

MARCELA DIAS HANNA

Deficiência intelectual com herança ligada ao X: estudo de irmandades com dois ou mais indivíduos afetados selecionadas pelos desvios extremos do padrão de inativação do cromossomo X materno

X-linked intellectual disability: study of sibships with two or more affected brothers whose mothers have highly skewed X-inactivation

São Paulo

2023

Exemplar corrigido

Deficiência intelectual com herança ligada ao X: estudo de irmandades com dois ou mais indivíduos afetados selecionadas pelos desvios extremos do padrão de inativação do cromossomo X materno

X-linked intellectual disability: study of sibships with two or more affected brothers whose mothers have highly skewed X-inactivation

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências – Programa Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

Orientadora: Angela Maria Vianna Morgante

São Paulo

2023

Dias Hanna, Marcela

Deficiência intelectual com herança ligada ao X: estudo de irmandades com dois ou mais afetados selecionadas pelos desvios extremos do padrão de inativação do cromossomo X materno / Marcela Dias Hanna; orientadora Angela Maria Vianna Morgante -- São Paulo, 2023. — 72 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

1. Deficiência intelectual. 2. Deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X. 3. Inativação do cromossomo X. I. Vianna Morgante, Angela Maria, orient. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Genética e Biologia Evolutiva.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Luciana A. Haddad

Profa. Dra. Juliana F. Mazzeu



Profa. Dra. Angela Maria Vianna Morgante

Orientadora

Este trabalho foi realizado com auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) concedido à orientadora (FAPESP-CEPID 2013/08028-1).

Dedico este trabalho ao Mário.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos pacientes e seus familiares, por concordarem em participar do projeto e permitir a realização deste estudo

À Profa. Dra. Ana Krepischi, pela ajuda na análise de dados.

Índice

I.	Introdução.....	9
I.1.	Deficiência intelectual.....	9
I.2.	Deficiência intelectual com herança ligada ao X.....	13
I.3.	Padrão de inativação do cromossomo X em mulheres heterozigóticas quanto a variantes do cromossomo X que causam DI em homens	18
I.4.	Importância da identificação de variantes causadoras de DI	22
II.	Objetivo	24
III.	Casuística e Métodos	25
III.1.	Casuística.....	25
III.2.	Métodos	27
III.2.1.	Obtenção das amostras de DNA genômico	27
III.2.2.	Análise do padrão de inativação do cromossomo X	28
III.2.3.	Investigação de microdeleções e microduplicações no cromossomo X por CMA	28
III.2.4.	Sequenciamento do exoma	28
III.2.5.	Análise de dados de exomas	29
III.2.6.	Priorização funcional e classificação de variantes	30
IV.	Resultados e Discussão.....	32
IV.1.	Análise das variantes e correlação genótipo-fenótipo.....	32
IV.1.1.	Irmandade 3	32
IV.1.2.	Irmandade 4	34
IV.1.3.	Irmandade 5	36
IV.1.4.	Irmandade 6.....	36
IV.1.5.	Irmandade 7	36

IV.2. Desvios extremos da inativação do cromossomo X materno e variantes no cromossomo X causais da deficiência intelectual de seus filhos	41
IV.3. Limitações do estudo.....	44
V. Conclusões.....	46
VI. Resumo	48
VII. Abstract.....	51
VIII. Referências Bibliográficas.....	54

I. Introdução

I.1. Deficiência intelectual

A deficiência intelectual (DI) é definida pela *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (AAIDD) por limitações da função intelectual e do comportamento adaptativo presente antes dos 22 anos de idade (Schalock, Luckasson e Tassé, 2021). A função intelectual está ligada a aprendizado, raciocínio e resolução de problemas, enquanto o comportamento adaptativo engloba habilidades necessárias para a independência do indivíduo, tais como linguagem, escrita, noção de números, tempo e dinheiro e capacidade de executar atividades da vida diária, como higiene. As limitações do indivíduo devem ser consideradas dentro do contexto cultural em que está inserido.

Historicamente, a DI é classificada de acordo com o Quociente de Inteligência (QI), em quatro categorias: leve (QI = 69 a 50), moderada (QI = 49 a 36), grave (QI = 35 a 20) e profunda (QI < 20) (APA, 1994). Entretanto, existe uma tendência de diminuição do foco no QI para o diagnóstico, dando mais ênfase à necessidade de auxílio ou nível de acometimento do comportamento adaptativo, para a classificação da gravidade da DI. Enquanto o Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM) 4ª edição distinguia os graus de DI por meio do QI, o DSM 5ª edição (DSM-5), classifica a gravidade da DI, ainda em leve, moderada, grave e profunda, mas com base principalmente no acometimento do comportamento adaptativo em três domínios: conceitual, social e prático (APA, 2013) (Tabela 1).

A frequência estimada de DI na população mundial é de aproximadamente 2-3% em países ocidentais desenvolvidos (Tzschach et al., 2015; Fieremans et al., 2016). A DI apresenta grande heterogeneidade clínica e etiológica, com causas que podem ser ambientais, genéticas, ou uma combinação de ambos os fatores. Entre as causas ambientais estão as infecções maternas, desnutrição, traumas durante o parto ou consumo de álcool pela mãe durante a gravidez (revisão em Ropers, 2008). Os fatores ambientais explicam a maior prevalência da DI em países de baixa e média renda, onde a frequência de DI, considerando todos os graus, é

Tabela 1. Classificação da gravidade da deficiência intelectual com base em diferentes critérios: critérios do DSM-4, do DSM-5, versão mais atualizada, e critérios da AAIDD. Tabela traduzida de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK332877/>.

Categoria de Gravidade	Distribuição Percentual Aproximada de Casos por Gravidade	Critérios do DSM-4 (os níveis de gravidade foram baseados apenas nas categorias de QI)	Critérios DSM-5 (gravidade classificada com base nas habilidades diárias)	Critérios AAIDD (gravidade classificada com base na intensidade do apoio necessário)
Leve	85%	Faixa aproximada de QI 50-69	Pode viver de forma independente com níveis mínimos de apoio.	Apoio intermitente necessário durante transições ou períodos de incerteza.
Moderada	10%	Faixa aproximada de QI 36-49	A vida independente pode ser alcançada com níveis moderados de apoio, como aqueles disponíveis em instituições.	Apoio limitado necessário em situações diárias.
Grave	3,5%	Faixa aproximada de QI 20-35	Requer assistência diária com atividades de autocuidado e supervisão de segurança.	Amplo apoio necessário para as atividades diárias.
Profunda	1,5%	QI <20	Requer cuidados 24 horas.	Apoio abrangente necessário para todos os aspectos das rotinas diárias.

quase o dobro, em comparação com países de renda mais alta (Durkin, 2002; Maulik et al., 2011). Uma das causas mais importantes de DI em países subdesenvolvidos é a desnutrição. Ou seja, algumas causas de DI são evitáveis - como desnutrição e consumo de álcool durante a gestação, e por isso o desenvolvimento de políticas públicas é essencial (Katz e Lazcano-Ponce, 2008). Na Figura 1, pode-se observar uma representação esquemática dos estágios do neurodesenvolvimento, com fatores genéticos e ambientais causadores da DI e sua janela de tempo. Para fatores genéticos, foi representado o início dos sinais ou o momento da detecção (Chiurazzi e Pirozzi, 2016).

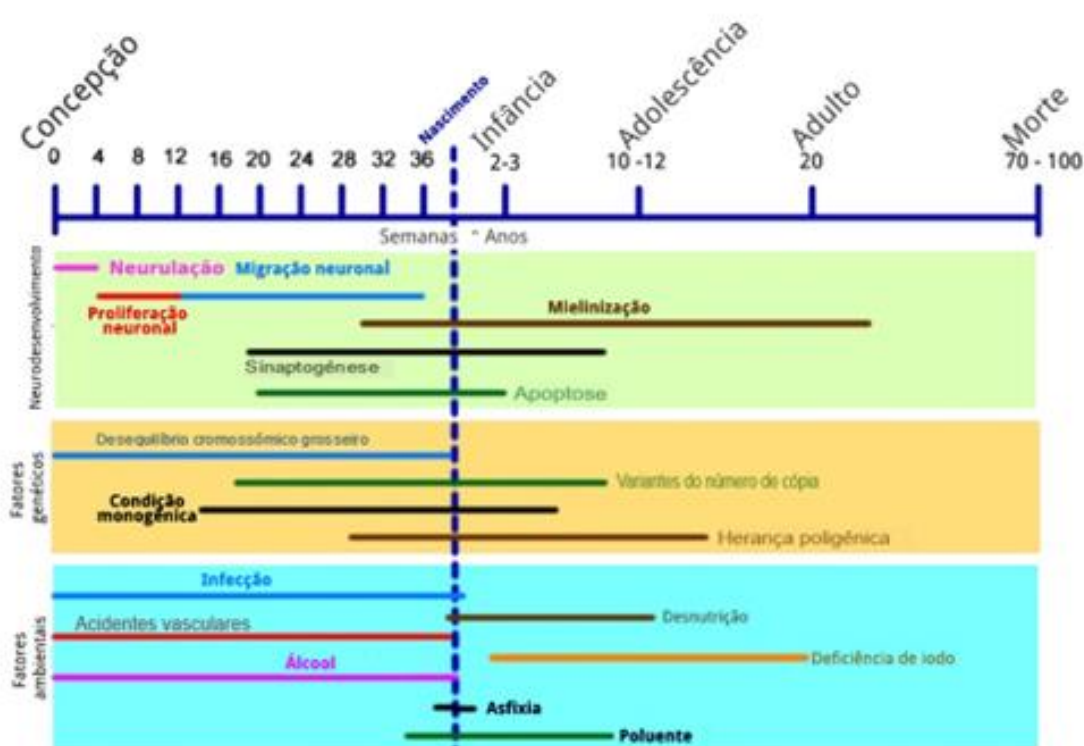


Figura 1. Representação esquemática dos estágios do neurodesenvolvimento, com fatores genéticos e ambientais causadores da DI e sua janela de tempo. Modificada de Chiurazzi e Pirozzi (2016).

A maior parte das pessoas com DI, em torno de 80-85%, apresenta DI de grau leve. A etiologia da DI leve é predominantemente multifatorial (Chiurazzi e Oostra, 2000; revisão em Leonard e Wen, 2002; Petterson et al., 2007; Ropers, 2010; Maulik et al., 2011; McKenzie et al., 2016). Estudos estimam que a DI considerada moderada, grave ou profunda tem maior probabilidade de ser causada por fatores genéticos e corresponde a 15-20% dos casos de DI, com frequência semelhante em diferentes níveis socioeconômicos, evidenciando o componente

genético (Drews et al., 1995; Yeargin-Allsopp et al., 1997; Knight et al., 1999; Chiurazzi e Oostra, 2000; Ropers, 2010; revisão em van Bokhoven, 2011).

As causas genéticas da DI são heterogêneas, incluindo alterações cromossômicas estruturais detectáveis ao microscópio, microdeleções e microduplicações cromossômicas e alterações gênicas (van Bokhoven, 2011; Chiurazzi e Pirozzi, 2016; Neri et al., 2018; Hanna, 2019; Hanna et al., 2019). Entretanto, a causa da DI permanece desconhecida em 40-60% dos casos, principalmente considerando os casos de DI leve (Ellison et al., 2012; De Ligt et al., 2012; Fieremans et al., 2016; Wieczorek, 2018; De Luca et al., 2020).

Tradicionalmente, a DI é classificada como síndrômica ou não-síndrômica (Ropers, 2010; van Bokhoven, 2011; Neri et al., 2018; Tejada e Ibarluzea, 2020). Nas formas síndrômicas ocorrem sinais adicionais clinicamente reconhecíveis, como dismorfismos ou defeitos metabólicos, enquanto nas formas não-síndrômicas a DI é a única característica evidente. Avanços realizados no estudo da DI dificultam essa classificação em DI síndrômica ou não-síndrômica, tendo em vista que variantes em genes associados à DI foram identificadas como causa de ambos os quadros (Chiurazzi e Pirozzi, 2016; Neri et al., 2018; Tejada e Ibarluzea, 2020).

Em pacientes que apresentam DI síndrômica, as alterações cromossômicas identificadas na análise após bandamento G são capazes de explicar cerca de 15% dos casos de DI. Em torno de 6 a 8% desses pacientes apresentam trissomia do cromossomo 21, ou síndrome de Down, que é a causa genética mais comum de DI, afetando 1:1000 nascidos vivos (Ropers, 2010; Vissers et al., 2016). As alterações detectadas por meio do bandamento G envolvem pelo menos 5 Mbp (milhões de pares de base). Ou seja, essa técnica é capaz de detectar alterações de tamanho considerável, que geralmente incluem uma grande quantidade de genes, ou cromossomos inteiros.

Uma técnica capaz de detectar alterações menores, como microdeleções e microduplicações submicroscópicas, é a análise cromossômica por *microarray* (CMA, do inglês “Chromosome Microarray Analysis”), que permite o diagnóstico de cerca de 15-20% dos pacientes com DI que apresentam cariótipo normal (Rosenberg et al., 2006; Miller et al., 2010; Hanna, 2019). A resolução dessa técnica varia de acordo com a plataforma utilizada, podendo detectar alterações no número de cópias (CNVs, do inglês “Copy Number Variations”) de cerca de 100-500 quilobases, ou milhares de bases nitrogenadas (kbp). Além de detectar CNVs, plataformas de SNPs (do inglês, “Single Nucleotide Polymorphisms”) também

conseguem detectar regiões de homozigose, identificando dissomias uniparentais (UPD, do inglês “Uniparental Disomy”) (Scionti et al., 2018).

No caso de mutações gênicas, a DI monogênica pode apresentar herança autossômica recessiva (AR), autossômica dominante (AD), ligada ao X recessiva (XLR) ou ligada ao X dominante (XLD). Caso haja uma hipótese diagnóstica e um gene associado, esse gene pode ser sequenciado para que se identifique a mutação e se confirme o diagnóstico. Ou seja, o sequenciamento pode ser direcionado e apenas um gene ser sequenciado ou um pequeno número de genes. O sequenciamento de nova geração ou sequenciamento massivo paralelo (NGS, do inglês “Next Generation Sequencing”) pode ser aplicado em painéis que incluem genes já associados ao quadro clínico ou a quadros semelhantes.

