de 96 poços, para as quais se utilizou as condições reacionais estabelecidas pelo fabricante (Tabela 2). Para cada reação realizada, além das amostras dos pacientes, foram utilizadas amostras de DNA de dois controles normais, representados por dois indivíduos intelectualmente saudáveis.

Tabela 2 - Condições reacionais para a PCR em tempo real quantitativa.

Reagente	Volume
TaqMan® Universal Master Mix (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)	5,0 µL
TaqMan® Copy Number Assay; 20X (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)	0,5 µL
TaqMan® Copy Number Reference Assay; 20X (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)	0,5 µL
Água ultrapura MilliQ q.s.p.	2,0 µL
DNA genômico (5 ng/µL)	2,0 µL
Volume Final	10,0 µL

Fonte: A autora, 2018.

A PCR em tempo real quantitativa foi conduzida no equipamento 7500 *FAST Real-Time PCR System* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.), seguindo as condições de corrida para o sistema TaqMan® e análise *Quantitation – Standard Curve*. As condições de ciclagem obedeceram às recomendações do fabricante num programa padrão de 2 minuto a 50 °C, 10 minutos de desnaturação a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 95 °C, 1 minuto de hibridização e extensão a 60 °C. Os dados de Ct calculados pelo *software* do equipamento de PCR em tempo real (7500 *software*- versão 2.0.6; THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.) foram subsequentemente exportados para uma planilha do *Excel* (Microsoft®), onde procederam as análises.

Diferentes métodos são reconhecidos para relatar os dados de PCR em tempo real quantitativo, incluindo a apresentação como quantificação absoluta ou relativa. A quantificação relativa se baseia na comparação entre os valores obtidos para um gene alvo em relação ao calibrador, que nesse estudo foi o grupo controle composto por dois indivíduos cognitivamente normais do mesmo sexo que os indivíduos da amostra em estudo. O método quantitativo utilizado para a análise dos dados foi o Ct comparativo ($\Delta\Delta Ct$). Neste método, primeiramente é calculada a diferença entre as Cts para o gene referência e para o gene alvo, gerando um valor de ΔCt que é utilizado para avaliar a diferença entre as amostras experimentais e o grupo controle ($\Delta\Delta Ct$). Subsequentemente, é avaliada a quantidade de alvo, normalizada para o gene referência, em relação ao calibrador, por meio da fórmula aritmética: $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Foram considerados alterados os pacientes que obtiveram valores de número relativo de cópias (*fold difference*) acima de 1,70; apresentando após normalização com o gene de referência duas cópias do gene *MECP2*.

2.6 Avaliação da expressão gênica

2.6.1 Extração de RNA

A expressão do gene *MECP2* foi avaliada por meio da conversão do RNA em cDNA (DNA complementar), nos pacientes portadores de duplicação e suas mães que estavam disponíveis para a coleta de material biológico. O RNA total foi extraído a partir do sangue periférico, seguindo o mesmo protocolo de coleta descrito no item 2.3. Para este experimento, foram adicionados 500 μL de sangue periférico total em tubos contendo 1,3 mL de solução *RNAlater* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.) para a conservação do RNA até o processo de extração.

A extração do RNA se procedeu pelo kit *RiboPure™-Blood Kit*, segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). As amostras conservadas em *RNAlater* foram centrifugadas a 16.000 rpm por 1 minuto (EPPENDORF; GER) e o sobrenadante foi removido. Em seguida, foram adicionados 800 μL de solução de lise (*Lysis Solution*) e 50 μL de acetato de sódio e as amostras

foram misturadas vigorosamente até a completa homogeneização da solução. Às amostras, foram adicionados 500 µL de fenol/clorofórmio e os tubos agitados por 30 segundos, sendo posteriormente mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos. Após este período, foi realizada a centrifugação das amostras a 16.000 rpm por 1 minuto (EPPENDORF) e o sobrenadante foi transferido para novos tubos. Foi adicionado metade do volume do sobrenadante de etanol absoluto e, então, a solução foi vortexada (KASVI, BR) 3 vezes por 5 segundos para a homogeneização completa, seguido de spin de 1 segundo. Posteriormente, 700 µL da solução foram transferidos para novos tubos coletores contendo coluna com filtro, seguido de centrifugação (EPPENDORF) a 16.000 rpm por 10 segundos. O precipitado foi descartado, as colunas foram recolocadas nos tubos coletores e novamente centrifugadas rapidamente (EPPENDORF). Tal processo foi repetido até que todo volume de cada tubo fosse esgotado. Subsequentemente, foram adicionados 700 µL de solução de lavagem 1 (Wash Solution 1) e o tubo foi centrifugado (EPPENDORF) a 16.000 rpm por 10 segundos, descartando-se o precipitado. O segundo processo de lavagem foi realizado através da adição de 700 µL de solução de lavagem 2/3 (Wash Solution 2/3), o tubo foi centrifugado (EPPENDORF) a 16.000 rpm por 10 segundos e o precipitado foi descartado. Tal processo foi repetido adicionando uma segunda alíquota de 700 µL de solução de lavagem 2/3 (Wash Solution 2/3). A centrifugação das amostras a 16.000 rpm por 1 minuto se procedeu para a retirada de resíduos da solução de lavagem restante nas colunas. Foram adicionados 50 µL de solução de eluição a 75 °C no centro das colunas e os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 30 segundos, seguido da centrifugação (EPPENDORF) a 7.000 rpm por 30 segundos e descarte das colunas.

A fim de remover contaminantes adicionais de DNA genômico do RNA eluído, foi realizada a etapa de tratamento com DNase I. Foram adicionados 2,5 µL de tampão de DNase 20X e 1,0 µL de DNase I (8 U/µL) à amostra extraída, seguido da inversão do tubo para a completa homogeneização e incubação a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, se adicionou 10 µL de reagente de inativação da DNase e, então, o tubo foi agitado e deixado em temperatura ambiente por 2 minutos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 16.000 rpm por 1 minuto para a separação das fases contendo a DNase e o RNA. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo, o qual foi armazenado a -20 °C até a utilização.

2.6.2 Estimativa da concentração de RNA

A estimativa da concentração e integridade das amostras de RNA foi executada de forma semelhante ao método descrito no item 2.4, para a análise de DNA. Para a realização da quantificação, o equipamento foi configurado para RNA e amostras que apresentaram relação 260/280 próximas à 2,0 prosseguiram para a etapa de conversão em cDNA.

2.6.3 Transcrição Reversa

Para a síntese de cDNA a partir do RNA extraído, foi utilizado o sistema *SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.), obedecendo o protocolo proposto pelo fabricante.

A reação para a geração de cDNA foi preparada a partir da adição de 800 ng de RNA total ao mix 1 (Tabela 3), seguido da incubação à 65 °C por 5 minutos no termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (THERMO FISHER INC.), e inserção no gelo por no mínimo 1 minuto. Posteriormente, o mix de síntese de cDNA foi preparado através das condições reacionais especificadas na Tabela 4, sendo adicionado ao mix 1. A reação foi então incubada à temperatura ambiente por 10 minutos e posteriormente processada no termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.) com a condição de ciclagem: 50 °C por 50 minutos e 85 °C por 5 minutos. Após essa etapa, as amostras de cDNA foram rapidamente centrifugadas (EPPENDORF) e 1 µL de RNase H foi adicionado em cada tubo, os quais foram incubados à 37 °C por 20 minutos.

Tabela 3 – Condições reacionais utilizadas para a preparação do mix 1.

Reagente	Volume
Oligo dt; 50 uM	1 µL
DNTP mix; 10 mM	1 µL
RNA (20-25 ng/µL)	8 µL
Volume Final	10 µL

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 4 - Condições reacionais utilizadas para a preparação do mix de síntese de cDNA.

Reagente	Volume
RT buffer; 10X	2 µL
MgCl₂; 25 mM	4 µL
DTT; 0,1 M	2 µL
RNase out; 40 U/µL	1 µL
SS III RT; 200 U/µL	1 µL
Volume Final	10 µL

Fonte: A autora, 2018.

2.6.4 Análise da expressão relativa por PCR em tempo real quantitativo

A expressão gênica foi analisada pela técnica de PCR em tempo real quantitativo sistema *SYBR™ Green* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). O *SYBR™ Green* é um composto que se intercala ao DNA dupla fita e, quando excitado, emite fluorescência durante a reação de PCR. O aumento do *amplicon* formado permite o crescimento da emissão de fluorescência por esse composto, possibilitando a geração de curvas de amplificação para quantificação relativa do número de cópias

gênicas. Tal qual ocorre para o sistema *TaqMan® Copy Number Assays* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.), a comparação das curvas de amplificação é feita pela avaliação do Ct.

A qPCR foi realizada em duplicata para cada paciente, utilizando-se o kit *SYBR™ Green PCR Master Mix* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.), com as proporções sugeridas pelo fabricante (Tabela 5), no equipamento *7500 FAST Real-Time PCR System* (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). Tais reações foram submetidas às condições de corrida padrão para o sistema *SYBR™ Green*.

Tabela 5 - Condições reacionais para o processo de qPCR por *SYBR™ Green*.

Reagente	Volume
Oligonucleotídeo senso 5 µM (IDT*)	1,25 µL
Oligonucleotídeo anti-senso 5 µM (IDT)	1,25 µL
<i>SYBR™ Green PCR Master Mix; 2X</i> (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.)	7,5 µL
cDNA (2 ng/µL)	5,0 µL
Volume Final	15,0 µL

*INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES (IDT), EUA
Fonte: A autora, 2018.

A RT-qPCR foi realizada com oligonucleotídeos descritos na Tabela 6. Além do gene *MECP2*, foi avaliado o nível de expressão do gene *GDP dissociation inhibitor 1* (*GDI1*) para um paciente cujo o rearranjo compreende esse gene, tendo em vista que duplicações no mesmo estão relacionadas com a DILX. Os genes *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*), *Glucuronidase beta* (*GUSB*) e *actin beta* (*ACTB*) foram utilizados como genes de referência, por serem genes constitutivos, altamente conservados, com expressão conhecidamente normal. Além disso, foram utilizados como controles, amostras de cDNA de dois homens cognitivamente normais.

Tabela 6 - Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão de cDNA por qPCR.

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Posição Genômica ¹
MECP2	Exons 2-3/F ²	GCTCCAACAGGATTCATGGT	chrX:154,092,205
	Exons 2-3/R ²	GAGGTCCTGGTCTTCTGACTTTTC	chrX:154,032,530
GDI1	Exon 11/F ³	CCTGCAACGACATCAAAGACA	chrX:15,4442,566
	Exon 11/R ³	TTTGCGCTTCATGTTCTCAAAG	chrX:154,442,618
GAPDH	Exon 4/F ⁴	CCACCCATGGCAAATTCC	chr12:6,536,706
	Exon 4/R ⁴	TGGGATTTCCATTGATGACAAG	chr12:6,536,753
GUSB	Exons 2-3/F ⁴	AGAGTGGTGCTGAGGATTGG	chr7:65,980,249
	Exons 2-3/R ⁴	CCCTCATGCTCTAGCGTGTC	chr7:65,979,877
ACTB	Exon 3/F ²	CACCCTGAAGTACCCCATCG	chr7:5,529,310
	Exon 3/R ²	TGCCAGATTTTCTCCATGTGC	chr7:5,529,264

¹: Posições baseadas no Hg38

Fonte: ²Van Esch *et al.*, 2005; ³Fieremans *et al.*, 2014; ⁴Froyen *et al.*, 2012.

Para a análise dos dados, foram utilizadas as Cts calculadas pelo *software* do próprio equipamento (*Software 7500* - versão 2.0.6; Thermo Fisher Scientific Inc), seguindo o mesmo procedimento descrito no item 2.5.

2.7 Determinação do padrão de inativação do cromossomo X

Dentre as principais abordagens para análise de inativação do cromossomo X, o ensaio mais utilizado é o *human androgen receptor assay (HUMARA)* (Vacca *et al.*, 2017). O gene *androgen receptor (AR)* (localizado em Xq11-q12), possui uma região de repetições curtas em *tandem* (STR), representadas por CAG no exon 1, que se localiza próximo à região promotora do gene que contém ilhas CpGs. O padrão de metilação dessas regiões está correlacionado com o processo de inativação do cromossomo X, a qual é alvo para endonucleases sensíveis à metilação. Além deste, o gene da *retinitis pigmentosa 2 (RP2)*, localizado em Xp11.3, possui uma região de repetição GAAA que apresenta um grande número de sítios CpGs que estão

diferencialmente metilados (Vacca *et al.*, 2017). Recentemente, foi demonstrado que o padrão de metilação do *RP2* apresenta a mesma configuração do gene *AR*, sendo então associado ao padrão de inativação do cromossomo X (XIC) (Machado *et al.*, 2014). Sendo assim, a combinação dos marcadores *AR/RP2* se torna mais eficiente para a análise de XIC, principalmente nos casos de homozigose para o marcador *AR*, onde não se consegue determinar a proporção de inativação.

A determinação do padrão de inativação do cromossomo X se sucedeu por ensaio de PCR com endonuclease de restrição sensível à metilação, que irá clivar o segmento de DNA alvo no cromossomo X ativo (não metilado), mas não no cromossomo X inativo (metilado).

Neste experimento, o processo de digestão foi realizado com a enzima *HhaI* (*Haemophilus haemolyticus*) (NEW ENGLAND BIOLAB, USA.), no qual foram utilizados 200 ng de DNA genômico (Tabela 7) para 1 µL de tampão *CutSMART* (10X) (NEW ENGLAND BIOLAB) e 0,3 µL de enzima *HhaI* (20 U/µL). Adicionalmente, uma reação de controle foi feita, na qual o volume da enzima foi substituído por água ultrapura MilliQ. As reações foram levadas ao termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler; THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.) por 2 horas, a 37 °C. A genotipagem do DNA foi realizada através de ensaio quantitativo multiplex fluorescente da PCR (QF-PCR), utilizando-se marcadores para os genes *AR* e *RP2*, sob as condições reacionais descritas na Tabela 8. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 95 °C por 11 minutos, seguida de 28 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 59 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto; e extensão final 60 °C por 60 minutos.

Tabela 7 - Condições reacionais para a realização da QF-PCR.

Reagentes	Volume
Tampão de reação 1X (BIOTOOLS, ESP)	2,5 µL
MgCl₂; 2,0 mM (BIOTOOLS)	1,25 µL
dNTPs; 200 µM (GE HEALTHCARE)	1,0 µL
Oligonucleotídeo AR senso; 2 µM	2,5 µL
Oligonucleotídeo AR anti-senso; 2 µM	2,5 µL
Oligonucleotídeo RP2 senso; 2 µM	2,5 µL
Oligonucleotídeo RP2 anti-senso; 2 µM	2,5 µL
<i>Tth</i> DNA polimerase; 1 U/µL (BIOTOOLS)	1,0 µL
Água ultra pura MilliQ q.s.p.	8,25 µL
Produto da digestão	1,0 µL
Volume total	25 µL

Fonte: A autora, 2018.

A qualidade dos amplicons e o rendimento da reação foi verificada por meio da técnica de eletroforese em gel de agarose 1% (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.), para a qual 4,0 µL do produto de PCR foi adicionado à 2,0 µL de de GelRed™ (UNISCIENCE). A eletroforese foi conduzida a 80 V durante 30 minutos em cuba horizontal [MultiSUB (UNISCIENCE)], utilizando como tampão de corrida o TBE 1X [Tris 89 mM (GE HEALTHCARE), ácido bórico 89mM (MERCK), EDTA 2 mM (GE HEALTHCARE)]. Após a eletroforese, o gel foi visualizado no fotodocumentador L-PIX ex (LOCCUS BIOTECNOLOGIA).

Posteriormente à etapa de PCR, 0,5 µL do produto de amplificação foi inserido na placa, juntamente com 0,1 µL do marcador LIZ 500 e 9,35 µL de formamida Hi Di (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.). Em seguida, a placa foi levada ao termociclador (Veriti 96 Well Thermal Cycler, THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.) por 5 minutos a 95 °C para desnaturação e ao sequenciador automático ABI 3130 (THERMO FISHER SCIENTIFIC INC.) para a separação e detecção alélica.

A análise dos dados gerados pela eletroforese capilar foi conduzida através do software *GeneMarker V2.6.2*. A determinação do padrão de inativação do cromossomo X nas células sanguíneas foi estimada através do cálculo descrito por Busque *et al.*, 2009. Visto que a metilação nos sítios alvos do DNA inibe a clivagem pela endonuclease *HhaI*, somente os alelos que não forem clivados serão amplificados, após o processo de digestão. A estimativa da proporção de inativação de cada cromossomo X foi feita utilizando-se a proporção entre a área sob o pico dos alelos, após clivagem com *HhaI*, já que essa medida é inversamente proporcional à porcentagem de células com o cromossomo X ativo (Grzesiuk *et al.*, 2016). Foi considerado como desvio de inativação proporções >80%.

