KAREN NOGUEIRA COQUETI

O CROMOSSOMO X E A DEFICIÊNCIA MENTAL NO SEXO MASCULINO

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo,
como requisito para obtenção do
título de Mestre em Ciências, na
área de Biologia/Genética

São Paulo

2011

Orientadora: **Angela M. Vianna Morgante**

COQUETI, KAREN NOGUEIRA

O CROMOSSOMO X E A DEFICIÊNCIA MENTAL NO SEXO MASCULINO.

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

1. Deficiência mental.
2. Herança ligada ao cromossomo X.
3. Inativação do cromossomo X

Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Angela M. Vianna Morgante

Mantenha seus pensamentos positivos, porque pensamentos tornam-se suas palavras.

Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes.

Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos.

Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores.

Mantenha seus valores positivos, porque seus valores...Tornam-se seu destino!”

Mahatma Gandhi

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Proc. CEPID 98/14254-2) e bolsa nível Mestrado da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Ao meu irmão, Willer Nogueira Coqueti, pelo
amor, companheirismo e constante apoio,
contribuindo na realização dos meus ideais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho e, de um modo especial, a:

Primeiramente a Deus, pela Luz que ilumina e que nos dá força para continuar a batalha, enfrentando as dificuldades que surgem no dia-a-dia.

Ao Departamento de Genética e Biologia Evolutiva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de poder fazer parte de seu corpo discente e desenvolver este trabalho.

À Dra. Angela M Vianna-Morgante, que foi para mim muito mais que uma orientadora, foi uma mestre, incentivadora, e acima de tudo uma amiga. Sinceramente agradeço pelo rigor e pela forma afetiva de acompanhar e orientar os meus caminhos no percurso deste trabalho. Aliando exigência e compreensão. Demandando constantemente meu empenho para corrigir equívocos e eliminar imprecisões, mas aceitando meus limites e me auxiliando a superar o superável. A sua dedicação, disponibilidade, paciência e generosidade marcaram sua orientação na minha vida. Minha eterna admiração e gratidão,

Ao Professor Dr. Paulo Alberto Otto, por sua paciência e principalmente pelos conhecimentos transmitidos. Fazendo da genética de populações algo mais simples do que o mistério que parecia.

Às Dras. Carla Rosenberg, Ana Cristina V. Krepischi e Regina Célia Mingroni-Netto, por seus valiosos ensinamentos e sugestões que possibilitaram agregar enorme valor a este trabalho.

Às professoras integrantes da banca do exame de qualificação, agradeço especialmente pela atenção na avaliação do trabalho e pelas contribuições que a ele acrescentaram.

À grande amiga e maior incentivadora, Larissa, pela paciência, por ter acreditado no meu potencial e principalmente pelos conhecimentos transmitidos. Com sua doçura e críticas em muito contribuiu para esse trabalho. Minha admiração e carinho.

À Ana Carla, pela amizade e torcida no desenvolvimento desta pesquisa, e por se dispor a participar das prévias com carinhosa atenção, sugestões e esclarecedoras contribuições.

À Fátima, pela inesquecível amizade, carinho e por seu incrível poder de tornar mais amenos os dias difíceis deste processo.

À Mara, por todo incentivo ao meu crescimento profissional, pela cumplicidade e amizade nesses anos de convivência.

Aos amigos José, Ana Carol e Adriano, por toda ajuda, amizade e estimulante convivência.

À Silvia pela dedicação com que ajudou a desenvolver este trabalho e pelos momentos de reflexão que me proporcionou

À Maraisa, pelo incentivo e colaboração inestimável.

Ao Paulo Rogério, pela preciosa colaboração técnica e pelo bom dia mais sincero e animador que já ouvi.

Aos colegas de laboratório, que colaboraram de forma indireta ou direta para a execução deste trabalho: Renata, Fernando, Lilian, Teresa, Ligia, Gustavo, Daniel, Daniela e Vitor sempre estiveram presentes de maneira prestativa.

À minha mãe, Ivonete, eu agradeço diariamente. Por tudo o que ela faz e representa, por mim e para mim. Meu porto seguro durante todas as dificuldades enfrentadas no desenvolvimento deste trabalho. Eterno agradecimento ao seu apoio, educação, amizade, dedicação, companheirismo e amor. Por incentivar-me desde o começo da minha trajetória, sendo a primeira, antes até de eu mesmo, a acreditar que eu conseguiria.

Ao amigo companheiro, Willer, maior incentivador, doce luz que divinamente acaricia minha alma, em êxtase majestoso, se o triunfo é supremo, os lauréis a você são os mais belos. É chama de clarão etéreo que em seu jorro cristalino, sentimento puro fecunda e em seu coração me torno seu mais infinito eleito. Você é o responsável por este momento, este trabalho é para você; tirando os erros, é claro.

Aos meus familiares mais próximos, especialmente a Bete, que com carinho e solidariedade estiveram sempre presentes nesta caminhada, tenho certeza de que não teria chegado até aqui, sem a presença de vocês na minha vida.

Ao meu segundo pai, Nil, pelo apoio e estímulo.

Em memória aos meus anjos da guarda, Valdomira e Alice, mesmo de longe sinto seu carinho que sempre me ajuda a vencer os desafios.

Ao Juliano, meu companheiro de vida, pela paciência, amor e carinho com que encarou meus períodos de tensão, me dando tranquilidade nesses momentos difíceis, por sua ajuda tão indispensável, quanto diversificada: das críticas de trabalho às tarefas domésticas. Obrigada por existir e contemplar-me com teu amor.

Às amigas Ariane, Raquel e Rose, pelos dez anos de caminhada que foram fundamentais na minha vida, sempre torcendo por mim, me incentivaram e deram força para que eu prosseguisse, seu carinho e a amizade sincera foram muito importantes todos esses anos.

Aos professores da graduação e pós-graduação, pela oportunidade de ter realizado minha formação na área ciências biológicas, que sem dúvida orientou as diretrizes da minha vida profissional, fornecendo-me os alicerces necessários para realização deste trabalho.

A todos os pacientes e suas genitoras que contribuíram para a pesquisa, os meus sinceros agradecimentos, pela disponibilidade e colaboração para este trabalho, pois sem vocês não seria possível esta realização. Espero que este trabalho seja digno de vocês.

À CAPES pelo auxílio financeiro, que tornou viável a realização da pós-graduação.

Aos funcionários acadêmicos, especialmente a Deise, por todo o carinho, atenção, compreensão e estímulo.

Finalmente, agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

I-INTRODUÇÃO.....	1
I.1. A deficiência mental.....	1
I.2. A deficiência mental com herança ligada ao cromossomo X.....	3
I.3. A inativação do cromossomo X em mulheres portadoras de mutações no cromossomo X associadas a deficiência mental.....	10
II-OBJETIVO.....	15
III-PACIENTES E MÉTODOS.....	16
III.1. Casuística.....	16
III.2. Métodos.....	16
IV-RESULTADOS.....	22
V-DISCUSSÃO.....	30
VI-SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	37
VII-ABSTRACT.....	40
VIII-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

I. INTRODUÇÃO

I.1. A deficiência mental

A Deficiência Mental (DM) é definida como a incapacidade caracterizada por limitações significativas nas funções intelectuais e no comportamento adaptativo do indivíduo, que fica explícita em suas habilidades conceituais, sociais e práticas. Estabelece-se antes dos 18 anos de idade sendo assim uma doença do neurodesenvolvimento (*World Health Organization*, 1992). Estima-se que afete de 2 a 3% da população.

A DM é condição clínica complexa e heterogênea, podendo ter causas genéticas, ambientais ou resultar da combinação de ambas. Convencionalmente é classificada de acordo com o quociente de inteligência (QI) dos indivíduos, cuja distribuição segue curva normal na população, o valor médio 100 ocorrendo na maioria dos indivíduos. Os indivíduos com QI abaixo de 70 são considerados deficientes mentais. A DM é classificada como leve (QI entre 70 e 50), moderada (QI entre 49 e 35), grave (QI entre 34 e 20) ou profunda (QI menor que 20) (revisão em Raymond, 2006). A DM grave a profunda tem frequência populacional que pode chegar a 0,5%, não diferindo nas diferentes classes econômicas, o que demonstra a importância do componente genético em sua etiologia. Já a DM leve geralmente está associada a causas ambientais, principalmente à desnutrição, comum em países de níveis sócio-econômicos baixos, onde pode atingir frequência de até 10% da população (Chiurazzi e Oostra, 2000; Inlow e Restifo, 2004).

Estima-se que a DM leve esteja presente em 85% dos afetados por deficiência mental. Em contrapartida, estima-se que a DM grave-profunda ocorra em 5% dos afetados (Chiurazzi e Oostra, 2000; Toniolo, 2000). As

formas mais graves de DM normalmente estão associadas a outras manifestações clínicas, físicas ou neurológicas, constituindo síndromes, o que muitas vezes permite um diagnóstico etiológico (Chiurazzi e Oostra, 2000). Assim, a causa da DM moderada a grave pode chegar a ser identificada em 50-80% dos casos, mas quando a DM é leve, a frequência de diagnóstico é significativamente menor, de 20-25% (Frints e col., 2002).

Os mecanismos genéticos que levam à DM podem ser mutações gênicas ou anomalias cromossômicas numéricas e estruturais não equilibradas que afetam grande número de genes, resultando em síndromes de malformações congênitas associadas a DM. A frequência das alterações cromossômicas pode variar nas diversas séries de pacientes, pois estão mais representadas quando se investiga a DM associada a malformações congênitas. Entre pacientes com DM sindrômica, as alterações cromossômicas podem ser responsáveis por até 15% dos casos e a trissomia do cromossomo 21, a síndrome de Down, é a principal causa genética de DM, afetando aproximadamente um em cada 1000 recém-nascidos vivos. Além das alterações detectáveis pelas técnicas citológicas de estudo cromossômico, a DM pode ser causada por desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos. Os estudos aplicando a técnica de hibridação genômica comparativa (*array*-CGH) mostram que cerca de 15% dos pacientes, com deficiência mental e cariótipo aparentemente normal após bandamento G, possuem microdeleções e microduplicações cromossômicas como fator causal de seus quadros clínicos (Rosenberg e col., 2006, revisão em Ropers, 2008). Já as mutações gênicas apresentam

todos os tipos de herança: autossômica e ligada ao cromossomo X, dominante ou recessiva, e mitocondrial.

1.2. A deficiência mental com herança ligada ao cromossomo X

A DM pode ser classificada como síndrome, quando o indivíduo apresenta outros sinais clínicos além da deficiência mental e DM não síndrome ou inespecífica, em que a única característica evidente é a DM. Atualmente, foram descritas cerca de 150 síndromes de DM de herança ligada ao cromossomo X (DMLX). Em 72 genes do cromossomo X, foram identificadas mutações responsáveis pelos quadros clínicos de DM síndrome e mutações diferentes de um mesmo gene foram identificadas como a causa de diferentes síndromes; outras 35 síndromes de DM foram mapeadas em regiões específicas do cromossomo X sem a identificação do gene mutado. Por outro lado, mutações em 37 genes foram identificadas em famílias com DM não síndrome e, dentre esses genes, 17 estavam também mutados em casos de DM síndrome; em 52 famílias a DM não síndrome foi mapeada em segmentos do cromossomo X sem ter o gene identificado (*Greenwood Genetic Center, GGC, XLMR Update* - fevereiro 2011). A menor quantidade de genes identificados como causa de DM não síndrome está relacionada à dificuldade em detectar as mutações causais, pois não havendo características clínicas distinguíveis além da deficiência mental é necessário investigar cada família como única, dificultando os estudos de ligação. É interessante que a identificação do mecanismo genético em família com DM não síndrome, frequentemente também leva à caracterização do quadro clínico como síndromico, já que sinais clínicos

antes despercebidos podem ser reconhecidos examinando-se vários portadores da mutação.

Em 1969, Lubs descreveu a associação de quadro de DM sindrômica com uma falha no braço longo do cromossomo X, em Xq27.3, que se manifesta quando os linfócitos são cultivadas em meio deficiente de ácido fólico (Sutherland, 1977). A síndrome, que foi denominada síndrome do cromossomo X frágil, tem incidência estimada de 1 em 4000-6000 homens, e 1 em 8000-9000 mulheres (Crawford e col, 2001). Estima-se que 2-3% dos casos de deficiência mental em homens e 1% em mulheres sejam devidos a essa síndrome (revisão em Chelly e Mandel, 2001), o que a faz a principal causa de DM herdada. É a causa da DM em cerca de 25% das famílias com DM ligada ao X (revisão em Ropers e Hamel, 2005). A síndrome do cromossomo X frágil resulta da mutação de perda de função no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), que codifica a proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*). Esse gene apresenta na região 5' não traduzida uma repetição de trinucleotídeos (CGG)_n que, em alelos comuns da população, tem entre 6 e cerca de 55 trincas de pares de bases. Alelos contendo repetições entre ~55 a ~200 trincas de bases são pré-mutados; nesse caso, a proteína é produzida, porém esses alelos são instáveis, podendo expandir-se para alelos completamente mutados, com repetições de 200 ou mais trincas de bases, quando transmitidos via materna. Esses alelos completamente mutados são transcritos, porém não são traduzidos. A ausência da proteína FMRP é a causa da síndrome do cromossomo X frágil .

O cromossomo X possui cerca de 155 milhões de pares de bases, aproximadamente 1155 genes e, entre eles, 868 foram identificados como codificadores de proteínas (Ensembl, fevereiro 2011). Essas proteínas possuem diversas funções estruturais e participam da regulação da transcrição de outros genes e da transdução de sinais; a maioria atua no núcleo e no citoplasma, porém podem também exercer sua função em organelas, na membrana plasmática e no meio extracelular (revisão em Chiurazzi e col., 2008). Apesar de o cromossomo X conter cerca de 4% dos genes identificados no genoma humano, 8-12% dos genes que causam deficiência mental quando mutados estão localizados nele. Essa representação significativa de mutações no cromossomo X como causa de DM pode resultar de maior densidade de genes de cognição no cromossomo X, mas deve ser considerado o viés introduzido pela maior facilidade no mapeamento de mutações no cromossomo X, com base no padrão de herança (Inlow e Restifo, 2004).

A observação de famílias em que a DM era claramente de herança ligada ao X levou Lehrke (1972) a considerar mutações no cromossomo X como explicação para o excesso de homens afetados por DM em relação a mulheres, observação feita inicialmente por Penrose (1938). Vários estudos em coortes de afetados por DM levaram à estimativa de que há 30%-40% mais afetados do sexo masculino (revisão em Mandel e Chelly, 2004, revisão em Ropers e Hamel, 2005).

Diante da importância da deficiência mental ligada ao cromossomo X como causa de deficiência mental, concentraram-se esforços para a identificação de genes relacionados à DM no cromossomo X e várias

estratégias são adotadas para tal identificação. Até aqui, a abordagem mais utilizada e que permitiu a identificação da maioria dos genes relacionados a DM foi o estudo de ligação por meio de marcadores moleculares. A caracterização de pontos de quebra em translocações X-autossomo em mulheres afetadas por deficiência mental também tem sido produtiva, indicando genes danificados pelas quebras. Outra estratégia há muito utilizada é a da busca de mutações num gene, com base no defeito metabólico associado à deficiência mental. Outras estratégias foram introduzidas mais recentemente, como a busca de microdeleções e microduplicações cromossômicas, com a utilização de *arrays* genômicos ou a investigação de alteração na expressão gênica, aplicando-se *arrays* de expressão. Em estudos recentes, o sequenciamento de genes do cromossomo X tem sido realizado em famílias com XLMR. Ao longo dos últimos anos, observa-se um aumento contínuo no número de genes relacionados a DM, mapeados e identificados (revisão em Chiurazzi e col., 2008)

Entretanto, as mutações em genes únicos identificados no cromossomo X não explicam todo o excesso de homens afetados. Entre as famílias com deficiência mental ligada ao X, a síndrome do cromossomo X-frágil é a mais comum, com frequência de 25%. Já dentre os casos esporádicos de homens com deficiência mental, 2,5% são causados pela síndrome. Assim, estima-se que cerca de 10% dos homens com deficiência mental possuam mutações em genes do cromossomo X. Essa frequência é, portanto, menor do que a esperada para explicar o excesso de homens em relação a mulheres com DM (revisão em Ropers e Hamel, 2005). Mandel e

Chelly (2004) propuseram que diferenças no desenvolvimento embrionário do cérebro masculino e feminino poderiam tornar os homens mais susceptíveis a agressões que resultariam em DM. Outra possibilidade aventada foi que polimorfismos no cromossomo X teriam efeitos sutis sobre as habilidades cognitivas na maioria dos portadores, mas resultariam em deficiência mental quando associados a certos alelos autossômicos ou ligados ao X ou ainda a fatores ambientais. Os autores estimam que 5% desses alelos teriam tal impacto na população masculina que, somados à deficiência mental causada por mutações em genes únicos do cromossomo X, seriam suficientes para explicar o excesso de homens afetados.

Quanto aos 10% estimados de deficiência mental de herança monogênica ligada ao X, eles não são explicados pelos genes do cromossomo X encontrados mutados até o momento em associação a DM. Com a notável exceção do gene *FMR1*, cuja mutação causa a síndrome do cromossomo X frágil, mutações nos demais genes já identificados ocorrem com frequências muito baixas. Entre 600 famílias do banco de famílias com DM ligada ao X do *EuroMRX Consortium*, não incluindo a síndrome do cromossomo X frágil, as mutações em 90 outros genes do cromossomo X associados a DM explicaram cerca de 42% da deficiência mental, quando havia afetados em diferentes gerações (de Brouwer e col. 2007). Quando se considera que as famílias com a síndrome do X frágil representam 25% das famílias com DMLX, mutações em genes do cromossomo X explicariam cerca da metade dos casos de deficiência mental ligada ao cromossomo X e, portanto, a maioria dos casos familiares permanece sem ter os genes mutados identificados. Nesse mesmo estudo, 17% das famílias com

afetados em apenas uma geração tiveram a DM explicada por mutações no cromossomo X e, entre os casos isolados de DM, apenas 1,4%. (de Brouwer e col. 2007).

Tarpey e col. (2009) empreenderam um grande esforço para identificar genes mutados em 208 famílias em que a deficiência mental segregava com padrão indicativo de herança ligada ao cromossomo X, realizando o sequenciamento de exons de 718 genes do cromossomo X, cobrindo cerca de 75% da região codificadora desses genes. Esse estudo identificou nove novos genes associados a DM, mas a mutação causal só foi identificada em 25% das famílias. Esse número relativamente pequeno de mutações detectadas pode ter diversas explicações: a não detecção de variações no número de cópias do DNA, a localização das mutações em genes não sequenciados ou em regiões não estudadas nos genes, como íntrons, regiões reguladoras ou outras regiões não codificadoras e ainda a inclusão de famílias que não teriam DMLX.

As dificuldades na avaliação do significado patogênico de uma substituição de par de bases detectada nesse estudo de sequenciamento em larga escala foram discutidas por Raymond e col. (2009). Por exemplo, grande parte das mutações *nonsense* não pôde ser relacionada à deficiência mental por não segregarem com a doença na família ou por estarem presentes em indivíduos da amostra controle, isso mostrando que cerca de 1% dos genes do cromossomo X podem aparentemente perder a função e não ter efeito fenotípico claro, em hemizigose. No caso das mutações *missense*, a decisão sobre a natureza patogênica fica ainda mais difícil. Tarpey e col. (2009) usaram critérios rígidos para buscar o significado para a

deficiência mental das 983 substituições diferentes que encontraram; além do estudo de segregação nas famílias, investigaram amostras controle com mais de 1000 indivíduos; levaram também em consideração a conservação evolutiva dos aminoácidos substituídos; o número de variantes do gene foi outro aspecto avaliado, pois se maior do que a taxa de evolução do gene prediz é indicativo de seleção positiva e, numa amostra de indivíduos com deficiência mental, incluiria também aquelas variantes causadoras da doença.

Assim, apesar de já terem sido identificados 92 genes no cromossomo X cujas mutações causam deficiência mental, a frequência de mutações nesses genes está longe de explicar os 10% estimados de deficiência mental ligada ao cromossomo X. Portanto, faltam genes do cromossomo X para explicar esses casos de padrão de herança monogênico.

A contribuição de microrrearranjos no cromossomo X para a DMLX tem sido investigada nos últimos anos, por meio de *microarrays* devotados ao cromossomo X. Microdeleções e microduplicações (CNV, *Copy Number Variation*) aparentemente patogênicas maiores do que 100 kb foram identificadas no cromossomo X em cerca de 5% das famílias com herança ligada ao X, catalogadas no *EuroMRX Consortium*, sendo a mais comum dessas alterações a microduplicação do gene *MECP2* (Lugtenberg e col., 2007), que fora antes identificada como responsável por cerca de 1% da DMLX (Van Esch e col., 2005). Mais recentemente, Whibley e col. (2010) detectaram CNV patogênicas no cromossomo X em 10% das 251 famílias em que a DM segregava com padrão de herança sugestivo de ser ligada ao

X. Nessas famílias, nenhuma mutação de ponto fora detectada, no estudo anterior do grupo, que sequenciou a região codificadora da maioria dos genes do cromossomo X (Tarpey e col., 2009). Esses estudos mostram que os microrrearranjos do cromossomo X podem explicar parte DMLX.

I.3. A inativação do cromossomo X em mulheres portadoras de mutações no cromossomo X associadas a deficiência mental

A inativação do cromossomo X nas células somáticas femininas ocorre como mecanismo de compensação de dose dos produtos gênicos entre os dois sexos. Essa inativação, estabelecida no início do desenvolvimento embrionário, é aleatória e clonal, pois uma vez tornado inativo, o cromossomo mantém-se inativo nas células descendentes (Lyon, 1960; revisão em Boumil e Lee, 2001). Disso resulta que, em média, as mulheres possuem 50% das suas células somáticas com o cromossomo X materno ativo e nos outros 50%, o cromossomo ativo é o paterno. São, assim, mosaicos quanto à inativação do cromossomo X e se distribuem de acordo com uma curva normal quanto à porcentagem de células com o cromossomo X materno ou paterno inativos, como demonstrado em estudo de 415 mulheres adultas da população geral (Amos-Landgraf e col., 2006). Os autores verificaram que apenas 1,7% dessas mulheres tinham padrão de inativação com desvio completo (100:0) e concluíram que uma mulher qualquer da população, que tenha tal padrão de inativação, tem probabilidades pelo menos iguais de ser portadora ou não de mutação no cromossomo X que afeta a razão de inativação, justificando a investigação de patologias de herança ligada ao X na família.

Willard e col. (2000) observaram que mutações do cromossomo X que causam deficiência mental apareciam frequentemente associadas a desvio de inativação do cromossomo X, detectado em células de sangue periférico nas mulheres portadoras. Para investigar essa associação, Plenge e col. (2002) analisaram o padrão de inativação do X em 155 mulheres portadoras certas (94) ou não portadoras (61) pertencentes a 24 famílias em que segregavam 20 diferentes mutações associadas a DMLX. Observaram que cerca de 50% das portadoras tinham desvio de inativação (>80:20) e que um terço delas apresentavam um grande desvio (>90:10), comparado com um desvio (>80:20) em apenas 9% das 205 mulheres de grupo controle da população geral. Os autores concluíram que o desvio de inativação extremo em mães de meninos com deficiência mental é característica comum de mutações em genes do cromossomo X que causam deficiência mental, aparecendo como específico para certas mutações. Esse padrão desviado da inativação seria consequência da vantagem proliferativa das células com o alelo normal ativo.

Abordando a questão de os desvios extremos no padrão de inativação nas portadoras de mutação do cromossomo X decorrerem de efeito primário no padrão de inativação ou serem secundários à seleção durante o desenvolvimento, Muers e col. (2007) estudaram a expressão do gene *Atrx*, no desenvolvimento de camundongos. Mutações no gene humano *ATRX* causam DMLX e as mulheres portadoras dessas mutações apresentam desvio de inativação do cromossomo X. O grupo estudou o padrão de inativação em fêmeas de camundongos heterozigotas quanto a mutação no gene *Atrx* e fêmeas controle sem a mutação, avaliando a

presença ou não da proteína, por imuno-histoquímica. Nos embriões com 8 dias não houve diferença entre o número de células Atrx-negativas e positivas, o que permitiu a conclusão de que, no estabelecimento, a inativação do cromossomo X é casual. A análise de diferentes tecidos durante o desenvolvimento mostrou declínio gradual de células que não expressavam a proteína. Esses resultados indicaram que o desvio da inativação do X observado em tecidos das fêmeas adultas resulta da seleção celular, que ocorre durante a formação dos tecidos.

Há trabalhos que mostram que a frequência de inativação do cromossomo X totalmente desviada aumenta com a idade da mulher, mas a extensão desse efeito varia entre os diferentes estudos, utilizando células de sangue periférico (revisão em Orstavik, 2009).

Amos-Landgraf e col. (2006) verificaram que, entre recém-nascidas, a frequência de desvios >90:10 era de cerca de 0,5% e de desvios extremos >95:5 era ainda menor, cerca de 0,2%. Esse desvio extremo entre recém-nascidas tinha, portanto, frequência cerca de nove vezes menor do que a de 1,7% observada entre mulheres adultas. Entre as mulheres estudadas por Hatakeyama e col. (2004), cerca de 10% apresentaram desvios de inativação > 90:10 na faixa de idade de 0 - 39 anos; essa proporção elevou-se para 14% na faixa de idade de 40-59 anos e para 29%, entre as mulheres com mais de 60 anos. A correlação entre idade e tamanho do desvio, embora fraca, foi positiva para todas as idades ($r = 0.23$, $p < 0.0001$) e a distribuição das mulheres mais velhas quanto à inativação diferiu da distribuição normal. Trabalhos analisando apenas mulheres como mais de 60 anos (Sharp e col., 2000), com mais de 73 anos (Kristiansen e col., 2005)

ou com 101 anos (Christensen e col., 2000) mostraram frequências de desvios >90:10 entre 8% a 18%, maiores do que a de 3,6% observada por Amos-Landgraf e col. (2006) entre 415 mulheres adultas e a de 5% que Bolduc e col. (2008), encontraram entre 450 mulheres jovens. A comparação entre resultados obtidos em células sanguíneas e células epiteliais de mucosa oral mostrou que, apesar de a correlação entre idade e frequência de desvio na inativação do X ser comum a ambos os tecidos, é menos pronunciada nas células epiteliais (Bolduc e col., 2008). As causas da correlação entre idade e aumento do desvio de inativação não são claras. A inativação do mesmo cromossomo X em células sanguíneas e epiteliais (Bolduc e col., 2008) aponta para a seleção contra células portadoras de certas mutações no cromossomo X ativo, com o envelhecimento, mas esse efeito pode refletir uma flutuação casual na população de células hematopoiéticas, com o tempo. Entretanto, Swierczek e col. (2008), estudando 40 mulheres saudáveis, com idades entre 65 e 92 anos, usando um ensaio de clonalidade baseado na determinação da transcrição de alelos que diferiam por polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), não encontraram desvio de inativação; mas nove de 26 dessas mulheres foram identificadas como portadoras de desvio >80:20, quando o teste utilizado, à semelhança dos trabalhos anteriores, baseou-se na metilação diferencial do gene receptor de andrógeno nos cromossomos X ativo e inativo. Esse resultado pode significar que alterações da metilação estejam ocorrendo em mulheres mais velhas, que possam não alterar a expressão de genes do cromossomo X. Uma investigação maior se faz necessária.

Em nosso projeto de iniciação científica (FAPESP, Processo: 06/57248-0), investigamos a presença de desvio total da inativação do X em genitoras de pacientes do sexo masculino com deficiência mental, como indicativa de que a DM em seus filhos fosse causada por mutação no cromossomo X. Dentre 25 mulheres, cinco apresentaram desvio total de inativação, uma frequência (20%) maior do que a esperada, levando em conta que o desvio total de inativação está presente em cerca de 2% das mulheres da população geral. Esses achados nos levaram a prosseguir esse estudo, em nosso programa de mestrado.

II. OBJETIVO

Este trabalho teve o objetivo de estimar a frequência de deficiência mental causada por mutações no cromossomo X entre pacientes do sexo masculino, que constituem casos isolados de deficiência mental. Com base (a) nas indicações de que o desvios extremos de inativação do cromossomo X em uma mulher está associado com alta probabilidade a mutações no cromossomo X e (b) na observação de que esses desvios estão significativamente aumentados em mulheres certamente portadoras de mutações que causam deficiência mental de herança ligada ao X, avaliamos a presença de desvios extremos da inativação do cromossomo X nas genitoras dos afetados.

III. PACIENTES E MÉTODOS

III.1. Casuística

Os pacientes com deficiência mental sindrômica foram triados no Serviço de Aconselhamento Genético do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para onde foram encaminhados em busca de diagnóstico e aconselhamento genético para a família. Possuíam deficiência mental (DM) moderada a grave, avaliada com base em suas limitações cognitivas e comportamentais. Para o estudo, foram selecionados os pacientes cujos quadros clínicos não se enquadravam em síndrome genética conhecida e que tiveram resultados normais em exame cromossômico, realizado após bandamento G, e em teste molecular para a síndrome do cromossomo X frágil. Para inclusão no estudo, foi obtido o consentimento esclarecido das genitoras dos pacientes. O estudo, extensão do projeto de Iniciação Científica (Processo FAPESP 06/57248-0), foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa- Seres Humanos do Instituto de Biociências (Protocolo: 058/2006).

III.2. Métodos

A determinação do padrão de inativação do cromossomo X nas genitoras dos pacientes selecionados para o estudo foi realizada pela análise da metilação da repetição polimórfica CAG do gene *AR* (*Androgen Receptor Gene*; Xq11-12), conforme descrito por Allen e col. (1992), com modificações. O gene *AR* codifica um receptor de andrógeno, membro de superfamília de receptores de esteróides e possui, em seu éxon 1, um número variável de repetições CAG (heterozigose = 0,9), traduzida em uma

cadeia de poliglutaminas, de comprimento variável, no domínio amino-terminal de transativação da proteína. Existe, próximo à repetição CAG, um sítio de restrição da enzima *HpaII*, que se encontra metilado apenas no X inativo. A análise do padrão de inativação do cromossomo X foi realizada amplificando-se a repetição CAG a partir de DNA genômico submetido ou não a digestão com a enzima *HpaII*. A repetição CAG foi amplificada por PCR (*Polimerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase), utilizando os *primers* (*Promega*, Wisconsin, USA) AR - F (56-FAM): 5'GCTGTGAAGGTTGCTGTTTCCTCAT3' e AR - R: 5'TCCAGAATCTGRTCCAGAGCGTGC3', que também flanqueiam o sítio de restrição da enzima *HpaII*. Como a enzima *HpaII* só corta os sítios de restrição desmetilados, ou seja dos alelos do gene *AR* localizados no cromossomo X ativo, esses alelos não são amplificados. Assim, é possível determinar o padrão de inativação do cromossomo X, analisando os alelos do cromossomo X inativo, aqueles que são amplificados após a digestão com a enzima *HpaII* (Figura 1).

A extração de DNA genômico de leucócitos de sangue periférico de cada indivíduo foi realizada, utilizando o *Autopurecs* (*Gentra Systems* Minneapolis, USA) e as amostras foram quantificadas no Nanodrop ND-1000 (*Nanodrop Technologies*, Rockland, USA). Duas amostras de 1000 ng de DNA foram tratadas simultaneamente: uma foi submetida à digestão pela enzima *HpaII* (*Invitrogen*, Carlsbad, USA), por 16 horas a 37°C, deixando-se em seguida à temperatura de 65°C por 25 minutos para inativação da enzima; a outra amostra foi incubada, na ausência da enzima *HpaII*. A reação de amplificação foi realizada a partir de 200 ng de DNA de cada

amostra, em volume final de reação de 30 μ l, na presença de Tris 30 mM (pH 8,5), KCl 10Mm, Hepes 10

A Lócus do gene AR

B Caso 1: Inativação Aleatória

Caso 2: Desvio total de inativação

C Digestão com *HpaII* - sensível à metilação

D PCR antes(1) e após(2) a digestão com a enzima *HpaII*

Caso 1: Inativação Aleatória

Caso 2: Desvio total de inativação

mM, MgCL 1,5 Mm, (NH₄)₂SO₄ 10 Mm, 200 uM de cada dNTP, 15 pmoles dos *primers forward* e *reverse* e 1 U de *Taq* polimerase. O programa de amplificação consistiu em um período de desnaturação inicial a 95°C por 5 min e 45 s, seguido da hibridação dos *primers* a 60° por 30 s e extensão a 72° C por 30 s; seguiram-se 28 ciclos, às temperaturas de 95°C por 45 s, 60°C por 30 s e 72° C por 30 s e por fim uma etapa de extensão a 72°C por 10 min. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em capilar no aparelho MegaBACE™ 1000 (*Amersham Biosciences*, New Jersey, USA), utilizando o padrão de peso molecular MegaBACE™ ET 550-R Size Standard. A análise foi feita por meio do *software* Genetic Profiler, versão 2.2.

Considerando que o teste da metilação do gene *AR*, baseia-se na digestão diferencial entre sítios metilados e não metilados, em todos os experimentos, utilizamos o DNA de um homem normal, como controle da digestão, pois estando seu cromossomo X sempre ativo, após tratamento enzimático, não se pode detectar produto amplificado. Também fizemos duplicatas de alguns experimentos, não encontrando desvios significativos. No caso de desvios completos ($\geq 98:2$), os resultados foram validados num segundo experimento.

Avaliamos o padrão de inativação do cromossomo X, estabelecendo a razão de inativação. Para isso, calculamos a razão entre o valor do pico de altura (amplificação) do menor alelo e a soma dos valores correspondentes aos dois alelos. O valor do pico de amplificação foi corrigido, usando-se a razão do valor do pico do alelo digerido e do mesmo alelo não digerido: $(phd1/phu1)/(phd1/phu1)+(phd2/phu2)$, em que phd1 = alelo menor após

digestão, phu1 = alelo menor não digerido, phd2 = alelo maior após digestão e phu2 = maior alelo não digerido (Bittel e col., 2008). Somente as mulheres heterozigóticas no loco *AR* puderam ter o padrão de inativação estabelecido.

IV. RESULTADOS

Foram estudadas 115 genitoras de pacientes do sexo masculino casos isolados de deficiência mental síndrômica, quanto ao padrão de inativação do cromossomo X. Cem mulheres foram informativas, pois eram heterozigóticas quanto ao gene *AR* (Tabela 1).

Tabela 1. Padrão de inativação do cromossomo X em 100 genitoras de pacientes do sexo masculino, casos isolados de deficiência mental síndrômica

Mulher	Idade (anos)	Razão de inativação* (alelos maior : menor)
1	65	63:37
2	55,4	30:70
3	46,3	25:75
4	38,6	70:30
5	41,7	17:83
6	40,6	0:100
7	37,1	60:40
8	41	58:42
9	34	Homozigótica
10	41,6	100:0
11	36,8	24:76
12	35,8	82:18
13	27,1	38:62
14	41	Homozigótica
15	33,7	14:86
16	29,8	Homozigótica
17	41,8	100:0
18	33,2	52:48
19	41	Homozigótica
20	44,2	100:0
21	38,1	16:84
22	30,2	61:39
23	35,8	52:48
24	37, 6	28:72

(Continua)

Mulher	Idade (anos)	Razão de inativação* (alelos maior : menor)
25	58,2	64:36
26	42,4	41:59
27	38,8	02:98
28	32,5	62:38
29	38,8	80:20
30	45	Homozigótica
31	27,2	13:87
32	30,8	56:44
33	21,1	Homozigótica
34	33,9	Homozigótica
35	35,7	69:31
36	25,3	30:70
37	32	40:60
38	29,7	43:57
39	56	0:100
40	38 .	30:70
41	31,8	45:55
42	28,9	54:46
43	54,6	50:50
44	28,7	65:35
45	33,3	72:28
46	32,2	74:26
47	40,1	33:67
48	32,1	40:60
49	20	38:62
50	42,8	Homozigótica
51	44,6	60:40
52	43,9	37:63
53	42,7	28:72
54	32,7	63:37
55	42,3	57:43
56	45,1	100:0
57	27,7	57:43
58	43,3	52:48
59	26,7	0:100
60	44	61:39
61	39,3	78:22
62	43,2	55:45
63	37,4	51:49
64	47,3	51:49
65	42,3	58:42

(Continua)

Mulher	Idade (anos)	Razão de inativação* (alelos maior : menor)
66	44,1	50:50
67	39,9	37:63
68	35,1	Homozigótica
69	47	64:36
70	41,5	60:40
71	42,9	47:53
72	39,3	Homozigótica
73	37,7	0:100
74	25,6	35:65
75	33,2	42:58
76	35,3	Homozigótica
77	22	58:42
78	30,9	27:73
79	31,6	43:57
80	23,3	20:80
81	34	72:28
82	42,1	54:46
83	38,9	43:57
84	38,8	69:31
85	47,7	100:0
86	37,7	43:57
87	31,5	53:47
88	33,2	80:20
89	30,1	75:25
90	39,9	28:72
91	44	73:27
92	49,3	86:14
93	31,3	Homozigótica
94	48,3	70:30
95	36,7	0:100
96	41,1	36:64
97	30,1	72:28
98	28,6	Homozigótica
99	29,1	55:45
100	40,7	34:66
101	34,8	52:48
102	42,9	Homozigótica
103	27,2	42:58
104	31,3	53:47
105	42,8	70:30
106	37,1	32:68

(Continua)

Mulher	Idade (anos)	Razão de inativação* (alelos maior : menor)
107	28,1	43:57
108	39,7	27:73
109	32,5	44:56
110	29	65:35
111	34,2	82:18
112	46,9	75:25
113	34,4	41:59
114	32,5	44:56
115	37,8	Homozigótica

*(phd1/phu1)/(phd1/phu1)+(phd2/phu2), em que phd1 = alelo menor do gene *AR*, após digestão *Hpa II*, phu1 = alelo menor não digerido, phd2 = alelo maior após digestão *Hpa II* e phu2 = maior alelo não digerido

Dentre as 100 mulheres informativas (Tabela 2), 11 apresentaram o que consideramos desvio total de inativação ($\geq 95:5$), ou seja, possuíam o mesmo cromossomo X inativo na quase totalidade das células de sangue periférico. Em 10 dessas mulheres, esse desvio foi total (100:0 ou 0:100; Figura 2) e em uma, quase total (02:98). Em 15 mulheres não foi possível avaliar o padrão de inativação, porque elas são homozigóticas quanto ao polimorfismo do gene *AR*. (Figura 3).

Tabela 2. Distribuição das genitoras de pacientes com deficiência mental sindrômica quanto ao padrão de inativação do cromossomo X com desvio total ou não.

Padrão de Inativação do Cromossomo X.			
Mulheres Informativas (Heterozigóticas)		Mulheres não Informativas (Homozigóticas)	Total
n=100		n=15	n=115
Sem Desvio Total	Com Desvio Total		
89 (89%)	11 (11%)

Figura 2. Padrão de inativação completamente desviado do cromossomo X, ou seja, o mesmo cromossomo X está inativo em todas as células (razão de inativação 100:0). Os picos de amplificação representam (A) os dois alelos amplificados antes do tratamento com a enzima *HpaII* e (B) um único alelo amplificado após o tratamento enzimático.

Figura 3. Teste para estabelecer o padrão de inativação do cromossomo X, em mulher homozigótica no locus *AR*: não se distinguem os picos de amplificação dos dois alelos, o que impede estabelecer a proporção de alelos no X inativo. Amplificação dos alelos (A) não digeridos pela enzima *Hpa II* e (B) após a digestão enzimática.

As Figuras 4 e 5 mostram outros gráficos obtidos na avaliação do padrão de inativação do cromossomo X, em genitoras dos pacientes. A Figura 6 mostra o gráfico obtido para controle masculino normal.

Figura 4. Padrão de inativação do cromossomo X, em que o mesmo cromossomo X está inativo em 56% das células do sangue periférico (razão de inativação 56:44). Observa-se que os dois alelos são amplificados de modo semelhante (A) antes do tratamento com a enzima *Hpa* II e (B) após a digestão enzimática.

Figura 5. Padrão de inativação do cromossomo X, em que um mesmo cromossomo X está inativo em 82% das células do sangue periférico (razão de inativação 82:18). Picos de amplificação dos alelos (A) antes do tratamento com a enzima *Hpa* II e (B) após a digestão enzimática.

Figura 6. Controle masculino: seu único cromossomo X está ativo em todas as células. Observa-se o pico de amplificação do alelo (A) antes do tratamento com a enzima *Hpa II*, mas não (B) após a digestão enzimática.

A frequência de mulheres com desvios extremos de inativação (100:0 ou $\leq 2:98$) na nossa amostra (0,11; IC 95% = 0,056 – 0,188) é significativamente maior ($P=0,0001$; teste exato de Fisher) do que aquele encontrado por Amos-Landgraf (2006) ao estudarem 415 mulheres adultas da população geral (0,017; IC 95% = 0,007 – 0,034).

A Figura 7A mostra a distribuição das 100 genitoras de pacientes com DM, quanto à razão de inativação do cromossomo X, em comparação com a distribuição das 415 mulheres adultas da população geral estudadas por Amos-Landgraf e col. (2006), mostrada na Figura 7B.

Diante da tendência de as mulheres mais velhas apresentarem maior frequência de desvio de inativação do X, comparamos as idades das mulheres com desvio total (média $41,536 \pm 7,305$; mediana 41,6) com as daquelas que não apresentaram esse desvio (média $37,064 \pm 7,950$;

mediana 37,1), encontrando diferença apenas marginalmente significativa (Teste de Mann-Whitney: $P = 0,053$).

Figura 7. A. Distribuição das 100 genitoras de pacientes com deficiência mental síndrômica quanto à razão de inativação do cromossomo X. **B.** Distribuição de 415 mulheres adultas da população geral quanto à razão de inativação do cromossomo X, segundo Amos-Landgraf e col.(2006).

V. DISCUSSÃO

Este estudo teve o objetivo de avaliar a frequência de deficiência mental causada por mutação no cromossomo X (DMLX) entre afetados do sexo masculino, casos isolados de deficiência mental. Apesar de reconhecida como causa genética importante de deficiência mental (DM), a extensão da contribuição das mutações no cromossomo X para a DM ainda não é claramente conhecida. As estimativas da frequência populacional da DMLX variam de 5:10.000 homens, com base no estudo de pares de irmãos e irmãos afetados, a 1:1.000 homens, a partir das estimativas das frequências da síndrome do cromossomo X frágil na população masculina e entre famílias com DMLX. Foi também o estudo da síndrome do X frágil em coortes de homens com DM e em famílias com DMLX que permitiram a estimativa de 10 a 12% para a frequência da DM causada por mutações no cromossomo X entre os afetados do sexo masculino. Quando se consideram a frequência de DM e as estimativas de DMLX na população geral masculina infere-se que 10 a 20% da deficiência mental no sexo masculino seriam de herança ligada ao X (revisão em Ropers e Hamel, 2005). Apesar de nos darem ideia da grandeza da contribuição da DMLX para a DM, as estimativas em que se baseiam esses cálculos são muito variáveis. Mesmo para a síndrome do X frágil, com diagnóstico molecular disponível, as estimativas da frequência entre homens variam de 1:4.000 a 1:6.000 (Crawford e col., 2001; Hagerman, 2008).

Neste estudo, usamos o padrão de inativação do cromossomo X em mães de pacientes do sexo masculino com DM, como parâmetro para avaliar a frequência de DMLX. Essa estratégia foi indicada pela observação

de que cerca de um terço das mulheres portadoras de mutação que causam DMLX têm desvios extremos no padrão de inativação do cromossomo X em relação às não portadoras, detectado em linfócitos de sangue periférico, sendo esta uma associação constante em cerca de 20% dos casos familiares (Plenge e col., 2002). Admite-se amplamente que esses desvios resultam da seleção contra aquelas células que têm a mutação no cromossomo X ativo, como demonstrado em fêmeas de camundongos portadoras de mutação no gene *Atrx*, cujo ortólogo humano está associado a DMLX (Muers e col., 2007).

Estudamos o padrão de inativação do cromossomo X em um grupo de 115 mães de pacientes do sexo masculino com deficiência mental de causa desconhecida. Além da deficiência mental, os pacientes apresentavam outros sinais clínicos e, portanto, possuíam quadros sindrômicos. O conjunto de seus sinais clínicos, entretanto, não caracterizava síndrome já descrita e causas frequentes e rotineiramente pesquisadas em casos de deficiência mental de causa desconhecida, ou seja, uma alteração cromossômica ou a síndrome do cromossomo X frágil foram afastadas nesses pacientes. Com base na avaliação da metilação do gene *AR* (*Androgen Receptor*), realizada em leucócitos de sangue periférico, identificamos 11 mulheres, entre as 100 informativas para o teste, com padrão de inativação completamente desviado, ou seja, com o mesmo cromossomo X inativo em praticamente todas as células. Essa frequência é significativamente maior do que aquela observada entre mulheres adultas da população por Amos-Landgraf e col (2006). Admitindo que todas as mulheres com desvios extremos da inativação do cromossomo X, em nossa amostra, sejam portadoras de

mutação no cromossomo X que cause a DM em seus filhos, a frequência de DMLX em nossa amostra de 100 meninos com deficiência mental moderada a grave, excluindo a síndrome do X frágil, é de 11% (95% IC = 0.056 - 0.188). Se incluirmos a síndrome do X frágil (2,5 – 3%), estimamos que, em cerca de 14% dos homens com DM sindrômica, a causa seja uma mutação no cromossomo X.

A frequência a que chegamos é, assim, de mesma ordem de grandeza das estimativas anteriores para a proporção de DMLX entre homens com DM moderada a grave. Entretanto, devemos considerar que apenas um terço das mulheres certamente portadoras de mutação que causa DMLX tem desvio significativo da inativação casual do cromossomo X, detectável no sangue (Plenge e col., 2002), o que sugere que a frequência que obtivemos seja uma subestimativa da real contribuição das mutações do cromossomo X para a DMLX. Uma limitação deste estudo é, sem dúvida, o fato de termos estudado apenas células sanguíneas. Por exemplo, o estudo de Muers e col. (2007), em fêmeas de camundongos, mostra que a seleção contra a proliferação de células portadoras de mutação no gene *Atrx* é tecido-específica.

Um fator que parece influenciar o padrão de inativação do cromossomo X é a idade da mulher. Alguns trabalhos mostram que a frequência de inativação do cromossomo X totalmente desviada aumenta com a idade da mulher, mas a extensão desse efeito varia entre os diferentes estudos utilizando células de sangue periférico (revisão em Orstavik, 2009). Em nossa amostra as idades das mulheres com padrão de inativação completamente desviado variaram de 26,7 anos a 56 anos (média

41,54 $\pm$ 7,31); as idades daquelas que não apresentaram esse desvio extremo no padrão de inativação variaram de 20 anos a 65 anos (média 37,06 $\pm$ 7,95). Essa diferença de idades entre os dois grupos mostrou-se marginalmente significativa no nível de significância de 5%. A seleção, ao longo do tempo, contra células portadoras de mutações patogênicas no cromossomo X ativo tem sido aventada para explicar a tendência de mulheres mais velhas apresentarem desvios de inativação, o que seria esperado entre mulheres portadoras de mutação que cause deficiência mental.

Para comparação das frequências de desvios extremos do padrão de inativação entre as mulheres de nossa amostra com o que ocorre na população geral, utilizamos a amostra de 415 mulheres adultas clinicamente normais, estudadas por Amos-Landgraf e col. (2006). Os indivíduos desse estudo provieram de diferentes populações (Cleveland, USA; Botnia, Finlândia; menonitas da Pensilvânia, USA; Tel Aviv, Israel), mas esses grupos não mostraram diferença entre si quanto à distribuição da razão de inativação. Essa amostra foi indicada pelos próprios autores para ser utilizada como controle, inclusive por outros pesquisadores, em estudos de pacientes ou de outras amostras geneticamente definidas. Nesse estudo, o padrão de inativação foi determinado também entre 590 recém-nascidas clinicamente normais. O teste laboratorial utilizado pelos autores foi o da metilação do gene *AR*, que teve, inclusive, sua validade testada, em estudo da transcrição de um polimorfismo do gene *XIST* (*Inactive X Specific Transcript*); como a expressão desse gene está restrita ao X inativo, esse teste permitiu estimar diretamente a proporção das células com um

determinado alelo no X inativo. A grande vantagem na utilização do teste de metilação do gene *AR* é a alta frequência de heterozigose na população feminina. Diante de tudo isso, especialmente considerando o tamanho da amostra estudada por Amos-Landgraf e col. (2006), decidimos usá-la como controle, não estudando número pelo menos equivalente de mulheres de nossa população geral.

Comparando a distribuição das mulheres quanto à razão de inativação padrão de inativação do cromossomo X em nossa amostra (Figura 7A) com aquela da amostra de Amos-Landgraf e col. (2006), que reproduzimos na Figura 7B, verificamos que basicamente as distribuições diferem quanto ao aumento na frequência de mulheres nos extremos da curva. A mediana da razão de inativação foi 52:48 em nossa amostra e 48:52 na amostra da literatura.

Com base na distribuição de frequência das 415 mulheres quanto à razão de inativação do X, do estudo de Amos-Landgraf e col. (2006), foi possível estimar a probabilidade exata de um padrão qualquer apresentado por uma determinada mulher ocorrer na população geral (Paulo A. Otto, Instituto de Biociências, USP; comunicação pessoal). Essa probabilidade para um padrão de inativação, em que o mesmo cromossomo X está inativo em todas as das células de uma mulher é 0,01. A aplicação de elementos de estatística Bayesiana, admitindo uma frequência de 1% para as doenças de herança ligada ao X, permitiu a Amos-Landgraf e col. (2006) estimar que, se uma mulher com tal desvio de inativação é membro de uma família em que segrega uma doença com herança ligada ao X, suas chances de ser portadora ou não da mutação que causa a doença são de praticamente

100:1. Tratando-se de uma mulher adulta da população geral, sua chance de ser ou não portadora de uma doença com herança ligada ao X é pelo menos igual, justificando a extensão do estudo. As mulheres que detectamos com desvios extremos da inativação do X constituem um grupo particular, pois todas tiveram um filho com deficiência mental. Portanto, os desvios de inativação do cromossomo X que apresentam podem ser considerados forte indicação de que elas sejam portadoras de mutações causadoras de deficiência mental em seus filhos. Esse aspecto deve ser abordado no aconselhamento genético, na avaliação dos riscos de recorrência da deficiência mental na prole dessas mulheres, e o estudo da inativação do X deve ser oferecido para outras mulheres da família, portadoras potenciais da provável mutação. A presença de desvio de inativação em outra mulher da família pode ser considerada como confirmatória da existência de mutação no cromossomo X causando a DM no propósito.

A identificação da alteração do cromossomo X associada ao desvio de inativação é um desafio. Estudos extensivos, incluindo o sequenciamento de regiões codificadoras da maioria dos genes do cromossomo X (Tarpey e col., 2009) ou daqueles anteriormente associados a DMLX (de Brouwer e col. 2007) deixaram de identificar mutações na maioria das famílias em que a deficiência mental segregava num padrão compatível com a herança ligada ao X. Em 10% dessas famílias sem diagnóstico, foram identificadas microdeleções ou microduplicações cromossômicas que explicaram a DMLX (Whibley e col., 2010); como salientaram os autores, a avaliação da relação de causa e efeito das CNV detectadas foi facilitada pela possibilidade de verificar a segregação

concomitante das variantes cromossômicas e da DM em famílias extensas; com tudo isso, a mutação não foi encontrada em cerca de 65% das famílias. Nos casos isolados, candidatos a possuírem mutações no cromossomo X, os desafios são claramente ainda maiores. O sequenciamento exônico do cromossomo X é factível, assim como a investigação de CNV, utilizando *microarray* dedicado ao cromossomo X, estratégia essa que já está sendo aplicada nos nossos pacientes, em outro projeto do laboratório. Entretanto, a validação das variantes cromossômicas possivelmente patogênicas como causa da DM é dificultada pela ausência de outros afetados; aqui novamente entra o desvio da inativação do cromossomo X que, em associação com uma CNV candidata em mulheres da família, vai dar apoio à conclusão sobre sua patogenicidade.

Com base em nossos resultados, consideramos que está indicado o estudo da inativação do cromossomo X em mulheres, mães de indivíduos do sexo masculino, casos isolados de DM. A detecção de desvio extremo do padrão de inativação do cromossomo X deve ser considerada indicativa de DMLX, contribuindo para o aconselhamento genético da família e podendo levar à identificação da mutação causadora da DM.

VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve o objetivo de estimar a frequência de deficiência mental causada por mutações no cromossomo X entre pacientes do sexo masculino, que constituem casos isolados de deficiência mental. A estratégia adotada foi a determinação do padrão de inativação do cromossomo X nas mães dos afetados, com base (a) nas indicações de que desvios extremos do padrão casual de inativação do cromossomo X têm alta probabilidade de estar relacionados à presença de mutações do cromossomo X e (b) na observação de que a frequência desses desvios está significativamente aumentada em mulheres certamente portadoras de mutações que causam deficiência mental de herança ligada ao X. A vantagem seletiva das células que possuem o alelo não mutado no cromossomo X ativo é uma explicação para tais desvios extremos da inativação do cromossomo X, raramente encontrados na população geral.

Selecionamos 115 meninos portadores de deficiência mental moderada a grave associada a outros sinais clínicos, não característicos de síndrome conhecida e que tinham cariótipos normais e teste negativo para a síndrome do cromossomo X frágil; suas genitoras concordaram com a participação no estudo. Esses pacientes foram encaminhados ao Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, por diferentes serviços médicos, para diagnóstico e orientação quanto a riscos de recorrência na família. O padrão de inativação do cromossomo X nas mães dos afetados foi investigado, com base na metilação diferencial dos alelos do gene *AR*

(*Androgen Receptor gene*), no cromossomo X ativo e inativo. As mães de 100 desses meninos se revelaram heterozigóticas quanto à repetição polimórfica CAG do gene *AR*, requisito do teste para determinar o padrão de inativação do cromossomo X. Onze mulheres (11%) apresentaram desvios extremos do padrão de inativação do X ($\geq 98:2$), frequência significativamente maior ($P = 0.0001$; teste exato de Fisher) do que aquela que a literatura registra, em estudo utilizando o mesmo ensaio, entre mulheres adultas da população geral (0,017; IC 95% = 0,007 – 0,034).

A raridade de desvios tão extremos na população geral permite admitir que as mães dos afetados que apresentam tais desvios sejam portadoras de mutação no cromossomo X, que causa a deficiência mental em seus filhos. Sendo assim, estimamos em 11% a frequência de deficiência mental em nossa amostra de 100 meninos casos isolados de deficiência mental (IC 95% = 0,056 – 0,188), sem incluir a síndrome do X frágil, responsável por 2,5% a 3% da deficiência mental no sexo masculino.

Essa nossa estimativa para a proporção de deficiência mental moderada grave ligada ao X entre indivíduos do sexo masculino com DM é da mesma ordem de grandeza daquelas relatadas na literatura, baseadas (a) na frequência da síndrome do X frágil em coortes de homens com deficiência mental e entre famílias com deficiência mental de herança ligada ao X ou (b) nas inferências da prevalência de deficiência mental e de deficiência mental causada por mutações no cromossomo X na população geral masculina. Entretanto, a frequência por nós determinada deve ser uma subestimativa, considerando que os desvios extremos do padrão de

inativação ocorrem em apenas um terço das portadoras obrigatórias de mutações que causam deficiência mental com herança ligada ao X.

Com base nos resultados deste estudo, consideramos indicada a avaliação do padrão de inativação do cromossomo X em mães de indivíduos do sexo masculino, casos isolados de deficiência mental. A detecção de desvio extremo da inativação deve ser considerada indicativa de deficiência mental de herança ligada ao X, constituindo subsídio para o aconselhamento genético da família e podendo levar à identificação da mutação causadora da deficiência mental.

VII. ABSTRACT

Nearly a third of obligate carriers of mutations causative of X-linked mental retardation (XLMR) have been reported to have extreme X-inactivation skewing in peripheral blood cells, compared to their non-carrier relatives. Selective advantage of cells with the non-mutated allele on the active X chromosome would explain this skewing. Based on these findings, we used the pattern of X-inactivation in mothers of mentally retarded boys, as a parameter to evaluate the frequency of XLMR among non-familial cases. To determine the X-inactivation pattern in these women, we investigated the methylation status of the *AR* (*Androgen Receptor*) alleles in blood cells. We selected 115 boys with moderate to severe mental retardation of unknown cause, who had normal karyotypes and tested negative for fragile X syndrome; the mothers of 100 of these boys were found to be heterozygous for the polymorphic CAG repeat of the *AR* gene, a requisite of the X-inactivation assay. Eleven women (11%) had extremely skewed X-inactivation ($\geq 98:2$), a frequency significantly higher ($P = 0.0001$; Fisher exact test) than the frequency reported for adult women from the general population (1.7%; 95% CI = 0.007 – 0.034). Assuming that every mother with extremely skewed X-inactivation is a carrier of an X-chromosome mutation that causes mental retardation in her son, the frequency of XLMR in our sample of 100 boys is 11% (95% CI = 0.056 – 0.188), the fragile X syndrome being excluded. Although these figures are quite in agreement with previous estimations of the frequency of XLMR among mentally retarded men, they might be an underestimation, when it is taken into account that only about a

third of obligate carriers of XLMR mutations have highly skewed X inactivation.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW – Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X-chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** 51: 1229-1239, 1992.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF – X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. **Am J Hum Genet.** 79: 493-499, 2006.
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG – Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. **J Med Genet** 45: 309-313, 2008.
- Bolduc V, Chagnon P, Provost S, Dubé MP, Belisle C, Gingras M, Mollica L, Busque L – No evidence that skewing of X chromosome inactivation patterns is transmitted to offspring in humans. **J Clin Invest** 118: 333-341, 2008.
- Boumil RM, Lee JT – Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. **Hum Mol Genet** 10: 2225-2232, 2001.
- Chelly J, Mandel JL – Monogenic causes of X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 2: 669-680, 2001.
- Chiurrazi P, Oostra BA – Genetics of Mental Retardation. **Curr Opin Pediatr** 12: 529-535, 2000.
- Chiurrazi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G – XLMR genes: update 2007. **Eur J Hum Genet** 18: 1-13, 2008.
- Christensen K, Kristiansen M, Hagen-Larsen H, Skytthe A, Bathum L, Jeune B, Andersen Ranberg K, Vaupel JW, Orstavik KH – X-linked genetic factors regulate hematopoietic stem-cell kinetics in females. **Blood** 95: 2449-2451, 2000.
- Crawford DC, Acuna JM, Sherman SL – *FMR1* and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genet Med** 3: 359-371, 2001.
- de Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BB, van Bokhoven H, Van Esch H, Frints SG, Froyen G, Fryns JP, Raynaud M, Moizard MP, Ronce N, Bensalem A, Moraine C, Poirier K, Castelnau L, Saillour Y, Bienvenu T, Beldjord C, des Portes V, Chelly J, Turner G, Fullston T, Gecz J, Kuss AW, Tzschach A, Jensen LR, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH, Hamel BC – Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. **Hum Mutat** 28:207-208, 2007.
- Frints SGM, Froyen G, Marynen P, Fryns J-P – X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. **Clin Genet** 62: 423-432, 2002.

- Hagerman PJ - The fragile X prevalence paradox. **J Med Genet** 45: 498–499, 2008.
- Hatakeyama C, Anderson CL, Beever CL, Peñaherrera MS, Brown CJ, Robinson WP - The dynamics of X-inactivation skewing as women age. **Clin Genet** 66: 327-332, 2004.
- Inlow JK, Restifo LL - Molecular and comparative genetics of mental retardation. **Genetics** 166: 835-81, 2004.
- Kristiansen M, Knudsen GP, Bathum L, Naumova AK, Sørensen TI, Brix TH, Svendsen AJ, Christensen K, Kyvik KO, Ørstavik KH - Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. **Eur J Hum Genet** 13: 599-606, 2005.
- Lehrke R - A theory of X-linkage age of major intellectual traits. **Am J Mental Deficiency** 78: 611-619, 1972.
- Lubs HA - A marker X chromosome. **Am J Hum Genet** 21: 231-244, 1969.
- Lugtenberg D, Veltman JA, van Bokhoven H - High-resolution genomic microarrays for X-linked mental retardation. **Genet Med** 9: 560-565, 2007.
- Lyon MF - Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature** 190: 372–373, 1961.
- Mandel JL, Chelly J - Monogenic X-linked mental retardation: is it a frequent as current estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. **Eur J Hum Genet** 12: 689-693, 2004.
- Muers MR, Sharpe JA, Garrick D, Sloane-Stanley J, Nolan PM, Hacker T, Wood WG, Higgs DR, Gibbons RJ - Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. **Am J Hum Genet** 80: 1138-1149, 2007.
- Ørstavik KH - X chromosome inactivation in clinical practice. **Hum Genet** 126: 363-373, 2009.
- Penrose L.S. - A clinical and genetic study of 1280 cases of mental defect. Special Report Series 229, Medical Research Council, London, UK *Apud* Turner G, Turner B - X-linked mental retardation. **J Med Genet** 11: 109-113, 1974.
- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF - Skewed X-chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. **Am J Hum Genet** 71: 168-173, 2002.
- Raymond FL - X linked mental retardation: a clinical guide. **J Med Genet** 43: 193-200, 2006.

- Raymond FL, Whibley A, Stratton MR, Gecz J – Lessons learnt from large-scale exon re-sequencing of the X chromosome. **Hum Mol Genet** 15: 18: 60-64, 2009
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ – Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents. **J Med Genet** 43:180-186, 2006.
- Ropers HH, Hamel BC – X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 6: 46-57, 2005.
- Ropers HH – Genetics of intellectual disability. **Curr Opin Genet Dev** 18: 241-250, 2008.
- Sharp A, Robinson D, Jacobs P - Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. **Hum Genet** 107:343-349, 2000.
- Sutherland GR – Fragile sites on human chromosomes: demonstration of their dependence on the type of tissue culture medium. **Science** 197: 265-266, 1997.
- Swierczek SI, Agarwal N, Nussenzweig RH, Rothstein G, Wilson A, Artz A, Prchal JT - Hematopoiesis is not clonal in healthy elderly women. **Blood** 112: 3186-3193, 2008.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41: 535-543, 2009.
- Toniolo D – In search of the MRX genes. **Am J Med Genet** 97: 221-227, 2000.
- Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvenu T, Jensen LR, Gecz J, Moraine C, Marynen P, Fryns JP, Froyen G - Duplication of the MECP2 region is a frequent cause of severe mental retardation and progressive neurological symptoms in males. **Am J Hum Genet** 77:442-453, 2005.

Whibley AC, Plagnol V, Tarpey PS, Abidi F, Fullston T, Choma MK, Boucher CA, Shepherd L, Willatt L, Parkin G, Smith R, Futreal PA, Shaw M, Boyle J, Licata A, Skinner C, Stevenson RE, Turner G, Field M, Hackett A, Schwartz CE, Gecz J, Stratton MR, Raymond FL - Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. **Am J Hum Genet** 87: 173-188, 2010.

Willard HF - The sex chromosomes and X chromosome inactivation. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B (eds) The metabolic and molecular bases of inherited Disease. **McGraw-Hill** 8: 1191–1221, 2000.

World Health Organization. The ICD-10 classification of neonatal and behavioral disorders – World Health Organization, Geneva, 1992.

Fontes da Internet

Ensembl - <http://www.ensembl.org> (fevereiro, 2011)

Greenwood Genetic Center – X linked mental retardation database:
<http://www.ggc.org/xlmr.htm> (fevereiro, 2011)

European MRX Consortium - <http://www.euomrx.com>