Quando não há uma hipótese diagnóstica, ou quando nada foi encontrado ao se sequenciarem alguns genes, uma possibilidade é o sequenciamento de todos os éxons, sequenciamento do exoma, ou de todo o genoma. Entretanto, apesar de ser a técnica mais eficiente para identificação de variantes patogênicas, ela também apresenta desafios. Por exemplo, a filtragem e a interpretação das variantes, pois é preciso diferenciar as variantes patogênicas das variantes benignas, que estão associadas à variabilidade entre as pessoas. Para auxiliar na filtragem e na interpretação das variantes, é importante que haja uma caracterização clínica detalhada do paciente e dos seus familiares (De Luca et al., 2020). Além desse desafio, há também o de armazenar a crescente quantidade de dados gerados, e a proteção e a segurança dos dados, garantindo a privacidade dos pacientes (Ozercan et al., 2018; Arshad et al., 2021; Gim, 2022, Gürsoy et al., 2022).

A identificação da causa da DI é importante pois auxilia o aconselhamento genético e o manejo das manifestações clínicas, melhorando a qualidade de vida do paciente (De Luca et al., 2020). Além disso, a identificação de mecanismos genéticos possibilita a pesquisa e o desenvolvimento de terapias direcionadas, como terapias de reposição enzimática e terapias de edição de genes (Webber et al., 2016; Fellmann et al., 2017; Ziccardi et al., 2019).

I.2. Deficiência intelectual com herança ligada ao X

O cromossomo X tem cerca de 156 Mbp e 850 genes codificadores (Ensembl Genome Browser 101, 2020). Os cromossomos X e Y compartilham duas regiões homólogas, as regiões

pseudoautossômicas PAR1 e PAR2, que se comportam como regiões autossômicas e se recombinam durante a meiose. Estima-se que haja em torno de 29 genes nessas regiões (Skaletsky et al., 2003; Ross et al., 2005; Blaschke e Rappold, 2006; Hinch et al., 2014).

O diagnóstico genético da DI começou com a observação da trissomia do 21, em 1959, como causa da síndrome de Down (Lejeune, Turpin e Gautier, 1959). Em 1967, a primeira alteração em gene único como causa de um quadro de DI foi identificada, associando alterações no gene *HPRT1*, localizado no cromossomo X, com a síndrome de Lesch-Nyhan (Seegmiller, Rosenbloom e Kelley, 1967). Em 1969, Lubs observou um “cromossomo X marcador” associado à DI em uma família com múltiplos homens afetados (Lubs, 1969); o gene associado a essa forma de DI foi identificado em 1991 (Verkerk et al., 1991) e a síndrome do X frágil foi reconhecida como a causa mais comum de DI em homens. À medida que o estudo da etiologia genética da DI se foi firmando, particularmente a partir dos anos 90, houve um foco no cromossomo X, pela maior prevalência de DI em homens do que em mulheres e pela facilidade de se realizarem estudos de ligação em famílias com homens afetados (Ropers, 2010; van Bokhoven et al., 2011; Vissers et al., 2015).

Os genes presentes no cromossomo X são altamente expressos no cérebro. Estudos estimam que cerca de 40% dos genes codificadores de proteínas identificados no cromossomo X humano são expressos no cérebro (Ropers e Hamel, 2005; Nguyen e Distèche, 2006; De Luca et al., 2020). A análise das entradas dos genes associados à DI no banco de dados OMIM (do inglês “Online Mendelian Inheritance in Man”) mostra que há um enriquecimento desses genes no cromossomo X, com duas vezes mais do que o esperado, considerando o número de genes em cada cromossomo (Inlow e Restifo, 2004; Chiurazzi e Pirozzi, 2016).

Uma hipótese que explica o enriquecimento de genes expressos no cérebro no cromossomo X é a “Faster X Hypothesis”, que postula que novas variantes recessivas que ocorrem no cromossomo X se expõem à seleção natural mais rapidamente, pois se expressam no macho em dose simples, enquanto aquelas que ocorrem nos autossomos precisam chegar à homozigose para serem expressas e, por sua vez, submetidas à seleção; assim, novas variantes no cromossomo X podem ser fixadas sob seleção positiva mais rapidamente do que aquelas que ocorrem nos autossomos (Vicoso e Charlesworth, 2006).

Atualmente, 155 genes já foram definitivamente associados à DI ligada ao X, representando cerca de 18% dos genes do cromossomo X. Foram identificadas mutações exclusivamente responsáveis pelo quadro clínico de DI síndrômica em 100 desses genes;

mutações causando exclusivamente DI não síndrômica em 27 genes, e mutações associadas tanto a DI síndrômica quanto a não síndrômica em outros 28 genes. Mais sete genes foram relacionados a DI, mas aguardam confirmação (Greenwood Genetic Center, CGC, XLID, janeiro de 2022).

Considerando que 400 genes foram associados a DI síndrômica ou não síndrômica com herança dominante e 684, com padrão de herança recessiva (Wieczorek, 2018; Jamra, 2018), aproximadamente 11% dos genes já associados a DI encontram-se no cromossomo X, que contém apenas 5% dos genes humanos, evidenciando densidade proporcionalmente elevada de genes nesse cromossomo que influenciam a capacidade cognitiva (Vissers et al., 2016).

Apesar da identificação de 155 genes no cromossomo X cujas mutações estão definitivamente associadas à deficiência intelectual, a frequência de mutações em cada um desses genes é baixa e não é capaz de explicar os 10%-16% estimados de DI ligada ao X. A exceção é a perda de função do gene *FMRI* - que codifica a proteína FMRP -, devida à expansão da repetição de trinucleotídeos (CGG)_n em sua região 5', a causa a síndrome do X Frágil (SXF). Essa síndrome constitui a causa monogênica mais frequente de DI, afetando cerca de 2,5% dos homens com DI, e que explica cerca de um quarto dos casos familiares de DI ligada ao X (de Brouwer et al., 2007).

Em 1938, Penrose observou um excesso de homens afetados com DI em relação a mulheres. Em 1972, Lehrke estudou famílias em que a DI segregava de acordo com a herança ligada ao cromossomo X e propôs que as mutações no cromossomo X eram a explicação para o excesso de homens afetados. Estudos posteriores confirmaram a maior prevalência da DI moderada a grave em homens, sendo aproximadamente 1,4 vezes mais frequente em homens do que em mulheres (Ropers e Hamel, 2005; Ropers, 2010). Esse excesso de homens com DI é observado tanto na DI quanto em relação a outros distúrbios neuropsiquiátricos, como o autismo (Baron-Cohen et al., 2011).

Se admitirmos que todo esse excesso de homens com DI moderada a grave é devido a alterações no cromossomo X, a frequência de DI ligada ao X, com manifestação apenas em homens, deveria ser de cerca de 30% (Ropers e Hamel, 2005). Estima-se, entretanto, que variantes no cromossomo X sejam responsáveis por cerca de 10% dos casos de DI moderada a grave em homens (Ropers, 2010). Assim, variantes em genes codificadores no cromossomo X não explicam a maior frequência de homens afetados entre as pessoas com DI e vários outros mecanismos foram propostos para explicar esse excesso, incluindo haplótipos no cromossomo

Y, efeito de andrógenos, *imprinting* de genes autossômicos e polimorfismos no X que modulam a capacidade cognitiva (Mandel e Chelly, 2004; Ropers e Hamel, 2005; Serajee e Huq, 2009; Ropers, 2010; Quartier et al., 2018).

Uma hipótese para a maior prevalência de distúrbios do neurodesenvolvimento em homens é a de que existe um efeito protetor nas mulheres. Mandel e Chelly, em 2004, propuseram que diferenças no desenvolvimento do homem e da mulher durante o período embrionário podem tornar os homens mais susceptíveis a fatores ambientais prejudiciais. Outra hipótese sugerida envolvia polimorfismos no cromossomo X associados a outros fatores de predisposição genética. Essa hipótese do efeito protetor feminino teve apoio no estudo de Jacquemont et al. (2014), em que foi observado um número significativamente maior de variantes patogênicas autossômicas - CNVs e variantes de nucleotídeo únicos (SNVs, do inglês “Single Nucleotide Variant”) - em mulheres com distúrbios do neurodesenvolvimento, em comparação com homens. Eles estudaram 9.206 homens e 6.379 mulheres com transtornos do neurodesenvolvimento. Além disso, foi observado um número maior de variantes com herança materna do que paterna e as variantes deletérias de tamanho acima de 400 kbp foram herdadas via materna com maior frequência do que via paterna. Os autores concluíram que as mulheres necessitam de carga etiológica maior, não relacionada a variantes deletérias do cromossomo X, para que manifestem os quadros clínicos investigados, apoiando o “modelo de proteção feminina”.

Progressos na elucidação das causas moleculares da DI ligada ao X foram obtidos em estudos colaborativos internacionais, como EURO-MRX e o Consórcio IGOLD, e várias revisões foram publicadas nos últimos anos. Esses estudos concluem que as CNVs e SNVs no cromossomo X não são capazes de explicar os cerca de 10% esperados da DI ligada ao X entre homens afetados (Ropers, 2010, van Bokhoven, 2011).

Em um estudo de 600 famílias (EURO-MRX), com padrão de herança indicativo de herança ligada ao X, os probandos foram testados quanto a variantes patogênicas em 90 genes do cromossomo X já associados à DI. Variantes patogênicas foram detectadas em 42% dos casos (de Brouwer et al., 2007). O estudo estimou, ainda, que em 40% das famílias com dois ou mais homens afetados, a DI era causada por alterações em um gene do cromossomo X.

Com o objetivo de identificar genes associados à DI, Tarpey et al. (2009) investigaram 208 famílias em que a DI tinha padrão de herança indicativo de ligada ao X, sequenciando os

éxons de 718 genes codificadores do cromossomo X, representando 84% dos genes registrados pelo Genome Browser. Foram identificadas variantes causais em 25% das famílias.

Uma técnica que revolucionou a genética clínica foi o sequenciamento de nova geração (NGS). Usando NGS pode-se sequenciar várias regiões do genoma em paralelo, facilitando a investigação genética. O sequenciamento do exoma é uma das técnicas do grupo do NGS e consiste no sequenciamento de todos os éxons do genoma. Assim, são investigados todos os genes codificadores de proteínas no genoma humano.

As taxas de detecção por NGS de variantes que causam deficiência intelectual são em torno de 25% (Vissers et al., 2015). Essa tem sido a taxa de detecção em estudos que investigaram famílias em que o padrão de herança da DI era indicativo de herança ligada ao X. Em 2015, Tzschach et al. aplicaram NGS no estudo de 50 famílias e detectaram 13 variantes patogênicas (26%); além disso, cinco variantes patogênicas foram detectadas entre 100 pacientes do sexo masculino que eram casos isolados de DI. Hu et al. (2016) aplicaram o sequenciamento do exoma de genes do cromossomo X nos probandos de 405 famílias e identificaram variantes patogênicas em genes já associados à DI em 80 famílias (20%) e mais variantes potencialmente causativas em novos genes em 5% das famílias. Ibarluzea et al. (2020) identificaram variantes patogênicas em 23% das 47 famílias com indicação de DI ligada ao X, em que realizaram o sequenciamento do exoma de 82 genes do cromossomo X já associados à DI.

Hu et al. (2016) relacionaram algumas possíveis explicações para a não identificação da causa da DI ligada ao X por meio do sequenciamento do exoma do cromossomo X: (1) limitações técnicas do sequenciamento em algumas famílias; (2) variantes causais não codificadoras ou não anotadas no cromossomo X; (3) apesar do padrão de herança indicativo de ligada ao X, em algumas famílias, este pode não ser realmente o tipo de herança da DI; (4) variantes de significado incerto podem na verdade ser patogênicas; (5) alguns casos podem ter como causa variantes em mais de um gene; (6) as variantes deletérias podem estar localizadas em elementos reguladores, em regiões não codificadoras.

Rojano et al. (2019) observaram por meio de estudos de associação genômica (GWAS, do inglês “Genome-Wide Association Studies”) que aproximadamente 90% das variantes associadas a doenças estão localizadas em regiões não codificadoras. O sequenciamento do exoma não seria capaz de detectar essas variantes. Para isso, seria necessária a realização do sequenciamento do genoma completo.

Como mencionado anteriormente, há um enriquecimento de genes associados ao neurodesenvolvimento no cromossomo X, em torno de 15 % dos genes atualmente associados à DI se localizam nesse cromossomo. Assim, há grande interesse da pesquisa básica na compreensão da função e na dinâmica desses genes no sistema nervoso central (SNC). Além disso, a maior compreensão desses genes e de variantes patogênicas auxilia no entendimento de malformações cerebrais e de distúrbios neuropsiquiátricos além da DI, como por exemplo bipolaridade, esquizofrenia e TEA (Hu et al., 2016; Chiurazzi e Pirozzi, 2016).

I.3. Padrão de inativação do cromossomo X em mulheres heterozigóticas quanto a variantes do cromossomo X que causam DI em homens

A diferença de dosagem do cromossomo X entre homens e mulheres é compensada pela inativação aleatória de um dos cromossomos X na mulher no início do desenvolvimento embrionário. Uma vez tornado inativo, o mesmo cromossomo X mantém-se inativo nas células descendentes. Portanto, as mulheres são consideradas mosaicos quanto ao cromossomo X inativo, que pode ser o materno ou o paterno em cada uma de suas células, com igual probabilidade (Lyon, 1961; revisão em Balaton et al., 2018). O período exato em que a inativação ocorre não está totalmente elucidado, mas estudos são indicativos de que, em humanos, a inativação se inicie nos blastocistos e esteja completa no final do primeiro mês de gestação (Tang et al., 2015; Moreira de Mello et al., 2017; Shvetsova et al., 2019; Zhou et al., 2019; Patrat, Ouimette e Rougeulle, 2020).

Com relação ao padrão de inativação, as mulheres normais da população se distribuem de acordo com a curva normal, como esperado pela inativação aleatória. Sendo assim, a maior parte das mulheres apresenta um padrão de inativação em torno de 50:50. Desvios extremos de inativação são raros, e desvios na proporção 95:5 estão presentes em 1,7% da população feminina adulta, representando os extremos da distribuição normal dos padrões de inativação (Amos-Landgraf et al., 2006; Shvetsova et al., 2019).

Amos-Landgraf et al. (2006) avaliaram o padrão de inativação do X, com base na metilação do gene *AR*, que codifica o receptor de andrógeno (Teste HUMARA, Allen et al., 1992), de 415 mulheres adultas da população geral e observaram que apenas 1,7% dessas mulheres apresentavam padrões de inativação com desvios extremos 95:5. Os autores concluem

que uma mulher com desvio total de inativação do cromossomo X tem alta probabilidade de ser heterozigótica quanto a uma variante patogênica nesse cromossomo, o que explicaria o desvio de inativação. Assim, essas mulheres são boas candidatas para a investigação de variantes causadoras de DI ligada ao X.

Shvetsova et al. (2019) avaliaram o padrão de inativação do X no sangue periférico de 79 mulheres, com base na expressão gênica, analisando dados de sequenciamento de RNA e também de sequenciamento completo do genoma de seus genitores, incluídos no Genome of the Netherlands Project. Os autores observaram que 27% das mulheres tinham desvio de inativação $\geq 70:30$ e 10% apresentavam desvio $\geq 80:20$, resultados semelhantes aos obtidos por Amos-Landgraf et al. (2006), aplicando o teste HUMARA.

Um aspecto a se considerar é que os estudos relacionados à inativação do X são realizados, em geral, em sangue periférico. Sua correspondência com outros tecidos tem sido avaliada. Bittel et al. (2008) avaliaram a concordância entre os padrões de inativação do cromossomo X, comparando o tecido sanguíneo e outros 34 tecidos, que representavam as três camadas germinativas embrionárias, obtidos de autópsia de 26 mulheres de diferentes idades; verificaram que o padrão de inativação dos tecidos hematopoiéticos avaliados, sangue e baço, eram semelhantes ao encontrado no cérebro e em outros tecidos, com uma variação $\leq 10\%$. Esses resultados indicam que há um alto nível de concordância entre o padrão de inativação do cromossomo X em tecidos do sistema nervoso central e em tecidos hematopoiéticos. Em outro estudo em que foram utilizados tecidos obtidos de autópsias, o epitélio bucal mostrou correspondência maior com tecidos inacessíveis do que o sangue (De Hoon et al., 2015). Resultados de Shvetsova et al. (2019) são indicativos de que o padrão da inativação do X nas células do sangue permite estimar em parte o padrão de inativação em outros tecidos. Em outro estudo, que avaliou dados do projeto Genotype Tissue Expression, observou-se uniformidade da expressão de 681 genes do cromossomo X em 29 tecidos (Tukiainen et al., 2017). Porém, apenas dois desses tecidos eram cerebrais, provenientes de córtex cerebral e glândula pituitária. Sendo assim, ainda não é possível a conclusão de que a expressão de genes em certos tecidos seria semelhante àquela em células neuronais (Wu et al., 2014; Tukiainen et al., 2017; Ziats et al., 2019).

Vários estudos vêm demonstrando que desvios extremos da inativação do X são frequentes em mulheres portadoras de alterações estruturais do cromossomo X e de variantes patogênicas ligadas ao X (Plenge et al., 2002; Fieremans et al., 2016; Neri et al., 2018; Ziats et

al., 2019; Ibarluzea et al., 2020). Várias doenças que incluem DI ligada ao X foram associadas a desvios extremos da inativação do X em mulheres heterozigóticas (Plenge et al., 2002; Dayer et al., 2007; Tzschach et al., 2015; Ziats et al., 2019).

O estudo de Plenge et al. (2002) foi o primeiro a mostrar desvios extremos da inativação do X em mulheres normais portadoras de variantes patogênicas em genes do cromossomo X que causavam DI nos homens de suas famílias. Analisaram o padrão de inativação do cromossomo X em 155 mulheres pertencentes a 24 famílias em que segregavam 20 diferentes variantes associadas a DI ligada ao X, sendo 94 portadoras e 61 não portadoras. Observaram que 30% das mulheres heterozigóticas apresentavam desvios $>90:10$, presente em apenas 3,9% do grupo controle. A distribuição das mulheres não portadoras não diferiu da distribuição das mulheres do grupo controle. Os resultados permitiram concluir que desvios extremos da inativação são comuns em portadoras de variantes no cromossomo X que causam DI em homens, sendo específico para variantes em certos genes. Esse padrão de desvio extremo da inativação seria consequência da vantagem proliferativa das células com o alelo normal ativo, em detrimento das células em que o alelo normal era o inativo.

Os desvios extremos da inativação do X em mães de indivíduos do sexo masculino têm sido utilizados na seleção de pacientes para investigação de variantes patogênicas que causam DI. Por exemplo, Ibarluzea et al. (2020) realizaram o sequenciamento de nova geração de 82 genes já relacionados à DI ligada ao X, em 61 pacientes do sexo masculino com DI sindrômica. Desses 61 pacientes, 14 possuíam pelo menos um irmão também afetado por DI e suas mães tinham desvios de inativação do cromossomo X $> 80:20$. Foram detectadas variantes candidatas em ch16 probandos. As variantes foram interpretadas como patogênicas/provavelmente patogênicas em quatro probandos e dois deles faziam parte do grupo de 14 irmandades cujas mães apresentaram desvio extremo de inativação. Nessas 14 irmandades foram ainda detectadas três VUS. Em outro estudo similar, realizado por Giorgio et al. (2016), os autores selecionaram sete famílias em que havia indicação de a DI ter herança ligada ao X e as mães dos afetados tinham desvios de inativação entre 84:16 e 100:0. Detectaram a variante patogênica em três famílias. No estudo de Bueno (2022), o sequenciamento completo do exoma foi realizado em 17 pacientes do sexo masculino, casos isolados de DI em suas famílias, selecionados pelos desvios extremos da inativação do cromossomo X (razão de inativação $\geq 95:5$) em suas mães. Variantes candidatas foram identificadas em sete pacientes e em quatro deles, a relação com o fenótipo pôde ser claramente estabelecida.

Uma das questões relativas ao desvio de inativação relacionado a variantes patogênicas no cromossomo X diz respeito a se tratar de fenômeno que ocorre quando do estabelecimento da inativação do X ou posteriormente. Muers et al. (2007), estudaram fêmeas de camundongo portadoras de mutação de perda de função no gene *Atrx*, cujo ortólogo causa DI ligada ao X em humanos, e mulheres heterozigóticas quanto a essas mutações apresentam desvio total de inativação. As fêmeas de camundongo do grupo controle não apresentavam a mutação. A presença ou não da proteína nas células foi avaliada por imuno-histoquímica. Nos embriões com oito dias de idade, não houve diferença entre o número de células *Atrx*-negativas e positivas. Ou seja, na fase inicial da embriogênese, o padrão de inativação dos alelos foi compatível com a inativação casual. A análise de diferentes tecidos durante o desenvolvimento embrionário mostrou diminuição gradual das células que não expressavam a proteína. Assim, os autores concluíram haver seleção contra as células em que a mutação está no X ativo, no decorrer do desenvolvimento.

Geralmente as mulheres heterozigóticas quanto a variantes patogênicas em genes do cromossomo X são assintomáticas ou são afetadas de forma mais leve, devido à compensação pelo segundo alelo normal ou ao desvio de inativação do cromossomo X com o gene alterado inativo na maioria das células. Entretanto, o desvio de inativação pode favorecer a variante patogênica e fazer com que mulheres portadoras apresentem fenótipo de DI (Fieremans et al., 2016; Ziats et al., 2019). Entre os motivos para esse fenômeno estão a disrupção da regulação do complexo de inativação do X, como na deleção do promotor do *Tsix* (Lee, Davidow e Warshawsky, 1999; Nesterova et al., 2003) ou rearranjos estruturais que incluem o cromossomo X (Cottrell et al., 2009; Sisdelli et al., 2016; Ziats et al., 2019). Além disso, uma mulher pode manifestar uma doença recessiva ligada ao X, tendo um desvio extremo do padrão de inativação, em decorrência de a inativação do X ser casual, não havendo seleção que favoreça células com o alelo normal (Fieremans et al., 2016; Ziats et al., 2019).

Fieremans et al. (2016) analisaram o padrão de inativação do cromossomo X em um grupo de 288 mulheres, que apresentavam DI, com o objetivo de correlacionar o desvio de inativação do X à presença de variantes que explicassem o fenótipo. Observaram que 22 mulheres (7,6%) apresentavam desvios extremos de inativação do X (>90:10), número significativamente maior do que o observado em mulheres da população estudada por Amos-Landgraf et al. (2006). Das 22 mulheres, 19 foram submetidas ao sequenciamento do exoma. Foram identificadas 11 variantes ligadas ao X, sendo seis variantes em genes associados a DI ligada ao X, uma taxa diagnóstica de 30%.

Dois estudos na população brasileira detectaram também aumento na frequência de desvio de inativação entre mulheres com DI idiopática. Vianna et al. (2020) analisaram 53 mulheres com DI e detectaram desvio extremo de inativação do cromossomo X em sete pacientes (13%), identificando variantes potencialmente relacionadas a DILX em cinco delas. No estudo de Chaves et al. (2023), entre 136 mulheres com DI, 11 (8%) apresentaram desvio extremo de inativação do cromossomo X e em oito delas, todas casos isolados, foram encontradas variantes patogênicas em heterozigose que explicavam o quadro clínico; as variantes estavam em genes já associados a DI com herança dominante: quatro no cromossomo X e quatro em genes autossômicos, sendo um deles, *YY1*, diretamente relacionado ao processo de inativação do cromossomo X.

Alguns genes escapam à inativação do X e são expressos no cromossomo X inativo, mesmo que em baixa taxa (Spatz et al., 2004; Carrel & Willard, 2005; Shvetsova et al., 2019). Vários estudos indicaram que, mesmo em baixas taxas, a expressão extra do alelo mutante no cromossomo X inativo pode causar o fenótipo clínico em mulheres heterozigóticas (Dayer et al., 2007; Fieremans et al., 2016; Mignot et al., 2018; Ziats et al., 2019; De Luca et al., 2020). Desvios extremos da inativação do X que favorecem a expressão do alelo normal já foram descritos em mulheres clinicamente normais heterozigóticas quanto a variantes patogênicas em genes que escapam à inativação, indicando seleção contra o alelo mutante no X ativo (Guerra et al., 2020).

I.4. Importância da identificação de variantes causadoras de DI

A investigação da etiologia genética da DI permite a identificação de novos genes candidatos ou de variantes novas em genes já associados a DI. A identificação da etiologia da DI impacta o aconselhamento genético da família e facilita sua conexão com associações e grupos de apoio específicos (Lenhard et al., 2005; Carmichael et al., 2014; Thevenon et al., 2016; Macnamara et al., 2019). Identificar a causa da doença pode aliviar sentimentos negativos manifestados pela família, como culpa, incerteza e ansiedade, dando fim à “odisseia diagnóstica”, além de auxiliar no planejamento familiar e no manejo dos sintomas (Antley & Hartlage, 1976; Lenhard et al., 2005; Carmichael et al., 2014; Thevenon et al., 2016; De Luca et al., 2020). Independentemente da gravidade do diagnóstico, pais reportaram preferir saber o prognóstico à incerteza (Carmichael et al., 2014).

O diagnóstico também pode beneficiar a autoestima da pessoa afetada pela doença genética, dando a ela a sensação de empoderamento, ao entender a razão dos seus sinais e sintomas, além de validação desses sintomas, que podem ter sido previamente desconsiderados pelos profissionais de saúde e outras pessoas na comunidade (Carmichael et al., 2014; Turriff et al., 2017).

A DI não é condição temporária, por mais que se estimule a criança (APA, 2013). Por esse motivo, os indivíduos podem continuar dependendo dos familiares mesmo na vida adulta. Entretanto, como foi mencionando anteriormente, a associação causal de variante patogênica com o quadro clínico permite a investigação do mecanismo que leva à DI, dando a oportunidade de desenvolvimento de terapias que possam atenuar a gravidade da DI (Vissers et al., 2015; Webber et al., 2016; Fellmann et al., 2017; Ziccardi et al., 2019).

Além do impacto para o próprio indivíduo e para as pessoas responsáveis pelo seu cuidado, a DI tem impacto na economia de um país, que precisa alocar verbas para a atenção a esses indivíduos (Polder et al., 2002; CDC, 2004). Pesquisas voltadas para o entendimento das causas genéticas da DI são essenciais, pois contribuem para o conhecimento científico e promovem acompanhamento de melhor qualidade às famílias afetadas. Além disso, tendo em vista o alto custo do cuidado a esses pacientes, é importante saber mais sobre a etiologia da DI, a fim de que se possa planejar políticas públicas voltadas à atenção aos pacientes e suas famílias.

Estudos anteriores investigaram variantes do X que podiam causar DILX em filhos de mulheres com desvios extremos do padrão de inativação, visando ao enriquecimento de pacientes que teriam variantes patogênicas no cromossomo X (Giorgio et al., 2016; Ibarluzea et al., 2020; Bueno, 2022). O objetivo deste estudo é justamente investigar variantes que causem DILX numa amostra que estaria enriquecida de variantes no X, com base no padrão de inativação do X das mães dos afetados.

II. Objetivo

O objetivo deste trabalho foi investigar variantes em genes do cromossomo X, detectadas por sequenciamento completo do exoma, que fossem causas da deficiência intelectual em irmandades em que ocorriam dois ou mais afetados do sexo masculino, cujas mães tinham desvios extremos da inativação do cromossomo X. Uma vez identificada a variante causal pode ser realizado o aconselhamento genético da família, identificando-se mulheres heterozigóticas com risco de virem a ter filhos com DI.

III. Casuística e Métodos

III.1. Casuística

Os pacientes com DI selecionados para este estudo foram averiguados no Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo, para onde foram encaminhados para diagnóstico e aconselhamento genético. Fazem parte de irmandades com dois ou mais indivíduos do sexo masculino com DI. Os pacientes apresentavam DI moderada a grave, avaliada com base em suas limitações cognitivas e comportamentais, de forma isolada ou em associação com outros sinais. Neles foram afastadas alterações cromossômicas e a síndrome do X Frágil.

A pesquisa de alterações no cromossomo X que explicassem a recorrência da DI em irmandades foi iniciada em projetos anteriores do Laboratório de Genética Humana, com a determinação do padrão de inativação do cromossomo X nas genitoras e os desvios extremos de inativação (razão de inativação $\geq 95:5$) considerados como indicação de herança ligada ao X. Esses estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (Protocolos 058/2006 e 093/2009). Os responsáveis pelos pacientes com DI deram consentimento para a investigação de alterações do cromossomo X, após receberem os resultados diagnósticos negativos quanto a alterações cromossômicas detectáveis após bandamento G e teste molecular para a síndrome do X frágil. As genitoras deram consentimento para a investigação do padrão de inativação do cromossomo X e busca de alterações que pudessem ser a causa de deficiência intelectual em seus filhos.

O estudo da inativação do cromossomo X nas genitoras de 24 irmandades foi objeto da Tese de Doutorado de Santos (2013); nesse estudo, desvios extremos da inativação do X (razão de inativação $\geq 95:5$) foram detectados em quatro genitoras; nenhuma variante patogênica de número de cópias de segmentos do cromossomo X foi identificada em seus filhos. O estudo da inativação do X incluiu ainda as genitoras de outras 34 irmandades e em quatro delas foram detectados desvios extremos da inativação do X. Assim, dentre 58 genitoras de irmandades com dois ou mais indivíduos do sexo masculino com deficiência intelectual, oito apresentaram desvios extremos da inativação do cromossomo X. Essa frequência - $8/58 = 0,1379$; IC 95% =

0,0615 - 0,2538, é significativamente maior do que aquela observada em mulheres adultas da população geral por Amos-Landgraf et al. (2006) - $7/415 = 0,017$; IC 95% = 0,007 – 0,035 ($P = 0.0001$); teste exato de Fisher. Assim, essas oito mulheres foram consideradas candidatas a serem heterozigóticas quanto a variantes em genes do cromossomo X que causam DI em seus filhos.

Nos quatro probandos cujas mães tinham desvios extremos da inativação do X não incluídos no estudo de Santos (2013), foram investigadas microduplicações e microdeleções cromossômicas e em um deles foi detectada uma microduplicação em Xq28, abrangendo o gene *MECP2* (Irmandade 1; Tabela 2); essa microduplicação estava presente no irmão do probando e em sua mãe (Carvalho et al. 2009).

O estudo teve continuação, com o objetivo de buscar variantes patogênicas causais de DI ligada ao X nas outras sete famílias, por meio do sequenciamento de nova geração (NGS, Next Generation Sequencing) do exoma completo. Antes do presente estudo, em uma das sete irmandades (Irmandade 2, Tabela 2), foi identificada variante patogênica no gene *KDM5C*, como causa do quadro clínico (Guerra et al., 2020). Uma outra irmandade foi excluída do estudo, porque o sequenciamento não pôde ser realizado por falta de material e insucesso no contato com a família.

Assim, neste estudo, continuamos a investigação de variantes patogênicas no cromossomo X nos probandos das outras cinco irmandades, por meio da análise dos dados gerados pelo sequenciamento do exoma. O estudo da segregação nas famílias de variantes detectadas por sequenciamento completo do exoma e os Termos de Consentimento e Assentimento foram aprovados pelo CEP-Seres Humanos IBUSP (Protocolo 307/2021).

A Tabela 2 mostra o número de irmãos e o padrão de inativação do cromossomo X materno das irmandades cujos probandos foram analisados neste estudo (Irmandades 3, 4, 5, 6 e 7) e das irmandades 1 e 2, que tiveram as alterações do cromossomo X identificadas em estudos anteriores, tendo sido incluídos na discussão do presente estudo.

Tabela 2. Irmandades incluídas no estudo, número de irmãos com deficiência intelectual (DI) e padrão de inativação do cromossomo X detectado em sangue periférico nas mães dos pacientes.

Irmandades	Número de irmãos com DI	Padrão de inativação do cromossomo X materno
1*	3(2 Gêmeos)	100:0
2*	2	100:0
3	2	100:0
4	3	100:0
5	2	97:3
6	2	100:0
7	2	100:0

- * Alterações patogênicas no cromossomo X identificadas anteriormente a este estudo.

III.2. Métodos

III.2.1. Obtenção das amostras de DNA genômico

As amostras de sangue periférico dos pacientes e de suas genitoras foram coletadas anteriormente a este estudo. O ácido desoxirribonucleico (DNA) foi extraído de leucócitos de sangue periférico, utilizando-se o aparelho Autopure LS (Gentra Systems, Minneapolis, USA). As amostras foram quantificadas e sua pureza avaliada, utilizando-se o NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Rockland, USA).

III.2.2. Análise do padrão de inativação do cromossomo X

A investigação do padrão de inativação do cromossomo X nas genitoras dos afetados foi realizada com base no padrão de metilação do gene *AR* – receptor de andrógeno, do inglês “Androgen Receptor” (Allen et al., 1992). A eletroforese foi realizada no analisador MegaBACE TM 1000 (Amersham Biosciences, New Jersey, USA) ou no analisador ABI 3700 (Applied Biosystems) e para as análises foram utilizados, respectivamente, o *software* Genetic Profiler, v 2.2. e o *software* GeneMapper v 4.1. Essa etapa foi realizada como parte da Tese de Doutorado de José Santos (Santos, 2013) e pela Dra. Silvia Souza da Costa, Técnica de Nível Superior do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB - USP. Uma descrição detalhada dos procedimentos técnicos pode ser acessada na Dissertação de Mestrado de Luíza Dias Chaves (Chaves, 2022).

III.2.3. Investigação de microdeleções e microduplicações no cromossomo X por CMA

Para a investigação de alterações de número de cópias de segmentos do cromossomo X por array-CGH, foi utilizada a plataforma Cytosure™, Chromosome X HD microarray 2x105K ou 4x44K (Oxford Gene Technology, OGT, UK; Agilent Technologies Inc., USA). A investigação foi realizada por Santos (2013) e pela Dra. Silvia Souza da Costa, Técnica de Nível Superior do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP.

III.2.4. Sequenciamento do exoma

O sequenciamento do exoma já havia sido realizado antes do início do Projeto e os arquivos com as variantes estavam disponíveis para a análise. O sequenciamento havia sido realizado pela Oxford Gene Technology - OGT UK (OGT) ou pelo Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco - CEGH-CEL-IBUSP. Em 2022, as variantes foram reanotadas e analisadas novamente.

O sequenciamento massivo paralelo do exoma foi realizado em apenas um dos irmãos da irmandade cuja genitora apresentava desvio de inativação do cromossomo X $\geq 95:5$. Três

pacientes (irmandades 4, 5 e 6; Tabela 2) tiveram o sequenciamento realizado pela OGT, por meio do serviço de sequenciamento Genefficiency™. Esse serviço incorpora as plataformas Agilent SureSelect V4+UTR (captura e enriquecimento de éxons), Illumina HiSeq™2000 (sequenciamento com cobertura de 50x) e OGT-software (análise de imagens e base-calling). As planilhas fornecidas incluem informações sobre *read depth*, posição genômica, alteração em relação à sequência referência, ocorrência anterior (dbSNP132), gene, transcrito e proteína, alteração de aminoácidos e predição de patogenicidade (PolyPhen, SIFT e CONDEL). Para a visualização das sequências, foi utilizado o browser Integrative Genomics Viewer - Broad Institute (IGV). O *software* fornecido pela OGT permite filtrar variantes segundo critérios estabelecidos pelo usuário.

Os pacientes das irmandades 3 e 7 (Tabela 2) tiveram o sequenciamento realizado pelo Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células Tronco - CEGH-CEL-IBUSP. As bibliotecas foram preparadas por meio do kit Nester DNA Library Prep Kits (Illumina INC, San Diego, California). A captura dos fragmentos foi realizada utilizando o kit Sure Select QXT Target Enrichment (Agilent Technologies, Santa Clara, California). O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento Hiseq 2500 (Illumina INC, San Diego, California) e as sequências resultantes foram alinhadas por meio do *software* Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). O realinhamento das regiões de indel, chamada de variantes de recalibração de qualidade das bases, foram realizados por meio do software Genome Analysis Tool Kit (GATK) (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) para a produção de arquivos Variant Call Format (VCF). A anotação das variantes foi realizada pelo *software* Annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>).

III.2.5. Análise de dados de exomas

Após reanotação, as variantes foram analisadas inicialmente com auxílio do *software* VarSeq versão 2.2.5 (Golden Helix, Inc., Bozeman, Montana, EUA). O VarSeq é um programa utilizado para priorização de variantes com base em diferentes parâmetros ajustáveis permitindo a anotação e a avaliação de diversos bancos de dados simultaneamente. A etapa inicial de reanotação dos VCFs e estabelecimento de critérios para priorização de variantes foi feita pela Profa. Dra. Ana Krepischki (IB-USP). O objetivo dessa filtragem inicial foi selecionar variantes

codificadoras raras de alta qualidade, com potencial efeito deletério, localizadas em genes do cromossomo X ou de autossomos, excluindo falsos positivos e artefatos.

Os critérios de qualidade utilizados foram: (1) *Phred quality score* maior que 20 (Medida da qualidade da identificação de nucleotídeos gerada pelo sequenciamento automatizado de DNA); (2) *Read depth* maior que 10 (Número de vezes em que uma base específica naquela posição está representada no conjunto de sequências - *reads*); (3) Frequência da variante (VAF) maior que 0,25 (variante detectada em mais de 25% do total de leituras e (4) Exclusão de genes hipervariáveis.

A partir desse conjunto de variantes de alta qualidade, foi realizada a priorização de variantes codificadoras raras com potencial efeito deletério no gene/proteína, de acordo com os seguintes critérios: (1) Frequência menor ou igual a 1% nos seguintes bancos de dados públicos de frequência populacional de variantes: gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>), ABraOM (<http://abraom.ib.usp.br/>) e 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>); (2) Localização em região codificadora ou sítio consenso de processamento de *splicing*; (3) Efeito provável na proteína (variantes das classes *missense*, *nonsense* e *frameshift*).

Esse conjunto de variantes raras codificadoras foi primeiro avaliado quanto a genes conhecidos como causa de deficiência intelectual, localizados em todo o genoma. Essa primeira etapa de priorização de variantes foi realizada com base em uma lista, compilada pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Ana Krepischi, de genes conhecidos e candidatos a deficiência intelectual, a partir de revisão dos bancos de dados OMIM (<https://www.omim.org/>), SysID (<https://www.sysid.dbmr.unibe.ch/>) e DD2GP (<https://www.deciphergenomics.org/dd/ddgenes>).

Em seguida, as variantes codificadoras raras com potencial efeito deletério mapeadas no cromossomo X foram todas selecionadas para análise, independentemente de serem genes já previamente associados a doenças.

III.2.6. Priorização funcional e classificação de variantes

Após a filtragem descrita na seção anterior, as variantes selecionadas foram analisadas com base na expressão do gene no cérebro, função do gene, classificação em bancos de dados e na literatura. Utilizamos a classificação de variantes segundo os critérios do *American College*

of *Medical Genetics and Genomics* (ACMG) 2015 (Richards et al., 2015). As variantes são classificadas em benígna (B), provavelmente benígna (PB), variante de significado incerto (VUS, do inglês “Variant of Uncertain Significance”), provavelmente patogênica (PP) e patogênica (P).

As variantes classificadas pelo ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), Varsome (<https://varsome.com/>) e Franklin (<https://franklin.genoox.com/>) como VUS, PP, P ou conflitantes foram mantidas. Em seguida, foram selecionadas variantes em genes com expressão no cérebro. A expressão no cérebro foi avaliada, utilizando o Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>). Assim, variantes em genes que não apresentavam expressão no cérebro ou cuja classificação era PB ou B por Franklin, Varsome e ClinVar foram excluídas da análise.

Em uma segunda etapa, priorizamos aquelas variantes que apresentam perda de função (LoF) com valores de pLI > 0,9 ou as variantes *missense* com REVEL score >0,5. O pLI é um valor que indica genes sensíveis à dosagem. Já o REVEL indica variantes mais frequentemente definidas como patogênicas em bancos de predição do que frequentemente classificadas como benígnas. O REVEL é um método utilizado para prever a patogenicidade de variantes *missense* com base em uma combinação de pontuações de 13 ferramentas individuais: MutPred, FATHMM v2.3, VEST 3.0, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP e phastCons.

IV. Resultados e Discussão

Este estudo teve o objetivo de investigar variantes causais de DI no cromossomo X em uma coorte de cinco irmandades em que ocorriam pelo menos dois indivíduos do sexo masculino com DI, selecionados a partir do padrão de inativação do cromossomo X, com desvios maiores ou iguais a 95:5, em suas mães. Os pacientes tiveram testes negativos quanto a alterações cromossômicas detectáveis após bandamento G, síndrome do X frágil e microdeleções ou microduplicações genômicas detectáveis por *microarray*. Em seguida, foi realizado o sequenciamento massivo paralelo do exoma de um dos irmãos com DI de cada irmandade. Analisamos os dados do sequenciamento. Utilizando os critérios para filtragem e priorização descritos acima, foram identificadas variantes potencialmente causais em três dos cinco propósitos (Tabela 3).

IV.1. Análise das variantes e correlação genótipo-fenótipo

Como mencionado, as Irmandades 1 e 2 foram analisadas e alterações no cromossomo X identificadas anteriormente a este trabalho. As duas irmandades foram consideradas neste estudo para fins estatísticos.

IV.1.1. Irmandade 3

A irmandade é composta pelo Paciente 3 e um irmão e foram avaliados no Serviço de Aconselhamento Genético quando tinham 23 e 21 anos de idade, respectivamente; ambos tinham DI aparentemente moderada. Apresentaram convulsões controladas por medicação desde a infância. Tiveram atraso na aquisição da fala, necessitando de fonoterapia. A mãe apresenta desvio total de inativação do cromossomo X.

Uma variante autossômica potencialmente causal foi filtrada no gene *GRIN2A* (Tabela 3).

Tabela 3. Variantes priorizadas após análise do sequenciamento completo do exoma com potencial associação ao quadro clínico dos pacientes em três das cinco irmandades selecionadas pelos desvios extremos de inativação do cromossomo X (razão de inativação $\geq 95:5$) em suas mães. As variantes estão descritas de acordo com coordenadas em hg19, GRCh37.

Paciente	Padrão materno de inativação do X	Gene	Variante	Consequência molecular	Significado clínico	Padrão de herança	MIM	Número total de reads	Frequência Alélica da Variante (VAF)
3	100:0	<i>GRIN2A</i>	NC_000016.10: g.9934656A>C NM_000833.5:c.1499T>G (NP_000824.1:p.Val500Gly)	<i>Missense</i>	VUS	AD	245570	21	0,33
4	100:0	<i>RERE</i>	NC_000001.10: g.8419907G>A NM_012102.4:c.3535C>T (NP_036234.3:p.Arg1179*)	<i>Nonsense</i>	PP	AD	616975	25	0,48
7	100:0	<i>CDK16</i>	NC_000023.10: g.47085422T>C NM_006201.5:c.788T>C (NP_006192.1:p.Val263Ala)	<i>Missense</i>	VUS	XLR	-	31	0,97
		<i>CDK19</i>	NC_000006.10: g.110953347T>C NM_015076.5:c.532A>G (NP_055891.1:p.Arg178Gly)	<i>Missense</i>	PP/VUS	AD	618916	28	0,5
		<i>UPF3B</i>	NC_000023.10: g.118971734G>A NM_080632.3:c.1288C>T (NP_542199.1:p.Arg430*)	<i>Nonsense</i>	P	XLR	300676	10 ¹	1,00

Legenda: P: patogênica, PP: possivelmente patogênica, VUS: variante de significado incerto, XLR: herança ligada ao X recessiva, AD: herança autossômica dominante.

¹ Ver item IV.1.5 – Variante considerada apesar de *read depth* = 10

GRIN2A (Glutamate Ionotropic Receptor NMDA Type Subunit 2A)

O gene *GRIN2A*, mapeado no cromossomo 16 (16p13.2) codifica a proteína GRIN2A, uma subunidade do receptor de glutamato NMDA (N-methyl-D-aspartate), expresso no sistema nervoso e de alta importância para processos cognitivos como aprendizado e memória (Traynelis et al., 2010). A proteína é expressa no cérebro de forma ubíqua, com expressão mais elevada no córtex cerebral.

O gene *GRIN2A* foi associado com “Epilepsy, focal, with speech disorder and with or without impaired intellectual development” (MIM #245570), que tem herança autossômica dominante. O quadro clínico inclui principalmente epilepsia e distúrbios de fala, presentes em cerca de 80% dos casos, mas existem variabilidade clínica e penetrância incompleta (Strehlow et al., 2019; De Bernardi et al., 2022). Em média 60% dos pacientes apresentam DI, de grau leve a profundo. Cerca de 250 pacientes com variantes em *GRIN2A* foram descritos e as variantes detectadas incluem deleções, truncamentos, variantes em sítios de *splicing* e variantes *missense* (Strehlow et al., 2019). Strehlow et al. realizaram análise da correlação genótipo-fenótipo e concluíram que variantes *missense* parecem levar a quadros mais graves e que, apesar da expressividade variável, a mesma variante costuma levar a quadros similares; relatam três indivíduos assintomáticos.

A variante NM_000833.5: c.1499T>G p.(Val500Gly), detectada no Paciente 3, é uma variante *missense* no éxon 8 (Tabela 3). Foi classificada pelas ferramentas Franklin e Varsome como VUS; o valor REVEL é 0,58. De acordo com o estudo de Strehlow et al. (2019), existem variantes patogênicas ao longo de todo o gene, inclusive no éxon 8, mas não no último éxon, o éxon 14. Variantes patogênicas e possivelmente patogênicas estão concentradas nos éxons 3 a 13, enquanto variantes *nonsense* detectadas em indivíduos saudáveis no GnomAD estão localizadas no éxon 14.

IV.1.2. Irmandade 4

A irmandade é composta pelo Paciente 4 e dois irmãos, com DI moderada, sem malformações associadas. Foram encaminhados ao Serviço de Aconselhamento Genético, com 15, 19 e 2 anos de idade, respectivamente, com solicitação de exame para a síndrome do X

frágil. Apresentavam hiperatividade e déficit de atenção, estando todos matriculados na APAE-SP. A irmandade incluía ainda uma menina clinicamente normal. A mãe apresenta desvio total de inativação do cromossomo X.

Após análise de acordo com o descrito na metodologia, uma variante autossômica foi filtrada, no gene *RERE* (Tabela 3).

RERE (Arginine-Glutamic Acid Dipeptide Repeats)

O gene *RERE*, mapeado no cromossomo 1 (1p36.23), codifica um co-regulador de receptor nuclear, importante na regulação da sinalização do ácido retinóico (Vilhais-Neto et al., 2010). Foi associado com “Neurodevelopmental disorder with or without anomalies of the brain, eye, or heart” (MIM #616975), cuja herança é autossômica dominante. Os principais sinais desse transtorno são similares a quadros de microdeleções no cromossomo 1, em 1p36, incluindo DI, TEA, epilepsia, problemas visuais e auditivos, malformações cardíacas, entre outros (Fregeau et al., 2016). Em 19 pacientes descritos, todas as variantes eram *de novo* (Scott e Sherr, 2019).

A variante NM_012102.4c.3535C>T p.(Arg1179*), detectada no Paciente 4, é uma variante *nonsense*, no éxon 20 (Tabela 3) . Foi classificada pelas ferramentas Franklin e Varsome como provavelmente patogênica. O valor de pLI é 0,99.

Jordan et al. (2018) descreveram nove pacientes com variantes *de novo*. O Paciente 9 apresentava um quadro mais leve, que incluía DI e traços dimórficos, sem malformações cerebrais ou oculares. O paciente 2 também parecia apresentar um quadro mais leve, tendo sido, porém, avaliado aos oito meses de idade; assim, existia a possibilidade de manifestações clínicas posteriores. Considerando o quadro clínico descrito por Jordan et al. (2018) e que o transtorno apresenta expressividade variável (Kim et al., 2013; Fregeau et al., 2016; Jordan et al., 2018), a variante encontrada no Paciente 4 pode ser causadora de quadro mais leve, afetando principalmente o SNC.

IV.1.3. Irmandade 5

A irmandade inclui o Paciente 5 e um irmão também com DI e mais quatro irmãos e uma irmã clinicamente normais. Foram encaminhados ao Serviço de Aconselhamento Genético aos 20 e 17 anos de idade, respectivamente, com solicitação de teste para a síndrome do X frágil. Apresentaram atraso para andar e falar. Têm deficiência intelectual moderada; o Paciente 5 não consegue ler ou escrever e seu irmão lê com dificuldade e consegue escrever usando letras de forma. Apresentam face triangular, hipoplasia malar, lábio superior fino e inferior evertido. A mãe tem desvio extremo de inativação do cromossomo X (97:3).

Após análise de acordo com o descrito na metodologia, não foi identificada variante no cromossomo X ou autossômica potencialmente causal do quadro clínico.

IV.1.4. Irmandade 6

A irmandade 6 inclui o Paciente 6 e um irmão, ambos com DI moderada, sem malformações associadas, e uma irmã com dificuldade de aprendizado. Os dois irmãos foram encaminhados aos 14 e seis anos de idade, respectivamente, com solicitação de teste para a síndrome do X frágil. Ambos eram hiperativos e tinham déficit de atenção. O Paciente 6 apresentou convulsões afebris a partir dos 9 anos de idade, estando controladas por medicação. A mãe apresenta desvio total de inativação do cromossomo X.

Após análise de acordo com o descrito na metodologia, não foi identificada variante no cromossomo X ou autossômica potencialmente causal do quadro clínico.

IV.1.5. Irmandade 7

A irmandade é composta pelo Paciente 7 e um irmão, ambos com DI moderada, sem malformações associadas, e uma irmã clinicamente normal. Não conseguem ler ou escrever e apresentam comprometimento da fala, articulando mal as palavras e trocando letras. O Paciente 7 passou a apresentar crises convulsivas aos 10 anos e seu irmão aos 11 anos de idade, estando

controladas por medicação. Foram encaminhados ao Serviço de Aconselhamento Genético aos 18 e 14 anos de idade, respectivamente, com solicitação para investigação da causa da DI, já tendo sido afastadas a síndrome do X frágil e alterações cromossômicas após bandamento G. A mãe dos pacientes tem desvio total da inativação do cromossomo X.

Após análise de acordo com o descrito na metodologia, duas variantes foram filtradas: uma no cromossomo X, no gene *CDK16*, e uma autossômica, no gene *CDK19*. Uma variante patogênica, já descrita anteriormente, foi detectada no gene *UPF3B* no cromossomo X; considerando estritamente o critério de *read depth* > 10, essa variante não deveria ser considerada, tendo *read depth* =10. Entretanto, o fato de ser variante reconhecidamente patogênica e já descrita como causa de DI, nos levou a considerá-la como potencialmente causal, o que exige, porém, sua validação por sequenciamento de Sanger.

CDK16 (Cyclin Dependent Kinase 16)

O gene *CDK16*, mapeado no cromossomo X (Xp11.3), codifica uma quinase dependente de ciclina com papel em proliferação celular, transporte vesicular e crescimento neuronal (Mokalled et al., 2010; Shehata et al., 2012; Gillani et al., 2021). É expresso no cérebro de forma ubíqua e em músculo esquelético. A variante *missense* NM_006201.5:c.788T>C p.(Val263Ala), no éxon 8, está classificada como VUS pelas ferramentas Varsome e Franklin; o valor REVEL é 0,64 (Tabela 3).

Hu et al. (2016) encontraram uma variante *frameshift*, p.Trp326Valfs*5, no probando, em seu irmão e em dois primos, todos apresentando DI e diplegia espástica. Satterstrom et al. (2020) descreveram a variante *nonsense* c.46C > T, p.(Arg16*) em um paciente com transtorno do espectro autista. Leitão et al. (2022) descreveram uma variante *nonsense*, p.(Glu321*), em um paciente de 42 anos com DI e espasticidade. Também descreveram uma variante *missense*, p.(Gly347Cys), em um paciente com DI, transtorno do espectro autista e epilepsia e histórico familiar condizente com herança ligada ao X.

CDK19 (Cyclin Dependent Kinase 19)

O gene *CDK19*, mapeado no cromossomo 6 (6q21), codifica a proteína CDK19, uma quinase dependente de ciclina cuja função está associada à regulação de genes. A proteína CDK19 forma um complexo com a ciclina C, MED12L e MED13L. Esse complexo de quatro subunidades regula a atividade de um complexo maior, o complexo Mediador, que por sua vez regula a atividade da RNA polimerase II e a transcrição de vários genes (Calpena et al., 2019). Esse gene é parálogo ao gene *CDK8*, mas eles atuam em vias mutualmente excludentes, com a proteína CDK8 agindo de forma mais generalizada e a CDK19, de forma mais específica. A proteína é expressa no cérebro de forma ubíqua, com expressão mais elevada em comparação a outros tecidos (Galbraith et al., 2014).

O gene *CDK19* foi associado com “Developmental and epileptic encephalopathy 87” (MIM #618916), que tem herança autossômica dominante. Os principais sinais incluem atraso global do desenvolvimento, hipotonia e epilepsia com início entre 6 e 15 meses de idade. Indivíduos afetados têm desenvolvimento motor e cognitivo gravemente prejudicado, com fala restrita ou ausente e rastreamento visual deficiente. Características mais variáveis incluem dismorfismos faciais, frouxidão articular e achados inespecíficos de imagem cerebral (Chung et al., 2020; Sugawara et al., 2021; Yang et al., 2021; Zarate et al., 2021).

A variante NM_015076.5: c.532A>G p.(Arg178Gly) detectada no Paciente 7 é uma variante *missense*, no éxon 6 (Tabela 3). Foi classificada como VUS pelo banco de dados Franklin, e como possivelmente patogênica pelo Varsome; o valor REVEL é 0,77.

Chung et al. (2020) descreveram três pacientes com DI e epilepsia ou atraso do desenvolvimento e espasmos infantis. Dois deles apresentavam uma variante *missense* também no éxon 6, c.586A>G (p.T196A). Os autores citam que o *missense Z score* desse gene é 3,56, indicando intolerância a variantes *missense*. Realizaram experimento utilizando *Drosophila knockout* quanto ao parálogo *Cdk8*, que apresentavam um quadro similar ao de espasmos epilépticos e diminuição do tempo de vida. Observaram que a expressão da proteína CDK19 era capaz de suprimir os espasmos e restaurar o tempo de vida normal, o que não foi observado com a expressão da CDK19 possuindo as variantes.

Zarate et al. (2021) descreveram 11 pacientes, todos apresentando DI e distúrbio de fala, nove deles sendo não-verbais. Todas as variantes detectadas no gene *CDK19* eram *missense*. Os autores realizaram estudo funcional em peixe-zebra e concluíram que mecanismos de ganho

de função e perda de função do gene podem causar as alterações observadas no modelo animal e em humanos.

Além das variantes detectadas no gene *CDK19*, outras variantes patogênicas nas outras subunidades do complexo e seus genes parálogos foram associadas a síndromes com sinais e sintomas que se sobrepõem e que incluem DI (Calpena et al., 2019). Mutações no gene *CDK8*, parálogo do *CDK19*, foram associadas à uma forma sindrômica de DI (MIM #618748). Doze pacientes foram descritos e todas as variantes eram *missense* e as substituições estavam localizadas no sítio de ligação a ATP do domínio de quinase. Mutações em *MED13L* e em seu parálogo, *MED13*, foram associadas, respectivamente, a uma forma sindrômica de DI (MIM #616789) e a um distúrbio do neurodesenvolvimento que inclui DI (MIM #618009). Mutações no *MED12*, parálogo do *MED12L*, causam pelo menos três síndromes diferentes: síndrome de Opitz-Kaveggia (MIM #305450), síndrome de Lujan-Fryns (MIM #309520) e síndrome de Ohdo (MIM #300895), todas de herança recessiva ligada ao X. Recentemente, também foi associado à síndrome de Hardikar (MIM #301068), uma síndrome de herança dominante ligada ao X apenas descrita em mulheres, que inclui várias anomalias, mas sem distúrbio de neurodesenvolvimento (Li et al., 2021), evidenciando a variabilidade clínica associada às diferentes variantes neste gene.

Tendo o gene expressão acentuada no cérebro e função importante no neurodesenvolvimento, a variante é candidata para explicar o quadro de DI no Paciente 7 e no irmão. Entretanto, os irmãos apresentam, em comum com os pacientes descritos, apenas DI, comprometimento da fala e epilepsia, porém de início mais tardio. É possível que a variante nessa irmandade seja patogênica e que os irmãos apresentem um quadro leve de uma doença com alta variabilidade de expressão, em especial quando se considera que não há outros pacientes descritos com a mesma variante.

UPF3B (UPF3B Regulator of Nonsense Mediated mRNA Decay)

O gene *UPF3B*, mapeado no cromossomo X (Xq24), codifica a proteína UPF3B, que está envolvida no processo de decaimento do mRNA mediado por mutações *nonsense* (NMD, do inglês “Nonsense-Mediated mRNA Decay”) (Kunz et al., 2006; Domingo et al., 2020). Esse mecanismo modula o fenótipo de mutações herdadas pela degradação de transcritos com códons de terminação prematura; esses transcritos podem ser originados de erros na transcrição ou no

splicing, ou de genes mutados (Mendell et al., 2004). Alterações nesse mecanismo foram associadas a distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo DI e TEA (Jaffrey e Wilkinson, 2019).

O gene *UPF3B* foi associado com “Intellectual developmental disorder, X-linked syndromic 14” (MIM #300676), que tem herança recessiva ligada ao X. O quadro clínico é variável, mas o principal sinal é a DI, que pode ser síndrômica ou não-síndrômica (por exemplo, Tarpey et al., 2007; Laumonnier et al., 2010; Xu et al., 2013). Há grande variabilidade de expressão, inclusive entre pacientes que possuem a mesma variante (Tejada et al., 2019).

A variante NM_080632.3: c.1288C>T p.(Arg430*) presente no Paciente 7 é uma variante *nonsense*, no éxon 10 (Tabela 3). Foi classificada pelas ferramentas Franklin e Varsome como patogênica, e pelo ClinVar como provavelmente patogênica/patogênica; o valor de pLI é 0,98. A mesma variante foi descrita em dois outros estudos, realizados por Tarpey et al. (2007) e por Xu et al. (2013).

Tarpey et al. (2007) descreveram quatro famílias não relacionadas, com mutações diversas nesse gene, três delas com DI síndrômica. Na Família 3, os afetados possuíam a mesma variante presente em nosso Paciente 7. Os quatro afetados apresentavam palato alto, ponte nasal alta, mandíbula proeminente, voz hipernasalada e DI – um caso de DI leve, outro de DI moderada e dois de DI grave, três deles apresentavam TEA. As variantes segregavam com o quadro clínico, além de desvios extremos da inativação do cromossomo X nas genitoras heterozigóticas, o que não foi observado nas genitoras não heterozigóticas da família. As características clínicas dos afetados tinham levado ao diagnóstico de síndrome de Lujan-Fryns (MIM #309520). Em uma das outras duas famílias esse fora também o diagnóstico clínico; na outra, o diagnóstico clínico era de síndrome de Opitz-Kaveggia (MIM #305450). Na quarta família, a deficiência mental era não síndrômica.

Xu et al. (2013), descreveram uma família chinesa, em que ocorriam três indivíduos do sexo masculino, dois irmãos e um primo materno, com DI leve não síndrômica, que herdaram a variante p.(Arg430*). As duas genitoras assintomáticas apresentavam desvio de inativação do X > 80:20.

Laumonnier et al. (2010) com o objetivo de elucidar a contribuição de variantes no gene *UPF3B* para a DI, investigaram sua sequência codificadora em afetados de 372 famílias coletadas pelo EuroMRX Consortium. Detectaram três variantes patogênicas em associação com DI não síndrômica, DI associada a autismo e DI síndrômica não específica. Entre 25

pacientes com diagnóstico clínico de síndrome de Lujan-Fryns, detectaram uma variante patogênica; os autores, entretanto, questionam o diagnóstico clínico desse paciente.

Ibarluzea et al. (2020) descreveram um paciente e seu irmão, cuja genitora apresentava desvio de inativação 80:20. Ambos tinham DI leve, dolicocefalia e alteração de implantação dentária. A variante detectada no gene *UPF3B*, NM_080632:c.371-1G>C, afeta um sítio de *splicing* e foi classificada como patogênica.

Domingo et al. (2020) identificaram uma mutação sinônima que afeta um sítio de *splicing* envolvendo o éxon 6 em um paciente com DI, ausência de fala e TEA. Os autores realizaram estudo funcional utilizando linhagem celular linfoblastoide e sugeriram um mecanismo capaz de associar mutações no gene *UPF3B* a distúrbios do neurodesenvolvimento. A proteína *UPF3B* truncada não foi detectada nas linhagens, indicando que a variante causa perda de função. Houve também aumento de expressão do seu parálogo, *UPF3A*, indicando uma possível tentativa de resgate do processo de NMD. Além disso, foi observada desregulação de vários genes associados ao neurodesenvolvimento, incluindo *FOXP1*, importante no desenvolvimento da fala.

Como a variante no gene *UPF3B* detectada no Paciente 7 teve *read depth* = 10, mesmo muito próxima ao critério de qualidade estabelecido (*read depth* > 10), deve ser validada por sequenciamento de Sanger. Validada a variante, deve ser realizado o estudo de sua segregação na família.

IV.2. Desvios extremos da inativação do cromossomo X materno e variantes no cromossomo X causais da deficiência intelectual de seus filhos

Considerando-se as duas irmandades que tiveram as variantes causais de DI diagnosticadas anteriormente, pode-se concluir neste momento que, utilizando-se a casuística de irmandades com mais de um afetado, selecionada com base no padrão extremo de inativação do cromossomo X materno, a taxa diagnóstica de DI de herança ligada ao X é de 28,6% (2/7). Considerando-se também a irmandade 7, caso uma das duas variantes filtradas (as variantes em *CDK16* ou *UPF3B*) no cromossomo X seja confirmada como causal, esta taxa aumentará para 42,8% (3/7).

Os estudos conduzidos por Giorgio et al. (2016), Ibarluzea et al. (2020) e Bueno (2022) também buscaram alterações em genes do cromossomo X em pacientes com DI selecionados com base no desvio da inativação do cromossomo X em suas genitoras.

Giorgio et al. (2016) avaliaram 18 meninos com DI isolada ou síndrômica - 15 probandos que tinham um ou mais irmãos afetados ou de famílias com padrão de herança indicativo de DI recessiva ligada ao X e três meninos com suspeita clínica de DI ligada ao X. Detectaram sete genitoras com desvio de inativação de pelo menos 80:20. O sequenciamento do exoma foi realizado nos sete probandos e variantes que explicavam a DI foram detectadas em quatro (57%), mas, em dois deles, não explicavam os sinais clínicos associados à DI e não foram detectadas variantes em outros genes que definitivamente explicassem os sinais associados. Assim, o quadro clínico pôde ter a causa genética determinada em dois pacientes (2/7; 28,6%). As quatro variantes estavam presentes nas genitoras que tinham desvio total de inativação do X (duas) ou desvios de 87% e 97%.

No estudo de Ibarluzea et al. (2020), foram avaliados 47 probandos com história familiar sugestiva de DI com herança recessiva ligada ao X e 14 meninos/adolescentes, de seis a 14 anos de idade, em cujas irmandades ocorria pelo menos um irmão também com DI, selecionados com base no padrão de inativação das genitoras, de pelo menos 75:25; 12 das genitoras tinham desvios da inativação do X >80:20. Os pacientes tinham DI não síndrômica. Foi realizado o sequenciamento de nova geração de 82 genes do cromossomo X que já tinham sido associados à DI ligada ao X, não síndrômica ou com ampla variação fenotípica em homens, e genes já descritos em associação com DI, mas essa associação ainda não considerada estabelecida. Foram detectadas variantes candidatas em 16 pacientes: 11/47 (23%), no primeiro grupo, e 5/14 (35,7%), no segundo grupo, em que a seleção foi semelhante à do presente estudo. Assim, entre os 61 propósitos, variantes candidatas foram identificadas em 26% (16/61). Como salientam os autores, considerando-se as 21 genitoras com desvios de inativação maior que 80:20 (12 no grupo de irmãos afetados e nove mães nas famílias com indicação de padrão de herança ligada ao X), variantes candidatas foram detectadas em 33,3% dos propósitos (7/21). Todas as variantes estavam presentes nas mães dos propósitos, mas o estudo de segregação pôde ser realizado em apenas sete famílias.

No estudo de Bueno (2022), foi realizado o sequenciamento completo do exoma em 17 pacientes do sexo masculino, casos isolados de DI em suas famílias, selecionados pelos desvios extremos da inativação do cromossomo X (razão de inativação $\geq 95:5$) em suas mães. Variantes

candidatas foram identificadas em sete pacientes; em quatro deles (23,5%), as variantes foram confirmadas pelo sequenciamento de Sanger, estando também presentes em suas mães, e a relação causal com o fenótipo pôde ser estabelecida. Além disso, duas variantes no cromossomo X e uma variante autossômica não puderam ser definitivamente associadas ao fenótipo, sendo necessários estudo da segregação nas famílias e dados clínicos adicionais. Portanto, a taxa diagnóstica para DI com herança ligada ao cromossomo X foi de 23,5% (4/17), podendo chegar a 35,3% caso as outras duas variantes no cromossomo X sejam confirmadas como causais.

Assim, comparando o presente estudo e os três estudos mencionados acima, as frequências de variantes definitivamente causais ou de variantes candidatas são similares e variações podem ser explicadas, em parte, pelo número pequeno de indivíduos estudados. Deve ser notado que, apesar de o desvio de inativação materno utilizado para a seleção dos pacientes ter variado entre os estudos, a quase totalidade das variantes detectadas no cromossomo X estavam presentes em pacientes com desvios > 90%.

Além das variantes no cromossomo X que se objetivava estudar nesta pesquisa, variantes autossômicas candidatas foram encontradas nos genes *GRIN2A*, *RERE* e *CDK19*. Essas variantes autossômicas não explicam o desvio total de inativação do cromossomo X materno, não havendo dados na literatura que permitam especular que esses genes autossômicos considerados candidatos tenham efeito sobre a inativação do cromossomo X. Uma possibilidade é que apresentem desvios de ocorrência casual, que não estejam de fato relacionados com a variante que causa DI nos filhos. Entre as 58 genitoras das irmandades de indivíduos com DI que tiveram o padrão de inativação do X determinado, oito apresentaram desvios extremos > 95:5 - 8/58 = 13,8% (IC 95% de 6,2% a 25,4%). De acordo com Amos-Landgraf et al. (2006), a frequência de mulheres adultas da população geral com tais desvios de inativação do X é de 7/415 = 1,7% (IC 95% de 0,7% a 3,5%). Espera-se, assim, que entre as 58 genitoras, em média, uma apresente esses desvios ($58 \times 1,7\% = 0,98 \sim 1$), com um intervalo de confiança a 95% estimado em $58 \times 0,7\% = 0,4 \sim 0$ a $58 \times 3,5\% = 2,0 \sim 2$. Pode-se, portanto, afirmar, com probabilidade da ordem de pelo menos 95%, que, entre as oito genitoras com desvios extremos de inativação, zero a duas apresentem tais desvios não relacionados à DI de seus filhos. Deve-se considerar a possibilidade de que sejam outras as variantes causais, que podem estar no cromossomo X, diante das limitações do sequenciamento do exoma.

Por fim, estudos mostraram que a reanálise das variantes após alguns anos pode levar a reclassificação, diante de atualização de bancos de dados, identificação de novos genes e

doenças, novas características clínicas e informações moleculares (Maia et al., 2021). Essa reclassificação envolve principalmente VUS, mas também foi observada para variantes classificadas inicialmente como patogênicas e possivelmente patogênicas. Assim, é possível que a classificação de uma variante mude ao longo do tempo e por isso é importante que a classificação mais atualizada da variante seja confirmada, tanto para se chegar a um diagnóstico para o paciente, quanto para seu acompanhamento e de seus familiares (Wright et al., 2018; Bennett et al., 2019; Slavin et al., 2019).

IV.3. Limitações do estudo

O presente estudo apresenta limitações. A principal limitação é termos analisado somente o propósito. Assim, não podemos concluir que as variantes detectadas são de fato responsáveis pelo quadro clínico nas famílias. O próximo passo na investigação é a validação das variantes por meio do sequenciamento de Sanger, considerado padrão ouro. A técnica pode ser usada primeiro para confirmar a presença da variante no probando e, em seguida, para análise dos genitores e dos irmãos. Quanto à validação das variantes, estudos têm reavaliado a necessidade de validação de variantes de boa qualidade pelo sequenciamento de Sanger. No estudo de Artech-López et al. (2021), foi realizado NGS e validação de 1.109 variantes, permitindo concluir que a validação não é necessária para variantes de boa qualidade e que cada laboratório pode estabelecer valores de corte para realização da validação pelo sequenciamento de Sanger. Em nosso estudo, a exceção seria a variante no gene *UPF3B*, que necessita de validação devido à quantidade de *reads* inferior ao corte estabelecido, como critério de qualidade. Apesar de a seleção dos pacientes deste estudo ter sido feita a partir do desvio extremo de inativação do X materno, as variantes nos genes *GRIN2A*, *RERE* e *CDK19* são autossômicas, então a possível herança paterna também deve ser investigada. A confirmação de variantes causais e a avaliação da segregação familiar são fundamentais para o aconselhamento genético.

No caso das variantes autossômicas, se a variante estiver também presente nos irmãos afetados, mas não nos genitores e irmãs clinicamente normais, reforçará a hipótese de que é a causadora da DI na irmandade. A repetição na irmandade poderia ser decorrente de mosaicismo gonadal em um dos genitores. Além de mosaicismo gonadal, outra explicação para o fato de os genitores serem assintomáticos é a possibilidade de penetrância incompleta, caso a variante seja

identificada em um deles. Como mencionado anteriormente, há relatos de pessoas assintomáticas com variantes patogênicas no gene *GRIN2A* (Strehlow et al., 2019).

É importante ressaltar que, no caso de variantes autossômicas, mesmo que sejam classificadas como patogênicas e capazes de explicar a DI, tais variantes não explicariam o desvio total de inativação do cromossomo X materno. Não há dados na literatura que permitam especular que os genes autossômicos considerados candidatos nos pacientes analisados tenham efeito sobre a inativação do cromossomo X.

Outra limitação é que os pacientes não foram reavaliados recentemente e, por isso, podem ter desenvolvido outros sinais e sintomas que não foram descritos neste estudo, prejudicando a correlação genótipo-fenótipo. É possível mesmo que outros membros da família tenham sido identificados com DI.

Deve-se também considerar que a busca de variantes foi realizada por meio da análise do sequenciamento de regiões codificadoras de proteínas. Entretanto, as variantes causais de DI podem estar localizadas em elementos reguladores, em regiões não codificadoras. Como salientam Rojano et al. (2019), estudos de associação genômica (GWAS; *Genome-Wide Association Studies*) mostram que variantes associadas a doenças se localizam frequentemente em regiões não codificadoras; para detectar variantes nessas regiões, o sequenciamento do genoma total deve ser combinado com técnicas computacionais sofisticadas, que os autores apresentam. Além disso, é possível que existam variantes patogênicas em regiões codificadoras do X, mas que elas não tenham sido detectadas por limitações técnicas do sequenciamento. Por exemplo, no estudo de Belkadi et al. (2015), cerca de 3% das SNVs em regiões codificadoras não foram detectadas no sequenciamento do exoma (WES), mas foram detectadas por meio do sequenciamento completo do genoma (WGS).

V. Conclusões

O objetivo deste estudo foi identificar variantes causais de DI em genes do cromossomo X, em irmandades selecionadas pelos desvios extremos da inativação do cromossomo X (razão de inativação $\geq 95:5$) em suas mães, indicativo de serem elas portadoras de variantes em genes do cromossomo X que causam DILX em seus filhos. Por meio do sequenciamento completo do exoma, foram filtradas e priorizadas variantes potencialmente causais de DI em três dos propósitos das cinco irmandades estudadas, nos genes *GRIN2A* e *RERE* e nos genes *CDK16* e *CDK19*, estes em um mesmo paciente. Entretanto, apenas o gene *CDK16* está localizado no cromossomo X. Outra variante possivelmente causal no cromossomo X, no gene *UPF3B*, presente no paciente com duas variantes candidatas, não atingiu o critério de qualidade deste estudo de *read depth* > 10 e requer validação por sequenciamento de Sanger. Na continuação do estudo, as variantes identificadas deverão ser validadas e a análise de segregação, realizada nas famílias.

Considerando-se que duas irmandades tiveram as variantes causais de DI diagnosticadas anteriormente, pode-se concluir neste momento que, no grupo de irmandades com mais de um afetado, selecionadas com base no padrão extremo de inativação do cromossomo X materno, a taxa diagnóstica de DI de herança ligada ao X é de 28,6% (2/7). Caso uma das variantes candidatas em *CDK16* ou *UPF3B*, genes localizados no cromossomo X, seja confirmada como causal, a taxa diagnóstica aumentará para 42,8% (3/7). Essas são taxas similares às obtidas em outros estudos que buscaram variantes causais de DI no cromossomo X em pacientes cuja seleção se baseou nos desvios de inativação em suas genitoras.

Além das variantes no cromossomo X que se objetivava estudar nesta pesquisa, variantes autossômicas candidatas foram encontradas nos genes *GRIN2A*, *RERE* e *CDK19*. Essas variantes autossômicas não explicam o desvio total de inativação do cromossomo X materno, não havendo dados na literatura que permitam especular que esses genes autossômicos considerados candidatos tenham efeito sobre a inativação do cromossomo X. Uma possibilidade é que sejam desvios de ocorrência casual e não estejam de fato relacionados com a variante causadora da DI nos filhos. Deve-se considerar a possibilidade de que sejam outras as variantes causais, que podem estar no cromossomo X, diante das limitações do sequenciamento do exoma.

Apesar das limitações deste estudo discutidas acima, podemos concluir que o desvio extremo de inativação do cromossomo X materno é indicador da presença de variantes patogênicas que causam deficiência intelectual com herança ligada ao X em seus filhos e deve ser considerado na investigação da DI.

VI. Resumo

A deficiência intelectual (DI) é definida por limitações da função intelectual e do comportamento adaptativo presente antes dos 22 anos de idade e afeta aproximadamente 2-3% dos indivíduos da população mundial. Há uma frequência significativamente maior de homens afetados por DI moderada a grave do que de mulheres, parte podendo ser explicada pela DI com herança ligada ao X. Desvios extremos de inativação são raros na população feminina adulta, sendo mais frequentes em mulheres portadoras de alterações estruturais do cromossomo X ou de variantes patogênicas em genes localizados no X.

O objetivo deste estudo foi identificar variantes causais de DI em genes do cromossomo X, em irmandades selecionadas pelo desvio extremo da inativação do cromossomo X (razão de inativação $\geq 95:5$) em suas mães, indicativo de serem elas portadoras de variantes em genes do cromossomo X que causam DI em seus filhos. A investigação da inativação do cromossomo X materno realizada anteriormente em 58 irmandades revelou que as genitoras de oito irmandades apresentavam desvios extremos da inativação do cromossomo X, número significativamente maior do que o observado em mulheres adultas da população geral. Em sete propósitos foi realizado sequenciamento do exoma. Em duas irmandades, a variante causal foi identificada anteriormente. Neste estudo, foram analisados os dados de sequenciamento do exoma dos outros cinco probandos, a fim de se identificarem variantes causais de DI.

Foram filtradas variantes potencialmente causais de DI nos genes *GRIN2A* e *RERE* em dois pacientes e nos genes *CDK16* e *CDK19*, num terceiro paciente. Apenas o gene *CDK16* está localizado no cromossomo X. Outra variante possivelmente causal no cromossomo X, no gene *UPF3B*, presente no paciente com duas variantes candidatas, não atingiu o critério de qualidade deste estudo de *read depth* > 10 e requer validação por sequenciamento de Sanger.

O gene *GRIN2A* foi associado a quadro clínico com herança autossômica dominante, incluindo principalmente epilepsia, distúrbios de fala e DI, sinais presentes no Paciente 3 deste estudo. A variante *missense* NM_000833.5: c.1499T>G p.(Val500Gly) nele detectada foi classificada pelas ferramentas Franklin e Varsome como VUS e tem valor REVEL de 0,58. Essa variante não foi descrita em outros estudos, mas variantes patogênicas foram detectadas ao longo de todo o gene, inclusive no éxon 8.

O gene *RERE* foi associado a quadro clínico com herança autossômica dominante similar aos de microdeleções no cromossomo 1, em 1p36, onde o gene se localiza, incluindo DI, transtorno do espectro autista (TEA), epilepsia, problemas visuais e auditivos e malformações cardíacas. O Paciente 4 deste estudo apresenta apenas DI e TEA. A variante *nonsense* NM_012102.4: c.3535C>T p.(Arg1179*) no éxon 20 foi classificada pelas ferramentas Franklin e Varsome como provavelmente patogênica. O valor de pLI é 0,99. Essa variante não foi descrita em outros estudos, mas, considerando a expressividade variável associada a variantes desse gene, é possível que seja a causa de quadro mais leve, afetando principalmente o sistema nervoso central, como é o do Paciente 4.

Três variantes candidatas foram detectadas no Paciente 7, nos genes *CDK16*, *CDK19* e *UPF3B*. O paciente apresenta DI, comprometimento da fala e epilepsia. O gene *CDK16* codifica uma quinase dependente de ciclina com papel em proliferação celular, transporte vesicular e crescimento neuronal. A variante *missense* NM_006201.5: c.788T>C p.(Val263Ala) no éxon 8, foi classificada como VUS pelas ferramentas Varsome e Franklin e o valor REVEL é 0,64. Essa variante não foi descrita em outros estudos, mas variantes *missense*, *nonsense* e *frameshift* nesse gene foram associadas a DI, TEA e espasticidade. O gene *CDK19* foi associado a quadro clínico com herança autossômica dominante cujos principais sinais incluem atraso global do desenvolvimento, hipotonia, epilepsia e comprometimento da fala. No Paciente 7, a variante *missense* NM_015076.5: c.532A>G p.(Arg178Gly), localizada no éxon 6, foi classificada como VUS pela ferramenta Franklin, e como possivelmente patogênica pela Varsome. O valor REVEL é 0,77. Essa variante não foi descrita em outros pacientes, mas variantes, inclusive no éxon 6, foram relatadas em pacientes com quadros clínicos similares. É possível que a variante na irmandade seja causal e que os irmãos apresentem um quadro leve de uma doença com alta variabilidade de expressão, tendo epilepsia de início mais tardio, em comparação com os pacientes descritos. Por fim, uma variante no gene *UPF3B* não atingiu o critério de qualidade deste estudo de *read depth* > 10. Entretanto, a descrição dessa variante como causa de DI em outros dois estudos levou a considerá-la candidata, devendo ser validada por sequenciamento de Sanger. O gene *UPF3B* foi associado a DI síndrômica e não síndrômica com herança recessiva ligada ao X e grande variabilidade de expressão. A variante *nonsense* NM_080632.3: c.1288C>T p.(Arg430*), localizada no éxon 10, foi classificada pelas ferramentas Franklin e Varsome como patogênica e no banco de dados ClinVar, como provavelmente patogênica/patogênica. O valor de pLI é 0,98.

Com relação às variantes autossômicas candidatas detectadas nos genes *GRIN2A*, *RERE* e *CDK19*, não há na literatura indicação de que esses genes possam ter efeito no processo de inativação do cromossomo X.

Palavras-chave: Deficiência intelectual ligada ao X; Inativação do cromossomo X; Análise do exoma; Sequenciamento de nova geração.

VII. Abstract

Intellectual disability (ID) is characterized by limitations in intellectual functioning and adaptive behavior present before the age of 22 years old, and affects approximately 2-3% of individuals in the world population. There is a significantly higher frequency of men than women affected by moderate to severe ID, which can be partly explained by X-linked ID. Extreme X-inactivation skewing is rare in the female adult population, being more frequent in women carrying structural abnormalities of the X chromosome or pathogenic variants in X chromosome genes.

The aim of this study was to identify causal variants of ID in X chromosome genes, in sibships with two or more affected brothers selected by the extreme skewing of X chromosome inactivation (inactivation ratio $\geq 95:5$) in their mothers, indicative of their being carriers of variants in X chromosome genes that cause ID in their children. The investigation of maternal X chromosome inactivation previously performed in 58 sibships revealed that the mothers of eight sibships had extreme X-inactivation skewing, a number significantly higher than that observed in adult women from the general population. Exome sequencing was performed in seven probands. In two sibships, the causal variant was previously identified. In this study, exome sequencing data from the other five probands were analyzed to identify causal variants of ID.

Potentially causal variants of ID were filtered in the genes *GRIN2A* and *RERE* in two patients and in the *CDK16* and *CDK19* genes, in a third patient. Only the *CDK16* gene maps to the X chromosome. Another possibly causal variant on the X chromosome, in the *UPF3B* gene, present in the patient with two other candidate variants, did not meet the quality criterion of read depth > 10 of the present study, and requires validation by Sanger sequencing.

The *GRIN2A* gene has been associated with a clinical condition with autosomal dominant inheritance, the most common signs being epilepsy, speech disorders and ID, also present in Patient 3 of this study. The detected *missense* variant NM_000833.5: c.1499T>G p.(Val500Gly) was classified by the Franklin and Varsome tools as VUS and has a REVEL value of 0.58. This variant has not been described before, but pathogenic variants have been detected throughout the entire gene, including in exon 8.

The *RERE* gene has been associated with a clinical condition with autosomal dominant inheritance, which is similar to those caused by chromosome 1 microdeletions at 1p36, where the gene is located, including ID, autism spectrum disorder (ASD), epilepsy, visual and auditory problems and heart malformations. Patient 4 of this study presents only ID and ASD. The *nonsense* variant NM_012102.4: c.3535C>T p.(Arg1179*) in exon 20 was classified by the Franklin and Varsome tools as likely pathogenic. The pLI value is 0.99. This variant has not been described in other studies, but, considering the variable expressivity associated with variants in this gene, it is possible that it is the cause of the milder condition, mainly affecting the central nervous system, in Patient 4.

Three candidate variants were detected in Patient 7, in the *CDK16*, *CDK19* and *UPF3B* genes. The patient has ID, speech impairment, and epilepsy. The *CDK16* gene encodes a cyclin-dependent kinase with a role in cell proliferation, vesicular transport and neuronal growth. The *missense* variant NM_006201.5: c.788T>C p.(Val263Ala), located in exon 8, was classified as VUS by the Varsome and Franklin tools, and the REVEL value is 0.64. This variant has not been described before, but other *missense*, *nonsense* and *frameshift* variants in this gene have been associated with ID, ASD and spasticity. The *CDK19* gene has been associated with a clinical condition with autosomal dominant inheritance, the main signs including global developmental delay, hypotonia, epilepsy and speech impairment. In Patient 7, the *missense* variant NM_015076.5: c.532A>G p.(Arg178Gly), located in exon 6, is classified as VUS by the Franklin tool, and as likely pathogenic by Varsome. The REVEL value is 0.77. This is a novel variant, but other variants have been described, including in exon 6, in patients with similar clinical presentations. It is possible that the variant in Patient 7 is causative, and that the brothers have a mild presentation of a disease with high expression variability, presenting later onset epilepsy, when compared to the patients hereto described. Finally, a variant in the *UPF3B* gene did not meet the quality criterion of read depth > 10, but the description of this variant as a cause of ID in two other studies led to its being considered a candidate, which must be validated by Sanger sequencing. The *UPF3B* gene has been associated with syndromic and non-syndromic X-linked recessive ID with highly variable expression. The *nonsense* variant NM_080632.3: c.1288C>T p.(Arg430*), in exon 10, was classified by the Franklin and Varsome tools as pathogenic, and by ClinVar as likely pathogenic/pathogenic. The pLI value is 0.98.

Regarding the candidate autosomal variants detected in the *GRIN2A*, *RERE* and *CDK19* genes, there is no indication in the literature that these genes have an effect on the X chromosome inactivation process.

Keywords: X-linked intellectual disability; X chromosome inactivation; Exome analysis; Next generation sequencing.

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.
- American Psychiatric Association - Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV (American Psychiatric Association), Washington, D.C., 1994.
- American Psychiatric Association, DSM-5 Task Force - Diagnostic and statistical manual of mental disorders: DSM-5™ (5th ed.). American Psychiatric Publishing, Inc, 2013.
- 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.
- Antley RM, Hartlage LC - Psychological responses to genetic counseling for Down's syndrome. **Clin Genet** **9**: 257-265, 1976.
- Arshad S, Arshad J, Khan MM, Parkinson S - Analysis of security and privacy challenges for DNA-genomics applications and databases. **J Biomed Inform** **119**: 103815, 2021.
- Arteche-López A, Ávila-Fernández A, Romero R, Riveiro-Álvarez R, López-Martínez MA, Giménez-Pardo A, Vélez-Monsalve C, Gallego-Merlo J, García-Vara I, Almoguera B, Bustamante-Aragonés A, Blanco-Kelly F, Tahsin-Swafiri S, Rodríguez-Pinilla E, Minguez P, Lorda I, Trujillo-Tiebas MJ, Ayuso C - Sanger sequencing is no longer always necessary based on a single-center validation of 1109 NGS variants in 825 clinical exomes. **Sci Rep** **1111**: 5697, 2021.
- Balaton BP, Dixon-McDougall T, Peeters SB, Brown CJ - The eXceptional nature of the X chromosome. **Hum Mol Genet** **27**: R242-R249, 2018.
- Baron-Cohen S, Lombardo MV, Auyeung B, Ashwin E, Chakrabarti B, Knickmeyer R - Why are autism spectrum conditions more prevalent in males? **PLoS Biol** **9**: e1001081, 2011.
- Belkadi A, Bolze A, Itan Y, Cobat A, Vincent QB, Antipenko A, Shang L, Boisson B, Casanova JL, Abel L - Whole-genome sequencing is more powerful than whole-exome sequencing for detecting exome variants. **Proc Natl Acad Sci U S A** **112**: 5473-8, 2015.

- Bennett JS, Bernhardt M, McBride KL, Reshmi SC, Zmuda E, Kertesz NJ, Garg V, Fitzgerald-Butt S, Kamp AN - Reclassification of Variants of Uncertain Significance in Children with Inherited Arrhythmia Syndromes is Predicted by Clinical Factors. **Pediatr Cardiol** **40**: 1679-1687, 2019.
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeveva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG - Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. **J Med Genet** **45**: 309-313, 2008.
- Blaschke RJ, Rappold G - The pseudoautosomal regions, *SHOX* and disease. **Curr Opin Genet Dev** **16**: 233-239, 2006.
- Bueno ACGM - Estudo da deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X: investigação de variantes causais em filhos de mulheres com desvios extremos da inativação do X. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.
- Calpena E, Hervieu A, Kaserer T, Swagemakers SMA, Goos JAC, Popoola O, Ortiz-Ruiz MJ, Barbaro-Dieber T, Bownass L, Brilstra EH, Brimble E, Foulds N, Grebe TA, Harder AVE, Lees MM, Monaghan KG, Newbury-Ecob RA, Ong KR, Osio D, Reynoso Santos FJ, Ruzhnikov MRZ, Telegrafi A, van Binsbergen E, van Dooren MF; Deciphering Developmental Disorders Study; van der Spek PJ, Blagg J, Twigg SRF, Mathijssen IMJ, Clarke PA, Wilkie AOM - *De novo* missense substitutions in the gene encoding *CDK8*, a regulator of the mediator complex, cause a syndromic developmental disorder. **Am J Hum Genet** **104**: 709-720, 2019.
- Carmichael SL, Ma C, Tinker S, Rasmussen SA, Shaw GM; National Birth Defects Prevention Study - Maternal stressors and social support as risks for delivering babies with structural birth defects. **Paediatr Perinat Epidemiol** **28**: 338-344, 2014.
- Carrel L, Willard HF - X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature** **434**: 400-404, 2005.
- Carvalho CM, Zhang F, Liu P, Patel A, Sahoo T, Bacino CA, Shaw C, Peacock S, Pursley A, Tavyev YJ, Ramocki MB, Nawara M, Obersztyn E, Vianna-Morgante AM, Stankiewicz P, Zoghbi HY, Cheung SW, Lupski JR - Complex rearrangements in patients with duplications of *MECP2* can occur by fork stalling and template switching. **Hum Mol Genet** **18**: 2188-203, 2009.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) - Economic costs associated with mental retardation, cerebral palsy, hearing loss, and vision impairment—United States. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep** **53**: 57–59, 2004.
- Chaves LD - Investigação de desvios extremos da inativação do cromossomo X em mulheres com deficiência intelectual idiopática como indicativo de variantes causais. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.
- Chaves LD, Carvalho LML, Tolezano GC, Pires SF, Costa SS, de Scliar MO, Giuliani LR, Bertola DR, Santos-Rebouças CB, Seo GH, Otto PA, Rosenberg C, Vianna-Morgante AM, Krepischi ACV - Skewed X-chromosome Inactivation in Women with Idiopathic Intellectual Disability is Indicative of Pathogenic Variants. **Mol Neurobiol**, 2023.
- Chiurazzi P, Oostra BA - Genetics of mental retardation. **Curr Opin Pediatr** **12**: 529-35, 2000.
- Chiurazzi P, Pirozzi F- Advances in understanding the genetic basis of intellectual disability. **F1000Res** **5**, 2016.
- Chung HL, Mao X, Wang H, Park YJ, Marcogliese PC, Rosenfeld JA, Burrage LC, Liu P, Murdock DR, Yamamoto S, Wangler MF; Undiagnosed Diseases Network; Chao HT, Long H, Feng L, Bacino CA, Bellen HJ, Xiao B - *De novo* variants in *CDK19* are associated with a syndrome involving intellectual disability and epileptic encephalopathy. **Am J Hum Genet** **106**: 717-725, 2020.
- Cottrell CE, Sommer A, Wenger GD, Bullard S, Busch T, Krahn KN, Lidral AC, Gastier-Foster JM - Atypical X-chromosome inactivation in an X;1 translocation patient demonstrating Xq28 functional disomy. **Am J Med Genet A** **149A**: 408-414, 2009.
- Dayer AG, Bottani A, Bouchardy I, Fluss J, Antonarakis SE, Haenggeli CA, Morris MA - MECP2 mutant allele in a boy with Rett syndrome and his unaffected heterozygous mother. **Brain Dev** **29**: 47-50, 2007.
- De Bernardi ML, Di Stazio A, Romano A, Minardi R, Bisulli F, Licchetta L, Aiello S, Carelli V, Brunetti-Pierri N, Cappuccio G, Terrone G - Mild neurological phenotype in a family carrying a novel N-terminal null GRIN2A variant. **Eur J Med Genet** **65**: 104500, 2022.
- 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.
- de Hoon B, Monkhorst K, Riegman P, Laven JS, Gribnau J - Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. **J Med Genet** **52**: 784-790, 2015.
- de Ligt J, Willemsen MH, van Bon BW, Kleefstra T, Yntema HG, Kroes T, Vulto-van Silfhout AT, Koolen DA, de Vries P, Gilissen C, del Rosario M, Hoischen A, Scheffer H, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA, Vissers LE - Diagnostic exome sequencing in persons with severe intellectual disability. **N Engl J Med** **367**: 1921-1929, 2012.
- De Luca C, Race V, Keldermans L, Bauters M, Van Esch H - Challenges in molecular diagnosis of X-linked Intellectual disability. **Br Med Bull** **133**: 36-48, 2020.
- Domingo D, Nawaz U, Corbett M, Espinoza JL, Tatton-Brown K, Coman D, Wilkinson MF, Gecez J, Jolly LA - A synonymous *UPF3B* variant causing a speech disorder implicates NMD as a regulator of neurodevelopmental disorder gene networks. **Hum Mol Genet** **29**: 2568-2578, 2020.
- Drews CD, Yeargin-Allsopp M, Decouflé P, Murphy CC - Variation in the influence of selected sociodemographic risk factors for mental retardation. **Am J Public Health** **85**: 329-334, 1995.
- Durkin M - The epidemiology of developmental disabilities in low-income countries. **Ment Retard Dev Disabil Res Rev** **8**: 206-211, 2002.
- Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG - Genetic basis of intellectual disability. **Annu Rev Med** **64**: 441-450, 2013.
- Fellmann C, Gowen BG, Lin PC, Doudna JA, Corn JE - Cornerstones of CRISPR-Cas in drug discovery and therapy. **Nat Rev Drug Discov** **16**: 89-100, 2017.
- Fieremans N, Van Esch H, Holvoet M, Van Goethem G, Devriendt K, Rosello M, Mayo S, Martinez F, Jhangiani S, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR, Vermeesch JR, Marynen P, Froyen G - Identification of intellectual disability genes in female patients with a skewed X-inactivation pattern. **Hum Mutat** **37**: 804-811, 2016.
- Fregeau B, Kim BJ, Hernández-García A, Jordan VK, Cho MT, Schnur RE, Monaghan KG, Juusola J, Rosenfeld JA, Bhoj E, Zackai EH, Sacharow S, Barañano K, Bosch DGM,

- de Vries BBA, Lindstrom K, Schroeder A, James P, Kulch P, Lalani SR, van Haelst MM, van Gassen KLI, van Binsbergen E, Barkovich AJ, Scott DA, Sherr EH - *De novo* mutations of *RERE* cause a genetic syndrome with features that overlap those associated with proximal 1p36 deletions. **Am J Hum Genet** **98**: 963-970, 2016.
- Galbraith MD, Allen MA, Bensard CL, Wang X, Schwinn MK, Qin B, Long HW, Daniels DL, Hahn WC, Dowell RD, Espinosa JM - HIF1A employs CDK8-mediator to stimulate RNAPII elongation in response to hypoxia. **Cell** **153**: 1327-1339, 2013.
- Gillani SQ, Nisa MU, Sarwar Z, Reshi I, Bhat SA, Nabi N, Andrabi S - Regulation of PCTAIRE1 protein stability by AKT1, LKB1 and BRCA1. **Cell Signal** **85**: 110032, 2021.
- Gim JA - A genomic information management system for maintaining healthy genomic states and application of genomic big data in clinical research. **Int J Mol Sci** **23**: 5963, 2022.
- Giorgio E, Brussino A, Biamino E, Belligni EF, Bruselles A, Ciolfi A, Caputo V, Pizzi S, Calcia A, Di Gregorio E - Exome sequencing in children of women with skewed X-inactivation identifies atypical cases and complex phenotypes. **Eur J Paediatr Neurol** **21**: 475–484, 2016.
- Guerra JVS, Oliveira-Santos J, Oliveira DF, Leal GF, Oliveira JRM, Costa SS, Krepischi ACV, Vianna-Morgante AM, Maschietto M - DNA methylation fingerprint of monozygotic twins and their singleton sibling with intellectual disability carrying a novel *KDM5C* mutation. **Eur J Med Genet** **63**: 103737, 2020.
- Gürsoy G, Brannon CM, Ni E, Wagner S, Khanna A, Gerstein M - Storing and analyzing a genome on a blockchain. **Genome Biol** **23**: 134, 2022.
- Hanna MD - Análise cromossômica por microarray como ferramenta para a identificação da etiologia genética de malformações cerebrais heterogêneas. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências de Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
- Hanna MD, Moretti PN, P de Oliveira C, A Rosa MT, R Versiani B, de Oliveira SF, Pic-Taylor A, F Mazzeu J - Defining the critical region for intellectual disability and brain malformations in 6q27 microdeletions. **Mol Syndromol** **10**: 202-208, 2019.
- Hinch AG, Altemose N, Noor N, Donnelly P, Myers SR - Recombination in the human Pseudoautosomal region PAR1. **PLoS Genet** **10**: e1004503, 2014.

Hu H, Haas SA, Chelly J, Van Esch H, Raynaud M, de Brouwer AP, Weinert S, Froyen G, Frints SG, Laumonnier F, Zemojtel T, Love MI, Richard H, Emde AK, Bienek M, Jensen C, Hambrock M, Fischer U, Langnick C, Feldkamp M, Wissink-Lindhout W, Lebrun N, Castelnau L, Rucci J, Montjean R, Dorseuil O, Billuart P, Stuhlmann T, Shaw M, Corbett MA, Gardner A, Willis-Owen S, Tan C, Friend KL, Belet S, van Roozendaal KE, Jimenez-Pocquet M, Moizard MP, Ronce N, Sun R, O'Keeffe S, Chenna R, van Bömmel A, Göke J, Hackett A, Field M, Christie L, Boyle J, Haan E, Nelson J, Turner G, Baynam G, Gillessen-Kaesbach G, Müller U, Steinberger D, Budny B, Badura-Stronka M, Latos-Bieleńska A, Ousager LB, Wieacker P, Rodríguez Criado G, Bondeson ML, Annerén G, Dufke A, Cohen M, Van Maldergem L, Vincent-Delorme C, Echenne B, Simon-Bouy B, Kleefstra T, Willemsen M, Fryns JP, Devriendt K, Ullmann R, Vingron M, Wrogemann K, Wienker TF, Tzschach A, van Bokhoven H, Gecz J, Jentsch TJ, Chen W, Ropers HH, Kalscheuer VM - X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. **Mol Psychiatry** **21**: 133-148, 2016.

Ibarluzea N, De la Hoz AB, Villate O, Llano I, Ocio I, Martí I, Guitart M, Gabau E, Andrade F, Gener B, Tejada MI - Targeted next-generation sequencing in patients with suggestive X-linked intellectual disability. **Genes** **11**: 51, 2020.

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

Jacquemont S, Coe BP, Hersch M, Duyzend MH, Krumm N, Bergmann S, Beckmann JS, Rosenfeld JA, Eichler EE - A higher mutational burden in females supports a “female protective model” in neurodevelopmental disorders. **Am J Hum Genet** **94**: 415–425, 2014.

Jaffrey SR, Wilkinson MF - Nonsense-mediated RNA decay in the brain: emerging modulator of neural development and disease. **Nat Rev Neurosci** **19**: 715-728, 2018.

Jamra R - Genetics of autosomal recessive intellectual disability. **Medgen** **30**: 323–327, 2018.

Jordan VK, Fregeau B, Ge X, Giordano J, Wapner RJ, Balci TB, Carter MT, Bernat JA, Moccia AN, Srivastava A, Martin DM, Bielas SL, Pappas J, Svoboda MD, Rio M, Boddaert N, Cantagrel V, Lewis AM, Scaglia F; Undiagnosed Diseases Network; Kohler JN, Bernstein JA, Dries AM, Rosenfeld JA, DeFilippo C, Thorson W, Yang Y, Sherr EH,

- Bi W, Scott DA - Genotype-phenotype correlations in individuals with pathogenic *RERE* variants. **Hum Mutat** **39**: 666-675, 2018.
- Katz G, Lazcano-Ponce E - Intellectual disability: definition, etiological factors, classification, diagnosis, treatment and prognosis. **Salud Publica Mex** **50 Suppl 2**: s132-41, 2008.
- Kim BJ, Zaveri HP, Shchelochkov OA, Yu Z, Hernández-García A, Seymour ML, Oghalai JS, Pereira FA, Stockton DW, Justice MJ, Lee B, Scott DA - An allelic series of mice reveals a role for *RERE* in the development of multiple organs affected in chromosome 1p36 deletions. **PLoS One** **8**: e57460, 2013.
- Knight SJ, Regan R, Nicod A, Horsley SW, Kearney L, Homfray T, Winter RM, Bolton P, Flint J - Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. **Lancet** **354**: 1676-1681, 1999.
- Kunz JB, Neu-Yilik G, Hentze MW, Kulozik AE, Gehring NH - Functions of hUpf3a and hUpf3b in nonsense-mediated mRNA decay and translation. **RNA** **12**: 1015-1022, 2006.
- Laumonnier F, Shoubridge C, Antar C, Nguyen LS, Van Esch H, Kleefstra T, Briault S, Fryns JP, Hamel B, Chelly J, Ropers HH, Ronce N, Blesson S, Moraine C, Gécz J, Raynaud M - Mutations of the *UPF3B* gene, which encodes a protein widely expressed in neurons, are associated with nonspecific mental retardation with or without autism. **Mol Psychiatry** **15**: 767-776, 2010.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D - Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. **Nat Genet** **21**: 400-404, 1999.
- Lehrke R - A theory of X-linkage of major intellectual traits. **Am J Ment Defic** **78**: 611-619, 1972.
- Leitão E, Schröder C, Parenti I, Dalle C, Rastetter A, Kühnel T, Kuechler A, Kaya S, Gérard B, Schaefer E, Nava C, Drouot N, Engel C, Piard J, Duban-Bedu B, Villard L, Stegmann APA, Vanhoutte EK, Verdonschot JAJ, Kaiser FJ, Tran Mau-Them F, Scala M, Striano P, Frints SGM, Argilli E, Sherr EH, Elder F, Buratti J, