

**SARITA BADIGLIAN ASCENÇO REIS**

**MUTAÇÃO NO GENE *ACSL4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA MENTAL DE  
HERANÇA LIGADA AO X**

**São Paulo**

**2009**

**SARITA BADIGLIAN ASCENÇO REIS**

**MUTAÇÃO NO GENE *ACSL4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) COMO CAUSA DE DEFICIÊNCIA MENTAL DE  
HERANÇA LIGADA AO X**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biotecnologia da Universidade de São Paulo,  
para a obtenção de Título de Mestre em  
Ciências, na Área de Biologia/Genética.

Orientadora: Angela M Vianna Morgante

**São Paulo**

**2009**

REIS, SARITA BADIGLIAN ASCENÇO

**MAPEAMENTO E BUSCA DE GENE MUTADO QUE  
CAUSA DEFICIÊNCIA MENTAL COM HERANÇA LIGADA AO  
CROMOSSOMO X. 57PP**

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

1. Deficiência Mental Ligada ao X. 2. Gene *ACSL4*

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

*Dedico cada minuto deste trabalho à minha mãe Vanda, que cuidou do meu filho como se fosse seu. Seu esforço foi o meu maior estímulo. Inúmeras vezes substituiu seu trabalho e lazer pelas extensas horas cuidando do neto. Não tenho como descrever minha gratidão, mas deixo nesta página uma reflexão para cada um de nós pensarmos no valor real de nossas mães. Mãe, seu valor é inestimável.*

"Procure ser um homem de valor em vez de ser um homem de sucesso."

Albert Einstein

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (CEPID – 98/14254-2, Centro de Estudos do Genoma Humano; Bolsa de Mestrado 06/58350-3).

## AGRADECIMENTOS

---

*Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, onde esta pesquisa foi realizada.*

*À Professora Angela Vianna Morgante, que desde o início acreditou, confiou no meu trabalho e cedeu seu espaço e tempo para a minha pesquisa.*

*Ao Prof. Dr. Luis Eduardo Soares Netto, que cedeu o espaço do seu laboratório para a elaboração do ensaio de complementação funcional com levedura.*

*À Rafaella, que me ensinou tantas técnicas e me ajudou com seu conhecimento científico.*

*À Gisele Monteiro, que me ajudou com muita paciência a executar os ensaios de complementação funcional com levedura.*

*À Silvia, que sempre esteve pronta para me ajudar com muito bom humor e agilidade.*

*À Lilian, Tereza, Luiz, Karen, Juliana, Fernando, Ana Carla, Leonardo, Larissa, Renata, Fátima, Paulo Rogério, Fernando, professora Luciana Haddad, que de alguma forma me ajudaram no cotidiano da pesquisa.*

*À Nathália, que se mostrou uma pessoa muito amiga e que me tranqüilizou em momentos de decepções.*

*À Maraísa, que sempre me ajudou com as papeladas burocráticas e compra de materiais, principalmente com as compras de primers (cerca de 200!) com muita paciência e dedicação.*

*À família estudada, por colaborarem e permitirem realizar essa pesquisa.*

*Aos meus pais, Vanda e Levon, que me criaram com liberdade e responsabilidades. Sempre me deram todas as oportunidades de estudos para chegar até aqui sem nunca pressionar ou exigir retorno. No entanto, hoje apresento todo meu aprendizado espelhado neste trabalho. Muito obrigada.*

*Ao meu marido Eduardo, que só traz felicidade à minha vida. Não sei como agradecer tudo o que você faz por mim. Sempre me apóia, me ouve, incentiva e acima de tudo dá valor a tudo que faço. Nunca reclamou da minha ausência em todos esses meses em que precisei estudar ou escrever durante noites ou finais de semana. Ainda precisou ser pai e mãe com uma dedicação exemplar. Deixo aqui minha imensa gratidão pelo marido e pai maravilhoso que sempre foi.*

*Aos meus sogros, Maria e Oswaldo, que sempre estiveram prontos para ajudar a cuidar de meu filho quando mais precisei, quase sempre avisados em cima da hora.*

*À minha tia Sônia, que ajudou a cuidar do meu filho com muito carinho diversas vezes em que precisei. Aí está a grande importância da família na minha vida...*

*À minha tia Siran, que cuidou do meu filho por apenas um dia, pouco tempo, mas o suficiente para minha ida ao laboratório.*

*Aos meus irmãos, Leandro e Levon, que de alguma forma me proporcionam dias mais felizes.*

*À minha avó Sara, que é o meu maior exemplo de vida. Passou pela guerra, cuidou de quatro filhos sozinha, passou por diversas cirurgias e continua mais forte do que nunca...*

*Ao meu filho, Dudu, que mantém cada dia da minha vida leve e sereno. Seu sorriso basta para lembrar que a vida é muito mais que genes expressos. A ciência está muito longe de explicar o amor por um filho...*



## ÍNDICE

---

### **I- INTRODUÇÃO**

I.1-A deficiência mental	1
I.2-A deficiência mental ligada ao cromossomo X	2
I.3-Identificação de genes do cromossomo X associados a deficiência mental	5
I.4-A inativação do cromossomo X e mutações que causam deficiência mental	8

### **II- OBJETIVO** 10

### **III- PACIENTES E MÉTODOS**

III.1- Casuística	11
III.2- Métodos	
III.2.1- Investigação do padrão de inativação do cromossomo X	12
III.2.2- Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X	14
III.2.3- Análise de genes candidatos	16
III.2.4 Busca da mutação em indivíduos controle	21
III.2.5- Ensaio de complementação funcional em levedura	21

### **IV- RESULTADOS**

IV.1- Investigação do padrão de inativação do cromossomo X	29
IV.2- Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X	29
IV.3- Análise de genes candidatos	32
IV.4- Busca da mutação em indivíduos controle	34
IV.5- Ensaio de complementação funcional em levedura	34

### **V- DISCUSSÃO** 39

### **VI- SUMÁRIO E CONCLUSÕES** 48

### **VII- ABSTRACT** 50

### **VIII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 52

## I - INTRODUÇÃO

---

### I.1 - A deficiência mental

A Deficiência Mental (DM) caracteriza-se por limitações significativas nas funções intelectuais e no comportamento adaptativo do indivíduo, originadas antes dos dezoito anos de idade (*American Association on Intellectual and Developmental Disabilities, AAID*). Afeta 2-3% da população geral e está frequentemente associada a outros sintomas neurológicos, deficiências metabólicas e malformações. A DM é classificada de acordo com o Quociente Intelectual (QI), cuja distribuição segue a curva normal, com o QI médio correspondendo a 100. A DM é convencionalmente considerada leve (QI de 69 a 50), moderada (QI de 49 a 35), grave (QI de 34 a 20) e profunda (QI menor que 20) (revisão em Raymond, 2006).

Estima-se que a DM leve esteja presente em 84% dos afetados e que 3% apresentem DM grave ou profunda (*World Health Organization, WHO*). Como a DM é condição multifatorial, com causas genéticas e ambientais, esses números variam de acordo com o nível de desenvolvimento sócio-econômico da população. Entre os mais pobres, fatores ambientais como nascimento prematuro, problemas no momento do parto, infecções pré- e pós-natais, subnutrição da gestante ou da criança contribuem fortemente, em especial para a DM leve; já a deficiência mental de causa predominantemente genética tem frequência semelhante nos diversos níveis sócio-econômicos (Frota-Pessoa, 1983; Inlow e Restifo, 2004). As alterações cromossômicas numéricas e estruturais aparecem como causa importante de DM e a trissomia do cromossomo 21, que afeta uma a cada mil crianças nascidas vivas é a principal causa genética de DM. A DM monogênica pode ter herança autossômica ou ligada ao X e as mutações mitocondriais também contribuem para a DM.

Classicamente, considera-se a DM como sindrômica e não sindrômica. Nas formas sindrômicas, a DM está associada a outras características clínicas, físicas, neurológicas ou metabólicas. Já nos casos não-sindrômicos, não existem outras manifestações fenotípicas além da própria deficiência mental. Essa classificação poder ser adequada para fins práticos no diagnóstico clínico, mas a identificação do mecanismo genético frequentemente leva à caracterização do quadro clínico como sindrômico, pois características antes não notadas são reconhecidas; deve-se levar em conta também que um mesmo gene pode estar mutado como causa de DM sindrômica e não sindrômica (Frints e col., 2002 e Renieri e col., 2005).

Quanto mais grave a DM, geralmente maior número de características clínicas aparece associado a ela, o que facilita o diagnóstico. No entanto, 20-50% dos pacientes com DM moderada a grave e até 80% dos casos de DM leve permanecem sem diagnóstico (Frints e col., 2002).

## **1.2 - A deficiência mental ligada ao cromossomo X**

O cromossomo X possui cerca de 155 milhões de pares de bases e contém aproximadamente 1155 genes, dos quais 868 codificam proteínas (*Ensembl*, março/2009); correspondem a cerca de 5% dos genes do genoma humano (revisão em Inlow e Restifo, 2004). Estudos tanto em camundongos como no homem indicam que genes do cromossomo X não somente influenciam a inteligência como também afetam o controle emocional e a cognição social (Skuse, 2005). Cerca de 16% dos genes, que quando mutados causam DM, encontram-se no cromossomo X (revisão em Inlow e Restifo, 2004). As proteínas codificadas possuem diversas funções e participam principalmente da regulação da transcrição de outros genes e da transdução de sinais; a maioria atua no núcleo e no citoplasma, porém podem

permanecer em organelas, membrana plasmática e no meio extracelular (revisão em Chiurazzi e col., 2008).

A síndrome do cromossomo X frágil (SXF; MIM #300624) é a principal causa de DM herdada e compreende 25% dos casos de DM ligada ao X (DMLX) (Fishburn e col., 1983). Afeta 1/4000-6000 homens e 1/8000-9000 mulheres (Crawford e col., 2001). Resulta de mutação de perda de função no gene *FMR1* (*Fragile-X Mental Retardation 1*) em Xq27.3, que codifica a proteína FMRP (*Fragile-X Mental Retardation Protein*). Esse gene apresenta uma repetição de trinucleotídeos (CGG)<sub>n</sub> na região 5' não traduzida. Nos alelos normais, a repetição tem entre seis e cerca de 55 trincas de pares de bases. Alelos contendo repetições com 55 a 200 trincas de bases são pré-mutados, pois, apesar de funcionais, são instáveis e podem expandir-se para alelos mutados com repetições de 200 ou mais trincas, que são transcritos, porém não são traduzidos. A ausência da proteína FMRP leva à síndrome do cromossomo X frágil.

O excesso de 30-40% de homens com DM em relação às mulheres é reconhecido desde a metade do século XX e, diante da documentação de DM de herança ligada ao X (DMLX), foi atribuído a mutações no cromossomo X. (revisão em Chiurazzi e col., 2000). Porém, as mutações no cromossomo X explicam menos da metade do excesso de homens afetados. Com base na frequência de 25% da síndrome do X-frágil entre famílias com DMLX e de 2,5% entre homens, casos isolados de DM, a frequência de DMLX em homens foi estimada em 10% (Ropers e Hamel, 2005). Mandel e Chelly (2004) chegaram a estimativa semelhante, levando em conta a frequência de mutações do gene *ARX* (*Aristaless X*) entre famílias com DMLX e casos isolados de DM, abaixo, portanto, dos 23% necessários para explicar um excesso de 30% de homens afetados em relação a mulheres; os autores sugerem que a diferença entre os sexos possa decorrer (a) de diferenças no desenvolvimento fetal

do cérebro, tornando o cérebro do homem mais susceptível a danos precoces ou (b) da presença de polimorfismos no cromossomo X, que teriam efeitos sutis sobre as habilidades cognitivas na maioria dos portadores, mas resultariam em DM, quando associados a certos alelos autossômicos ou ligados ao X ou ainda a fatores ambientais.

Por outro lado, os genes do cromossomo X já relacionados a DM não explicam os 10% estimados de DMLX. Com a notável exceção do gene *FMR1*, mutações nos demais genes já identificados ocorrem com frequências muito baixas. Quando se exclui a síndrome do X frágil, as mutações em genes do X explicam 42% da DM em famílias com vários afetados, 17%, em famílias com afetados em apenas uma geração e apenas 1,4% dos casos isolados de DM (De Brouwer e col., 2007). Recentemente foi realizado um grande esforço para identificar genes mutados em famílias em que a DM aparecia como ligada ao X, pelo seqüenciamento direto de 718 genes do cromossomo X codificadores de proteína, cobrindo em média 75% da região codificadora (Tarpey e col., 2009). No total 25% das famílias tiveram a causa da DM estabelecida, quando se juntou ao esforço de seqüenciamento a investigação de variação no número de cópias de segmentos cromossômicos por CGH. O número relativamente pequeno de mutações consideradas patogênicas detectadas pode ter várias explicações: a não detecção de microduplicações, a ocorrência da mutação em região não codificadora dos genes, a presença de mutações nas regiões não estudadas ou mesmo a inclusão na amostra de famílias em que a DM não era ligada ao X (Tarpey e col., 2009).

A aplicação da técnica de hibridação genômica comparativa baseada em *array* (*array-CGH*) ao estudo da DMLX tem mostrado que microduplicações e microdeleções no cromossomo X, abrangendo em geral vários genes, podem ser causa de DMLX. Rosenberg e col., (2006), verificaram que dois de 46 pacientes do sexo masculino

afetados por DM possuíam rearranjos do cromossomo X, que segregavam em suas famílias com a DM. Microdeleções e microduplicações aparentemente patogênicas maiores do que 100 kb foram identificadas em cerca de 5% das mais de 400 famílias catalogadas no European MRX Consortium; a mais comum dessas alterações é a microduplicação do gene *MECP2* (Van Esch e col., 2005; Lugtenberg e col., 2007). Esses rearranjos podem, portanto, explicar parte da DMLX e estudos em coortes de pacientes do sexo masculino, casos isolados, estão indicados para avaliar sua contribuição.

### **I.3 - Identificação de genes do cromossomo X associados a deficiência mental**

Até o momento, foram identificados 87 genes do cromossomo X que aparecem mutados como causa de deficiência mental (DM) (*Greenwood Genetic Center, GGC, XLMR Update* - maio/2009). Dezesete desses genes quando mutados causam DM não síndrômica (DM-NS) e 70 DM síndrômica (DM-S), dos quais 17 estão associados a ambos os tipos de DM.

Estudos de ligação, usando marcadores moleculares polimórficos em famílias com DM de herança ligada ao X levaram ao mapeamento da doença e subsequentemente o teste de genes candidatos no segmento delimitado permitiu a identificação de 39 genes diferentes mutados, em geral, em famílias com grande número de afetados em mais de uma geração. Em algumas famílias pequenas, o uso de marcadores moleculares, permitindo a exclusão de segmentos do X não associados à doença, também tem permitido a identificação do gene mutado. Este foi o caso do estudo que levou à identificação de mutação no gene *UBE2A* (*Ubiquitin-*

*conjugating enzyme E2A*) como causa de nova síndrome de DMLX (Nascimento e col., 1996).

Rearranjos do cromossomo X presentes em afetados contribuíram para a identificação de 30 novos genes associados a DM. Os pontos de quebra de rearranjos equilibrados podem ter alterado genes. Por exemplo, ao estudar um quadro de deficiência mental grave presente em uma menina com translocação equilibrada t(X;15)(q13.3;cen), Mansouri e col., (2005) demonstraram que o gene *ZDHHC15*, localizado no ponto de quebra do cromossomo X perdeu sua função. Mutações nesse gene foram posteriormente identificadas como causa de DMLX não síndrômica (*GGC, XLMR Update* - maio/2009). Os genes mapeados nos segmentos abrangidos por microduplicações e microdeleções detectadas em pacientes com DM também são candidatos. A duplicação do gene *MECP2*, responsável por cerca de 1% da DMLX, foi identificado por esse caminho (Van Esch e col., 2005). Outras vezes mais de um gene contido no segmento parecem contribuir para a DM, como no caso das microduplicações do cromossomo X, abrangendo os genes *HSD17B10* (*17-@beta-hydroxysteroid dehydrogenase X*) e *HUWE1* (*HECT, UBA, and WWE domains-containing protein 1*; Froyen e col., 2008).