2.8 Análise de extensão das duplicações identificadas

A análise do conteúdo gênico envolvido nas duplicações identificadas se sucedeu por meio de colaboração com a Profa Dra. Claudia M. B. Carvalho, pesquisadora do *Baylor College of Medicine* (Estados Unidos), para a qual foram enviadas as amostras de DNA genômico dos pacientes portadores de duplicação no gene *MECP2* e de suas mães.

A extensão das duplicações envolvendo o gene *MECP2* foi verificada através da metodologia de *array comparative genomic hybridization* (array CGH) de alta densidade. O *microarray* customizado 4X44K *Agilent Technologies* (USA) abrange 4,6 Mb em torno do *MECP2* em Xq28, cobrindo a área situada em ChrX: 150,000,000-154,600,000 (*NCBI Build 36*). O procedimento experimental foi conduzido conforme descrito por Carvalho *et al.*, 2009.

Os processos de preparo da amostra de DNA genômico e do *microarray* foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. A etapa inicial consistiu na digestão de 1,5 µg de DNA de pacientes e controles femininos e masculinos, utilizando as enzimas de restrição *Alu I* (5 U/µL) e *Rsa I* (5 U/µL) (PROMEGA, USA), seguido da incubação por 2 horas a 37 °C. A marcação do DNA foi realizada com os fluoróforos Cy5-dUTP para as amostras de pacientes e Cy3-dUTP para as amostras referência, seguindo as instruções do fabricante (AGILENT GENOMIC DNA Labeling Kit Plus, 5188–5309), as quais foram purificadas por meio

da utilização do *Microcon Ym-30 filters* (MILLIPORE CORPORATION, USA) e posteriormente quantificadas no espectrofotômetro NanoDrop. Para a etapa de hibridização, primeiramente as amostras foram combinadas com *Human Cot-1 DNA*[®] (INVITROGEN CORPORATION, USA), utilizado para bloquear hibridização não específica no *microarray*, ao *Agilent 10X Blocking Agent* (minimiza a ligação não específica) e *Agilent hybridization buffer*. A reação foi desnaturada a 95 °C por 3 minutos, foi pré-incubada durante 30 minutos a 37 °C e o processo de hibridização ao array ocorreu em uma câmara de hibridização por 40 horas a 65 °C, sendo as lâminas posteriormente inseridas em uma estufa de rotação (AGILENT TECHNOLOGIES). As lâminas de *array* prosseguiram para o processo de lavagem utilizando as soluções 1 e 2 (*Agilent Wash solutions 1 and 2*), acetonitrila (MERCK), e a solução de estabilização e secagem, de acordo com as condições reacionais indicadas pelo fabricante.

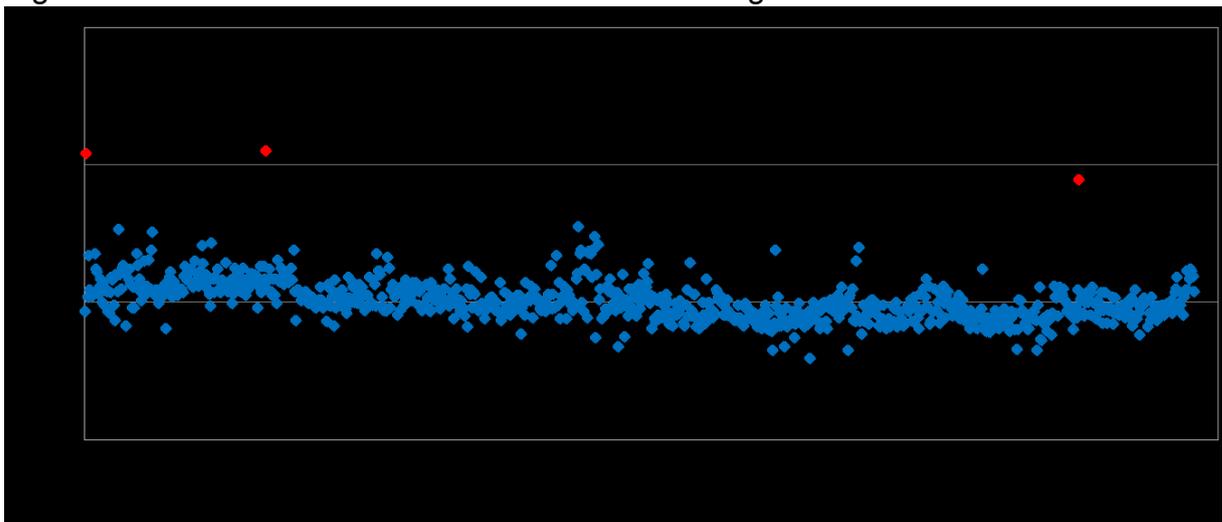
Os resultados gerados pela técnica de *array*-CGH foram digitalizados através do *GenePix 4000B Microarray Scanner* (AXON INSTRUMENTS, GBR) e posteriormente foram analisados, extraídos e tratados no *Feature Extraction software A.7.5.1* (AGILENT TECHNOLOGIES). A análise estatística foi conduzida no *software CGH Analytics v3.1.28* (AGILENT TECHNOLOGIES), o qual permite detectar e mapear as regiões do genoma que exibem amplificação ou deleção de um dado segmento. O número de cópia genômica foi definido pela análise da média normal de \log_2 (Cy5/Cy3) do sinal do *array*-CGH, no qual as regiões com valor de 0,6 foram consideradas duplicadas, enquanto que 1,2 foram consideradas triplicadas. Os dados do *array* e as posições genômicas dos rearranjos foram analisados utilizando o *Genome Browser Gateway* do UCSC hg18 (<http://genome.ucsc.edu/>).

3 RESULTADOS

3.1 Análise de variação no número de cópias no gene *MECP2*

Neste estudo, foi realizado o rastreamento de VNCs no gene *MECP2* através da técnica de PCR em tempo real quantitativo, em 920 pacientes portadores de DI idiopática. A amostra foi composta por indivíduos do sexo masculino (média de idade no momento da coleta= $10 \pm 5,6$ anos) residentes no Estado do Rio de Janeiro, os quais apresentavam níveis de severidade da DI variando de leve a severa. Inicialmente, a análise molecular possibilitou a identificação de seis indivíduos portadores de duplicação (0,65%). No entanto, a confirmação das duplicações a partir da metodologia de *array*-CGH demonstrou que três indivíduos (0,33%) eram portadores de duplicação em Xq28 envolvendo o gene *MECP2* (pacientes 58, 565 e 4219). Os outros três pacientes eram portadores da síndrome de Klinefelter (47,XXY; pacientes 507 e 2771) e um era portador de aneuploidia (48,XXYY; paciente 597) (Figura 8). Nestes três casos falso-positivos, o cariótipo não havia sido realizado no momento da coleta.

Figura 8 - Resultados do rastreamento de VNCs no gene *MECP2*.



Legenda: O gráfico demonstra o número relativo de cópias obtido para cada paciente (eixo y), estando esses organizados em ordem crescente em relação aos seus respectivos números de identificação (eixo x). Foram considerados alterados os pacientes que obtiveram valores de número relativo de cópias acima de 1,7. Ao todo, foram identificados três indivíduos portadores de duplicação, os quais encontram-se destacados em vermelho.

Fonte: A autora, 2018.

3.2 Descrição clínica dos pacientes afetados

A etapa posterior à identificação dos indivíduos portadores de duplicação no gene *MECP2* constituiu na reavaliação clínica pelo geneticista clínico responsável. Este processo foi realizado com os pacientes cujas famílias puderam ser contatadas, tendo sido reavaliados os pacientes 565 e 4219. As características aqui descritas para o paciente 58 foram relatadas durante a primeira avaliação clínica do mesmo pelo geneticista clínico. As informações clínicas dos pacientes encontram-se discriminadas na Tabela 8.

Os heredogramas das famílias dos pacientes portadores de duplicação encontram-se na figura 9.

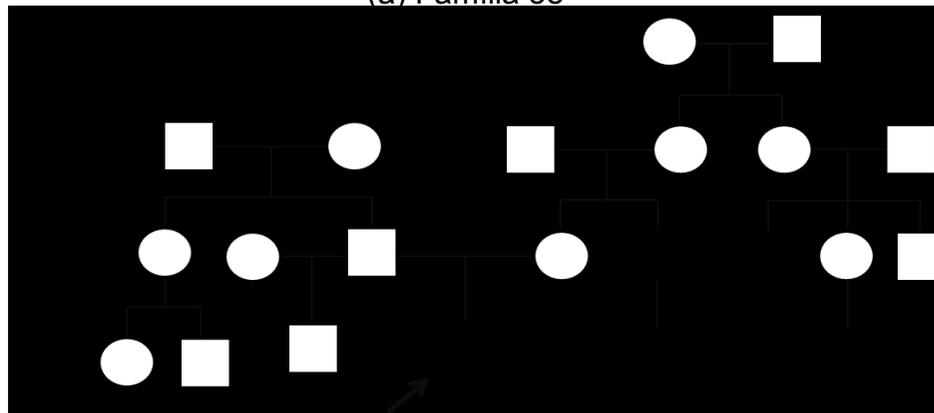
Tabela 8 - Comparação entre as características clínicas observadas nos indivíduos portadores de duplicação.

Características clínicas	Pacientes		
	58	565	4219
Idade no momento da avaliação	13 anos	25 anos	6 anos
Deficiência Intelectual severa	+	+	+
Hipotonia	ND	+	+
Atraso do desenvolvimento motor	ND	+	+
Espasticidade	ND	-	+
Infecções respiratórias recorrentes	+	+	+
Atraso do desenvolvimento e comprometimento da fala	+	+	+
Comportamento autista	+	+	+
Orelhas grandes	+	+	+
Disfunção da bexiga	ND	+	+
Contato ocular pobre	-	+	-
Déficit de atenção	ND	-	+
Hiperatividade	ND	-	+
Defensivo ao tato	ND	+	-
Movimento estereotipado das mãos	+	-	+
Ansiedade	ND	+	+
Temperamento dócil	ND	+	+
Perímetro cefálico aumentado	+	+	+
Face alongada	-	+	-
Fronte proeminente	-	+	-
Flacidez ligamentar	+	-	+

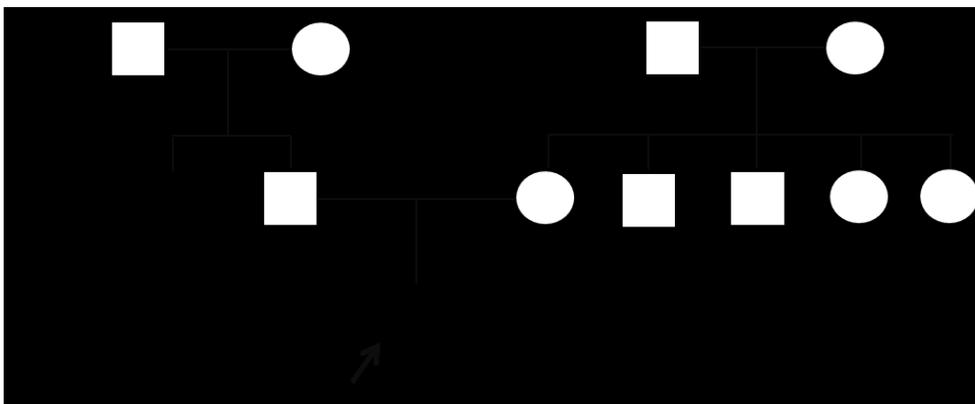
Legenda: ND- dados não disponíveis; (+) presença e (-) ausência das características clínicas.
 Fonte: A autora, 2018.

Figura 9 – Heredogramas das famílias 58, 565 e 4219.

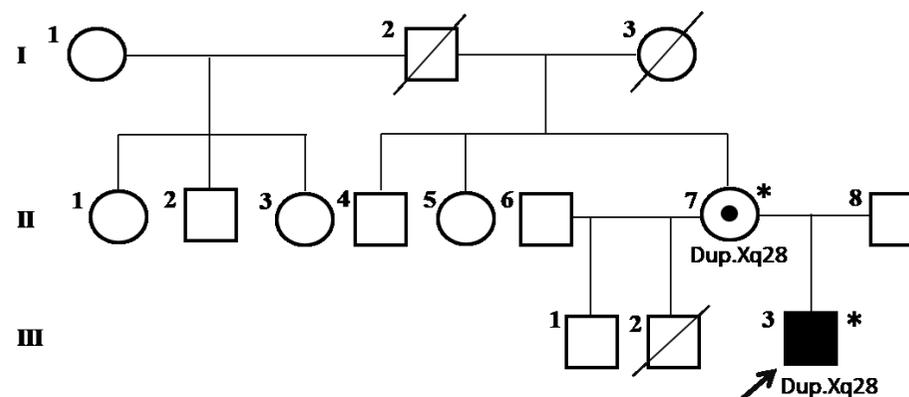
(a) Família 58



(b) Família 565



(c) Família 4219



Legenda: As setas indicam os probandos de cada família analisada, enquanto que os familiares disponíveis para avaliação molecular foram marcados com um asterisco (*). As mães portadoras foram identificadas com um círculo preenchido por um ponto escuro.

Fonte: A autora, 2018.

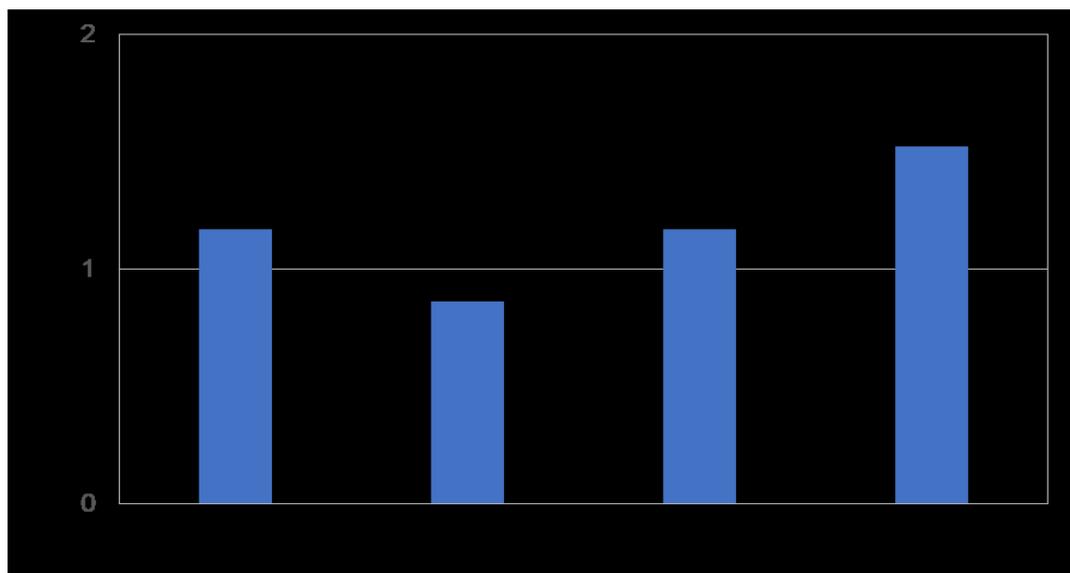
3.3 Análise de segregação das duplicações nas mães dos pacientes alterados e inativação do cromossomo X

A análise de segregação das duplicações no gene *MECP2* e de inativação do cromossomo X foi conduzida nas mães dos pacientes portadores da alteração que estavam disponíveis (565A e 4219A).

3.3.1 Análise de segregação das duplicações

O rastreamento das duplicações nas mães dos pacientes alterados demonstrou que a mãe 565A apresentou um resultado normal, indicado pelo número relativo de cópias igual a 1,17. Em contrapartida, a mãe 4219A é portadora da duplicação, tendo essa apresentado um número relativo de cópias igual a 1,52; o que configura a presença de 3 cópias do gene *MECP2* (Figura 10).

Figura 10 - Resultado da análise de segregação das alterações nas mães dos pacientes portadores de duplicação do gene *MECP2*.



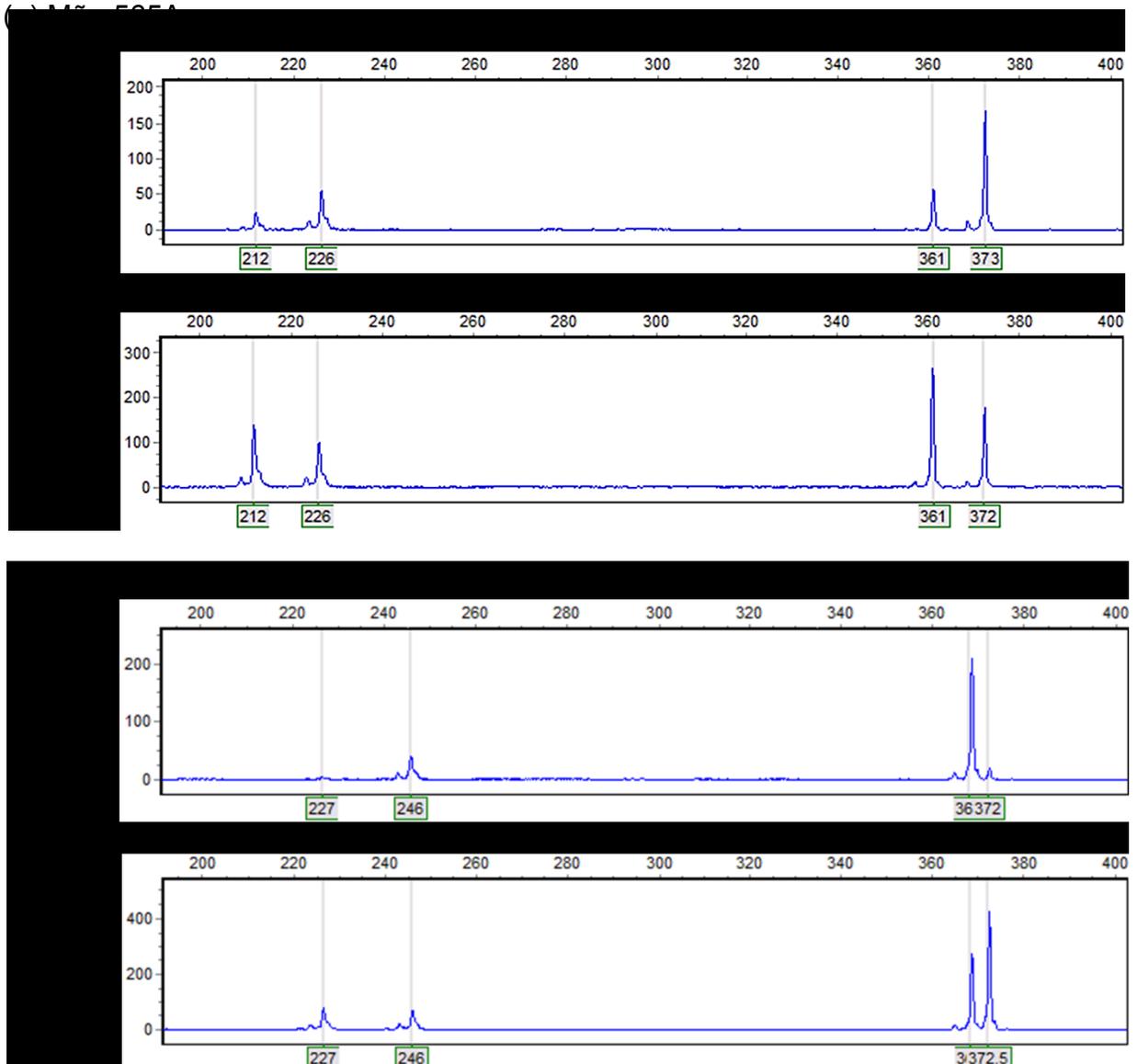
Legenda: O gráfico demonstra o número relativo de cópias obtido para as mães dos pacientes alterados. Foram consideradas portadoras de duplicação, as mulheres que exibiram número relativo de cópias maior que 1,3.

Fonte: A autora, 2018.

3.3.2 Determinação do padrão de inativação do cromossomo X

A análise do padrão de inativação do cromossomo X foi conduzida nas mães 565A e 4219A (Figura 11 e Tabela 9). A investigação demonstrou que mãe 565A apresentou uma razão de 24:76 para o marcador *AR* e 15:85 para o marcador *RP2*. Enquanto que a razão obtida para o marcador *RP2* representa desvio de inativação do cromossomo X (>80%), para o marcador *AR* tal fato não foi verificado. A mãe 4219A apresentou uma razão de 7:93 para o marcador *AR* e 95:5 para o marcador *RP2*, indicando um desvio extremo de inativação do cromossomo X (>90%).

Figura 11 - Resultados do ensaio de inativação do cromossomo X.



Legenda: Eletroferogramas obtidos a partir da reação de digestão pela endonuclease sensível à metilação *HhaI* em sítios dos genes *AR* e *RP2*, nas mães dos probandos identificados com duplicação envolvendo o gene *MECP2*. (a) Amostra 565A: para o marcador *RP2* foi verificado desvio de inativação do cromossomo X, o que não foi demonstrado pelo marcador *AR* (b) Amostra 4219A: o resultado revelou um desvio extremo de inativação do cromossomo X.

Fonte: A autora, 2018.

Tabela 9 - Análise dos dados de inativação do cromossomo X.

Amostra	Marcador <i>AR</i>		Marcador <i>RP2</i>	
	Genótipo	Razão XCI	Genótipo	Razão XCI
565A	212/226	24:76	361/372	15:85
4219A	227/246	7:93	368/372	95:5

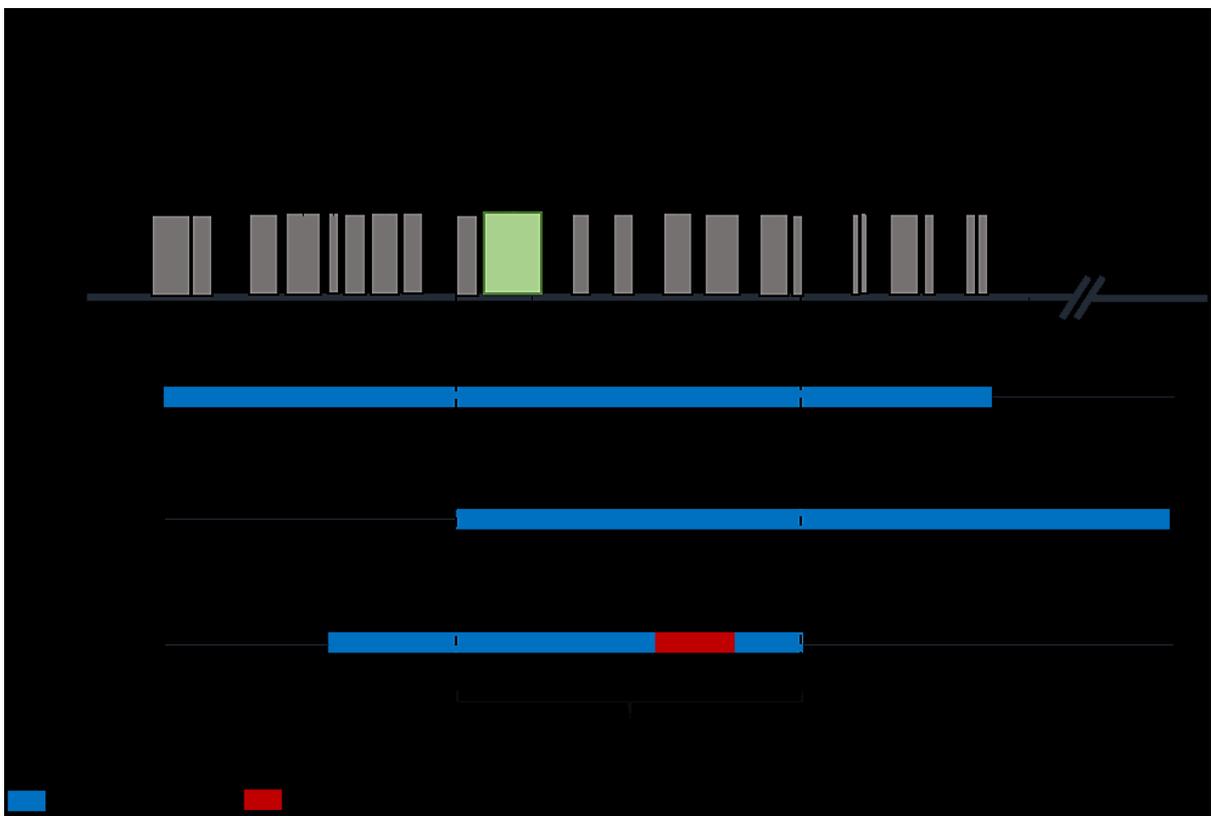
Fonte: A autora, 2018.

3.4 Análise de extensão das duplicações identificadas

A fim de determinar a extensão do segmento duplicado, a posição dos pontos de quebra e o conteúdo gênico de cada duplicação, foi realizada a técnica de *array-CGH* customizado de alta densidade, abrangendo o gene *MECP2* e regiões flangeadoras em Xq28.

A análise demonstrou que todas as duplicações identificadas se diferem quanto ao tamanho, e, conseqüentemente, ao conteúdo gênico (Figura 12). Os rearranjos se estenderam de 420 Kb a 2 Mb. A delimitação da região de sobreposição mínima das duplicações entre os pacientes, indicou uma região de aproximadamente 350 Kb, a qual incluiu os genes *IRAK1*; *MECP2*; *OPN1LM*; *TEX28*; *OPN1MW*; *TKTL1*; *FLNA*; *EMD*.

Figura 12 - Representação da região genômica que compreende os rearranjos identificados em Xq28.



Legenda: Tamanho e conteúdo gênico envolvidos nos rearranjos estão identificados para cada paciente portador. A barra azul indica a região duplicada e a barra vermelha a região triplicada. A região mínima de sobreposição (SRO) entre as duplicações identificadas nos pacientes foi delimitada, demonstrando os genes em comum entre os indivíduos.

Fonte: A autora, 2018.

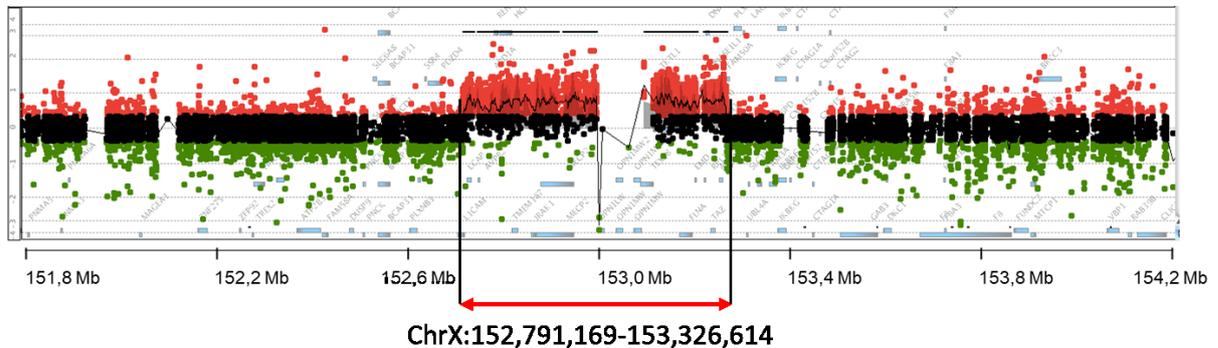
3.4.1 Paciente 58

A análise desse paciente por *array*-CGH demonstrou que a duplicação exibida apresenta uma extensão de aproximadamente 535 Kb (ChrX:152,791,169-153,326,614) (figura 13a).

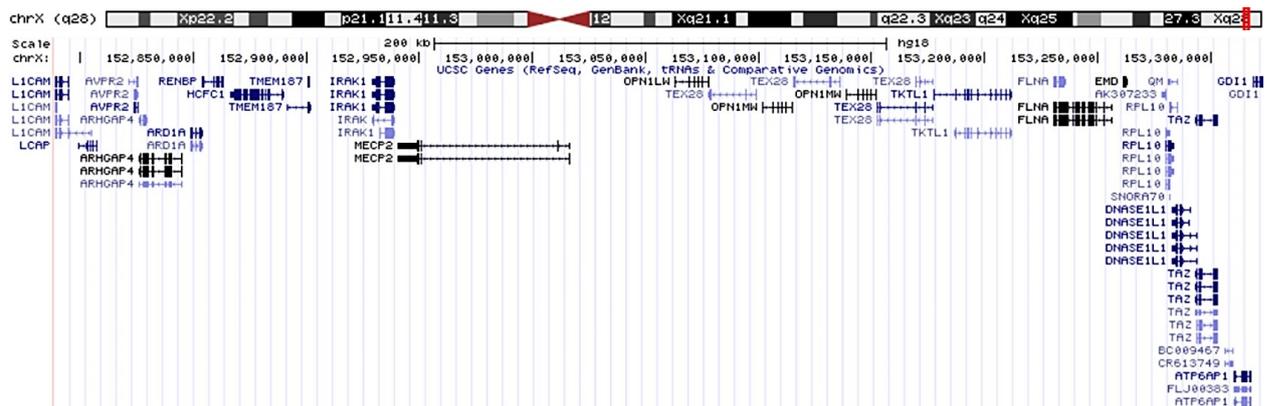
A cerca do conteúdo gênico envolvido no rearranjo, a avaliação através do *software* online *genome browser*, revelou que o segmento duplicado corresponde a uma região de grande densidade gênica. Considerando os pontos de quebra distais, que compreendem os genes *L1CAM* e *GDI1*, 27 genes estão envolvidos na duplicação, além do gene *MECP2* (figura 13b).

Figura 13 - Mapeamento da extensão e conteúdo gênico da duplicação identificada no paciente 58.

(a) Resultado da análise de *array*-CGH



(b) Conteúdo gênico envolvido na duplicação em Xq28



Legenda: (a) Os resultados da técnica de *array*-CGH são representados em um gráfico de dispersão, no qual o eixo y representa a relação $\log_2(Cy5/Cy3)$, enquanto o eixo x expressa as coordenadas genômicas no cromossomo X. As sondas em vermelho representam os pontos onde há ganho de cópia em relação ao grupo controle (duplicação- *threshold* de 0,6; triplicação- *threshold* de 1,2) e os pontos pretos são os resultados considerados normais. A área delimitada por setas indica a posição genômica aproximada dos pontos de quebra (início e término) da duplicação (ChrX:152,791,169-153,326,614). Os *gaps* entre as linhas representam intervalos em que não foi possível inferir o *status* do número de cópias, devido a uma fraca cobertura de sonda em virtude da presença de LCRs. (b) Representação do conteúdo gênico envolvido na duplicação em Xq28 obtida no UCSC *Genome Browser* versão *Human March 2006* (NCBI36/hg18).

Fonte: A autora, 2018.

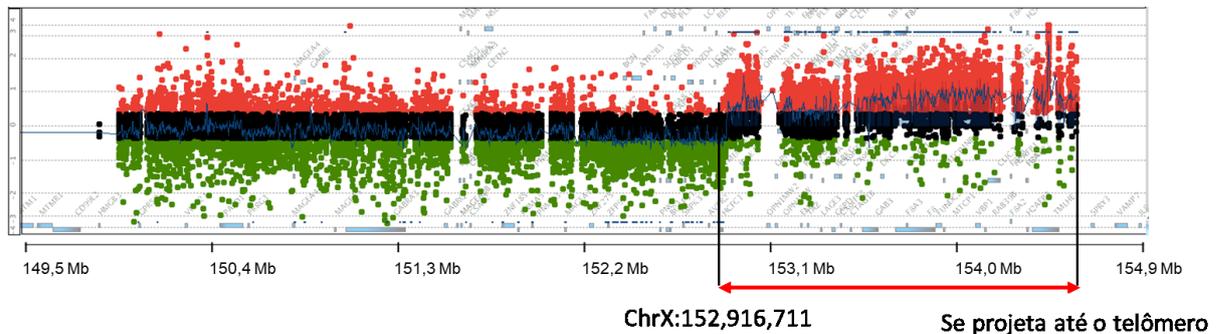
3.4.2 Paciente 565

A análise de *array* de alta resolução do paciente supracitado, revelou que o segmento duplicado em Xq28 apresenta aproximadamente 2 Mb de extensão (chrX:152,916,711-154,913,754) (Figura 14a). A cerca do conteúdo gênico presente no rearranjo, tendo em vista que o segmento duplicado se estende do gene *IRAK1* até o telômero, a região com ganho de cópias apresenta uma grande densidade gênica. Ao todo, 56 genes incluindo o *MECP2* estão envolvidos na duplicação (Figura14b).

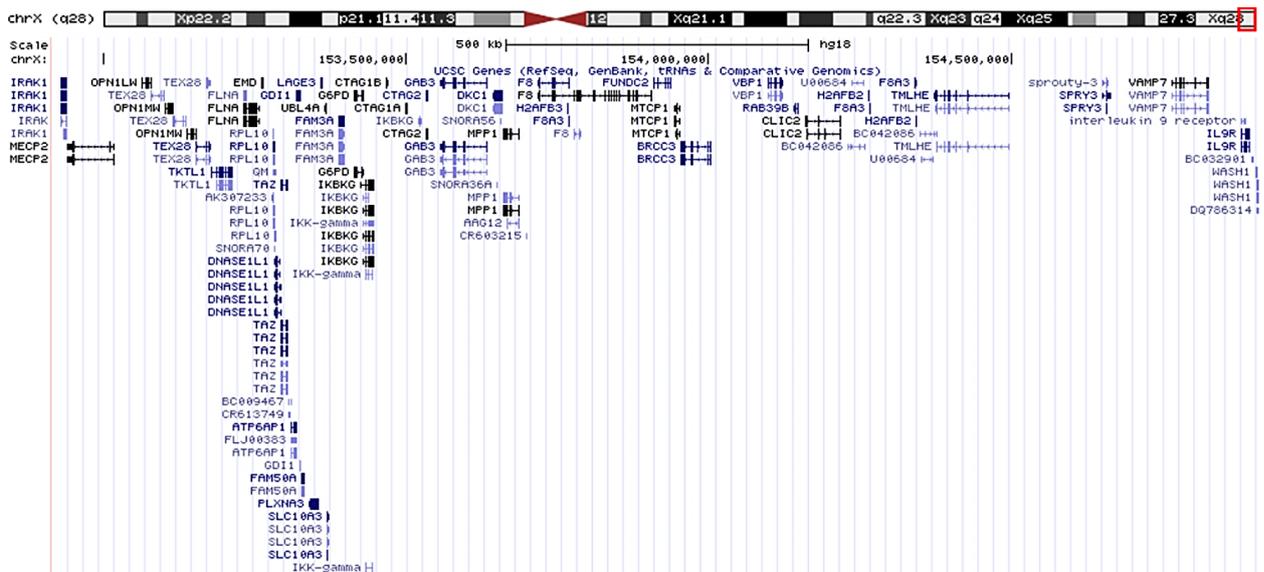
Ademais, além da duplicação, foi verificado que esse paciente possui uma deleção na região pseudoautossômica 1 (PAR1) do cromossomo Y com extensão equivalente a 697 Kb (chrY:1-697,574) (Figura 15a). Quanto ao segmento deletado do cromossomo Y, foram identificados cinco genes (*PLCXD1*, *BC033659*, *GTBP6*, *PPP2R3B*, *SHOX*) compreendidos em tal região (Figura 15b).

Figura 14 - Mapeamento da extensão e conteúdo gênico da duplicação identificada no paciente 565.

(a) Resultado da análise de *array*-CGH



(b) Conteúdo gênico envolvido na duplicação em Xq28

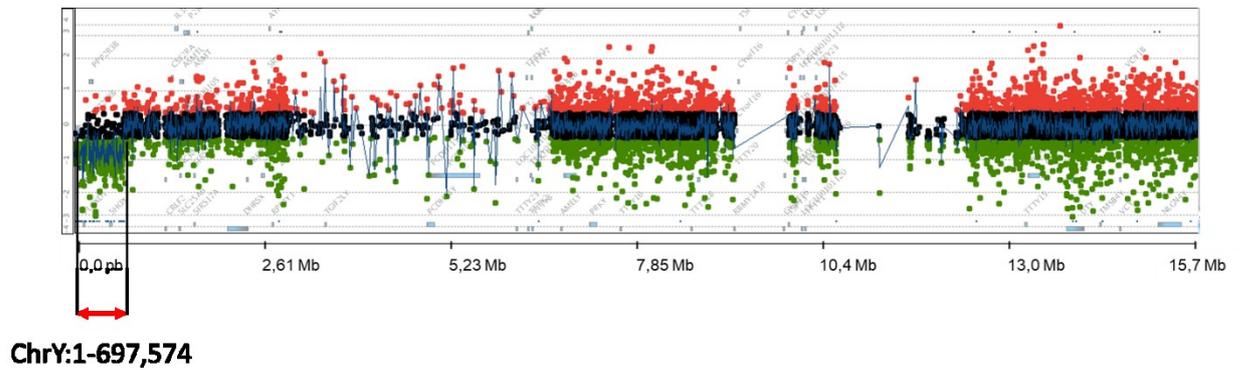


Legenda: (a) Os resultados da técnica de *array*-CGH são representados em um gráfico de dispersão, no qual o eixo y representa a relação $\log_2(Cy5/Cy3)$, enquanto o eixo x expressa as coordenadas genômicas no cromossomo X. As sondas em vermelho representam os pontos onde há ganho de cópia em relação ao grupo controle (duplicação- *threshold* de 0,6; triplicação- *threshold* de 1,2) e os pontos pretos são os resultados considerados normais. As setas pretas indicam a posição genômica aproximada dos pontos de quebra (início e término da duplicação). Os *gaps* entre as linhas representam intervalos em que não foi possível inferir o *status* do número de cópias, devido a uma fraca cobertura de sonda em virtude da presença de LCRs. (b) Representação do conteúdo gênico envolvido na duplicação em Xq28 obtida no UCSC *Genome Browser* versão *Human March 2006* (NCBI36/hg18).

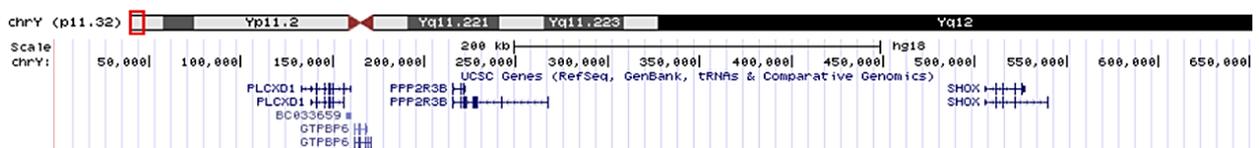
Fonte: A autora, 2018.

Figura 15 - Identificação da deleção presente no cromossomo y e o conteúdo gênico envolvido nesse rearranjo.

(a) Resultado da análise de *array*-CGH



(b) Conteúdo gênico envolvido na deleção do cromossomo Y



Legenda: (a) Os resultados da técnica de *array*-CGH são representados em um gráfico de dispersão, no qual o eixo y representa a relação $\log_2(Cy5/Cy3)$, enquanto o eixo x expressa as coordenadas genômicas no cromossomo Y. As sondas em verde representam os pontos onde há uma diminuição de cópia em relação ao grupo controle e os pontos pretos são os resultados considerados normais. A seta preta indica a posição genômica aproximada do término da deleção, a qual se estende por chrY:1-697,574. Os *gaps* entre as linhas representam intervalos em que não foi possível inferir o *status* do número de cópias, devido a uma fraca cobertura de sonda em virtude da presença de LCRs. (b) Representação do conteúdo gênico envolvido na deleção no cromossomo Y obtida no UCSC *Genome Browser* versão *Human March 2006* (NCBI36/hg18).

Fonte: A autora, 2018.

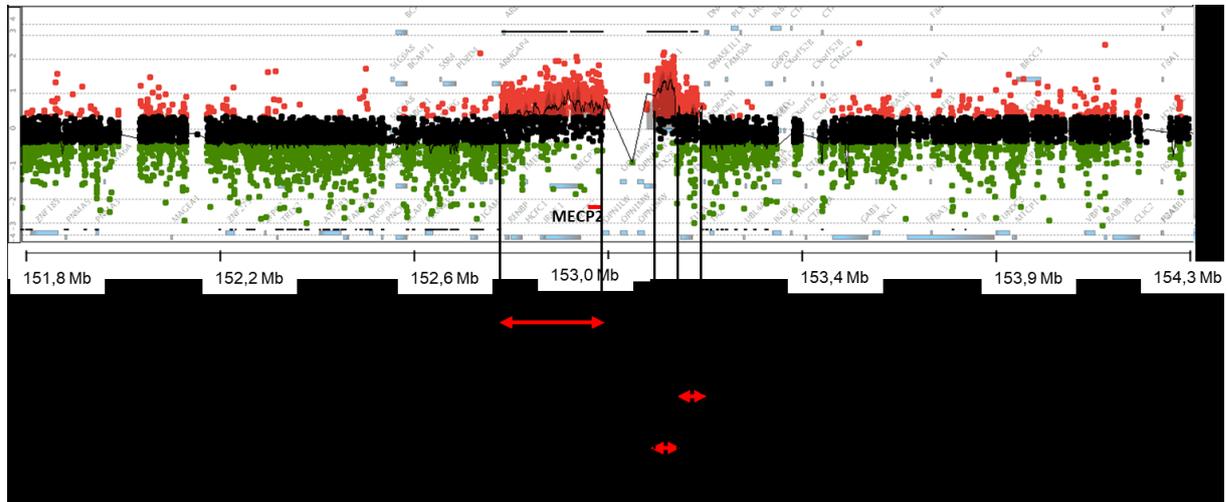
3.4.3 Paciente 4219

A análise do paciente revelou que todo o segmento duplicado apresenta uma extensão de aproximadamente 420 Kb (ChrX:152,846,170-153,266,394), sendo essa a menor duplicação identificada entre os pacientes relatados nesse estudo. A região do rearranjo é formada por uma duplicação intercalada com um segmento triplicado (DUP-TRP/INV-DUP), onde a triplicação representa uma sequência menor da região alterada [ChrX: 153,157,753-153,221,909 (64 Kb)] (Figura 16a).

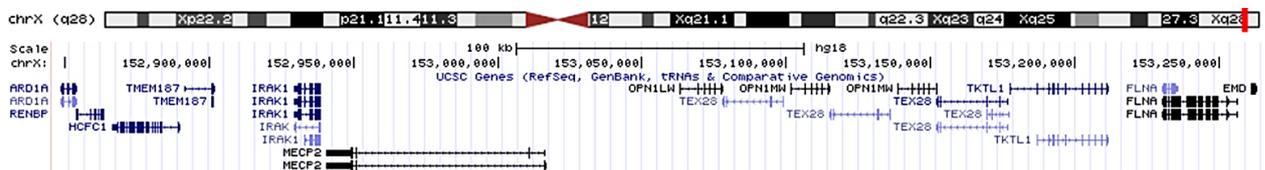
O conteúdo gênico envolvido no rearranjo foi identificado através da utilização do *Genome Browser*. Além do *MECP2*, mais oito genes estão envolvidos na duplicação. O primeiro segmento duplicado abrange os genes *ARD1A*, *RENBP*, *HCFC1*, *TMEM187*, *IRAK1*, *OPN1LW*; enquanto que o segundo segmento contém os genes *FLNA* e *EMD*. Quanto ao conteúdo gênico compreendido no segmento triplicado há no total três genes, sendo eles: *TEX28*, *OPN1MW* e *TKTL1* (Figura 16b).

Figura 16 - Mapeamento da extensão e conteúdo gênico da duplicação identificada no paciente 4219.

(a) Resultado da análise de *array*-CGH



(b) Conteúdo gênico envolvido na duplicação em Xq28



Legenda: (a) Os resultados da técnica de *array*-CGH são representados em um gráfico de dispersão, no qual o eixo y representa a relação \log_2 (Cy5/Cy3), enquanto o eixo x expressa as coordenadas genômicas no cromossomo X. Os pontos em vermelho representam ganho de cópia em relação ao grupo controle (duplicação- *threshold* de 0,6; triplicação- *threshold* de 1,2) e os pontos pretos são os resultados considerados normais. As setas pretas indicam a posição genômica aproximada do início e término da duplicação. Os *gaps* entre as linhas representam intervalos em que não foi possível inferir o *status* do número de cópias, devido a uma fraca cobertura de sonda em virtude da presença de LCRs. (b) Representação do conteúdo gênico envolvido na duplicação de Xq28 obtida no UCSC *Genome Browser* versão *Human March 2006* (NCBI36/hg18).

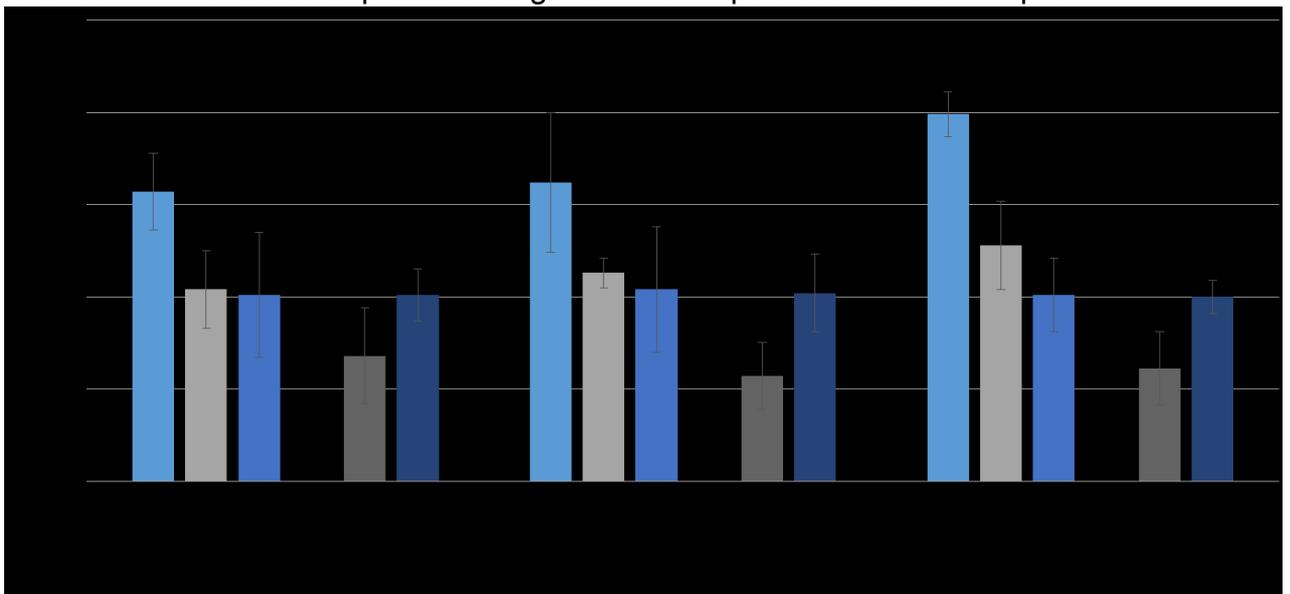
Fonte: A autora, 2018.

3.5 Análise de expressão

3.5.1 Análise de expressão do gene *MECP2*

O ensaio de expressão do gene *MECP2* foi conduzido através do cDNA em células sanguíneas dos probandos 565 e 4219 e da mãe 4219A, portadora da duplicação em Xq28. Para este fim, fez-se o uso da técnica de RT-qPCR pelo sistema SYBR™ Green (Gráfico 1). A análise revelou que o paciente 565 apresenta um aumento de expressão relativa de 1,72 vezes em relação ao grupo controle (média entre o *fold difference* obtido para os normalizadores). Em contrapartida, o paciente 4219, aparentemente, não apresentou o aumento de expressão do gene *MECP2* (média do *fold difference*= 1,15), exibindo resultados similares aos observados no grupo controle. A mãe 4219A que apresenta a duplicação, exibiu níveis normais de expressão (média do *fold difference*= 0,62) e é cognitivamente inalterada. O paciente 4219 e sua mãe ainda não retornaram para uma nova coleta de sangue e repetição dos ensaios de qPCR.

Gráfico 1 - Análise de expressão do gene *MECP2* pela técnica de RT-qPCR.



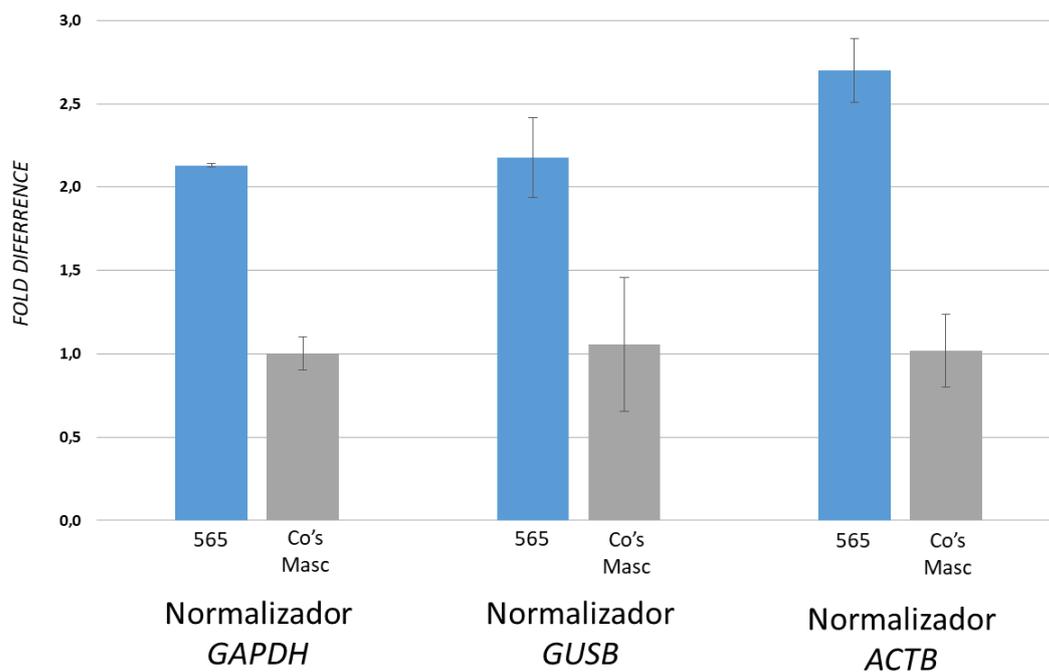
Legenda: Verificação dos níveis de expressão dos pacientes 565, 4219 e 4219A comparados com dois controles normais dos respectivos sexos. Os genes glyceraldehyde-3-phosphate *dehydrogenase* (*GAPDH*), *beta glucuronidase* (*GUSB*) e *actin beta* (*ACTB*) foram utilizados como genes de referência. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão das replicatas experimentais.

Fonte: A autora, 2018.

3.5.2 Análise de expressão do gene *GDI1*

Tendo em vista que o paciente 565 apresenta um rearranjo que compreende o gene *GDI1*, um gene de destaque relacionado com a DILX, foi conduzida a análise de expressão desse gene. Os resultados obtidos demonstram um aumento de expressão relativa de 2,33 vezes em comparação com o grupo controle (média entre o *fold difference* obtido para os normalizadores) (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Análise de expressão do gene *GDI1* pela técnica de RT-qPCR.



Legenda: Verificação dos níveis de expressão do paciente 565 comparado com dois controles normais do mesmo sexo. Os genes *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*, *beta glucuronidase (GUSB)* e *actin beta (ACTB)* foram utilizados como genes de referência. Os resultados são apresentados na forma de média \pm desvio padrão das replicatas experimentais.

Fonte: A autora, 2018.

4 DISCUSSÃO

O genoma humano é estruturalmente dinâmico e apresenta grande variabilidade genética, manifestada sob a forma de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), pequenos polimorfismos de inserção-deleção (*indels*), sequências repetitivas de número variável e variações estruturais (Iafrate *et al.*, 2004), que incluem as VNCs. Aproximadamente 12-16% do genoma humano (Li & Olivier, 2013) são formados por VNCs, o que as tornam mais comuns que os SNPs (Harel & Lupski, 2017). As VNCs são caracterizadas principalmente por deleções, duplicações ou multiplicações de cópias de segmentos do DNA de um par de cromossomos homólogos (Carvalho & Lupski, 2016). Um total de 552.586 VNCs foram listadas no banco de dados Database of Genomic Variant (DGV, 2018) e embora a maior parte seja benigna, uma parcela substancial dessas é capaz de gerar consequências funcionais, incluindo diferentes distúrbios neurológicos e do neurodesenvolvimento (Carvalho & Lupski, 2016).

Estudos empregando *whole-genome microarrays* foram conduzidos a fim de elucidar as causas submicroscópicas da DI, demonstrando um importante papel das VNCs para o desenvolvimento da condição (Vissers *et al.*, 2005). Ainda, o rastreamento do cromossomo X revelou que as VNCs submicroscópicas patogênicas são responsáveis por 5%–15% dos casos de DI. Entre as regiões do genoma com maior susceptibilidade à formação de tais rearranjos estão as regiões Xp11.2 e Xq28, sendo essa última, o *locus* do gene *MECP2* (Whibley *et al.*, 2010).

As duplicações envolvendo o gene *MECP2* são os rearranjos mais comuns relacionados com o desenvolvimento da DILX (Lugtenberg *et al.*, 2009). Até o momento, 200 casos de duplicação do gene *MECP2* foram reportados na literatura (Yi *et al.*, 2016). Tais rearranjos já foram descritos em homens e também em mulheres, sendo consideradas 100% penetrantes para a DI em indivíduos do sexo masculino (Na *et al.*, 2013). A correlação entre a patogenicidade das duplicações e os fenótipos apresentados pelos pacientes afetados, levou ao estabelecimento de uma condição clínica, que ficou conhecida como Síndrome da duplicação do *MECP2* (Van Esch, 2012). As características clínicas que são comumente observadas em indivíduos do sexo masculino portadores dessa síndrome constituem na DI severa a profunda,

atraso do desenvolvimento ou fala limitada, atraso do desenvolvimento motor, hipotonia (100%) e predisposição a infecções respiratórias (75%) (Van Esch, 2008).

4.1 Rastreamento de VNCs no gene *MECP2*

No presente estudo, a avaliação da frequência de VNCs no gene *MECP2* em uma amostra de 920 pacientes com DI idiopática foi conduzida por meio da metodologia de PCR em tempo real quantitativo, utilizando o sistema TaqMan. A análise possibilitou a identificação de três indivíduos portadores de duplicação no gene *MECP2*, o que representa uma frequência de 0,33% (3/920). No entanto, tendo em vista que a análise molecular foi realizada apenas no exon 4, não se pode excluir a possibilidade de não terem sido detectadas duplicações ou deleções intragênicas nos exons 1, 2 e 3; embora somente dois rearranjos no gene *MECP2* desse tipo, tenham sido relatados na literatura (Lugtenberg *et al.*, 2009; Hanchard *et al.*, 2012).

Apesar dos casos já descritos na literatura, a incidência exata das duplicações em indivíduos do sexo masculino ainda não é conhecida, pelo fato de análises não terem sido conduzidas na população em geral. No entanto, estudos baseados em *array*-CGH realizados nas populações norte americanas (del Gaudio *et al.*, 2006) e européias (Lugtenberg *et al.*, 2009) indicam uma incidência que varia entre 1-2%.

A prevalência da duplicação do gene *MECP2* depende basicamente dos critérios de inclusão na amostra [padrão de herança (ligado ao X, familiar ou esporádico); nível de severidade da DI (branda, moderada ou severa); características clínicas além da DI e exclusão de outras causas genéticas da DI], da metodologia empregada para a análise molecular [*array*-CGH; MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*); qPCR] e do tamanho amostral. Sendo assim, quando são estabelecidos critérios de inclusão específicos, tal como a severidade fenotípica e um padrão de herança ligado ao X, a frequência de detecção aumenta. Tal fato foi observado no trabalho de Van Esch *et al.* (2005), no qual foram selecionados indivíduos do sexo masculino portadores de DI e espasticidade progressiva, o que possibilitou a observação de uma frequência igual à 17,6% na amostra (3/17). Além

deste, Friez *et al.* (2006) demonstraram uma frequência equivalente à 11,8% (2/17), a partir da seleção de indivíduos do sexo masculino portadores de DI ligada ao X.

A frequência de 0,33% de indivíduos portadores de duplicação envolvendo o gene *MECP2* identificada em nosso estudo, que utilizou a presença de DI idiopática como critério de inclusão, se mostra compatível com as frequências detectadas nos trabalhos realizados em amostras amplas que não tiveram critérios de seleção específicos. O trabalho de Shao *et al.* (2008), realizou o rastreamento de rearranjos subteloméricos em um grande grupo amostral, não selecionado, composto por 5.380 indivíduos residentes nos Estados Unidos. Tais indivíduos apresentavam fenótipos distintos, incluindo DI, distúrbio do desenvolvimento, autismo, distúrbio convulsivo e outros distúrbios comportamentais. Para este fim, foi empregada a tecnologia de *array*-CGH de alta cobertura em regiões subteloméricas, permitindo a identificação de 16 indivíduos (~0,30%) do sexo masculino, portadores de duplicação em Xq28 envolvendo o gene *MECP2*. No trabalho de revisão de Ramocki *et al.* (2010), os autores relatam que no laboratório de sua instituição, por um período de 3 anos, foi realizado como rotina para o diagnóstico clínico o rastreamento por *array*-CGH de 4.683 indivíduos do sexo masculino, que possuíam as características clínicas distintas como atraso do desenvolvimento, DI, características dismórficas, anomalias congênitas múltiplas, autismo, epilepsia, baixa estatura ou outros fenótipos correlatos. A análise molecular destes pacientes revelou que 19 indivíduos eram portadores de duplicação no gene *MECP2*, demonstrando uma frequência de 0,41%. Além disso, por comunicação pessoal com a pesquisadora Sau Wai Cheung, os autores citam que a análise conduzida em 600 indivíduos controle que eram parentes de meninos portadores de duplicação do gene *MECP2* não detectou nenhuma duplicação nesse gene.

O método de *array*-CGH, atualmente é considerado o teste inicial para a análise molecular de pacientes com DI, por apresentar alto rendimento de diagnóstico, elevada resolução e ser eficaz na identificação de rearranjos subteloméricos, tal como as VNCs. No entanto, apesar de suas vantagens, a técnica ainda apresenta um elevado custo e o processo de execução é laborioso. Em relação ao *array*-CGH, para o rastreamento de alvos previamente estabelecidos, o PCR em tempo real quantitativo possui um melhor custo-benefício, tendo em vista que esse é menos dispendioso e apresenta maior praticidade de execução. Além disso, tendo em vista que os resultados identificados foram posteriormente confirmados por *array*-CGH, os dados

gerados pelo presente estudo demonstram que o PCR em tempo real quantitativo por TaqMan® *copy number assay* é uma metodologia sensível e segura para o rastreamento de microduplicações.

4.2 Correlação fenotípica e análise de extensão das duplicações identificadas

As duplicações envolvendo o gene *MECP2* são rearranjos grandes variando entre 79,7 Kb a 15,5 Mb (zhang *et al.*, 2015) e, na maior parte dos casos, envolvem os genes adjacentes. Caracteristicamente, os rearranjos abrangendo o gene *MECP2* são classificados como não-recorrentes, pelo fato de apresentarem pontos de quebra em regiões distintas, exibindo uma ampla variedade de tamanhos entre os indivíduos afetados (Bauters *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2009). As duplicações envolvendo o gene *MECP2*, já relatadas na literatura, apresentam uma região de sobreposição mínima entre esses rearranjos que compreende somente os genes *MECP2* e *IRAK1* (Carvalho *et al.*, 2009). Sendo assim, as características clínicas compartilhadas entre os portadores dos rearranjos são devido à região de sobreposição mínima, na qual os mesmos genes se encontram afetados. Tal fato sugere que esses genes sejam os causadores dos fenótipos apresentados pelos pacientes, sendo o gene *MECP2* o responsável pelos fenótipos neurológicos (Chahrour *et al.*, 2007). Enquanto isso, o gene *IRAK1* (*Interleukin 1 receptor associated kinase 1*) codifica a proteína membro das vias de sinalização do Toll-like receptor (TLR) e IL-1R, sendo esse um mediador da sinalização da imunidade inata e do controle da resposta imune adaptativa (Gottipati *et al.*, 2008). Achados recentes demonstram que o aumento da suscetibilidade às infecções na síndrome da duplicação do *MECP2* se deve basicamente à deficiência de IgA/IgG2, baixos níveis de anticorpos contra pneumococos e respostas elevadas de fase aguda (Bauer *et al.*, 2015).

A análise clínica dos pacientes portadores de duplicação em Xq28 envolvendo o gene *MECP2* demonstrou que as características clínicas estavam em concordância com dados anteriores da literatura (Van esch *et al.*, 2005; Ramocki *et al.*, 2010). Todos os pacientes apresentaram DI severa, infecções respiratórias recorrentes, atraso da fala, características autísticas, perímetro cefálico aumentado e orelhas grandes. Ambos os pacientes 565 e 4219, nos quais a reavaliação clínica foi realizada

apresentaram atraso no desenvolvimento motor, hipotonia, disfunção da bexiga, ansiedade e movimento estereotipado das mãos. Além disso, alterações no cerebelo foram observadas no paciente 565, característica essa que já foi identificada em outros pacientes portadores de duplicação no gene *MECP2* (Van Esch, 2008).

4.2.1 Delimitação da extensão das duplicações

A delimitação dos pontos proximais e distais dos rearranjos demonstrou que cada paciente possuía duplicações de tamanhos únicos, variando de 420 Kb a 2 Mb, estando em concordância com dados da literatura sobre a natureza não recorrente das duplicações envolvendo o gene *MECP2*. A determinação da região de sobreposição mínima entre as duplicações dos pacientes aqui relatados, demonstrou um segmento que abrange os genes *MECP2*, *IRAK1*, *OPN1LW*, *TEX28*, *OPN1MW*, *TKTL1*, *FLNA* e *EMD* (Tabela 10).

Tabela 10 - Genes localizados na região de sobreposição mínima das duplicações identificadas nos pacientes 58, 565 e 4219.

Símbolo do gene	Nome	Função	Associação clínica
IRAK1	<i>Interleukin 1 receptor associated kinase 1</i>	Indução do início da resposta mune inata contra patógenos, estando envolvido nas vias de sinalização do Toll-like receptor (TLR) e IL-1R	Susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças infecciosas e desequilíbrio da resposta imune
MECP2*	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>	Ligação à região metilada do DNA, promovendo a regulação da transcrição gênica	Síndrome de <i>Rett</i> e DI
OPN1LW	<i>Opsin 1, long wave sensitive</i>	Pigmentos visuais que absorvem luz de comprimento de onda longo	Grau elevado de miopia sindrômica e não-sindrômica ligada ao X
TEX28	<i>Testis expressed 28</i>	Não há função conhecida	Não há função conhecida
OPN1MW	<i>Opsin 1, medium wave sensitive</i>	Pigmentos visuais que absorvem luz de comprimento de onda médio	Distrofia dos cones oculares
TKTL1	<i>Transketolase like 1</i>	Participa da via das pentoses fosfato, através da catálise de uma cetose de dois carbonos para um aceptor de aldose	Síndrome de Wernicke-Korsakoff
FLNA*	<i>Filamin A</i>	Ancora proteínas transmembranares ao citoesqueleto de actina e serve como uma ponte de sinalização com proteínas citoplasmáticas	Associação com as síndromes: heterotopias nodulares periventriculares, síndromes otopalatodigitais, displasia frontometafisária, síndrome de Melnick-Needles e pseudoobstrução intestinal idiopática congênita ligadas ao X
EMD	<i>Emerin</i>	Estabiliza e promove a formação de uma rede nuclear de actina cortical	Distrofia muscular de Emery-Dreifuss

Legenda: *Genes que foram associados à DILX

Fonte: A autora, 2018.

4.2.1.1 Paciente 58

O paciente 58 apresentou uma duplicação simples com a extensão de 535 Kb. A delimitação dos pontos de quebra do rearranjo demonstrou a presença de 28 genes compreendidos no segmento duplicado, o qual inclui, além do *MECP2*, outros genes de destaque também relacionados à DILX, sendo esses o *L1CAM*, *FLNA*, *RPL10* e o *GDI1*. O gene *L1CAM* (*L1 cell adhesion molecule*) codifica a molécula de adesão celular L1, que no SNC atua nos processos de migração de células neuronais, sinaptogênese, proliferação neuronal e sobrevivência celular (Otter *et al.*, 2017). Mutações patogênicas no gene *L1CAM* foram descritas em pacientes com um amplo espectro de condições neurológicas e DI, dentre as quais as duplicações nesse *locus* foram relacionadas ao desenvolvimento de hidrocefalia e outros fenótipos como a síndrome MASA (DI, afasia, paraplegia espástica, polegares aductos), SPG1 (paraplegia espástica do tipo 1 hereditária) e agenesia de corpo caloso (Adle-Biassette *et al.*, 2013).

Outro gene envolvido na duplicação é o *FLNA*, o qual está contido na região SRO, sendo responsável pela codificação da proteína filamina A, que se liga à actina e promove o processo de remodelagem do citoesqueleto (Nakamura *et al.*, 2011). Mutações nesse gene afetam a migração neuronal por não induzir a reorganização da actina (Bolduc *et al.*, 2009). As síndromes associadas a mutações no gene *FLNA* apresentam uma série de alterações esqueléticas severas, anomalias craniofaciais, cardíacas, genitourinárias e intestinais e um amplo espectro de DI. As características do SNC incluem um amplo espectro de DI, hidrocefalia e hipoplasia cerebelar (Stevenson *et al.*, 2013).

O gene *RPL10* (*ribosomal protein L10*) codifica a proteína *60S ribosomal protein L10* (*rpl10*), componente da subunidade 60S do ribossomo (Brooks *et al.*, 2014). Inicialmente, o gene *RPL10* foi relacionado com o desenvolvimento de autismo, e os indivíduos com mutações neste gene podem ou não apresentar a DI (Klauck *et al.*, 2006). No entanto, análises de famílias com DILX, demonstraram mutações patogênicas no gene *RPL10* em indivíduos portadores de DI síndrômica, os quais apresentaram outras manifestações clínicas como atraso do desenvolvimento motor, características faciais como orelhas grandes, anomalias do sistema urogenital, microcefalia e miopia moderada a grave (Thevenon *et al.*, 2015).

O terceiro gene corresponde ao *GDI1* (*GDP dissociation inhibitor 1*), que é altamente expresso no cérebro e codifica a proteína *Rab GDP dissociation inhibitor alpha* (Rab GDI alpha). A proteína Rab GDI alpha regula o tráfego de vesículas, por meio da recuperação das proteínas Rab (família de proteínas *Ras-like GTPases*) da membrana após um evento de transporte vesicular (Pereira-Leal & Seabra, 2001). O gene *GDI1* é sensível a dosagem, desta maneira o equilíbrio dos níveis da proteína GDI1 é fundamental para que o tráfego vesicular e a liberação de neurotransmissores aconteçam. Sendo assim, o aumento da dosagem também afeta o mecanismo Rab GTPase, envolvido na sinalização das células neuronais (Vandewalle *et al.*, 2009). A relação de mutações no gene *GDI1* com o desenvolvimento da DILX foi estabelecida a partir da observação de tais alterações entre indivíduos de grandes famílias, cuja a única manifestação clínica era a DI. Ainda, os indivíduos do sexo masculino exibiram DI variando de moderada a severa (Strobl-Wildemann *et al.*, 2011).

4.2.1.2 Paciente 565

O paciente 565 exibiu a maior duplicação entre os indivíduos detectados nesse estudo. A duplicação em Xq28 desse paciente foi gerada a partir de um evento de translocação. As duplicações na região de Xq28 podem ocorrer a partir de uma duplicação intracromossômica ou através de uma translocação não balanceada entre Xq e Xp, ou entre Xq e o cromossomo Y (Breman *et al.*, 2011). O surgimento de rearranjos em Xq28 a partir do processo de translocação é mais raro e, em geral, estes rearranjos apresentam tamanhos maiores, variando entre 8 e 23 Mb. Além disso, os fenótipos observados nesses pacientes são severos (Van Esch, 2012).

O rearranjo apresentado pelo paciente 565 tem aproximadamente 2 Mb de extensão e a delimitação dos pontos de quebra demonstrou a presença de 56 genes no segmento duplicado. Dentre os genes identificados, nove são relacionados à DILX, incluindo o *MECP2* (*FLNA*, *GDI1*, *RPL10*, *IKBKG*, *DKC1*, *RAB39B*, *CLIC2* e *TMLHE*). Além dos genes *FLNA*, *GDI1* e *RPL10* cujas funções e associações clínicas foram descritas anteriormente, o *RAB39B* também é um gene de destaque associado ao desenvolvimento da DI. O gene *RAB39B* (*RAB39B*, *member RAS oncogene Family*) gera a proteína de mesmo nome, membro da família RAS-like GTPase, a qual atua no

processo de regulação do tráfego vesicular (Mignogna *et al.*, 2015). Recentemente, foi demonstrado que duplicações envolvendo esse gene promovem o aumento de expressão gênica, acarretando na diminuição da ramificação de neurônios primários e do número de terminais pré-sinápticos. Os pacientes portadores dessas duplicações apresentaram DI leve a moderada, características faciais brandas e problemas comportamentais, como agressividade e dificuldade de socialização (Vanmarsenille *et al.*, 2013).

Adicionalmente à duplicação, o paciente 565 apresentou uma deleção em Yp na região PAR1, a qual abrange cinco genes (*PLCXD1*, *BC033659*, *GTBP6*, *PPP2R3B*, *SHOX*). O único gene envolvido no rearranjo relacionado com o desenvolvimento de uma condição é o *SHOX* (*short stature homeobox*) (Blaschke *et al.*, 2006). Considerando a multiplicidade de fatores genéticos que afetam o crescimento, o gene *SHOX* desempenha um papel importante na formação e desenvolvimento do tecido ósseo. O gene *SHOX* é sensível à dosagem (Binder & Rappold, 2005), sendo assim deleções e mutações que levem à perda de função da proteína resultam na desordem da deficiência de *SHOX*, que causa insuficiência de crescimento, baixa estatura idiopática, Síndrome *Léri-Weill* caracterizadas pela deformidade de *Madelung* e alterações esqueléticas menos específicas (Binder, 2011).

4.2.1.3 Paciente 4219

O paciente 4219 apresentou a menor duplicação entre os pacientes relatados. O rearranjo exibido é complexo, apresentando um segmento triplicado incorporado entre as duplicações, o qual foi inserido em uma orientação invertida em relação ao genoma de referência (DUP-TRP/INV-DUP). Somente esse paciente apresentou um rearranjo com tal configuração, dentre os descritos no presente estudo. O primeiro segmento duplicado apresenta aproximadamente 227 Kb, no qual o gene *MECP2* está contido junto com mais seis genes (*ARD1A*, *RENBP*, *HCFC1*, *TMEM187*, *IRAK1*, *OPN1LW*), enquanto que o segundo segmento é menor, ~44 Kb, e abrange dois genes (*FLNA*; *EMD*). O segmento triplicado se estende por 64 Kb, envolvendo os

genes *TEX28* e *TKTL1*. Além dos genes *MECP2* e *FLNA*, nenhum outro gene presente no rearranjo foi associado com a DI.

4.3 Análise de expressão

A avaliação da expressão dos genes *MECP2* e *GDI1* foi conduzida através da obtenção do cDNA de células sanguíneas dos pacientes, o tecido mais viável para este tipo de análise, tendo em vista que uma biópsia cerebral não seria possível. No entanto, cabe ressaltar que ambos os genes têm expressão significativa no sangue periférico (version 18. proteinatlas.org), o que permite o estabelecimento de uma correlação em relação a alterações nos níveis de expressão gênica, mesmo que essa seja diferente nesses tecidos. A expressão do gene *MECP2* no paciente 565 apresenta um aumento de expressão relativa de 1,72 vezes em relação ao grupo controle. Esses dados estão de acordo com relatos prévios da literatura, que demonstraram aumento da expressão do gene *MECP2* de aproximadamente 2 vezes em indivíduos portadores de duplicação envolvendo todo o gene *MECP2* em relação aos indivíduos controles (Meins *et al.*, 2004; Van Esch *et al.*, 2005). Quanto ao gene *GDI1*, também foi observado o aumento de expressão relativa, indicado pela média de *fold difference* igual a 2,33. Os resultados obtidos estão em concordância com os dados da literatura que indicam o aumento de expressão do gene *GDI1* variando de 2,8 a 5 vezes (Madrigal *et al.*, 2007; Vandewalle *et al.*, 2009). Os valores elevados de expressão estão de acordo com recentes achados que indicam que duplicações envolvendo um dado gene não necessariamente levam ao dobro de sua expressão, podendo ser observado um aumento de 2 até 6 vezes (Santos-Rebouças *et al.*, 2015).

A avaliação da expressão no 4219, no entanto, não indicou, aparentemente, o aumento de expressão do gene *MECP2*, apresentando uma média de *fold difference* de 1,15. Infelizmente, este paciente ainda não retornou para a confirmação destes resultados em uma nova amostra de RNA. Contudo, estes dados sugerem que o gene *MECP2* não estaria, a princípio, relacionado por um efeito de dosagem com o desenvolvimento da DI nesse paciente em específico.

Uma possível explicação para o nível de expressão aparentemente normal observado no paciente 4219 é o efeito de posição causado pela duplicação. A

regulação do processo de transcrição do gene *MECP2* é complexa e envolve elementos *cis*-atuantes localizados a longas distâncias (Singh *et al.*, 2008). Tal fato pode ser corroborado a partir da presença de sequências potencializadoras de *splicing* do gene *MECP2* localizadas na região a montante entre os genes *IRAK1* e *CXorf12*, e na região a montante do intron 1 do gene *HCFC1*. Além desses, potencializadores e silenciadores de *splicing* do *MECP2* foram identificados na região do gene *L1CAM* (Liu & Francke, 2006). A presença de duplicações nessas sequências pode interromper o controle da transcrição gênica através da alteração da interação entre o promotor e a unidade de transcrição, com seus reguladores *cis*-atuantes (Liu & Francke, 2006). Além disso, dado que os elementos *cis*-atuantes podem atuar a longas distâncias, é possível que esses regulem a expressão não apenas de um gene específico, mas de um conjunto de genes (Kleinjan & Heyningen, 2005). Sendo assim, nossa hipótese consiste em que a duplicação no paciente 4219 não está *em tandem* (duas sequências idênticas, uma após a outra, em um segmento cromossômico) e, poderia estar localizada em uma sequência *cis*-atuante que regule a transcrição de genes envolvidos com a DI, levando ao ganho ou perda de função destes e, conseqüentemente, ao fenótipo observado.

A segunda possibilidade está relacionada com o efeito de outros genes compreendidos na duplicação, que poderiam influenciar o fenótipo neurológico no paciente 4219, tal como o gene *FLNA*, que já foi relacionado com o desenvolvimento da DI em homens, e está contido no rearranjo. Duplicações envolvendo esse gene foram relacionadas com alguns fenótipos apresentados por indivíduos portadores da síndrome de duplicação do gene *MECP2*. Sendo assim, esse gene poderia estar levando ao desenvolvimento da DI e de outros fenótipos apresentados por nosso paciente. Além disso, mutações no gene *FLNA* que levam ao ganho de função da proteína geram diferentes síndromes (síndrome otopalatodigital I ou II e síndrome de Melnick-Needles), nas quais a única característica clínica que se sobrepõe com as apresentadas pelos pacientes com duplicação do gene *MECP2*, é a DI (Lugtenberg *et al.*, 2009).

Esta visão é sustentada por estudos prévios que demonstraram que indivíduos portadores de duplicação em Xq28 que não envolvia o gene *MECP2*, mas os genes *GDI1* e *FLNA*, apresentavam DI variando de moderada a severa e outras características clínicas observadas em indivíduos com duplicação no gene *MECP2* (Vandewalle *et al.*, 2009). A análise de expressão desses genes indicou que a

severidade da DI e de outras características clínicas, estava relacionada com o nível de expressão do gene *GDI1* (Vandewalle *et al.*, 2009). Esses achados sugerem que outros genes sensíveis a dosagem contidos nos rearranjos podem, por si só, resultar em um fenótipo clínico. Além disso, tendo em vista que mutações em outros genes relacionados a DI, tal como *SLC6A8*, *L1CAM*, *FLNA*, *GDI1*, *IKBKG* e *DKC1*, que comumente são afetados pela duplicação, podem resultar no desenvolvimento da DI e autismo, criou-se a hipótese de que os fenótipos nos probandos sejam modificados através de um efeito aditivo ou epistático entre o *MECP2* e outros genes envolvidos na duplicação (Honda *et al.*, 2012; Lin *et al.*, 2014).

4.4 **Análise das mães 565A e 4219A**

4.4.1 Análise de segregação das duplicações

Na DI, 10% das VNCs causais são ligadas ao X, dentre as quais de 80-90% são herdadas da mãe (Hehir-Kwa *et al.*, 2013). O rastreamento conduzido em famílias de pacientes portadores de duplicação no gene *MECP2* por Carvalho e colaboradores (2009) indicou que 70% desses rearranjos são herdados maternalmente (21/30). A análise de segregação nas mães 565A e 4219A demonstrou que a mãe 4219A é portadora da duplicação. Sendo assim, os resultados indicam que a duplicação no gene *MECP2* no paciente 4219 foi herdada, enquanto que no 565 essa alteração é *de novo*.

4.4.2 Análise do padrão de inativação do cromossomo X e expressão do gene *MECP2*

Em uma etapa posterior, foi determinado o padrão de inativação do cromossomo X em 565A e 4219A. A mãe 565 com a dosagem de cópias normal em

Xq28, apresentou uma razão de 32:68 para o marcador *AR* e 23:77 para o marcador *RP2*, indicando um padrão aleatório de inativação. A mãe 4219A, portadora da duplicação em Xq28 apresenta um desvio de inativação demonstrado pela razão de 86:14 para o marcador *AR* e 89:11 para o marcador *RP2*. A proporção de inativação da mãe 4219A indica que há desvio de inativação (>80%), resultando na inativação preferencial de um cromossomo X. A análise de expressão do gene *MECP2* nessa mulher indicou um resultado normal, similar ao obtido para o grupo controle. Tal fato sugere que o cromossomo X com a duplicação do gene *MECP2* tenha sido preferencialmente inativado, levando a uma dosagem normal desse gene, e conseqüentemente ao fenótipo assintomático observado. Os dados obtidos estão condizentes com outros trabalhos na literatura que mostram que a maior parte das mulheres portadoras de duplicação no gene *MECP2*, que são cognitivamente normais, apresentam um desvio extremo de inativação (Van Esch *et al.*, 2005; del Gaudio *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2015). Ainda, no trabalho desenvolvido por Bauters e colaboradores (2008) a análise em 16 mães de indivíduos portadores de duplicação em Xq28, que também apresentavam essa alteração, demonstrou que todas possuíam desvio extremo de inativação.

A análise da expressão do gene *MECP2* demonstrou que a mãe 4219A, mesmo sendo portadora da duplicação envolvendo o gene *MECP2*, apresenta níveis normais de expressão, refletido no *fold difference* de 0,62. Tal resultado em conjunto com os dados indicando um desvio de inativação do cromossomo X, sugerem que a mãe 4219A tenha inativado o cromossomo afetado pela duplicação.

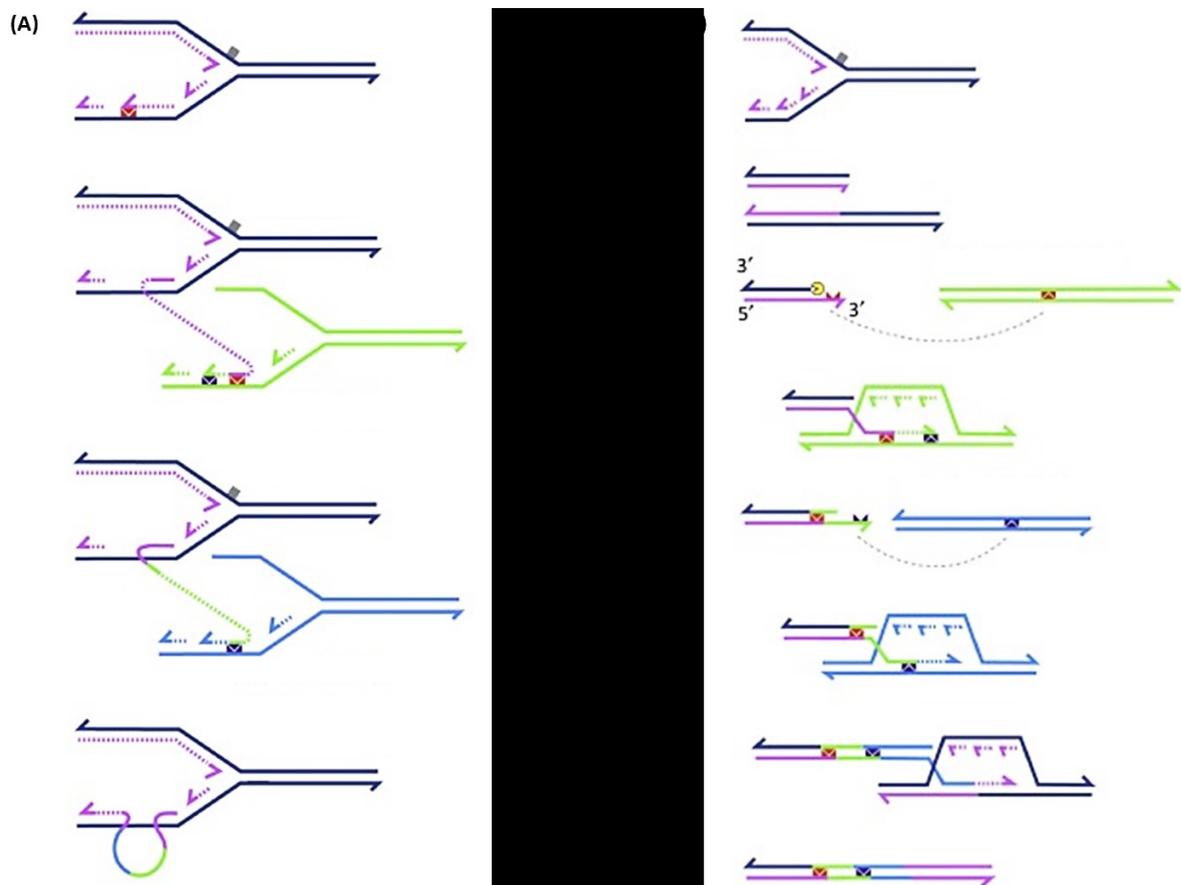
4.5 Possíveis mecanismos envolvidos na formação das duplicações identificadas

A formação de duplicações intracromossômicas envolvendo o gene *MECP2* ocorre a partir de dois eventos. O primeiro refere-se ao modelo FoSTeS, o qual foi proposto para explicar a formação de rearranjos complexos que eram inconsistentes com os outros mecanismos de formação de VNCs não recorrentes [*non-homologous end joining* (NHEJ) e RBMs como *break-induced replication* (BIR)] (Zhang *et al.*, 2009). De acordo com esse mecanismo, durante a replicação do DNA ocorre a interrupção

do processo em uma dada forquilha de replicação e a fita *lagging* se desprende da forquilha original e invade uma forquilha adjacente. Esse processo se dá em decorrência da presença de microhomologia na região 3' terminal de uma forquilha de replicação e de uma próxima, a qual irá atuar como um *primer* para o reinício da síntese de DNA até que se complete a duplicação da forquilha original (figura 17a) (lee *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2008). Tal processo promove a transferência de um dado segmento do genoma para outro local, podendo ocorrer várias vezes em sequência, gerando rearranjos complexos (Gu *et al.*, 2008).

O mecanismo MMBIR foi proposto para explicar com mais detalhes o surgimento de rearranjos mais complexos do que os gerados pelo FoSTeS (Hastings *et al.*, 2009). Nesse modelo, a arquitetura genômica complexa da região, tal como a presença de LCRs invertidos, promovem a quebra da dupla fita de DNA durante o processo de replicação. A microhomologia presente na região 3' terminal da sequência rompida e de um segmento fita simples de DNA disponível promovem a formação de uma forquilha, reiniciando o processo de replicação (Ottaviani *et al.*, 2014). Tal modelo explica a formação dos rearranjos que apresentam triplicações invertidas entre segmentos duplicados, observados nos pacientes portadores de duplicação envolvendo o gene *MECP2*. Na figura 17, propomos os mecanismos de formação dos rearranjos nos pacientes 58 e 4219.

Figura 17 – Possíveis mecanismos envolvidos na formação das duplicações nos pacientes duplicados 58 e 4219.



Legenda: Mecanismos de replicação mediados por microhomologia, FoSTeS e MMBIR responsáveis por gerar rearranjos complexos. (A) No mecanismo FoSTeS, durante o processo de replicação, lesões ou estruturas secundárias podem levar à parada do processo (quadrado cinza). A fita *lagging* (roxa pontilhada) invade uma forquilha de replicação adjacente, a qual se anela ao segmento por meio da microhomologia (quadrado vermelho) e atua como um primer para o início da síntese. Uma segunda forquilha pode ser invadida pela fita *lagging*, continuando a duplicação. Essa fita pode voltar a forquilha original, terminando o processo de replicação. (B) No mecanismo MMBIR, a forquilha de replicação é interrompida por uma lesão do DNA ou por sequências repetitivas invertidas (quadrado cinza), tal como LCRs. Posteriormente, e então a endonuclease quebra a dupla fita de DNA. A fita 3' invade uma molécula uma dupla fita próxima e se anela, por meio da microhomologia. A estrutura formada se torna uma forquilha de replicação, dando prosseguimento ao processo. A baixa capacidade de processamento da DNA polimerase faz com que a fita de 3' se desengate da forquilha. Essa fita por microhomologia se anela em um segmento de uma forquilha próxima. A troca de forquilha é interrompida quando uma DNA polimerase de alta capacidade de processamento possibilita uma síntese contínua.

Fonte: Ottaviani *et al.*, 2014, com alterações.

Em conclusão, esse é o primeiro trabalho a analisar duplicações no gene *MECP2* em uma amostra ampla no Brasil, no qual os dados gerados reforçam a importância do gene *MECP2* na etiologia da DI em indivíduos do sexo masculino e promovem um melhor entendimento sobre as manifestações clínicas em nossa população. Tais evidências demonstram que a avaliação de rearranjos envolvendo o gene *MECP2* deve ser considerada para homens portadores de DI moderada a severa, de origem desconhecida. Além disso, os dados sobre expressão gerados por esse trabalho demonstram que nem todas as duplicações envolvendo o gene *MECP2* levam ao aumento da expressão gênica, indicando outros mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos a montante das duplicações nesse gene e geração dos fenótipos. Ademais, o estudo do gene *MECP2* possibilita um melhor entendimento sobre sua funcionalidade com relação ao desenvolvimento neurocognitivo e suas disfunções, levando à identificação de novos mecanismos moleculares e, assim, ao estabelecimento de estratégias terapêuticas.

CONCLUSÕES

- O rastreamento de VNCs no gene *MECP2* em uma amostra de 920 indivíduos do sexo masculino portadores de DI idiopática possibilitou a identificação de três pacientes portadores de duplicação envolvendo este gene;
- O método de PCR em tempo real quantitativo pelo sistema TaqMan® *copy number assay* constitui uma metodologia sensível, rápida e de custo relativamente baixo para avaliar as duplicações envolvendo o gene *MECP2*;
- A frequência de duplicações detectadas (0,33%) demonstra a relevância desses rearranjos no gene *MECP2* para o desenvolvimento da DI idiopática em homens;
- A delimitação do segmento duplicado demonstrou que os rearranjos se diferem quanto às extensões, características estruturais e conteúdo gênico, nos quais outros genes relacionados à DILX foram identificados;
- Dentre as mães disponíveis para as análises de segregação e inativação do cromossomo X foi verificado que a duplicação em Xq28 envolvendo o gene *MECP2* é *de novo* em um paciente, enquanto que no outro paciente a mesma foi herdada, tendo sido demonstrado que a mãe portadora da duplicação apresenta desvio de inativação do cromossomo X;
- Os dados de expressão do gene *MECP2* obtidos indicam, preliminarmente, que outros mecanismos moleculares, além da dosagem gênica, e que outros genes inseridos na duplicação possam estar relacionados com a geração dos fenótipos em pacientes portadores da síndrome de duplicação do *MECP2*, evidenciando a necessidade de se elucidar a real contribuição deste gene para o desenvolvimento das características clínicas observadas.

REFERÊNCIAS

- ADLE-BIASSETTE, H. *et al.* Neuropathological review of 138 cases genetically tested for X-linked hydrocephalus: evidence for closely related clinical entities of unknown molecular bases. *Acta Neuropathol.*, v. 126, p. 427-442, 2013.
- AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Disponível em: < <https://www.psychiatry.org/> > Acesso em: 04 jan. 2018.
- ASAHARA, H. *et al.* Chromatin-dependent cooperativity between constitutive and inducible activation domains in CREB. *Mol. Cell Biol.*, v. 21, p. 7892-7900, 2001.
- AUSIÓ, J., MARTÍNEZ DE PAZ, A.; ESTELLER, M. MeCP2: the long trip from a chromatin protein to neurological disorders. *Trends Mol. Med.*, v. 20, p. 487-498, 2014.
- BASSANI, S. *et al.* The neurobiology of X-linked intellectual disability. *Neuroscientist*, v. 19, p. 541-552, 2013.
- BAUER, M. *et al.* Infectious and immunologic phenotype of MECP2 duplication syndrome. *J. Clin. Immunol.*, v. 35, p. 168-181, 2015.
- BAUTERS, M. *et al.* Nonrecurrent MECP2 duplications mediated by genomic architecture-driven DNA breaks and break-induced replication repair. *Genome Res.*, v. 18, p. 847-858, 2008.
- BIENVENU, T.; CHELLY, J. Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat. Rev. Genet.*, v. 7, p. 415-426, 2006.
- BINDER, G. Short stature due to SHOX deficiency: genotype, phenotype, and therapy. *Horm. Res. Paediatr.*, v. 75, p. 81-89, 2011.
- BIRD, A. P. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids.*, v. 8, p. 1499-1504, 1980.
- BLASCHKE, R.J.; RAPPOLD, G. The pseudoautosomal regions, SHOX and disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 16, p. 233-239, 2006.
- BOLDUC, F.V. *et al.* Fragile X Mental Retardation 1 and Filamin A Interact Genetically in Drosophila Long-Term Memory. *Front. Neural Circuits*, v. 3, p. 22, 2009.
- BOURDON, V. *et al.* MECP2 mutations or polymorphisms in mentally retarded boys: diagnostic implications. *Mol. Diagn.*, v. 7, p. 3-7, 2003.
- BREMAN, A.M. *et al.* MECP2 duplications in six patients with complex sex chromosome rearrangements. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 19, p. 409-415, 2011.

- BROOKS, S.S. *et al.* A novel ribosomopathy caused by dysfunction of RPL10 disrupts neurodevelopment and causes X-linked microcephaly in humans. *Genetics*, v. 198, p. 723-733, 2014.
- BUSQUE, L. *et al.* Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood*, v. 113, p. 3472-3474, 2009.
- CARVALHO, C.M. *et al.* Complex rearrangements in patients with duplications of MECP2 can occur by fork stalling and template switching. *Hum. Mol. Genet.*, v. 18, p. 2188-21203, 2009.
- CARVALHO, C.M. *et al.* Inverted genomic segments and complex triplication rearrangements are mediated by inverted repeats in the human genome. *Nat. Genet.*, v. 43, p. 1074-1081, 2011.
- CARVALHO, C.M.; LUPSKI, J.R. Mechanisms underlying structural variant formation in genomic disorders. *Nat. Ver. Genet.*, v. 17, p. 224-238, 2016.
- CHAHROUR, M. *et al.* MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science*, v. 320, p. 1224-1229, 2008.
- CHAHROUR, M.; ZOGHBI, H.Y. The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron*, v. 56, p. 422-437, 2007.
- CHAO, H.T.; ZOGHI, H.Y.; ROSENMUND, C. MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. *Neuron*, v. 56, p. 58-65, 2007.
- CHELLY, J. *et al.* Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 14, p. 701-713, 2006.
- CHENG, T.L. *et al.* Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. *Sci. Rep.*, v. 7, p. 1-12, 2017.
- CHOLEWA-WACLAW, J. *et al.* The Role of Epigenetic Mechanisms in the Regulation of Gene Expression in the Nervous System. *J. Neurosci.*, v. 36, p. 11427-11434, 2016.
- CLAVERIA-GIMENO, R. *et al.* The intervening domain from MeCP2 enhances the DNA affinity of the methyl binding domain and provides an independent DNA interaction site. *Sci. Rep.*, v. 7, p. 1-16, 2017.
- CLOUAIRE T., STANCHEVA I. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol. Life Sci.*, v. 65, p. 1509-1522, 2008.
- COUVERT, P. *et al.* MECP2 is highly mutated in X-linked mental retardation. *Hum. Mol. Genet.*, v. 10, p. 941-946, 2001.
- CRESPI, B.; SUMMERS, K.; DORUS, S. Evolutionary genomics of human intellectual disability. *Evol. Appl.*, v. 3, p. 52-63, 2010.

CUNDIFF, P.E.; ANDERSON, S.A. Impact of induced pluripotent stem cells on the study of central nervous system disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 21, p. 354-561, 2011.

DATABASE OF GENOMIC VARIANTS (DGV). Disponível em: < <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home?ref=>> Acesso em: 5 jan. 2018.

DEFOSSEZ, P.A.; STANCHEVA, I. Biological functions of methyl-CpG-binding proteins. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, v. 101, p. 377-398, 2011.

DEL GAUDIO, D. *et al.* Increased MECP2 gene copy number as the result of genomic duplication in neurodevelopmentally delayed males. *Genet. Med.*, v. 8, p. 784-792, 2006.

DELCUVE, G.P.; KHAN, D.H.; DAVIE, J.R. Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin. Epigenetics*, v. 4, p. 1-13, 2012.

DENG, X. *et al.* X Chromosome regulation: diverse patterns in development, tissues and disease. *Nat. Rev. Genet.*, v. 15, p. 367-378, 2014.

ELLISON, J.W. *et al.* Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med.*, v. 64, p. 441-450, 2013.

ENSEMBL. Versão 91. Disponível em: < <http://www.ensembl.org/index.html>> Acesso em: 15 dez. 2017.

FIEREMANS, N. *et al.* De novo MECP2 duplications in two females with intellectual disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. *Hum. Genet.*, v. 133, p. 1359-67, 2014.

FISHBURN, J. *et al.* The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. *Am. J. Med. Genet.*, v. 14, p. 713-724, 1983.

FRANCO B.; BALLABIO A. X-inactivation and human disease: X-linked dominant male lethal disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 16, p. 254-259, 2006

FRIEZ, M.J. *et al.* Recurrent infections, hypotonia, and mental retardation caused by duplication of MECP2 and adjacent region in Xq28. *Pediatrics*, v. 118, p. e1687-1695, 2006.

FROYEN, G. *et al.* Copy-number gains of HUWE1 due to replication- and recombination-based rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 91, p. 252-264, 2012.

GEMELLI T. *et al.* Postnatal loss of methyl-CpG binding protein 2 in the forebrain is sufficient to mediate behavioral aspects of Rett syndrome in mice. *Biol. Psychiatry*, v. 59; p. 468-476, 2006.

GENOME BROWSER GATEWAY. versão Human March 2006 (NCBI36/hg18). Disponível em: < <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>> Acesso em: 13 dez. 2017.

GOTTIPATI, S.; RAO, N.L.; FUNG-LEUNG, W.P. IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal.*, v. 20, p. 269-276, 2008.

GREENWOOD GENETIC CENTER. Disponível em: <<http://www.ggc.org/>> Acesso em: 05 nov. 2017.

GRZESIUK, J.D. *et al.* Familial chromosomal translocation X; 22 associated with infertility and recurrent X mosaicism. *Mol. Cytogenet.*, v. 15, p. 1-7, 2016.

GU W.; ZHANG, F.; LUPSKI, J.R. Mechanisms for human genomic rearrangements. *Pathogenetics*, v. 1, p. 1-17, 2008.

GUIBERT, S.; WEBER, M. Functions of DNA methylation and hydroxymethylation in mammalian development. *Curr. Top. Dev. Biol.*, v. 104, p. 47-83, 2013.

GUY, J. *et al.* A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat. Genet.*, v. 27, p. 322-326, 2001.

HANCHARD, N.A. *et al.* A partial MECP2 duplication in a mildly affected adult male: a putative role for the 3' untranslated region in the MECP2 duplication phenotype. *BMC Med. Genet.*, v. 13, p. 1-9, 2012.

HANSEN, J.C.; GHOSH, R.P.; WOODCOCK, C.L. Binding of the Rett syndrome protein, MeCP2, to methylated and unmethylated DNA and chromatin. *IUBMB Life*, v. 62, p. 732-738, 2010.

HAREL, T.; LUPSKI, J.R. Genomic disorders 20 years on-mechanisms for clinical manifestations. *Clin. Genet.*, doi: 10.1111/cge.13146, 2017.

HASTINGS, P.J. *et al.* Mechanisms of change in gene copy number. *Nat. Rev. Genet.*, v. 10, p. 551-564, 2009.

HEHIR-KWA, J.Y. Pathogenic or not? Assessing the clinical relevance of copy number variants. *Clin. Genet.*, v. 84, p. 415-421, 2013.

HENDRICH, B.; BIRD, A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell Biol.*, v. 18, p. 6538-6547, 1998.

HITE, K.C.; ADAMS, V.H.; HANSEN, J.C. Recent advances in MeCP2 structure and function. *Biochem. Cell Biol.*, v. 87, p. 219-227, 2009.

HONDA, S. *et al.* Concomitant microduplications of MECP2 and ATRX in male patients with severe mental retardation. *J. Hum. Genet.*, v. 57, p. 73-77, 2012.

HU, H. *et al.* X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. *Mol. Psychiatry*, v. 21, p. 133-148, 2016.

IAFRATE, A.J. *et al.* Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat. Genet.*, v. 36, p. 949-951, 2004.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.*, v. 33, p. 245-254, 2003.

JONES, P.A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.*, v. 13, p. 484-492, 2012.

KATO, T.; IWAMOTO, K. Comprehensive DNA methylation and hydroxymethylation analysis in the human brain and its implication in mental disorders. *Neuropharmacology*, v. 80, p. 133-139, 2014.

KEMKEMER, C. *et al.* Enrichment of brain-related genes on the mammalian X chromosome is ancient and predates the divergence of synapsid and sauropsid lineages. *Chromosome Res.*, v. 17, p. 811-820, 2009.

KIM, S.; KAANG, B.K. Epigenetic regulation and chromatin remodeling in learning and memory. *Exp. Mol. Med.*, v. 49, p. e281, 2017.

KIMURA, H.; SHIOTA, K. Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p. 4806-4812.

KINDE, B. Reading the unique DNA methylation landscape of the brain: Non-CpG methylation, hydroxymethylation, and MeCP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 112, p. 6800-6806, 2015.

KLAUCK, S.M. *et al.* Mutations in the ribosomal protein gene RPL10 suggest a novel modulating disease mechanism for autism. *Mol. Psychiatry*, v. 11, p. 1073-1084, 2006.

KLEINJAN, D.A.; van Heyningen, V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 76, p. 8-32, 2005.

KOBAYASHI, H. *et al.* Contribution of Intragenic DNA Methylation in Mouse Gametic DNA Methylomes to Establish Oocyte-Specific Heritable Marks. *PLoS Genet.*, v. 8, 1-14, 2012.

KOKURA, K. *et al.* The Ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 34115-34121, 2001.

KRIAUCIONIS, S.; BIRD, A. The major form of MeCP2 has a novel N-terminus generated by alternative splicing. *Nucleic Acids Res.*, v. 32, p. 1818-1823, 2004.

LANDGRAVE-GÓMEZ, J.; MERCADO-GÓMEZ, O.; GUEVARA-GUZMÁN, R. Epigenetic mechanisms in neurological and neurodegenerative diseases. *Front. Cell Neurosci.*, v. 9, p. 58, 2015.

LEE, J.A.; CARVALHO, C.M.; LUPSKI, J.R. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. *Cell*, v. 131, p. 1235-1247, 2007.

LEWIS, J.D. Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, v. 69, p. 905-914, 1992.

- Li, W.; Olivier, M. Current analysis platforms and methods for detecting copy number variation. *Physiol. Genomics*, v. 45, p. 1-16, 2013.
- LIN, D.S. *et al.* De novo MECP2 duplication derived from paternal germ line result in dysmorphism and developmental delay. *Gene*, v. 533, p. 78-85, 2014.
- LIU, J.; FRANCKE, U. Identification of cis-regulatory elements for MECP2 expression. *Hum. Mol. Genet.*, v. 15, p. 1769-1782, 2006.
- LIYANAGE, V.R. *et al.* DNA modifications: function and applications in normal and disease States. *Biology (Basel)*, v. 3, p. 670-723, 2014.
- LOMBARDI, L.M.; BAKER, S.A.; ZOGHBI, H.Y. MECP2 disorders: from the clinic to mice and back. *J. Clin. Invest.*, v. 125, p. 2914-2923, 2015.
- LUBS H.A.; STEVENSON R.E.; SCHWARTZ C.E. Fragile X and X-linked intellectual disability: four decades of Discovery. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 90, p. 578-590, 2012.
- LUGTENBERG, D. *et al.* Structural variation in Xq28: MECP2 duplications in 1% of patients with unexplained XLMR and in 2% of male patients with severe encephalopathy. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 17, p. 444-453, 2009.
- LUPSKI, J.R. Structural variation mutagenesis of the human genome: Impact on disease and evolution. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 56, p. 419-436, 2015.
- LYST, M.J. *et al.* Rett syndrome mutations abolish the interaction of MeCP2 with the NCoR/SMRT co-repressor. *Nat. Neurosci.*, v.16, p. 898-902, 2013.
- LYST, M.J.; BIRD, A. Rett syndrome: a complex disorder with simple roots. *Nat. Rev. Genet.*, v. 16, p. 261-275, 2015.
- 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, p. e103714, 2014.
- MADRIGAL, I. *et al.* X-chromosome tiling path array detection of copy number variants in patients with chromosome X-linked mental retardation. *BMC Genomics*, v. 8, p. 1-10, 2007.
- MAUNAKEA, A.K. *et al.* Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res.*, v. 23, p. 1256-1269, 2013.
- MEEHAN, R.R. *et al.* Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell*, v. 58, p. 499-507, 1989.
- MEEHAN, R.R.; LEWIS, J.D.; BIRD, A.P. Characterization of MeCP2, a vertebrate DNA binding protein with affinity for methylated DNA. *Nucleic Acids Res.*, v. 20, p. 5085-5092, 1992.
- MEINS, M. *et al.* Submicroscopic duplication in Xq28 causes increased expression of the MECP2 gene in a boy with severe mental retardation and features of Rett syndrome. *J. Med. Genet.*, v. 42, p. 1-6, 2005.

MELLÉN, M. *et al.* MeCP2 binds to 5hmC enriched within active genes and accessible chromatin in the nervous system. *Cell*, v. 151, p. 1417-1430, 2012.

MIGNOGNA, M.L. *et al.* The intellectual disability protein RAB39B selectively regulates GluA2 trafficking to determinesynaptic AMPAR composition. *Nat. Commun.*, v. 6, p. 1-15, 2015.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res.*, v. 16, 1215.

MNATZAKANIAN, G.N. *et al.* A previously unidentified MECP2 open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat. Genet.*, v. 36, p. 339-341, 2004.

MOORE, L.D.; LE T.; FAN G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, v. 38, p. 23-38, 2013.

MORLEO M.; FRANCO B. Dosage compensation of the mammalian X chromosome influences the phenotypic variability of X-linked dominant male-lethal disorders. *J. Med. Genet.*, v. 45, p. 401-408, 2008.

NA, E.S. *et al.* A mouse model for MeCP2 duplication syndrome: MeCP2 overexpression impairs learning and memory and synaptic transmission. *J. Neurosci.*, v. 32, p. 3109-3117, 2012.

NA, E.S. *et al.* The impact of MeCP2 loss- or gain-of-function on synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology*, v. 38, p. 212-219, 2013.

NAKAMURA, F.; STOSSEL, T.P.; HARTWIG, J.H. The filamins Organizers of cell structure and function. *Cell Adh. Migr.*, v. 5, p. 160-169, 2011.

NAN, X.; CAMPOY, F.J.; BIRD, A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell*, v. 88, p. 471-481, 1997.

NAUMOVA, O.Y. *et al.* Gene Expression in the Human Brain: The Current State of the Study of Specificity and Spatio-temporal Dynamics. *Child. Dev.*, v. 84, p. 76-88, 2013.

NCBI GEO database. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> > Acesso em: 12 ago. 2017.

NGUYEN, D.K.; DISTECHE, C.M. High expression of the mammalian X chromosome in brain. *Brain Res.*, v. 1126, p. 46-49, 2006.

NGUYEN, M.V. *et al.* MeCP2 is critical for maintaining mature neuronal networks and global brain anatomy during latestages of postnatal brain development and in the mature adult brain. *J. Neurosci.*, v. 32, p. 10021-10034, 2012.

NIRANAN, T.S. *et al.* Affected Kindred Analysis of Human X Chromosome Exomes to Identify Novel X-Linked Intellectual Disability Genes. *PLoS ONE*, v. 10, e0116454, 2015.

- NIRANJAN, T.S. *et al.* Affected Kindred Analysis of Human X Chromosome Exomes to Identify Novel X-Linked Intellectual Disability Genes. *PLoS ONE*, v. 10, p. 1-22, 2015.
- O'DONOVAN, K.J.; DARNELL, R.B. Neuronal signaling through alternative splicing: some exons CaRRE. *Sci. STKE.*, v. 2001, p. 1-3, 2001.
- OKANO, M. *et al.* DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, v. 99, p. 247-257, 1999.
- ORRICO, A. *et al.* MECP2 mutation in male patients with non-specific X-linked mental retardation. *FEBS. Lett.*, v. 481, p. 285-288, 2000.
- OTTAVIANI, D.; LECAIN, M.; SHEER, D. The role of microhomology in genomic structural variation. *Trends Genet.*, v. 30, p. 85-94, 2014.
- OTTER, M. *et al.* A novel mutation in L1CAM causes a mild form of L1 syndrome: a case report. *Clin. Case Rep.*, v. 5, p. 1213-1217, 2017.
- PEREIRA-LEAL, J.B.; SEABRA, M.C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J. Mol. Biol.*, v. 313, p. 889-901, 2001.
- PIMENTEL, M.; SANTOS-REBOUÇAS, C.; GALLO, C. *Genética Essencial*. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- PROBST, A.V.; DUNLEAVY, E.; ALMOUZNI, G. Epigenetic inheritance during the cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 10, p. 192-206, 2009.
- RAMOCKI, M.B.; TAVYEV, Y.J.; PETERS, S.U. The MECP2 duplication syndrome. *Am. J. Med. Genet. A.*, v. 152A, p. 1079-1088, 2010.
- RAYMOND F.L. X linked mental retardation: a clinical guide. *J. Med. Genet.*, v. 43, p. 193-200, 2005.
- REICHENBERG, A. *et al.* Discontinuity in the genetic and environmental causes of the intellectual disability spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 113, p. 1098-1103, 2016.
- RETTBASE: RettSyndrome.org. Variation Database. Disponível em: < <http://mecp2.chw.edu.au/>> Acesso em: 13 ago. 2017.
- RICE, A.M.; MCLYSAGHT, A. Dosage-sensitive genes in evolution and disease. *BMC Biol.*, v. 15, p. 1-10, 2017.
- ROPER, H.H.; HAMEL, B.C. X-linked mental retardation. *Nat Rev Genet.*, v. 6, p. 46-57, 2005.
- SADAKIERSKA-CHUDY, A.; KOSTRZEWA, R.M.; FILIP, M. A comprehensive view of the epigenetic landscape part I: DNA methylation, passive and active DNA demethylation pathways and histone variants. *Neurotox Res.*, v. 27, p. 84-97, 2015.

SANTOS-REBOUÇAS, C.B. *et al.* Novel microduplications at Xp11.22 including HUWE1: clinical and molecular insights into these genomic rearrangements associated with intellectual disability. *J. Hum. Genet.*, v. 60, p. 207-211, 2015.

SASSONE-CORSI, P. Physiology. When metabolism and epigenetics converge. *Science*, v. 339, p. 148–150, 2013.

SHAHBAZIAN, M.D. *et al.* Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum. Mol. Genet.*, v. 11, p. 115-124, 2002.

SHAO, L. *et al.* Identification of Chromosome Abnormalities in Subtelomeric Regions by Microarray Analysis: A Study of 5,380 Cases. *Am. J. Med. Genet. A.*, v. 146A, p. 2242-2251, 2008.

SIEGMUND, K.D. *et al.* DNA Methylation in the Human Cerebral Cortex Is Dynamically Regulated throughout the Life Span and Involves Differentiated Neurons. *PLoS ONE*, v. 2, p. 1-9, 2007.

SINGH, J. *et al.* MECP2 genomic structure and function: insights from ENCODE. *Nucleic Acids Res.*, v. 36, p. 6035-6047, 2008.

SKENE P.J. *et al.* Neuronal MeCP2 is expressed at near histone-octamer levels and globally alters the chromatin state. *Mol. Cell*, v. 37, p. 457-468, 2010.

SROUR, M.; SHEVELL, M. Genetics and the investigation of developmental delay/intellectual disability. *Arch. Dis. Child.*, v. 99, p. 386–389, 2014.

STANCHEVA, I. *et al.* A mutant form of MeCP2 protein associated with human Rett syndrome cannot be displaced from methylated DNA by notch in *Xenopus* embryos. *Mol. Cell*, v. 12, p. 425-435, 2003.

STEVENSON, R.E.; SCHWARTZ, C.E.; ROGERS, R.C. Malformations Among the X-Linked Intellectual Disability Syndromes. *Am. J. Med. Genet. A.*, v. 161A, p. 2741–2749, 2013.

STROBL-WILDEMANN, G. *et al.* Novel GDI1 mutation in a large family with nonsyndromic X-linked intellectual disability. *Am. J. Med. Genet. A.*, v. 155^a, p. 3067-3070, 2011.

The Human Protein Atlas. Versão 18. Disponível em: < <https://www.proteinatlas.org/> > Acesso em: 19 out. 2017.

THEVENON, J. RPL10 mutation segregating in a family with X-linked syndromic Intellectual Disability. *Am. J. Med. Genet. A.*, v. 167A, p. 1908-1912, 2015.

TRAPPE, R. *et al.* MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 68, p. 1093-1101, 2001.

UNIPROTKB. Versão 2017_12. Disponível em: < <http://www.uniprot.org/> > Acesso em: 20 set. 2017.

- URDINGUIO, R.G.; SANCHEZ-MUT, J.V.; ESTELLER, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. *Lancet Neurol.*, v. 8, p. 1056-1072, 2009.
- VACCA, M. *et al.* X inactivation and reactivation in X-linked diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v. 56, p. 78-87, 2016.
- VAN ESCH, H. *et al.* Duplication of the MECP2 Region Is a Frequent Cause of Severe Mental Retardation and Progressive Neurological Symptoms in Males. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 77, p. 442-453, 2005.
- VAN ESCH, H. *MECP2 Duplication Syndrome*. *GeneReviews*. 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1284/>> Acesso em: 15 dez. 2017.
- VAN ESCH, H. MECP2 Duplication Syndrome. *Mol. Syndromol.*, v. 2, p. 128-136, 2012.
- VANDEWALLE, J. *et al.* Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 85, p. 809-822, 2009.
- VANMARSENILLE, L. *et al.* Increased dosage of RAB39B affects neuronal development and could explain the cognitive impairment in male patients with distal Xq28 copy number gains. *Hum. Mutat.*, v. 35, p. 377-383, 2014
- VISSERS, L.E. *et al.* Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum. Mol. Genet.*, v. 2, p. R215-R223, 2005.
- VISSERS, L.E.; GILISSEN C., VELTMAN J.A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat. Ver. Genet.*, v. 17, p. 9-18, 2016.
- VOGEL-CIERNIA A.; WOOD M.A. Neuron-specific chromatin remodeling: a missing link in epigenetic mechanisms underlying synaptic plasticity, memory, and intellectual disability disorders. *Neuropharmacology*, v. 80, p. 18-27, 2013.
- WEN, L. *et al.* Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biol.*, v. 15, p. 1-17, 2014.
- WENG Y.L. *et al.* DNA modifications and neurological disorders. *Neurotherapeutics*, v. 10, p. 556-567, 2013.
- WHIBLEY, A.C. *et al.* Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 87, p. 173-188, 2010.
- YASUI, D.H. *et al.* Integrated epigenomic analyses of neuronal MeCP2 reveal a role for long-range interaction with active genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 104, p. 19416-19421, 2007.
- Yi, Z. *et al.* Chromosome Xq28 duplication encompassing MECP2: Clinical and molecular analysis of 16 new patients from 10 families in China. *Eur. J. Med. Genet.*, v. 59, p. 347-353, 2016.

YNTEMA H.G., *et al.* Low frequency of MECP2 mutations in mentally retarded males. *Eur. J. Hum. Genet.*, v. 10, p. 487-490, 2002.

YOUNG J.I. *et al.* Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpGbinding protein 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 102, p. 17551-17558, 2005.

ZHANG, F. The DNA replication FoSTeS/MMBIR mechanism can generate genomic, genic and exonic complex rearrangements in humans. *Nat. Genet.*, v. 41, p. 849-853, 2009.

ZHANG, Q. *et al.* MECP2 duplication syndrome in a Chinese family. *BMC Med. Genet.*, v. 16, p. 1-6, 2015.

ZHAO, C.; GONG, G. Mapping the effect of the X chromosome on the human brain: Neuroimaging evidence from Turner syndrome. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 80, p. 263-275, 2017.

ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para pacientes com DI



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes
Departamento de Genética

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DO PROJETO: *Investigação de alterações em microRNAs expressos no cérebro e de variações no número de cópias gênicas como causas de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X*

INSTITUIÇÃO RESPONSÁVEL: UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: CÍNTIA BARROS SANTOS-REBOUÇAS

NOME DO PACIENTE: _____ **DN:** _____

REGISTRO: _____ **PROCEDÊNCIA:** _____

O projeto "*Investigação de alterações em microRNAs expressos no cérebro e de variações no número de cópias gênicas como causas de deficiência intelectual ligada ao cromossomo X*" realizado pelo Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SERVGEN), tem como objetivo investigar fatores genéticos no cromossomo X que podem levar à deficiência mental em homens. Através do conhecimento gerado a partir deste projeto, pretendemos melhorar o conhecimento sobre as causas deste distúrbio e contribuir para a elaboração futura de estratégias voltadas para o seu tratamento/prevenção.

Os indivíduos selecionados para participarem deste projeto são pessoas diagnosticadas clinicamente como portadores de deficiência mental de causa desconhecida. As condutas adotadas nesta pesquisa seguirão as normas de Bioética descritas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Qualquer indivíduo selecionado poderá se recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa, sem que haja penalização ou prejuízo ao seu atendimento.

O exame gratuito será realizado a partir de amostras de DNA já armazenadas nas dependências no Serviço de Genética Humana da UERJ (regimento interno IBRAG 001/2008), sob a responsabilidade dos pesquisadores envolvidos, cabendo ao doador ou ao seu responsável o direito de retirá-la do banco de DNA a qualquer momento, se assim o desejar. Todos os procedimentos serão acompanhados por uma equipe de geneticistas e biólogos. Cada amostra de material biológico será identificada por números específicos e poderá ser utilizada para investigações futuras, desde que mediante o consentimento dos doadores (ou de seus responsáveis) e/ou da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Instituição.

As condições de sigilo quanto ao resultado do exame, assim como, a identidade dos pacientes será preservada. Aos responsáveis pelos pacientes será fornecido todo e qualquer esclarecimento que se fizer necessário antes e durante a realização da pesquisa. Os dados desta pesquisa podem vir a ser divulgados e publicados cientificamente, respeitando a privacidade e o anonimato dos participantes, visando evitar a exposição e a discriminação dos doadores e de suas famílias.

Eu, _____, identidade nº _____, responsável pelo paciente acima citado, declaro que li e compreendi o que me foi explicado e, desta forma, autorizo voluntariamente a participação no estudo.

Rio de Janeiro, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável

Assinatura do pesquisador

☎ **Endereço e telefone para contatos** (Horário de atendimento: 9:00 – 17:00 horas): Rua São Francisco Xavier, 524 – Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha - sala 501F - Maracanã - Rio de Janeiro - RJ - CEP 20550-013 - Tel: (021) 2334-0039 - Email: cbs@uerj.br.

Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa da UERJ: Av. Boulevard 28 de Setembro, 77, Térreo, - Vila Isabel - Rio de Janeiro, RJ, e-mail: cep-lupe@uerj.br - Telefone: (021) 2868-8253.