Recentemente, nove genes do cromossomo X foram relacionados pela primeira vez a DM, em estudo de seqüenciamento direto de genes do cromossomo X, em 208 famílias com DMLX, independentemente de mapeamento prévio (Tarpey e col., 2009). As dificuldades na avaliação do significado patogênico de uma substituição de par de bases detectada nesse estudo de seqüenciamento em larga escala foram discutidas por Raymond e col. (2009). Por exemplo, grande parte das mutações *nonsense* não pôde ser relacionada com a DM por não segregarem com a doença na família ou por estarem presentes em indivíduos da amostra controle; assim 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 situação é mais complexa e a decisão sobre a natureza patogênica fica ainda mais difícil. Tarpey e col. (2009) usaram critérios rígidos para buscar a relação com a DM das 983 substituições diferentes que encontraram: além do estudo de segregação nas famílias, investigaram amostras controle, que em muitos casos incluiu mais de 1000 indivíduos; ainda, classificaram essas substituições de base de acordo com um escore de conservação evolutiva; outra estratégia baseou-se no número de variantes do gene que, se maior do que sua taxa de evolução prediz, é indicativo de seleção positiva e numa amostra de indivíduos com DM incluiria também aqueles genes com excesso de variantes causadoras da doença. As lições desse estudo aplicam-se a outras estratégias para a detecção de causas genéticas de DM. Por exemplo, na avaliação do significado patogênico de variações no número de cópias de segmentos genômicos.

Em alguns poucos casos, a avaliação de vias metabólicas que estariam comprometidas levou à detecção do gene mutado. Salomons e col., (2001) identificaram mutação no gene do transportador de creatina *SLC6A8* em Xq28 como causa de DM em um menino, único afetado na família, que apresentava DM e hipotonia. A análise por espectroscopia de prótons por ressonância magnética de seu cérebro indicou ausência de creatina, que estava em níveis elevados na urina e no plasma. Como a creatina é sintetizada principalmente no fígado, rins e pâncreas, seu transporte pela proteína *SLC6A8* é essencial para seu metabolismo nos outros tecidos em que a biossíntese não ocorre. A hipótese dos pesquisadores, portanto, foi que uma mutação nesse gene fosse responsável pela DM, o que foi comprovado. A mutação foi detectada em heterozigose na mãe do afetado.



#### **I.4 - A inativação do cromossomo X e mutações que causam deficiência mental**

Nas mulheres, um dos cromossomos X está sempre inativo como mecanismo de compensação de dose dos seus genes em relação aos do único cromossomo X dos homens (revisão em Boumil e Lee, 2001). A inativação é um processo aleatório que ocorre em cada célula no início do desenvolvimento embrionário, mantendo-se inativo o mesmo cromossomo X nas divisões celulares subseqüentes. Assim sendo, as mulheres são mosaicos com duas populações de células e se distribuem de acordo com uma curva normal quanto à percentagem de células com o cromossomo X materno ou paterno inativos. Em média, metade de suas células tem o cromossomo X herdado do pai como o inativo e a outra metade com o cromossomo X materno inativo. No entanto, podem ocorrer desvios não aleatórios no padrão de inativação do cromossomo X, decorrentes de mutações gênicas ou cromossômicas que levam à seleção contra as células portadoras. Amos-Ladgraf e col. (2006) mostraram que apenas 1,7% das mulheres da população têm desvios de inativação extremos ( $\geq 95\%$ ) e concluíram que uma mulher que apresente tal padrão de inativação é muito provavelmente portadora de mutação no cromossomo X que afeta a razão de inativação, justificando a investigação de patologias de herança ligada ao X.

Willard e col. (2000) verificaram que mutações do cromossomo X que causam deficiência mental aparecem freqüentemente associadas a desvios extremos no padrão de inativação do cromossomo X, detectados em células do sangue periférico de mulheres portadoras. Ao analisar o padrão de inativação do cromossomo X em 155 portadoras certas de mutação causadora de DMXL, Plenge e col. (2002) demonstraram que cerca de metade delas apresentavam grande desvio de inativação ( $\geq 80:20$ ) e apenas 10% das mulheres controle apresentavam tal desvio. Assim, a presença de desvios extremos de inativação em mães de meninos com deficiência

mental pode ser tomada como indicativa de mutação em gene no cromossomo X como causa da doença.

Encontrar novas mutações no cromossomo X que causam deficiência mental e relacioná-las com os fenótipos tem sido o objetivo da pesquisa de muitos laboratórios, utilizando diferentes estratégias. Não somente se busca explicação para o excesso de homens afetados e para grande parte dos 10% estimados de DMLX, mas compreender a ação desses genes no sistema nervoso central e suas implicações no desenvolvimento da inteligência e de habilidades cognitivas e sociais. Além da contribuição para a pesquisa básica, identificar tais genes vem auxiliar no diagnóstico de inúmeras formas de deficiência mental de causa desconhecida. Determinar a mutação causadora de DM numa família tem importância para o aconselhamento genético, a identificação de portadoras e o diagnóstico pré-natal.

## II - OBJETIVO

---

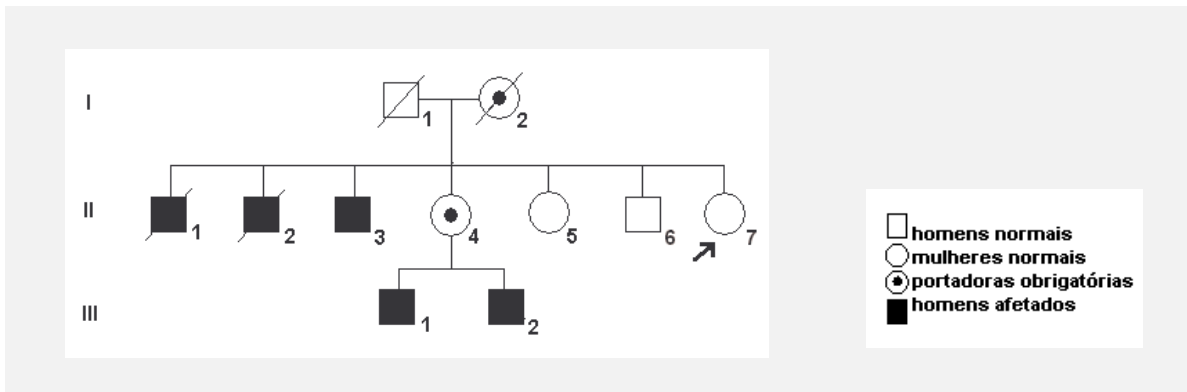
Visando contribuir para o conhecimento de genes do cromossomo X que contribuem para a deficiência mental, o objetivo desta pesquisa foi identificar o gene mutado que condiciona a deficiência mental em uma família com cinco afetados, num padrão de ocorrência compatível com a herança ligada ao X.

### III - PACIENTES E MÉTODOS

---

#### III.1 - Casuística

A família estudada (Figura 1) inclui cinco homens com deficiência mental, distribuídos em duas gerações e relacionados por mulheres, num padrão com a herança ligada ao X (Figura 1). A família foi averiguada através de uma mulher, II-7, que procurou aconselhamento no serviço de aconselhamento genético do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências/USP. Na ocasião, seus dois irmãos mais velhos, II-1 e II-2 já haviam falecidos, aos 21 e 26 anos, tendo como *causa mortis* broncopneumonia e edema cerebral, respectivamente. Os outros afetados, II-3, III-1 e III-2, apresentavam deficiência mental associado a crises convulsivas. A mãe de III-1 e III-2 foi relatada pela irmã (II-7), como apresentando dificuldades de aprendizado. O exame do gene *FMR1* realizado em II-3, em outro laboratório (Laboratório Fleury, SP), afastara a possibilidade de tratar-se da síndrome do cromossomo X frágil. A análise cromossômica de II-7, realizada no mesmo laboratório, revelou cariótipo normal. No Laboratório de Genética Humana/USP, foi afastada, em II-3 e em III-1, a presença de perdas ou ganhos de segmentos cromossômicos submicroscópicos, empregando *array-CGH* (*Comparative Genomic Hybridization*), com resolução média para detecção de desequilíbrios cromossômicos de 1 Mb (1 Mb *set* de cerca de 3.500 clones, banco de dados *Ensembl*; Rosenberg e col., 2006). O afetado III-2 não esteve disponível para as análises iniciais de mapeamento da deficiência mental no cromossomo X.



**Figura 1.** Genealogia dos afetados por deficiência mental, que ocorrem num padrão compatível com a herança recessiva ligada ao X.

Os membros da família concordaram em participar da pesquisa para buscar o gene mutado relacionado à deficiência mental na família, fornecendo consentimento esclarecido. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolo 057/2006).

### III.2 - Métodos

A extração do DNA genômico foi realizada automaticamente, utilizando-se o aparelho *Autopure LS* (*Gentra Systems, Minneapolis, USA*).

#### III.2.1 - Investigação do padrão de inativação do cromossomo X

Mulheres portadoras de mutações no cromossomo X que causam deficiência mental nos homens tendem a apresentar desvio completo de inativação do cromossomo X (Plenge e col., 2002). Considerando a hipótese de herança ligada ao X, as mulheres II-4, II-5 e II-7 foram investigadas quanto ao padrão de inativação do cromossomo X. No DNA extraído de linfócitos de sangue periférico, analisamos

o padrão de metilação do gene *AR* (*Androgen Receptor*), conforme proposto por Allen e col., (1992). O gene *AR* possui no exon 1 uma repetição CAG altamente polimórfica com 20 alelos (heterozigose de 90%). Para determinar o padrão de inativação, a repetição CAG do gene *AR* é amplificada por PCR (*Polimerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase), utilizando-se *primers* que também flanqueiam o sítio de restrição da enzima *Hpa* II. Como a enzima é sensível a metilação, só digere os sítios que se encontram desmetilados, ou seja, aqueles localizados no cromossomo X ativo. Assim, é possível determinar o padrão de inativação do cromossomo X, analisando-se os alelos amplificados antes e após a digestão com a enzima *Hpa* II.

Cerca de 1 µg de DNA genômico de cada mulher (II4, II5, II7) e de um controle masculino para a digestão (II-6) foi submetido a digestão com 16 U da enzima *Hpa* II (*Promega*), a 37°C por cerca de 16 horas. Das mesmas amostras, 1 µg de DNA sem tratamento enzimático, foi submetido às mesmas condições. Procedeu-se à PCR (*primers forward* fluorescente 5' gctgtgaaggtgctgttctcat 3' e *reverse* 5' tccagaatctgttccagagcgtgc 3'), utilizando-se 100 ng de DNA, das amostras digeridas e não digeridas, em volume total de 30 µl, contendo 3 µl de *buffer* 10X (*Invitrogen*), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 3,5 µl de dNTP (2,5 µM de A/T/G/CTP), 1,5 µl de *primers forward* e *reverse* 45 mM, 3,0 de DMSO e 2 U da *Taq polimerase* (*Invitrogen*). Foi utilizado o seguinte programa: 95°C por 5 minutos para desnaturação inicial seguidos de 28 ciclos de 45 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 30 segundos à 72°C e extensão final de 10 minutos. Para genotipagem, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese por capilar, utilizando-se o *size standard Megabace<sup>tm</sup>* ET550R, no seqüenciador *MegaBACE<sup>tm</sup>* 1000 (*Amersham Biosciences, Sweden*), conforme recomendações do fabricante. Para análise, foi utilizado o *software MegaBACE Genetic Profiler* (*Amersham Biosciences*). Os valores obtidos para o DNA digerido foram normalizados em relação ao DNA não digerido e a razão de inativação foi

calculada utilizando-se a fórmula  $(phd1/phu1)/(phd1/phu1)+(phd2/phu2)$ , em que phd1 é a altura do pico do maior alelo e phd2, do menor alelo, no DNA digerido; phu1 é a altura do pico do maior alelo e phu2, do menor alelo, no DNA não digerido (Lau e col., 1997).

### **III.2.2 - Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X**

Como o tamanho e a estrutura da família não permitiam um estudo de ligação clássico para obter LOD score significativo, foi adotado o mapeamento da doença por exclusão, utilizando marcadores de DNA distribuídos ao longo do cromossomo X (Nascimento e col., 2006); uma vez delimitada a menor região de origem comum compartilhada pelos afetados, genes candidatos mapeados nessa região foram analisados por seqüenciamento direto para identificar possíveis mutações.

Foram utilizados marcadores de microssatélites distribuídos aproximadamente a cada 3 cM no cromossomo X, descritos no banco de dados NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*), cujos *primers* já existiam no laboratório (Tabela 1). Esses marcadores foram usados para buscar segmentos com origem comum compartilhados pelos afetados, mas não por II-6, homem clinicamente normal.

**Tabela 1.** Marcadores moleculares do tipo microssatélite mapeados ao longo do cromossomo X utilizados no mapeamento. Distância física (Mb), distância genética (cM), localização no idiograma do cromossomo X (Banda), tamanhos mínimo-máximo dos alelos em pb e heterozigose (Het).

Marcador	Mb	cM (Marshfield)	Banda	pb	Het
DXS 7108	10.0	18,73	Xp22.32	236-256	0,85
DXS1224	12.9	21,23	Xp22.31	157-169	0,75
DXS999	18.59	23,26	Xp22.13	258-278	0,85
DXS1237	31.7	*	Xp21.3	156-174	0,87
DXS8083	44.9	46,24	Xp11.3	165-183	0,85
DXS1055	46.2	47,08	Xp11.23	81-93	0,68
DXS8023	49.27	51,78	Xp11.22	130-152	0,75
AR	66.5	*	Xq11.22	261-288	0,9
DXS986	78.9	57,37	Xq13.3	149-173	0,87
DXS990	89.9	60,62	Xq21.33	164-182	0,86
DXS8077	95.1	62,52	Xq21.33	101-121	0,72
DXS8020	96.4	65,5	Xq22.1	185-209	0,9
DXS8112	104.7	66,58	Xq22.2	79-100	0,86
DXS1210	106.1	67,12	Xq22.2	192-206	0,8
DXS1059	111.1	68,2	Xq23	180-200	0,71
DXS8088	113.2	68,74	Xq23	247-263	0,8
DXS1220	114.4	70,91	Xq23	192-220	0,81
DXS8053	115.4	70,91	Xq24	237-281	0,68
DXS8064	117.0	70,91	Xq24	209-225	0,77
DXS8067	119.1	75,79	Xq24	212-236	0,85
DXS8059	121.9	78,5	Xq24	210-224	0,81
DXS8098	122.6	78,5	Xq24	210-258	0,78
DXS8093	123.67	81,02	Xq25	153-160	0,67
DXS1206	125.08	82,07	Xq25	163-181	0,71
DXS8044	126.3	82,07	Xq25	271-281	0,73
DXS8069	149.3	98,83	Xq28	166-174	0,8
DXS8103	149.8	100,73	Xq28	234-248	0,88
DXS8061	151.7	100,73	Xq28	125-153	0,83

\* dados não encontrados

A genotipagem dos *loci* (exceto do DXS986 e DXS990) foi feita por PCR, utilizando-se 100 ng DNA genômico para um volume total de 25 µl contendo 2,5 µl de tampão (Tris 30 mM pH8,5, KCl 10 mM, MgCl 2,5 mM, Hepes 10 mM e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM), 2,5 µl de dNTP (200 µM de A/T/G/CTP), 30 µM de *primers forward* e *reverse* e 1U da *Taq polimerase*. Foi utilizado o seguinte programa “touch-down”: 1 minuto a 95°C; um ciclo de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 69°C e 1 minuto a 72°C; 13 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 69°C, diminuindo-se 0,5°C por ciclo até 62°C, 1 minuto



a 72°C; 16 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 69°C e 1 minuto a 72°C; extensão final de 10 minutos a 72°C. Após eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (4,56% de acrilamida, 0,24% de bisacrilamida, 42% de uréia, 0,05% de TEMED e 0,045% de persulfato de amônia), em tampão TBE 1X (Tribase 0,068 M; ácido bórico 0,089 M, EDTA 2 mM, pH 8,0) por cerca de quatro horas, os produtos da amplificação foram visualizados por coloração pela prata (Santos e col., 1993).

Os marcadores DXS986 e DXS990 fazem parte do kit comercial *ABI PRISM® Linkage Mapping set 2.5 –MD10* (Applied Biosystems, USA) e foram amplificados com *primers* fluorescentes seguindo o protocolo do fabricante. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese por capilar no seqüenciador *MegaBACE™ 1000* (Amersham Biosciences) e analisados, utilizando-se o *software MegaBACE Genetic Profiler* (Amersham Biosciences).

### **III.2.3 - Análise de genes candidatos**

Os genes candidatos mapeados no segmento mínimo comum aos afetados foram selecionados nos bancos de dados do *Genatlas* e do GGC (*Greenwood Genetic Center*), com base em sua expressão no cérebro ou associação a deficiência mental .

Para a análise das seqüências codificadoras dos genes candidatos foram desenhados *primers* (Tabela 2) que permitiam a amplificação da fronteira exon-intron, utilizando-se o programa *Primer3*. O mapeamento dos *primers* foi validado utilizando-se os programas *PCRinsilico*, UCSC (*University of California, Santa Cruz*) e BLAST, NCBI. Para cada gene analisado, o DNA dos afetados III-1 e II-4 foram submetidos a PCR utilizando-se 100 ng DNA genômico para um volume total de 25 µl, como acima descrito para a análise de microssatélites. O programa usado foi o mesmo descrito para os experimentos anteriores, porém para alguns pares de *primers* com Tm mais

baixa, a temperatura de hibridação foi alterada inicialmente para 67°C, diminuindo 0,5°C a cada ciclo até atingir 60°C. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *GFX<sup>tm</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare)* de acordo com o protocolo do fabricante. Após a purificação, os produtos de PCR foram submetidos à reação de seqüenciamento nos dois sentidos (30 ciclos de 20 segundos à 95°C, 15 segundos à 60°C e 1 minuto à 60°C) em volume final de 10 µl, contendo 30 ng do produto de PCR, 5 µM de *primer* e 4 ul de *DYEnamic ET terminator reagent premix (Amersham Bioscience.)* Após precipitação com etanol absoluto e 70%, respectivamente, e secos por 24 horas, os produtos foram ressuspendidos em 10 ul de *loading buffer (Amersham Bioscience)* e submetidos a sequenciamento automático no *MegaBACE<sup>TM</sup> 1000 (Amersham Bioscience)*. Para a análise das seqüências foi usado o programa *Chromas Lite (versão 2.01)*.

**Tabela 2.** *Primers* correspondentes às fronteiras *exon-intron* dos genes seqüenciados. Pb=pares de bases do produto amplificado.

<b>Gene-exon</b>	<b>Foward 5' → 3'</b>	<b>Reverse 5' → 3'</b>	<b>Pb</b>
AGTR2-1a	GCATAAGAACTAGGAGCTG	CAGATTGGTACCTATCAACAC	468
AGTR2-1b	TGTGATGTGCAAAGTTTTTGG	TTCCCATAGCTATTCGTCTTCA	396
AGTR2-1c	TGGGATTGCCTTAATGAAAAA	ACATGCATTTTGCTCTCACG	487
UBE2A-1	CGTGGGGCTTTAATGACATA	AACCTTCGGGAAGACAGACA	492
UBE2A-2	CATGCGGGACTTCAAGAGGT	CCAAACATTTTCCCCTACCC	355
UBE2A-3	CCGGGACATCCATTTGTAGT	CAGAGGCAGGTTCTTAAGCA	264
UBE2A-4	CCTCTCTACCCTGTATCTTTGCAT	GGCACCACAAAATACACAGGA	298
UBE2A-5	TGGGAAGCAACATAGGAATCTT	AGGTGTGAGCGACTGTACCC	392
UBE2A-6	TGTTTTGCATTAAGGAACTGACA	GGGAGGTGACAAACACATCA	238
MRGX-4a	TGTTATTCTCTGATGGCCTTT	AACGCCTCCTCACTTTCAAC	451
MRGX-4b	GAACCAGCTCTCCAGGAA	AGGGTGAGCCAAGAGGATTT	492
MRGX-4c	CAAGAAATCGCAGGGAAATG	CAAACCTGAAACATAAGCCCTGTT	498
GLA-1	TAGGGCGGGTCAATATCAAG	TCCCGTTGAGACTCTCCAGT	491
GLA-2	GTGAAATCCCAAGGTGCCTA	GCCATGAGGGCTGTTTCTAA	345
GLA-3	CAGCCTGGAATGGTTCTCTC	AGCTCTGGCACATGGAGAAT	396
GLA-4	CAGACTGAACCCCATCTCAAA	GGACTTTGAAGGAGACCTTGG	293
GLA-5	GAAGGCTACAAGTGCCTCCT	AACCACTTTCCACAGCATCC	390
GLA-6	GGATGCTGTGGAAAGTGGTT	CATCAAGAGCAAGGGAAAAA	387
GLA-7	TGCTACAGGATCATTTTAATTTTC	AGCCACCTAGCCTTGAGCTT	494
PAK3-1	AGCAATGCTTTTGTCTTAAGATG	CCCTGAACAGTCAATCCTCAA	400
PAK3-2	TGGAATCAATTGTCTTTCACTTT	GGACATGGCAATTCTTGCTT	294
PAK3-3	TAGCATGGGCTTCTTGGTG	TCGATTTCAAATGTCCCACA	344
PAK3-4	TTGGAGCATTTCCTTCTAGTTGA	CCAAAACCTATTGAAGTGTACCT	330
PAK3-5	GTTTCCTCCTATCCCTACATGCT	CAGTATCCTCAAACCTTGGTCA	394
PAK3-6	ACCACTTGCTTTTAAAAATTCATTGAT	CATGATTTTGGGAAGTCTGGA	389
PAK3-7	TTGTCACTGACTCTGGCATCTT	CCAGAAACCCAAGCTCTTACTG	278
PAK3-8	TTGCTAATTTTCTCCCCTCA	TTTTAGGCGAAGTTGCCATC	236
PAK3-9	TTCACTCTATGTCCCCAAAAA	TGTTAAATGAACGAATCCCAAA	288
PAK3-10	TGGGCATAGCACAACTCAGA	TGGCCTCTCCAATTGTTTTTC	362
PAK3-11	AAGTGGTGTGTAAAGCATTTCAG	TTCTTTACTTCAAACCTGGGCTGT	373

Continua

<b>Gene-exon</b>	<b>Foward 5' → 3'</b>	<b>Reverse 5' → 3'</b>	<b>Pb</b>
PAK3-12	TGAGCTAGGCAGTTGTGGAA	ACTTTTGGTGGGAAGCCAGAA	398
PAK3-13	GAAACTGGATTTTTGCCGTCT	CGTGCCTATAGTTATGTGCCTGT	365
PAK3-14	AAAAGGGCTGCTTGAAAATG	CCACCCCATTTGACTGTCTT	271
PRPS1-1	AGAGCTACACCGAGGACCAA	CAACCCCAAGTCTGTTTGAG	469
PRPS1-2	CCATAGATGTGGAACCTATGGAT	GGGTAATACCTAAGAAAAGGTGATTTT	399
PRPS1-3	TTCTGGGTACCATAGTGCCTTT	TTTTGGCTTCTCTGCAGTCTT	298
PRPS1-4	CTCTGAGCAAGTTACTACTTTGTGTTT	CCACTTGGATAGAAAACTTCACTT	300
PRPS1-5	CACTGTGTTAGCCAGGATGG	GGTTCCAAAAGGAATCAGCA	430
PRPS1-6	TTGTTGTGGAAGCCTAAGCA	TTCAGAATCCAGAGACCTAATTCA	343
PRPS1-7	CTCATGACAGGGAAACAGCA	GCAAGGCCACAGAATTATC	463
CUL4B-4	CACAATTTACCCTAAAATTAGTAATGC	TGTACCCATGGTTTATGTGAGA	396
CUL4B-5	AAGCTGATGTGGTAGAAATATCAAA	TTCAAGCTGGGTTAAACAGTG	282
CUL4B-6	TTTCACTTAGTGTGCAAGGTATTCA	TGAAGCAATCTCCCTATTGCTAA	291
CUL4B-7	TGTGTTTATCTGCATGTTTGATCTT	AGGAAAGTCTAGAACCAAATGTGAA	337
CUL4B-8	TGGAGCCCTAATTAGCATGG	ATGTGCTTCCTTCAAACCTTGT	378
CUL4B-9	CAAAAGGATCCTAGCTTGATGTT	GAAGATAAATGCAAAGGGAAGC	300
CUL4B-10	CCACTTCCAGGATCTTTTGG	AACACTTCAAATCACACCTGAAAA	277
CUL4B-11	GGAATCTTGAAATCAACATAAAATGA	AGAAATGCAGCCACATGCTA	299
CUL4B-12	CCAGAAAAGATGGTTGGGTTT	AAACAAGAAATGCTTGCCAAT	381
CUL4B-13	TTCAGACTAGCCTGGGCAAC	GCAACCTCAAACAAATCAGGA	471
CUL4B-14	CAGTGTATCATACTCCTCTTTGGGTA	CCCTCCAGTTTGAATATACTTGC	279
CUL4B-15	AACTTGGAATAATGGTGTGCTTT	GAGGAAATCGATTGAAAGGGTA	291
CUL4B-16	TTTGTATTTTCGTGTTTCCCACTT	TCACCTCAGTTGCCATGAAT	292
CUL4B-17	AAGGATGGTCAGTGTTCAT	AGCCCAAGAGTTCAAGACCA	368
CUL4B-18	TTTCCAGAACTATATCACATGAGG	ACAATAGCCTAAACTTTCAGTTAAGAA	295
CUL4B-19	AAATCCACTAATTGAAAATGCTT	CAGTTCTGAGGCAAGGAATTA	300
CUL4B-20	GGGATGGAGTGAAGCTAGA	CAGGAAACATATTTAGCTGGACA	400
CUL4B-21	TCATGTCCCTAAAATGCACAA	CATATGCATCAACATGGGAAA	378
CUL4B-22	GAGCCGAAACTGTTGTCTTTTT	GAGTTCAACAACATTCTTCTTAAAGG	400
UPF3B-1	AAAACCTTTGCACTGGGAAA	GAACCAGGATGATGCGACTT	482

Continua

<b>Gene-exon</b>	<b>Foward 5' → 3'</b>	<b>Reverse 5' → 3'</b>	<b>Pb</b>
<i>UPF3B-2</i>	CCAGCCTTCTTCAGGAACTG	CAAGCTCAAAAATCAAATGAAAAA	283
<i>UPF3B-3</i>	TTTCATTTGATTTTTGAGCTTGTC	ACTCTAGGAAGCAACGCAATG	291
<i>UPF3B-4</i>	GGTTGTGCCAGTGTGCTTTA	AAGCTTCCATCGGCAAATAA	394
<i>UPF3B-5</i>	CCTTGTGGGTATGGTTTGGT	GGCAGGTATTACCATCTGCAA	398
<i>UPF3B-6/7</i>	GCTTCAGTGGATTCCCTCC	GAGAGACATGGGGTGGGTC	555
<i>UPF3B-8</i>	GGCTGGCATGATTTATGGT	CAACCTGAAGGGGTTTTCAA	248
<i>UPF3B-9</i>	GCAGAGATAGGGGGCTTTGT	TGCCCTGCATAAAACAGCTT	379
<i>UPF3B-10</i>	GGGCCAAATCAGAATCACAG	GCAGATGATTAAAGTCCCCTTT	496
<i>UPF3B-11</i>	GTGCCCTCACATTTTTGGTC	AGCGGCTCCCTTTCTCTC	388
<i>SRPX2-2</i>	GGGAGGAAAAGGGACCATAA	TTGGTAGTCTGTTGCCATGTTT	494
<i>SRPX2-3</i>	AGTTGGATGAGAGGGGGAAG	AATCACAGCCCCTGATTCC	295
<i>SRPX2-4</i>	GTGGGTTTACTTCTGGGCTCT	TCGAATGTTAGAATGGGGAAA	472
<i>SRPX2-5</i>	GGGCAGTTCAGGTAGGGTTT	GGAATGCCTTCTGTGGTGAG	397
<i>SRPX2-6/7</i>	GCTTCAGTGGATTCCCTCC	GAGAGACATGGGGTGGGTC	465
<i>SRPX2-8</i>	AAAGCCATTTTTCTGATCATCC	ACCCTTCTTCTGGGGTAGG	480
<i>SRPX2-9</i>	TTTTAGGATTTCCCCAAGG	GGTAAGGTTTGTGCTGCAGAG	368
<i>SRPX2-10</i>	CCACAGTGTGATTGCGTGAT	GTTTCCCCATAGTCCGCTTT	361
<i>SRPX2-11</i>	TAGAGGGAATGGGGACCAG	ACCCACCTCAGAGTCCTGTC	438
<i>NDUFA1-1</i>	TGCACGTCACTCCACGTT	CAACCGGAAGCAAGTAGAGG	468
<i>NDUFA1-2</i>	CCATTTCTCTGGAATGTCCC	GCATTACCAGAACCCACCTC	277
<i>NDUFA1-3</i>	GAAATGTGGGATGTGGAAGC	CAAGCCTCACAGTTGCCTTC	374
<i>FACL4-4</i>	TTCTTCAGCACATAAAGGCTTTC	CAGCATACTTAAAACGCACTCG	512
<i>FACL4-5</i>	CTCACATGCAAGCAAAGACC	TTATGCTTTGGATAGTATTTTAATTGC	301
<i>FACL4-6/7</i>	GAAGCAAGGTTGAAGGATGG	TTTTCAGTCAAAGAACTTTTGTGG	649
<i>FACL4-8/9</i>	CAAGTGATCCTCCCACCTTG	GTTCTCAGCCAAACCATGC	687
<i>FACL4-10</i>	GCAATAAAAGCTCAAATCCAAG	GATTTTAATGAACACATTTGCTGTG	335
<i>FACL4-11</i>	TTTACCCAAGATGTTGCAAGTAAG	CCTTATGATCATGGTGGTGATATTC	345
<i>FACL4-12</i>	GTGTGTTGCCAAGAATAATGTATG	TTTCAAAGGTAATGCGAATG	305
<i>FACL4-13</i>	TGGTTCTAACTCTAATATTCCCAGTG	CAGAGAATTATTTGCTTCCCC	242
<i>FACL4-14</i>	AATCACAGTCACCCAGTATCCTC	TGTCCTTGTTTTGCTGATGG	524
<i>FACL4-15</i>	CGATTAAGGCAATGATATTCAAAG	TTTAGCAAGATGCAGGTGTCC	548
<i>FACL4-16</i>	CCTTCTTTATGCTGGTACTAT	CAAACATATTGAAGAGCCTAATGC	479
<i>FACL4-17</i>	GGTGATTCAACACCCGAATC	TGCTCTATAATAACACAGCTAAAGGG	548

### **III.2.4 - Busca da mutação em indivíduos controle**

Para afastar a possibilidade de a mutação encontrada no exon 9 do gene *FACL4* dos pacientes ser um polimorfismo, sem significado clínico, buscamos essa mutação em 160 amostras de DNA genômico de indivíduos do sexo masculino, clinicamente normais, do banco mantido pelo Centro de Estudos do Genoma Humano, IB-USP. Os homens controle eram de ascendência européia, como a família estudada. A busca direta da mutação foi feita com base em digestão enzimática diferencial entre o alelo mutado e não mutado.

Utilizando o programa *Webcutter* (versão 2.0), identificamos a enzima *Nla III*, capaz de cortar o alelo normal, mas não o mutado, no sítio da mutação. O DNA genômico foi submetido a PCR com *primers* que amplificam os exons 8 e 9 do gene *FACL4*, utilizando o mesmo programa acima descrito para amplificação dos microssatélites. O produto de PCR contido em 3 µl da reação foi digerido com 5 U da enzima de restrição *NlaIII* (*BioLabs*), incubado à 37°C por cerca de 16 horas e submetido a eletroforese em gel de agarose 2%, corado em seguida com brometo de etídio (1:1000).

### **III.2.5 - Ensaios de complementação funcional em levedura**

#### **III.2.5.1 - Obtenção do cDNA do gene *ACSL4***

O RNA total foi extraído a partir de 4 ml de sangue periférico do afetado III-1 e de indivíduo normal, utilizando *TRIZOL® LS Reagent* (*Invitrogen*), segundo protocolo do fabricante. O RNA foi ressuspendido em 30 µl de água DEPC, na concentração final de cerca de 20 µg/ml. A partir do RNA total foi sintetizado o cDNA num volume final de 20 µl, usando o *Super Script™ First Strand Synthesis System for RT-PCR*

$\mu$ (Invitrogen). Para amplificação do cDNA, desenhamos os *primers*, *foward* (5' GTTCCTTTTGCAGCTTTC 3') e *reverse* (5' ACTGCTATTCTTACTGCTGCTTCTAT 3') utilizando o programa *Primer3* e, para análise das características dos *primers*, o programa *NetPrimer*. A PCR foi realizada com cerca de 1  $\mu$ g de cDNA em volume final de 20  $\mu$ l, contendo 0,5  $\mu$ l de cada *primer* a 10  $\mu$ M, 2  $\mu$ l de 10X *Accuprime<sup>tm</sup> Pfx Reaction Mix* (Invitrogen) e 0,2  $\mu$ l da *Accuprime Pfx DNA Polymerase* (0,5 U) (Invitrogen). A reação seguiu o seguinte programa "touch-down": 4 minutos a 94°C; 14 ciclos de 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 67°C, diminuindo-se 0,5°C por ciclo até 60°C e 3 minutos a 68°C; 23 ciclos de 1 minuto a 94°C, 30 segundos a 69°C, 2,5 minutos a 68°C; 16 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 60°C e 3 minutos a 68°C; extensão final de 10 minutos a 68°C. O produto da reação foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e corado com brometo de etídio (1:1000), para visualização.

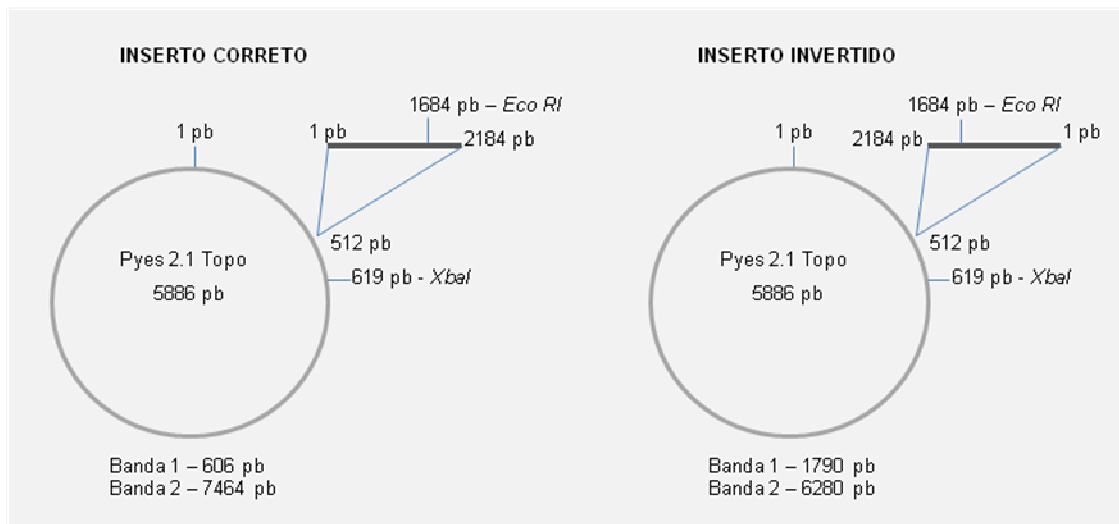
### III.2.5.2 - Clonagem no vetor de expressão em levedura

Para inserir o produto amplificado na levedura foi utilizado o vetor de expressão do kit *pYES 2.1 TOPO/ TA Cloning® kit* (Invitrogen), com marca de resistência a ampicilina em bactéria, marca de auxotrofia a uracila e indução da expressão por galactose em leveduras. A ligação dos produtos amplificados com o plasmídeo e posteriormente a transformação por eletroporação em células competentes de *E.coli* DH5 $\alpha$  foram feitos seguindo o protocolo do fabricante: 1 $\mu$ l do vetor e 1 $\mu$ l de solução salina (NaCl 1.2 M e MgCl<sub>2</sub> 0.06 M) foram adicionados a 4  $\mu$ l (cerca de 400 ng) do produto da amplificação do cDNA do gene *ACSL4*, mutado e controle, e mantidos à temperatura ambiente por 1 hora. O produto da ligação foi colocado em membrana de diálise em água por 30 minutos, para extrair o resíduo de sal. Foram utilizados 2,5  $\mu$ l do produto da ligação para eletroporação, utilizando-se cerca de 50  $\mu$ l de *E.coli* DH5 $\alpha$

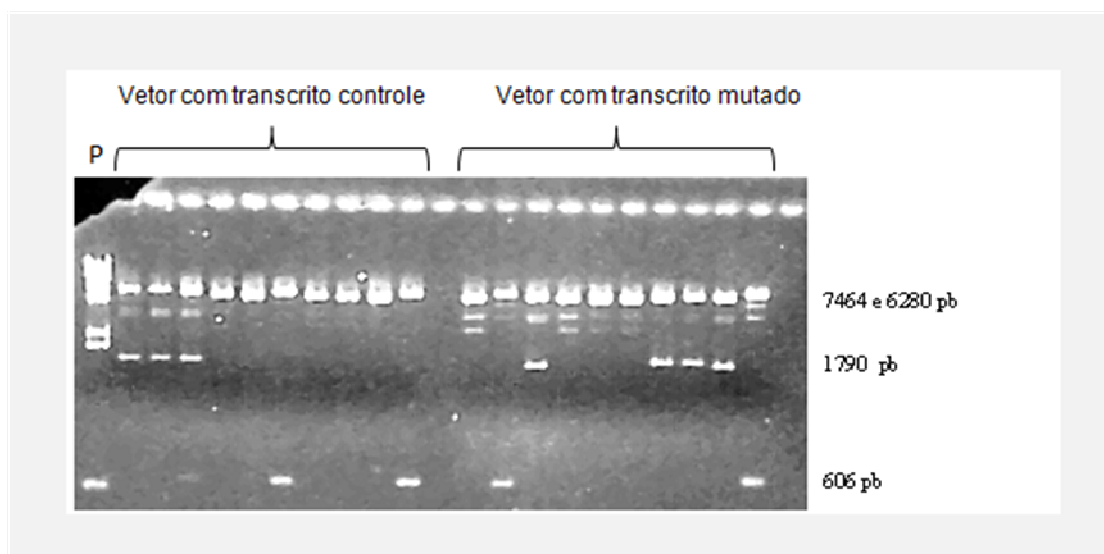
eletrocompetentes estocadas em glicerol 8%. As bactérias, após eletroporação a 2.5kV, resistência 200Ω, capacitância de 25uF, em média por 4.8 ms no eletroporador *Gene Pulser*® (*BioRad*), foram incubadas em 1 ml de meio LB (1% de bacto triptona, 0,5% de extrato de levedura, 1% de NaCl) e mantidas por 1 hora em *shaker* a 170 rpm e 37°C. Após crescimento, procedeu-se a centrifugação (1 minuto 16000g), concentrando-se as bactérias num volume de 100 µl. Em seguida foi realizado o plaqueamento das bactérias em meio sólido LB ágar com ampicilina pH 7,0 (2% de bacto ágar e 150 ug/ml de ampicilina), de modo a selecionar as bactérias contendo o vetor. As placas foram mantidas na estufa a 37°C por cerca de 16 horas.

Para verificar a inserção do vetor na direção correta do quadro de leitura, foi feita uma minipreparação plasmidial de algumas colônias selecionadas ao acaso, usando o kit *Illustra PlasmidPrep (mini spin kit)* (*Ge- Healthcare*). Os plasmídios foram submetidos a digestão enzimática a 37°C por 1 hora: 10 U da enzima *EcoRI* (*BioLabs*), 6 U da enzima *XbaI* (*BioLabs*), ambas selecionadas pelo programa *WebCutter 2.0*, 1 µl do tampão NE2 (*BioLabs*), 0,5 µl de plasmídeo, BSA 1x para volume total de 10 µl. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1 % e corados com brometo de etídio (1:1000). A direção de inserção do inserto foi determinada pelo padrão de bandas observado no gel (Figura 2 e 3). Obtivemos três colônias de *E.coli* transformadas corretamente: uma colônia contendo o inserto controle e duas contendo o inserto com a mutação c.845C→T.





**Figura 2.** Padrão de bandas esperado após digestão pelas enzimas de restrição *EcoRI* e *XbaI*, com sítios de restrição no inserto e no vetor, respectivamente. O inserto insere-se na posição 512 pb do vetor.



**Figura 3.** Padrão de bandas dos vetores contendo o inserto do cDNA do gene *ACSL4*, após digestão com as enzimas *EcoRI* e *XbaI*. A banda de 606 pb corresponde ao inserto com ligação no sentido correto e a de 1790 pb, ao inserto com sentido invertido.

Os insertos com direção correta foram submetidos a seqüenciamento direto, para verificar se as seqüências estavam intactas após a amplificação inicial do transcrito. Como o transcrito era relativamente grande (2184 pb), o seqüenciamento

nos dois sentidos foi feito com cinco pares de *primers* sobrepostos (Tabela 3). Para cada reação foram utilizados 200 ng de plasmídeo, 1 µl de primer a 5 µM, 4 µl de *DYEnamic ET terminator reagent premix* (Amersham Bioscience) para volume total de 10 µl, submetidos ao seguinte programa: 5 minutos à 95°C, 30 ciclos de 40 segundos a 95°C, 15 segundos a 60°C e 1,5 minutos a 60°C. Os produtos foram purificados utilizando-se *Illustra Sephadex G-50 Fine DNA Grade* (GE-Healthcare) e submetidos a seqüenciamento automático no *MegaBACE™ 1000* (Amersham Bioscience). Para a análise das seqüências foi usado o programa *Chromas Lite* (versão 2.01). Os vetores com o inserto correto foram utilizados para a transformação das leveduras.

**Tabela 3.** *Primers* utilizados para o seqüenciamento do cDNA correspondente ao transcrito 203 (ENST00000407441, *Ensembl*- jan/2009) do *FACL4*.

Par	<i>Foward 5' → 3'</i>	<i>Reverse 5' → 3'</i>
1	ACTGCTATTCTTACTGCTGCTTCTAT	TTCACCTCAAGATAGTTCATCCATTT
2	CCAGGGAAATCCTAAGTGAAGAA	TGTCTGAAGGCGTTGGTCTAC
3	TACCCTGAAGGATTTGAGATTCA	CTTGGACTTTGCTCATAACATTCTTAT
4	GTACTGTACTGAAGCCCACACTTATG	ATCCACAGAATAATCTTCTGCTGT
5	GAAATCGTAATTGGTGGACAGAA	TACCTCCTGCACAACACTGACAAT

### III.2.5.3 - Preparação de leveduras competentes e transformação

Para a preparação de leveduras competentes, 500 µl de leveduras estocadas em glicerol 80% das linhagens de *S. cerevisiae*, mutante YB525 (*faa1Δfaa4Δ*) e selvagem YB332 (*FAA1FAA4*) (Johnson e col., 1994; gentilmente doadas pelo Prof. Jeffrey I. Gordon, Washington University School of Medicine, St. Louis), foram pré-inoculados em 10 ml de meio YPD (1% de extrato de levedura, 2% de peptona e 2% de glicose) e mantidos no *shaker* a 30°C por 16 horas. Depois de diluir os pré-inóculos

em 50 ml de YPD para  $OD_{600}$  (*Optical Density*) = 0.2, os inóculos foram mantidos por mais 6 horas no *shaker* a 30°C até atingir a  $OD_{600}$  = 0.8. Após 15 minutos em gelo, foram centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm, a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as leveduras ressuspensas por inversão em 40 ml de água estéril gelada. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Após nova centrifugação, as leveduras foram ressuspensas em 40 ml de sorbitol 1M gelado e novamente centrifugadas. As células foram finalmente ressuspensas em 200 µl de sorbitol 1 M.

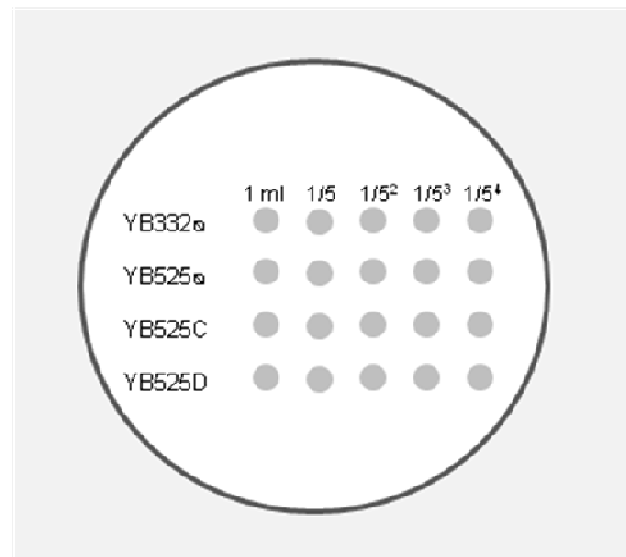
Para a transformação, foram usados 100 µl de leveduras ressuspensas em sorbitol 1 M e 10 µl do vetor pYES2.1 TOPO contendo o inserto de cDNA. As leveduras foram transformadas por eletroporação a 1.25 kV, resistência 200Ω, capacitância de 25 uF, em média por 4.8 ms, usando o eletroporador *Gene Pulser*® (*BioRad*). A linhagem selvagem YB332, utilizada como controle, foi transformada com o vetor sem inserto (referido adiante como vetor vazio) e plaqueada no meio SD URA<sup>-</sup> (0,7% de *Yeast Nitrogen Base*, 0,5% sulfato de amônia, 2% de glicose, 0,12% de *drop-out*, 0,8% de histidina, 0,8% de leucina, 0,8% de triptofano e 2% de ágar). Esse é um meio mínimo sem o aminoácido uracila, necessário para selecionar as leveduras que receberam os vetores, uma vez que estes contêm o gene para a produção da uracila. A linhagem mutante YB525 foi transformada com o vetor sem inserto, vetor com inserto *ACSL4* controle (sem mutação) e vetor com inserto *ACSL4* mutado, e plaqueada no meio SD HIS<sup>-</sup> URA<sup>-</sup> (0,7% de *Yeast Nitrogen Base*, 0,5% sulfato de amônia, 2% de glicose, 0,12% de *drop-out*, 0,8% de leucina, 0,8% de triptofano e 2% de ágar). Esse meio mínimo, com ausência de uracila e histidina, permite selecionar a linhagem YB525 contendo o vetor, uma vez que a linhagem é capaz de produzir histidina, pela interrupção do gene *FAA1* pelo gene *HIS3*, e o vetor confere capacidade de produzir uracila. As placas foram mantidas a 30°C por quatro dias. As

colônias obtidas foram estriadas em novas placas, nas mesmas condições, apenas para confirmação das marcas de auxotrofia.

#### III.2.5.4 - Testes de viabilidade para análise de complementação funcional

Para testar a viabilidade das leveduras em diferentes meios de cultura como resultado da complementação funcional do gene *ACSL4* humano nas leveduras mutantes *faa1Δfaa4Δ*, foi feito um pré-inóculo com uma camada de células estriadas de cada linhagem mergulhadas separadamente em 3 ml de YPGal (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona e 2 % de galactose), e incubadas em *shaker* por cerca de 16 horas a 30°C. Esse meio contém galactose, necessária para estimular o promotor *GAL1* presente no vetor, levando à expressão do transcrito inserido. Após 16 horas, os pré-inóculos foram diluídos para OD<sub>600</sub>=0,2, em volume final de 3 ml de YPGal e mantidos no *shaker* por mais 4 horas. Foram novamente diluídos para OD<sub>600</sub>= 0,2, em volume final de 1 ml de água estéril. A partir dessa diluição inicial foram feitas mais quatro diluições seriadas de 1:5 de cada linhagem (YB332Ø, YB525Ø, YB525C e YB525C→T). Cada placa contendo o meio de cultura sólido recebeu 5 µl de cada diluição das linhagens, conforme esquematizado na Figura 4. Foram feitas duas placas de cada meio: YPGal (2% de ágar), YPGal/CER (25 µM de cerulenina e 2 % de ágar), YPGal/CER/miristato (25 µM de cerulenina, 500 µM de miristato, 1 % de Brij-58 e 2 % de ágar), YPGal/CER/palmitato (25 µM de cerulenina, 500 µM de palmitato, 1 % de Brij-58 e 2 % de ágar), YPGlicerol (1 % de extrato de levedura, 2 % de peptona, 3 % de glicerol, 0,1 % de glicose e 2 % de ágar), SD URA<sup>-</sup> e YPOleato (0,7% de **Yeast Nitrogen Base**, 1% de ácido oleico, 1% de tween 40, 0,1% de glicose, 0,12% de *drop-out*, 0,8% de histidina, 0,8% de leucina, 0,8% de triptofano, 0,8% de uracila e 2% de ágar). A adição de cerulenina ao meio de cultura inibe o gene *Fas* da levedura capaz

de produzir ácidos graxos na ausência dos genes *FAA1* e *FAA4*. O miristato e palmitato são adicionados aos meios de cultura para que as leveduras utilizem esses ácidos graxos para a produção de ésteres acil-coA, na presença da proteína ACSL4. Para testarmos a viabilidade das leveduras quanto ao fenótipo relativo à respiração, glicerol e oleato foram adicionados aos meios de cultura, estimulando a levedura a realizar respiração mitocondrial. Para cada meio de cultura, uma placa foi incubada a 30°C e outra a 37°C.



**Figura 4.** Esquema da placa contendo meio de cultura para o teste de complementação do gene *FAA4* de *S. cerevisiae* pelo *ACSL4* humano. Os círculos cinza representam gotas de 5 µl das diluições de cada linhagem. YB332Ø, linhagem selvagem com vetor vazio; YB525Ø, linhagem mutante com vetor vazio; YB525C, mutante com inserto controle e YB525C→T, mutante com inserto mutado.

## IV- RESULTADOS

---

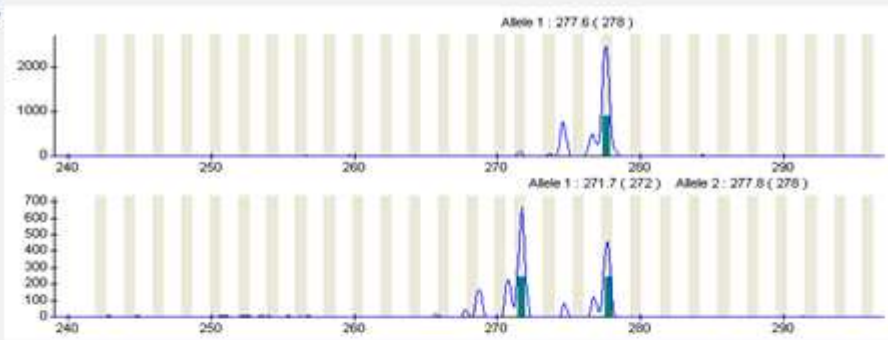
### IV.1 - Investigação do padrão de inativação do cromossomo X

A mãe II-4 dos afetados III-1 e III-2 apresentou desvio total de inativação do cromossomo X, ou seja, o mesmo cromossomo X ativo em todas as células. As tias maternas dos afetados, II-5 e II-7, não apresentaram desvio total de inativação, estimando-se as razões de inativação em 60:40 e 63:37, respectivamente (Figura 5).

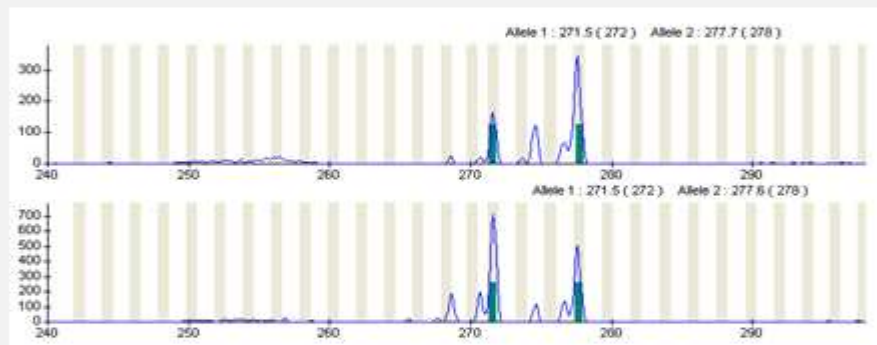
### IV.2 - Mapeamento da deficiência mental no cromossomo X

Para delimitar a região comum compartilhada pelos afetados II-3 e III-1 e pela portadora obrigatória (II-4), mas não pelo homem normal II-6, (Figura 1), foram genotipados 28 locos de microssatélites (Tabela 3). O indivíduo afetado III-2 não estava disponível para essa análise. Uma região compartilhada com cerca de 32 Mb, entre os marcadores DXS986 e DXS8067 (alelos não compartilhados), foi identificada no braço longo do cromossomo X (Tabela 4). Considerando que II-7 é uma mulher normal que não apresenta desvio de inativação do cromossomo X, admitimos que ela não deveria ser portadora da mutação que causa a doença. Assim, concluímos que o segmento compreendido entre os locos DXS8064 e DXS8098, cujos alelos II-7 compartilha com os afetados, não contém o gene associado à doença e que a presença desse segmento compartilhado no cromossomo de II-7 resultou de um evento de *crossing-over*. Assim, os genes localizados nesses cerca de 5Mb não foram considerados como candidatos para a deficiência mental na família. A região candidata ficou, portanto, delimitada pelos locos DXS986 e DXS8064 (Tabela 4).

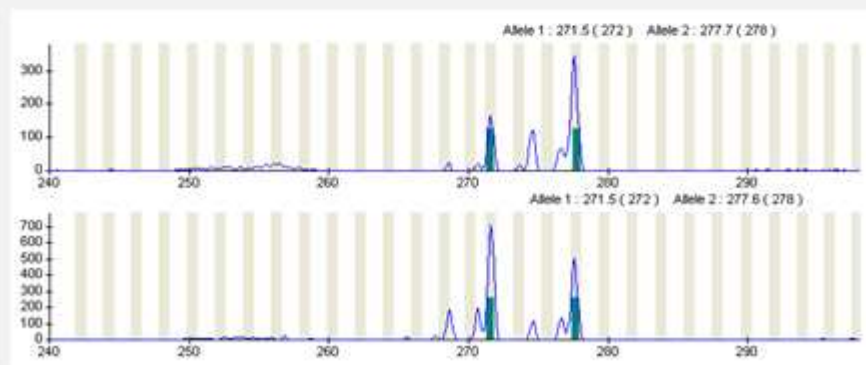
II-4



II-7

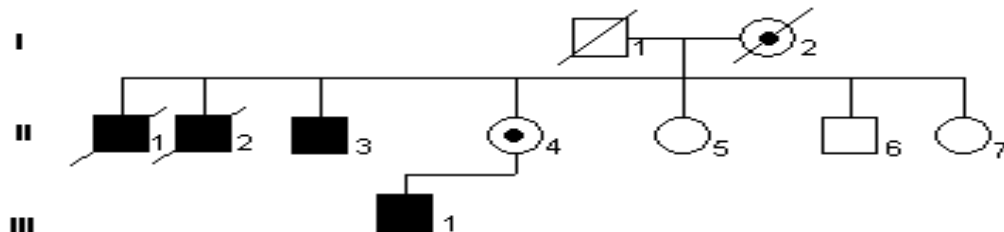


II-5



**Figura 5.** Eletroferogramas dos alelos do gene *AR*. As barras verdes correspondem aos alelos. Para cada mulher (II-7 e II-4), o gráfico superior mostra os alelos amplificados após digestão enzimática com *Hpa* II e o gráfico inferior, os alelos amplificados sem digestão enzimática. A mulher II-4 possui desvio total de inativação do cromossomo X, demonstrado pela ausência de amplificação de um dos alelos, após a digestão enzimática. Os dois alelos das mulheres II-7 e II-5 foram amplificados após digestão (razão: 63:37 e 60:40, respectivamente).

**Tabela 4-** Haplótipos dos marcadores de microsatélite. Os números em negrito indicam alelos compartilhados pelos afetados e a portadora obrigatória II-4. Os números marcados em verde indicam alelos herdados de I-1, em cinza aqueles herdados de I-2 e em azul, alelos informativos que segregam com o gene da doença (Ver observação acerca dos alelos DXS8064, DXS8067, DXS8059 e DXS8098, no texto).



Marcador	Banda	II-3	III-1	II-4	I-1*	II-5	I-2*	II-6	II-7
DXS7108	Xp22.32	2	2	1 2	?	1 2	? 2	2	1 2
DXS1224	Xp22.31	2	2	1 2	1	1 1	1 2	2	1 1
DXS999	Xp22.13	1	1	1 1	1	1 2	1 2	1	1 2
DXS1237	Xp21.3	1	1	1 1	1	1 1	1 2	1	1 2
DXS8083	Xp11.3	2	2	1 2	1	1 2	2 3	2	1 3
DXS1055	Xp11.23	1	1	1 1	1	1 1	1 1	1	1 1
DXS8023	Xp11.22	1	1	1 2	1	1 2	1 2	1	1 1
AR	Xq11-12	2	2	1 2	1	1 2	2 3	2	1 3
DXS986	Xq13.3	2	2	1 2	1	1 1	1 2	2	1 1
<b>DXS990</b>	Xq21.33	2	2	1 2	1	1 1	1 2	1	1 1
<b>DXS8077</b>	Xq21.33	2	2	1 2	1	1 1	1 2	1	1 1
<b>DXS8020</b>	Xq22.1	3	3	1 3	1	1 2	2 3	2	1 2
<b>DXS8112</b>	Xq22.2	2	2	1 2	1	1 1	1 2	1	1 1
<b>DXS1210</b>	Xq22.2	2	2 ?	2 2	2	2 1	1 2	1	2 1
<b>DXS1059</b>	Xq23	1	1	2 1	2	2 3	3 1	3	2 3
<b>DXS8088</b>	Xq23	3	3	1 3	1	1 2	2 3	2	1 2
<b>DXS1220</b>	Xq23	2	2	1 2	1	1 1	1 2	1	1 1
<b>DXS8053</b>	Xq24	3	3	2 3	2	2 1	1 3	1	2 1
<b>DXS8064</b>	Xq24	2	2	1 2	1	1 3	3 2	3	1 2
<b>DXS8067</b>	Xq24	2	2	1 2	1	1 3	3 2	3	1 2
<b>DXS8059</b>	Xq24	1	1	1 1	1	1 1	1 1	1	1 1
<b>DXS8098</b>	Xq24	1	1	2 1	2	2 2	2 1	2	2 1
DXS8093	Xq25	1	2						
DXS1206	Xq25	2	2	1 2	1	1 2	? 2	2	1 2
DXS8044	Xq25	2	2	1 2	1	1 1	1 2	2	1 2
DXS8069	Xq28	1	1	1 2	?	1 2	1	1	1 2
DXS8103	Xq28	1	2						
DXS8061	Xq28	2	1	1 2	1	1 1	1 2	1	1 2

\*Genótipos supostos a partir dos alelos da prole. ? não informativo quanto à origem comum.

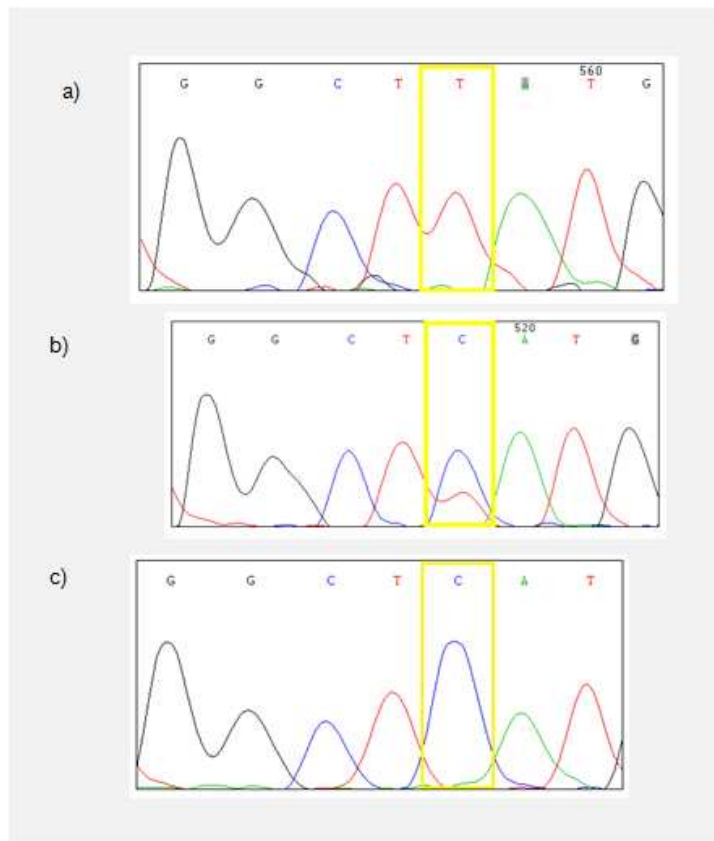


### IV.3 - Análise de genes candidatos

Para busca de mutações nos genes mapeados na região candidata, selecionamos para sequenciar a região codificadora, aqueles que já tinham sido anteriormente associados com DM ou se expressavam em cérebro e em leucócitos. Esse último critério baseou-se no achado de desvio completo de inativação do cromossomo X na portadora certa, indicativo de seleção contra as células com a mutação no X ativo, ou seja, de atividade do gene mutado em leucócitos.

Não foram encontradas mutações nos genes *MORF4L2* (Xq22) (Tominaga e col., 2003), *GLA* (Xq22) (Calhoun e col., 1985), *AGTR2* (Xq22-q23) (Vervoort e col., 2002), *UBE2A* (Xq24) (Nascimento et al., 2006), *PRPS1* (Xq21.32-q24) (Roessler e col., 1993), *PAK3* (Xq22.3-q23) (Allen e col., 1998), *CUL4B* (Xq23) (Tarpey e col., 2007a; Zou e col., 2007), *UPF3B* (Xq25-26) (Tarpey e col., 2007b), *NDUFA1* (Xq24) (Fernandez-Moreira e col., 2007), e *SRPX2* (Xq21.33-q23) (Roll e col., 2006).

No gene *ACSL4* (*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) conhecido também como *FACL4* (*Long-Chain Fatty Acyl-CoA Ligase 4*), em Xq22.3 (Meloni e col., 2002), encontramos no afetado III-1 uma mutação de ponto no exon 9, c.845C→T (Figura 6), que resulta na substituição do aminoácido conservado histidina por tirosina, p.H282Y na isoforma 1 (p.H323Y na isoforma 2 cérebro-específica) (Figura 7). Essa mutação estava presente também em heterozigose em sua mãe II-4 e nos outros dois afetados II-3 e III-2. Estava ausente, entretanto, no homem normal II-6 e nas mulheres II-5 e II-7 que não tinham desvio de inativação do cromossomo X. Portanto a mutação segregava com a deficiência mental na família.



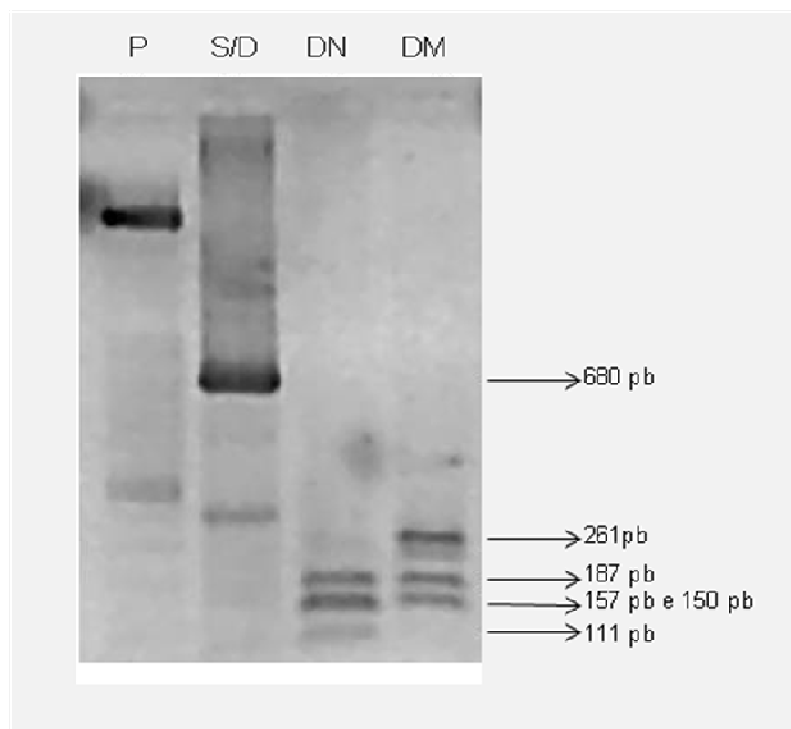
**Figura 6.** Mutação c.845C→T no exon 9 do gene *ACSL4*. Cromatogramas da seqüência *sense* (a) no indivíduo afetado III-1, (b) em sua mãe heterozigota II-4 e (c) no homem normal II-6.



**Figura 7.** Seqüência de aminoácidos da isoforma 2 (expressa no cérebro) da proteína *ACSL4* com 711 resíduos (*Ensembl*, 04/2009). Em destaque o aminoácido histidina que é substituído pela tirosina na presença da mutação c.845C→T. Sítios polimórficos estão marcados em verde e amarelo.

#### IV.4 - Busca da mutação em indivíduos controle

A substituição c.845C→T no gene *ACSL4* não está descrita como polimorfismo (*Ensembl*, fev/2009). Também não encontramos essa mutação, em 160 indivíduos do sexo masculino, clinicamente normais (Figura 8). Esses resultados são indicativos de que a mutação encontrada não constitui polimorfismo gênico.



**Figura 8.** Identificação da mutação c.845C→T no gene *ACSL4* por PCR-RFLP: produtos de amplificação por PCR, digeridos ou não pela enzima *Nla* III, após eletroforese em gel de agarose 2%. S/D, produto de PCR não digerido (680 pb). Padrões do produto de PCR digerido com a enzima *Nla* III: DN, indivíduo normal; DM, indivíduo portador da mutação. A banda de 261pb está presente apenas no indivíduo mutado, que não apresenta a banda de 111 pb. P, padrão de peso molecular 50 pb.

#### IV.5 - Ensaio de complementação funcional em levedura

Para analisarmos a capacidade funcional da proteína *ACSL4* mutada nós baseamos no trabalho de complementação funcional em *Saccharomyces cerevisiae* de Knoll e col. (1995). Nas leveduras, os ácidos graxos de cadeia longa são

convertidos em derivados da coenzima A na presença das sintetases de acil-coA de ácidos graxos Faa1p e Faa4p (produtos dos genes *FAA1* e *FAA4*), essenciais para a importação dos ácidos graxos para o meio intracelular. Esses genes, porém, não são necessários para o crescimento vegetativo da levedura, quando a síntese de novo de acil-coA é catalisada pela sintetase de ácido graxo FAS. A inibição do gene *FAS* pela cerulenina adicionada ao meio de cultura exige que a levedura importe e utilize ácidos graxos, como miristato ou palmitato, do meio para a conversão em derivados de acil-coA mediada por Faa1p e Faa4p e assim permanecer viável (Johnson e col., 1994). As leveduras mutantes apenas quanto ao gene *FAA4* ou quanto ao *FAA1* não têm fenótipo alterado, pois o gene *FAA1* é capaz de complementar a função do *FAA4* e vice-versa. O estudo de complementação funcional de Knoll e col. (1995) revelou que o gene *RLCAS* (*Rat Liver acyl-coA Synthetase*) de rato é capaz de restaurar o fenótipo de leveduras duplo mutantes YB525 (*faa1Δfaa4Δ*) em meios contendo recursos fermentáveis de carbono, como o miristato e palmitato, com adição de cerulenina. Esses autores mostraram ainda que na presença de fontes não fermentáveis de carbono como oleato ou glicerol o duplo mutante é inviável à 37°C. O gene *ACSL4* humano é ortólogo ao *FAA4* da levedura, apresentando 30% de similaridade entre suas sequências (*Ensembl*, jan/2009). Elaboramos, assim, um ensaio de complementação utilizando as linhagens, mutante YB525 (*faa1Δfaa4Δ*) e a selvagem YB332 (*FAA1FAA4*), nas quais inserimos, em vetor de expressão, o cDNA correspondente ao transcrito 203 que codifica a isoforma 1 da proteína ACSL4 (ENST00000407441, *Ensembl*- jan/2009).

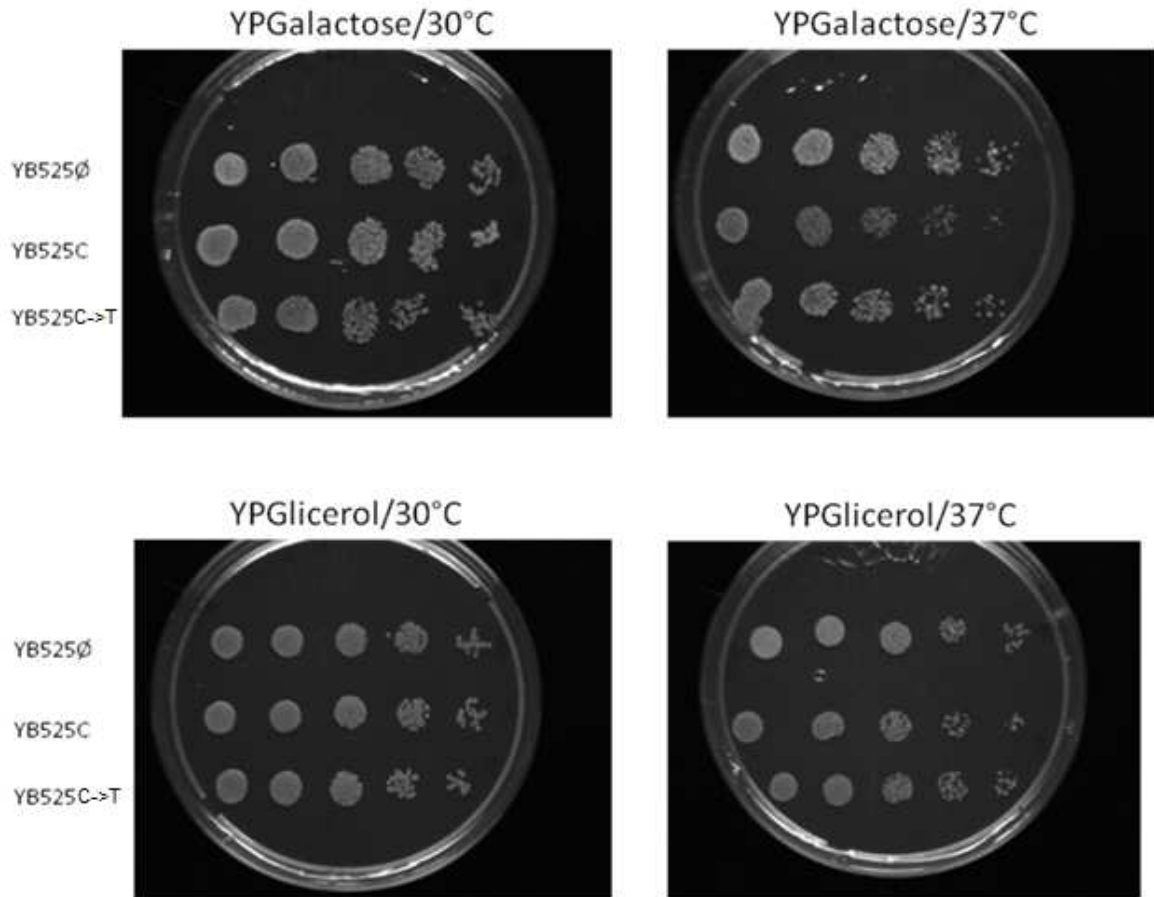
As linhagens de *S. cerevisiae* YB332Ø (*FAA1FAA4*), selvagem com vetor vazio, YB525Ø (*faa1Δfaa4Δ*) com vetor vazio, YB525C (*faa1Δfaa4Δ*) com inserto sem a mutação e YB525C→T (*faa1Δfaa4Δ*) com inserto mutado foram plaqueadas em

meios distintos. Depois de três dias a 30°C e 37°C, observamos os seguintes resultados:

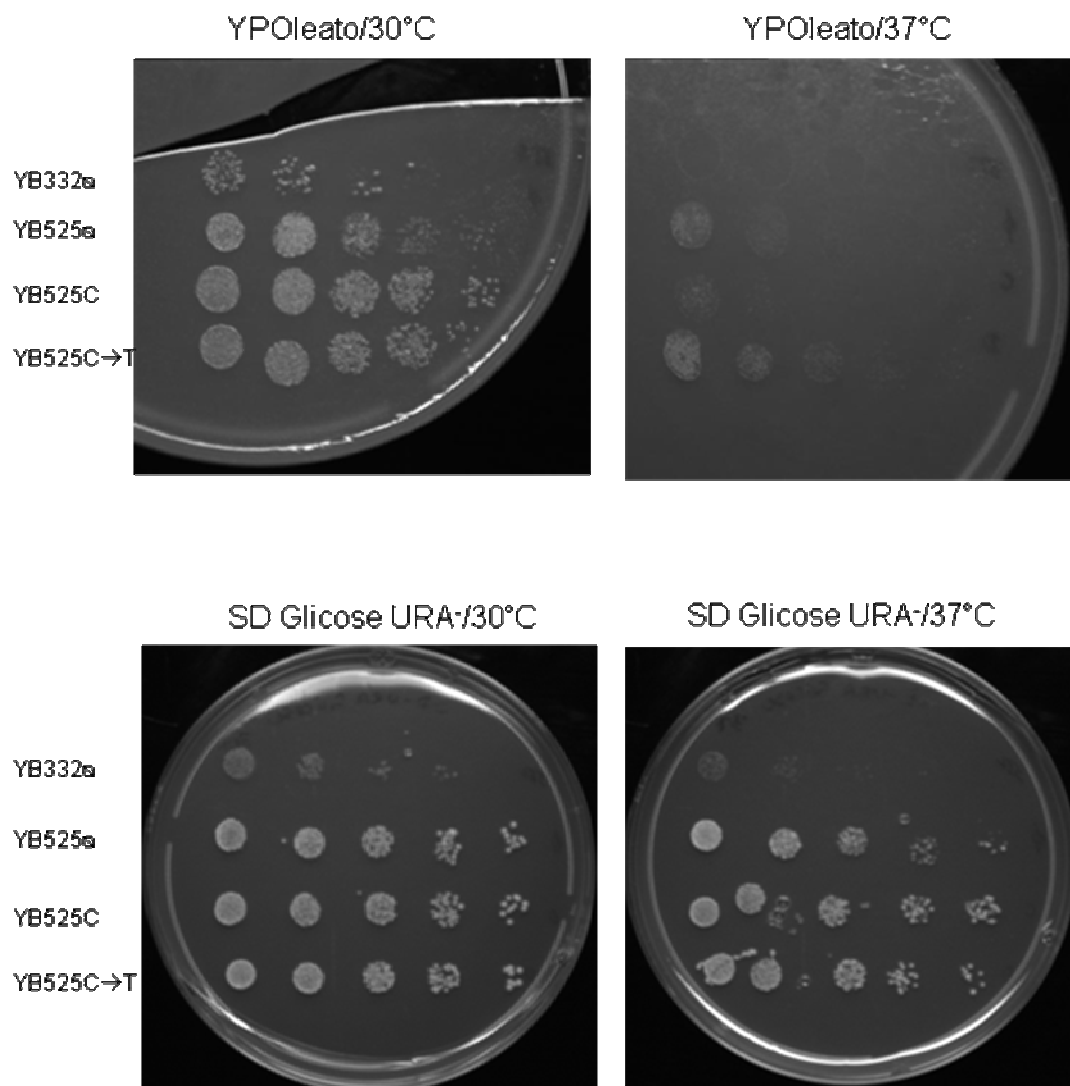
-Nos meios de cultura YPGal/CER, YPGal/CER/miristato e YPGal/CER/palmitato não houve crescimento a 30°C e 37°C de qualquer das linhagens mutantes YB525 (dados não mostrados). Porém, se houvesse complementação funcional pelo gene ACSL4, era esperado o crescimento da linhagem YB525C nas duas temperaturas.

- Nos meios YPGlicerol e YPGalactose todas as linhagens YB525 cresceram a 30°C e 37°C, no entanto não era esperado a viabilidade das três linhagens mutantes no meio YPGlicerol a 37°C (Figura 9). Em experimento em que usamos também a linhagem selvagem YB332, verificamos a viabilidade de todas as linhagens a 30° C, mas a linhagem selvagem, inesperadamente, não sobreviveu a 37°C no meio YPGalactose (dados não mostrados)

- No meio SD/Glicose URA<sup>-</sup>, as linhagens mutantes YB525 e selvagem YB332, foram viáveis nas duas temperaturas, porém a selvagem cresceu mais lentamente. Era esperado que apenas as linhagens YB332 e YB525C fossem viáveis a 37°C (Figura 10).



**Figura 9.** Ensaio de complementação funcional: viabilidade das linhagens YB525 (*faa1Δfaa4Δ*) de *Saccharomyces cerevisiae* transformadas com o vetor de expressão pyes2.1 TOPO, contendo ou não o inserto do cDNA correspondente ao transcrito do gene *ASCL4*, após 3 dias a 30°C ou 37°C, nos meios YPGalactose e YPGlicerol. YB525Ø com vetor vazio, YB525C com inserto sem a mutação e YB525C→T com inserto mutado. Observa-se o crescimento das colônias a partir de inóculos diluídos, de acordo com o esquematizado na Figura 4.



**Figura 10.** Ensaio de complementação funcional: viabilidade das linhagens YB525 (*faa1Δfaa4Δ*) de *S. cerevisiae* transformadas com o vetor de expressão pyes2.1 TOPO, contendo ou não o inserto do cDNA correspondente ao transcrito do gene *ASCL4*, após 3 dias a 30°C ou 37°C, nos meios YPOleato e SD URA. YB332Ø (*FAA1FAA4*), selvagem com vetor vazio; leveduras mutantes: YB525Ø com vetor vazio, YB525C com inserto sem a mutação e YB525C→T com inserto mutado. Observa-se o crescimento de colônias, a partir de inóculos diluídos, de acordo com o esquematizado na Figura 4.

## V - DISCUSSÃO

---

Neste estudo, a deficiência mental, transmitida em uma família segundo padrão de herança ligada ao X em uma família, foi mapeada no braço longo do cromossomo X (q21 – q24), com base na identificação de segmento de origem comum, cujos marcadores tinham alelos compartilhados pelos afetados. O sequenciamento de genes candidatos aí mapeados levou à identificação da mutação c.845C→T no gene *ACSL4*. A mutação segregava com a DM na família. O gene *ACSL4* (*Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) conhecido também como *FACL4* (*Long-Chain Fatty Acyl-CoA Ligase 4*), encontra-se no banco de dados do *Greenwood Genetic Center* (atualizado em maio/2009) como causa de DM não-sindrômica. As mutações nesse gene, entretanto, não parecem ser causa freqüente de DM e a mutação c.845C→T que detectamos não foi descrita anteriormente.

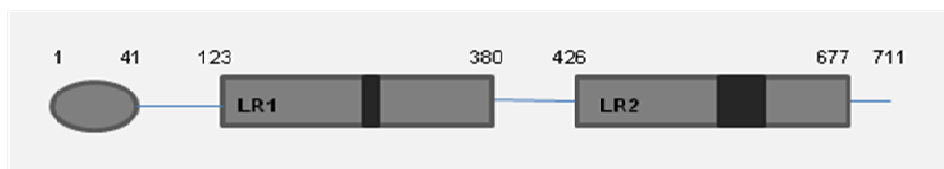
O gene *ACSL4* foi clonado em humanos por Cao e col., (1998), que identificaram a isoforma 1 da proteína com 670 resíduos de aminoácidos, com expressão ubíqua. No mesmo ano, Piccini e col. (1998) identificaram uma segunda isoforma, cérebro-específica, com 711 resíduos de aminoácidos, devido á adição de 41 aminoácidos altamente hidrofóbicos na porção N-terminal. Essas isoformas são traduzidas a partir de dois transcritos formados por *splicing* alternativo. Meloni e col. (2009) identificaram um terceiro transcrito, cérebro-específico, diferindo do anteriormente conhecido pela ausência do exon 2; como esse exon se encontra na 5'UTR, as proteínas codificadas pelos dois transcritos não diferem.

A proteína *ACSL4* é integrante da família de acil-CoA sintetases que catalizam a formação de ésteres acil-CoA a partir de ácidos graxos livres, ATP e coenzima A. Adiciona coenzima A a cadeias longas de ácidos graxos livres. Os ésteres acil-CoA formados são intermediários na síntese de lipídios complexos (triglicerídeos,



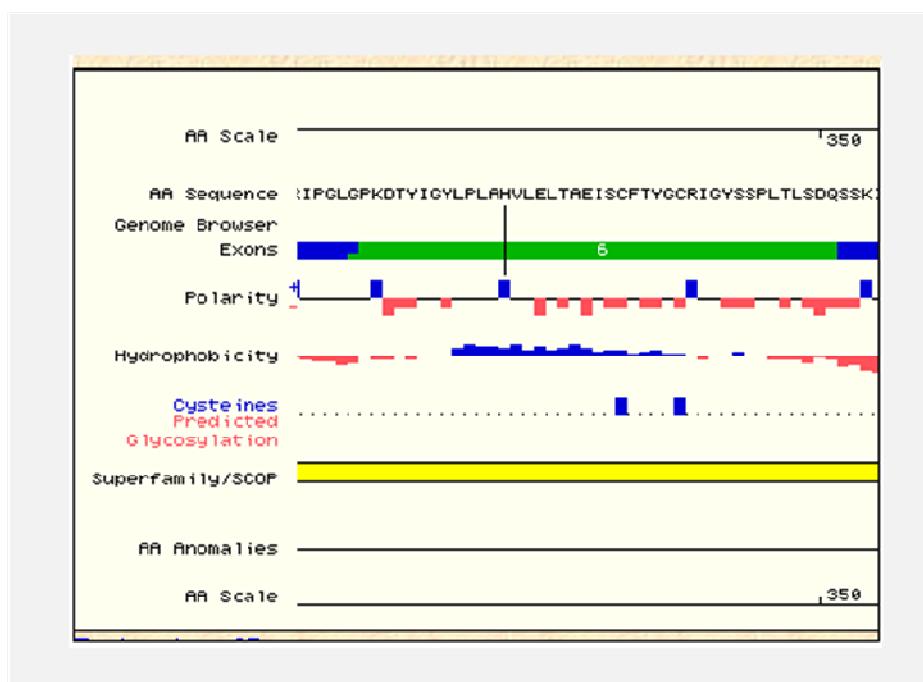
fosfolípidios e colesterol), importantes na biogênese de membranas e reserva de energia (Meloni e col.,2002). A proteína tem como substrato preferencial o ácido aracdônico, atuando no controle de ácido aracdônico livre intracelular, que constitui ponto chave regulador na formação de mediadores de lipídios. O tecido cerebral contém grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados necessários para diferenciação celular, sinaptogênese e biogênese de membrana. O ácido aracdônico é um dos mais abundantes nas membranas do cérebro e influencia a fluidez de membrana e sua proteção contra danos mecânicos, assim como a transdução de sinais e a transcrição de genes. (Faergeman e Knudsen, 1997). Portanto uma vez mutado, o gene *ACSL4*, levando a alteração da atividade enzimática da isoforma cérebro-específica da proteína, pode prejudicar o metabolismo lipídico nos neurônios e causar defeitos na sinaptogênese e no desenvolvimento neuronal.

A proteína ACSL4 possui dois domínios de luciferase, separados por uma região contendo 46 aminoácidos, onde se encontram domínios nos quais ATP e o grupo carboxila dos ácidos graxos interagem para formar acil-AMP (Figura 11). O primeiro domínio possui um domínio menor de ligação com AMP, enquanto o segundo contém uma região de 25 aminoácidos comum a todas as sintetases de acil-CoA procarióticas e eucarióticas (Piccini e col., 1998). Essa região contém vários aminoácidos específicos essenciais para a atividade catalítica e especifica a ligação com o substrato.



**Figura 11.** Esquema da isoforma 2 da proteína ACSL4. LR1 E LR2 são domínios de luciferase. Os números indicam a posição dos aminoácidos. A faixa preta em LR1 indica o domínio de ligação de AMP e em LR2, a sequência consenso das proteínas ACSL.

A mutação encontrada nos pacientes que estudamos gera a substituição do aminoácido histidina (resíduo 282 da isoforma 1 ou 323 da isoforma 2) por tirosina, que se encontra no primeiro domínio de luciferase da proteína (Figura 11), conservado na família de sintetases de acil-CoA humanas. A histidina substituída é um dos poucos aminoácidos com polaridade positiva na região em que se encontra na proteína (Figura 12) e, portanto, sua troca pela tirosina com polaridade negativa provavelmente afeta a conformação tridimensional da proteína e conseqüentemente sua atividade. A importância desse aminoácido para a função da enzima pode também ser inferida pela sua conservação em vertebrados e invertebrados e na levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 13). Existem 51 genes ortólogos ao *ACSL4* de diversos organismos listados no banco de dados *Ensembl* (maio/2009).



**Figura 12.** Características dos aminoácidos presentes na ACSL4. Observa-se que a histidina substituída pela tirosina resultante da mutação c.845C→T é relativamente isolada com polaridade positiva (NCBI, 2008).

<i>Homo sapiens</i>	MMHHSNLIAG MTG QICERIPGLGPKDITYIGYLP LAHVLELTAEISCFTYGCRIGYSSPLTL
<i>Mus musculus</i>	MMHHSNLIAG MTG QICERIPGLGPKDITYIGYLP LAHVLELTAEISCFTYGCRIGYSSPLTLS
<i>Danio rerio</i>	GVMIIHSNLIGGMAGQICERIPGLGPKDITYIAYLP LAHVLEMTAEISCVTYGCRIGYSSPGLS
<i>Xenopus tropicalis</i>	MMIHSNLIAGMAGQICERIPGLGPKDITYIGYLP LAHVLEMTAEISCVTYGCRIGYSSPLTLS
<i>Aedes aegypti</i>	TPKGMLLSHSNCIGTMKNFCDIFK-IYRDDVLIGFLPLAHVFEELAEVCLLTGVPIGYSTALTIL
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VVLTHYNIVACIGCVCHNVICWICPTDRIIAFLPLAHIFELTFEFEAFYWNICILCYANVKTL

**Figura 13.** Sequências dos aminoácidos de proteínas ortólogas à ACSL4 humana. O aminoácido Histidina (H) em destaque, substituído pela tirosina na mutação que descrevemos, encontra-se conservado nas diversas espécies. Sequências obtidas do *Ensembl* (2009).

Por meio do ensaio de complementação funcional dos genes *FAA1* e *FAA4* da levedura *Saccharomyces cerevisiae* pelo gene ortólogo *ACSL4* humano, pretendemos avaliar se a mutação c.845C→T afetava a função da proteína ACSL4. Após transformação, analisamos a capacidade de o gene *ACSL4* mutado restaurar a viabilidade das leveduras duplo *knockout* YB525 (*faa1Δfaa4Δ*), permitindo-lhes utilizar recursos fermentáveis de carbono do meio, na presença de cerulenina, como demonstrado para o ortólogo *RLCAS* (*Rat Liver acyl-coA Synthetase*) de rato por Knoll e col. (1995).

Obtivemos entretanto, resultados incongruentes. Enquanto as linhagens YB525 duplo mutantes cresceram no meio YPGalactose, o que seria esperado, pois trata-se de meio rico, inesperadamente, a linhagem selvagem não cresceu a 37°C nesse meio. É possível, assim, que essa linhagem tivesse alguma alteração que afetasse sua viabilidade. A ausência de crescimento das linhagens no meio contendo apenas cerulenina era esperada devido à inibição do gene *FAS* e ausência de ácidos graxos no meio. Porém, com a adição de miristato ou palmitato ao meio de cultivo era esperado que as leveduras selvagem e mutante YB525C (*faa1Δfaa4Δ*, com inserto sem a mutação) se tornassem viáveis, pois espera-se que sintetizem as proteínas Faa1pFaa4p e ACSL4, respectivamente, sendo capazes de importar ácidos graxos presentes no meio. Pode, portanto, não ter havido complementação funcional ou,

alternativamente, a concentração de cerulenina no meio poderia estar elevada a ponto de impedir a sobrevivência das leveduras, independentemente do meio de cultivo. O problema com o crescimento da linhagem selvagem não permite uma conclusão.

Nos meios não fermentáveis, contendo glicerol e oleato, é possível a viabilidade da linhagem selvagem YB332 mesmo a 37°C, pois essas leveduras podem converter o glicerol em gliceraldeído-3-fosfato necessário para a via glicolítica e promover a respiração mitocondrial para que o NADH gerado possa ser utilizado (Johnson e col., 1994). A linhagem selvagem cresceu nos dois meios a 30°C, como esperado, porém não cresceu a 37°C, no meio com oleato. Era esperado que as linhagens mutantes fossem inviáveis a 37°C e apenas a selvagem e a YB525C fossem capazes de manter a viabilidade. Diante desses resultados, nada pudemos concluir quanto à complementação dos genes *FAA1* e *FAA4* pelo gene *ACSL4* humano. As linhagens YB332 e YB525, cedidas pelo Prof. Dr. Jeffrey I. Gordon, foram armazenadas de forma incorreta pelo transportador e pareciam contaminadas na ocasião em que as recebemos. Foram feitos diversos testes de seleção visando obter as linhagens puras, mas os resultados que obtivemos nos ensaios de complementação funcional são indicativos de que as linhagens que utilizamos deviam ter problemas. A possibilidade de um novo teste de complementação funcional com uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* mutante apenas quanto ao gene *FAA4* pode ser um recurso, pois recentemente Yadav e col. (2007) observaram um fenótipo de crescimento diminuído nesses mutantes quando em contato com amiodarona, fármaco que bloqueia canais de potássio nos miócitos do coração, relaxando o músculo liso e aumentando o débito coronário por vasodilatação.

Mutações de ponto no gene *ACSL4* foram descritas pela primeira vez por Meloni e col. (2002), como causa de DM considerada não específica. Foi o primeiro gene participante do metabolismo de lipídios relacionado a DM ligada ao X. Anteriormente, uma deleção incluindo esse gene foi descrita em afetados pela

síndrome de Alport, que é causada por mutações no gene *COL4A5* (cadeia alfa do colágeno tipo 4). Além de características típicas da síndrome de Alport (nefrite, falha renal, surdez sensorial e catarata), os afetados apresentavam deficiência mental, o que permitia sugerir que a deleção de *ACSL4* era responsável pela DM (Piccini e col., 1998).

Meloni e col. (2002) identificaram mutações de ponto segregando com a DM em duas famílias. Em uma família, encontraram uma mutação no exon 15 (c.1585C→A), que acarreta a substituição p.R570S na isoforma cérebro-específica; o aminoácido arginina no segundo domínio de luciferase é conservado na sequência consenso das proteínas ACSL (Figura 11). Na outra família, detectaram uma substituição no sítio de *splicing* 3' no intron 10 (c.1003-2A→G), que leva à adição de 28 nucleotídeos, gerando um códon de parada prematuro e consequentemente, a perda do segundo domínio de luciferase (Figura 11). Uma terceira família foi descrita por Longo e col. (2003), em que os afetados em duas gerações apresentavam uma mutação *missense* no gene *ACSL4* (c.1001C→T na isoforma 2) que levou à substituição (p.P375L) do aminoácido prolina, altamente conservado, pela leucina no primeiro domínio de luciferase da isoforma cérebro-específica. A atividade da enzima *ASCL4* avaliada nos homens afetados das três famílias estava drasticamente reduzida em linfoblastos ou leucócitos de sangue periférico, indicando perda de função do gene.

Recentemente, ao seqüenciar genes codificadores de proteínas do cromossomo X em 218 famílias com afetados por DM num padrão de herança ligada ao X, Tarpey e col. (2009) relataram uma substituição *missense* c.1382→T no gene *ACSL4*. Dados clínicos referentes aos afetados não foram apresentados. Este achado mostra que mutações no gene *ACSL4* contribuem para menos de 1% dos casos de DM ligada ao X.

Como na família que estudamos, os afetados nas famílias descritas por Meloni e col. (2002) e por Longo e col. (2003) apresentavam quadro de DM considerada não-sindrômica. Na família MRX63, analisada por Meloni e col., (2002), os homens afetados em três gerações tinham DM moderada a grave, não-progressiva, enquanto as mulheres portadoras apresentavam capacidades cognitivas variadas, desde DM moderada até inteligência normal. Na outra família analisada pelos mesmos pesquisadores, ocorriam três irmãos, afetados por DM grave não-sindrômica. Um dos meninos apresentava hiperatividade e déficit de atenção. A família descrita por Longo e col. (2003) incluía cinco homens afetados por DM leve a moderada em duas gerações, um deles falecido com oito meses de idade. As mulheres tinham inteligência limítrofe. Na família que descrevemos os afetados, claramente portadores de deficiência mental, não foram submetidos a testes para avaliação do comprometimento mental. A portadora certa II-4 apresentava dificuldades de aprendizado. No total de onze mulheres heterozigotas estudadas até o momento, cinco apresentavam algum grau de comprometimento intelectual.

A investigação do padrão de inativação do cromossomo X no sangue periférico das portadoras da mutação revelou em todas elas desvios extremos, estando o mesmo cromossomo X ativo praticamente em todas as células (Meloni e col., 2002; Longo e col., 2003 e o presente estudo). Portanto, o déficit intelectual observado na maioria das portadoras não está correlacionado com esse padrão de inativação do X no sangue periférico. Na verdade, nem sempre o padrão de inativação do cromossomo X em leucócitos correlaciona-se com a presença de deficiência mental em portadoras de mutações do cromossomo X (Nielsen e col., 2001). Por outro lado, os níveis normais de atividade da enzima observados no sangue periférico das portadoras (Meloni e col., 2002; Longo e col., 2003) estavam de acordo com o padrão de inativação do cromossomo X.

Como o ácido aracdônico participa de diversos processos no cérebro e seu acúmulo devido à mutação no gene *ACSL4* pode levar a várias respostas alteradas, torna-se difícil identificar o processo exato que leva ao quadro de deficiência mental quando o gene está mutado.

Cao e col. (2000) observaram que o gene *ACSL4*, com expressão exacerbada em adenocarcinomas de cólon, protege a célula contra apoptose induzida pelo ácido aracdônico não esterificado *in vitro*, enquanto que a inibição da *ACSL4* por triascina C permite a apoptose celular induzida pelo ácido não esterificado acumulado nas células. Assim, a apoptose devida ao acúmulo de ácido aracdônico, decorrente da perda de função da enzima *ACSL4*, poderia ser um mecanismo contribuindo para a deficiência mental.

Na tentativa de compreender como mutações no gene *ACSL4* causam deficiência mental, Meloni e col., (2009) investigaram expressão do gene no cérebro de humanos e de rato. Foi nesse estudo que descobriram um terceiro transcrito alternativo traduzido na isoforma de expressão exclusiva no cérebro (ver acima). Em neurônios do hipocampo humano, as duas isoformas da *ACSL4* estavam presentes. Ao analisarem a distribuição dos transcritos variantes em mais sete áreas do cérebro, observaram que o transcrito da isoforma ubíqua encontra-se principalmente nos lobos temporais e occipitais e no corpo caloso, enquanto o transcrito maior da isoforma cérebro-específica encontra-se preferencialmente no hipocampo e lobo temporal e o transcrito menor, no cerebelo. Ao avaliarem a expressão das duas isoformas, notaram que a isoforma ubíqua tem expressão relativamente maior no lobo occipital, núcleo caudato e hipotálamo e ambas as isoformas encontram-se principalmente nos lobos frontais e temporais. Já no corpo caloso e no cerebelo, apesar da presença dos três transcritos, apenas a isoforma cérebro-específica foi detectada. Supõem que isso ocorra devido à baixa expressão da outra isoforma a ponto de não ser detectada ou

porque ela é degradada rapidamente; existe ainda a possibilidade de ocorrer um mecanismo de regulação pós-transcrição. Em neurônios do hipocampo de embriões de ratos, usando imunofluorescência, os autores observaram que a ACSL4 estava associada preferencialmente ao retículo endoplasmático. Como essa organela participa do controle da liberação do ácido aracdônico intracelular, supõem que a ACSL4 se acumule aí pela proximidade com seu substrato preferencial. O silenciamento do gene *ACSL4*, mediada por interferência de RNA em neurônios de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento, mostrou que a proteína não é essencial para a formação geral de axônios e dendritos e para a determinação de seu comprimento, porém seu nível reduzido leva a alteração do número e da distribuição dos espinhos dendríticos, prejudicando a dinâmica da actina local; esse efeito da ausência da proteína foi acompanhado pelo acúmulo de ácido aracdônico não esterificado. O estudo da função de genes relacionados a DM têm mostrado que o efeito sobre a morfogênese dos espinhos dendríticos parece constituir característica comum a vários genes já associados a DM (Humeau e col., 2009).

A nova mutação do gene *ACSL4* que descrevemos como causa de DM vem reforçar a relação entre as alterações desse gene e a DM de herança ligada ao X. O padrão de inativação do X totalmente desviado foi mais uma vez observado em mulher portadora da mutação, indicando a importância da expressão desse gene em leucócitos. A presença de dificuldades de aprendizado na portadora da mutação concorda com o observado nas três famílias da literatura em que o estudo das portadoras foi relatado, indicando o efeito de diferentes mutações sobre a função intelectual mesmo em heterozigose. A ausência de correlação entre o padrão de inativação do cromossomo X em células do sangue periférico e o comprometimento intelectual foi confirmada. Esses são dados de importância prática na avaliação de riscos, no processo de aconselhamento genético.



## VI – SUMÁRIO E CONCLUSÕES

---

Estudamos uma família com cinco homens (dois falecidos) afetados por deficiência mental (DM) não-sindrômica em duas gerações, num padrão de herança ligada ao cromossomo X. A análise do padrão de inativação do cromossomo X, com base na metilação do gene *AR*, evidenciou que a mulher portadora obrigatória tinha desvio completo de inativação nos leucócitos, uma característica freqüente em portadoras de mutações do cromossomo X relacionadas com DM. Para o mapeamento da DM, genotipamos 28 locos de microssatélites ao longo do cromossomo X e delimitamos um segmento de cerca de 32 Mb, entre os marcadores DXS986 e DXS8067, compartilhado pelos afetados e pela portadora obrigatória, mas não pelo homem normal ou pelas possíveis portadoras que não tinham desvio do padrão de inativação do cromossomo X. Na busca do gene mutado, analisamos, por seqüenciamento direto, genes mapeados no intervalo compartilhado e já relacionados a DM ou que tivessem expressão em cérebro e leucócitos. Nos afetados e na portadora obrigatória, encontramos a mutação c.845C→T no gene *ACSL4*, que resulta na substituição do aminoácido histidina, conservado na família de sintetases de acil-CoA humanas e em diversos outros organismos, por tirosina (p.H323Y da isoforma cérebro-específica). Tratando-se de mutação que altera um aminoácido evolutivamente conservado em gene já relacionado com DM, que segregava com a DM na família, não tendo sido encontrada em amostra controle de 160 indivíduos do sexo masculino, concluímos que era a causa da DM na família. Mutações de ponto no gene *ACSL4* foram relacionadas com a DM não-sindrômica em três famílias descritas na literatura. O gene *ACSL4* codifica a acil-coA sintetase 4 da família das sintetases de cadeia longa, que catalisa a formação de ésteres acil-coA a partir de ácidos graxos de cadeia longa. Sua expressão já foi documentada em vários tecidos, incluindo o

cérebro e dados recentes mostraram que a proteína é essencial para a formação normal de espinhos dendríticos.

A nova mutação do gene *ACSL4* que descrevemos como causa de DM vem reforçar a relação alterações desse gene e a DM de herança ligada ao X. O padrão de inativação do X totalmente desviado foi mais uma vez observado em mulher portadora da mutação, indicando a importância da expressão desse gene em leucócitos. A presença de dificuldades de aprendizado na portadora da mutação concorda com o observado nas três famílias da literatura em que o estudo das portadoras foi relatado, indicando o efeito de mutações do gene *ACSL4* sobre a função intelectual mesmo em heterozigose. A ausência de correlação entre o padrão de inativação do cromossomo X em células do sangue periférico e o comprometimento intelectual foi confirmada. Na família estudada, a identificação da mutação permitiu o aconselhamento genético.

## VII – ABSTRACT

---

We studied a family with five men (two of them deceased) affected by non-syndromic mental retardation in two generations, in a pattern of X-linked inheritance (MRX). The study aimed at identifying the causative mutation. The obligate female carrier showed completely skewed inactivation of the X chromosome, based on the methylation status of the *AR* gene in peripheral blood in leukocytes, a common feature in carriers of X-linked mutations that cause mental retardation. We genotyped 28 microsatellite loci mapped throughout the X chromosome and delimited a 32 Mb segment, between markers DXS986 and DXS8067, that was shared by the affected males and obligate carrier, but was not present in a normal man or in two women who did not show skewed X-inactivation. We searched for the causative mutation by sequencing genes mapped to this candidate interval that had been associated with MR and/or were expressed in brain and leukocytes. In the affected men and obligate carrier, we found a c.845C→T mutation in the *ACSL4* gene, resulting in the amino acid tyrosine substituting for a histidine (p.H323Y in brain isoform), which is conserved in the acyl-CoA synthetase family in humans and others organisms. This mutation was not found in a control sample of 160 men. Previously, point mutations in the *ACSL4* gene had been identified as the cause of MRX in three families. *ACSL4* encodes the acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, which catalyzes the formation of acyl-CoA esters from long-chain fatty acids. It is expressed in several tissues, and in brain it is essential for the normal formation of dendritic spines.

The novel mutation here described confirmed the causal association of *ACSL4* mutations with non-syndromic mental retardation. The completely skewed X-inactivation, also observed in the previously described carriers, supported a functional role for this gene in peripheral blood leukocytes. The intellectual impairment present in

the carrier in the family here reported is in accordance with previous findings pointing to the effect on intellectual abilities of *ACSL4* mutations in heterozygosis. The absence of correlation between the pattern of X-inactivation in leukocytes and mental status was confirmed.

## 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.
- Allen KM, Gleeson JG, Bagrodia S, Partington MW, MacMillan JC, Cerione RA, Mulley JC, Walsh CA - PAK3 mutation in nonsyndromic X-linked mental retardation. **Nature Genet** 20:25-30,1998.
- 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.
- Boumil RM, Lee JT – Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. **Hum Mol Genet** 10: 2225-2232, 2001.
- Calhoun DH, Bishop DF, Bernstein HS, Quinn M, Hantzopoulos P, Desnick RJ - Fabry disease: isolation of a cDNA clone encoding human alpha-galactosidase A. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 82:7364-7368, 1985.
- Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM – Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). **Genomics** 49:327-330, 1998.
- Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM - Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. **PNAS** 97:11280-11285, 2000.
- Chiurrazzi P, Oostra BA – Genetics of Mental Retardation. **Curr Opin Pediatr** 12: 529-535, 2000.
- Chiurrazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G – XLMR genes: update 2007. **Eur J Hum Genet** 18:1-13, 2008.
- 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.

Faergeman NJ, and Knudsen J- Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signaling. **Biochem J** 323:1-12, 1997.

Fernandez-Moreira D, Ugalde C, Smeets R, Rodenburg RJ, Lopez-Laso E, Ruiz-Falco ML, Briones P, Martin MA, Smeitink JA, Arenas J- X-linked NDUFA1 gene mutations associated with mitochondrial encephalomyopathy. **Ann Neurol** 61:73-83, 2007.

Fishburn J, Turner G, Daniel A, Broowell R - The diagnosis and frequency of X-linked conditions in a cohort of moderately retarded males with affected brothers. **Am J Med Genet** 14:713-724, 1983.

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.

Frota-Pessoa O – Genética da deficiência mental. In Krinski S, Novos rumos do retardo mental. Sarvier, São Paulo, pp 13-26, 1983.

Froyen G, Corbett M, Vandewalle J, Jarvela I, Lawrence O, Meldrum C, Bauters M, Govaerts K, Vandeleur L, Van Esch H, Chelly J, et al - Submicroscopic duplications of the hydroxysteroid dehydrogenase HSD17B10 and the E3 ubiquitin ligase HUWE1 are associated with mental retardation. **Am J Hum Genet.** 82:432-443, 2008.

Humeau Y, Gambino F, Chelly J, Vitale N - X-linked mental retardation: focus on synaptic function and plasticity. **J Neurochem** 109:1-14, 2009.

Inlow JK, Restifo, LL – Molecular and comparative genetics of mental retardation. **Genetics** 166: 835-881, 2004.

Johnson DR, Knoll LJ, Levin DE , Gordon JI - *Saccharomyces cerevisiae* contains four Fatty Acid Activation (FAA) genes: an assessment of their role in regulating protein N-myristoylation and cellular lipid metabolism. **J Cell Biol** 127:751-762, 1994.

Knoll LJ, Johnson DR, Gordon JI – Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* strains containing Fatty Acid Activation gene (FAA) deletions with a mammalian Acyl-CoA Synthetase. **J Bio Chem** 270: 10861-10867, 1995.

- Lau AW, Brown CJ, Peñaherrera M, Langlois S, Kalousek DK, Robinson WP- Skewed X-chromosome inactivation is common in fetuses or newborns associated with confined placental mosaicism. **Am J Hum Genet** 61:1353-1361, 1997.
- Longo I, Frints SGM, Fryns JP, Meloni I, Pescucci C, Ariana F, *et al* - A third MRX family (MRX68) is the result of mutation in the long chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4) gene: proposal of a rapid enzymatic assay for screening mentally retarded patients. **J Med Genet** 40:11-17, 2003.
- Lugtenberg D, Veltman JA, van Bokhoven H - High-resolution genomic microarrays for X-linked mental retardation. **Genet Med** 9:560–565, 2007.
- Mandel JL, Chelly J – Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. **Eur J Hum Genet** 12:689-693, 2004.
- Mansouri MR, Marklund L, Gustavsson P, Davey E, Carlsson B, Larsson C, White I, Gustavson KH, Dahl N- Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation. **Eur J Hum Genet** 13:970-977, 2005.
- Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, *et al* – FACL4, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. **Nat Genet** 30:436-440, 2002.
- Meloni I, Parri V, De Filippis R, Ariani F, Artuso R, Brutini M, Katzaki E, Longo I, Mari F, Bellan C, Dotti CG, Renieri A- The XLMR gene ACSL4 plays a role in dendritic spine architecture. **Neuroscience** 159:657-669, 2009.
- Nascimento RMP, Otto PA, de Brouwer APM, Vianna-Morgante AM - UBE2A, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet** 79:549-555, 2006.
- Nielsen JB, Henriksen KF, Hansen C, Silaharoglu A, Schwartz M, Tommerup N - MECP2 mutations in Danish patients with Rett syndrome: high frequency of mutations but no consistent correlations with clinical severity or with the X chromosome inactivation pattern. **Eur J Hum Genet** 9:178-184, 2001.
- Nodé-Langlois R, Muller D, Boda B - Sequential implication of the mental retardation proteins ARHGEF6 and PAK3 in spine morphogenesis. **J Cell Sci** 119:4986-4993, 2006.

- Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, *et al* – *FACL4*, a new gene encoding acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport Syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. **Genomics** 47:350-358, 1998.
- 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.
- Renieri A, Pescucci C, Longo I, Ariani F, Mari F, Meloni I – Non-syndromic X-linked mental retardation: from a molecular to a clinical point of view. **J Cell Physiol** 204: 8-20, 2005.
- Roessler BJ, Nosal JM, Smith PR, Heidler AS, Palella TD, Switzer RL, Becker MA - Human X-linked phosphoribosylpyrophosphate synthetase superactivity is associated with distinct point mutations in the *PRPS1* gene. **J Biol Chem** 268: 26476-26481, 1993.
- Ropers HH, Hamel BC – X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 6:46-57, 2005.
- Roll P, Rudolf G, Pereira S, Royer B, Scheffer IE, Massacrier A, Valenti MP *et al.* - *SRPX2* mutations in disorders of language cortex and cognition. **Hum Mol Genet** 15:1195-1207, 2006.
- 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.
- Salomons GS, van Dooren SJ, Verhoeven NM, Cecil KM, Ball WS, Degrauw TJ, Jakobs C - X-linked creatine-transporter gene (*SLC6A8*) defect: a new creatine-deficiency syndrome. **Am J Hum Genet** 68:1497-1500, 2001.
- Santos FR, Pena SD, Epplen JT – Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphisms with a simple non-isotopic technique. **Hum Genet** 90:655-656, 1993.



- Skuse DH – X-linked genes and mental functioning. **Hum Mol Genet** 14: 27-32, 2005.
- Tarpey PS, Raymond FL, O'Meara S, Edkins S, Teague J, Butler A, Dicks E, Stevens C, Tofts C, Avis T, Barthorpe S, Buck G, e col. - Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. **Am J Hum Genet** 80: 345-352, 2007a.
- Tarpey PS, Raymond FL, Nguyen LS, Rodriguez J, Hackett A, Vandeleur L, Smith R e col.- Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. **Nat Genet.** 39:1127-1133, 2007b.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, e col.- A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41:535-543, 2009.
- Tominaga K, Leung JK, Rookard P, Echigo J, Smith JR, Pereira-Smith OM- MRGX is a novel transcriptional regulator that exhibits activation or repression of the B-myb promoter in a cell type-dependent manner. **J Biol Chem.** 278:49618-49624, 2003.
- Van Esch H, Bauters M, Ignatius J, Jansen M, Raynaud M, Hollanders K, Lugtenberg D, Bienvendu T, Jensen LR *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** 77:442–453, 2005.
- Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat, X, Clarkson K, DuPont B, Schwartz CE, Stevenson RE, Boyd E, Srivastava AK - AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. **Science** 296:2401-2403, 2002.
- Willard HF – The sex chromosomes and X chromosome inactivation, In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Childs B, Vogelstein B - The metabolic and molecular bases of inherited Disease. **Brain Dev** 12:131-135, 2000.
- Yadav J, Muend S, Zhang Y, Rao R - A phenomics approach in yeast links proton and calcium pump function in the Golgi. **Mol Biol Cell** 18:1480-9, 2007.
- Zou Y, Liu Q, Chen B, Zhang X, Guo C, Zhou H, Li J, Gao G, Guo Y, Yan C, Wei J, Shao C, Gong Y - Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. **Am J Hum Genet.** 80:561-566, 2007.

## RECURSOS DE INTERNET

*American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AAIDD)* -  
<http://www.aamr.org> (nov/2008)

*Ensembl* –  
<http://www.ensembl.org> (maio/2008)

*GENATLAS* –  
<http://www.genatlas.gov> (dez/2006)

*Greenwood Genetic Center (GGC) – X-linked Mental Retardation Update*,  
<http://www.ggc.org/xlmr.htm> (nov/2006 para busca de genes candidatos, maio/2009 para dados atualizados)

*National Center for Biotechnology Information (NCBI)*  
<http://www.ncbi.nih.gov> (ago/2006, análise de marcadores de microssatélites; dez/2006, desenho de *primers* dos genes candidatos)

*NETPRIMER*  
<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html> (jan/2009)

*PRIMER3*  
<http://frodo.wi.mit.edu/> (dez/2006)

*University of California, Santa Cruz (UCSC)*  
<http://genome.ucsc.edu/> (dez/2006)

*WebCutter*  
<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/> (jan/2009, testes controle; maio/2009, ensaio de complementação em levedura.)

*World Health Organization (WHO)*  
<http://www.who.int/en/> (jun/2009)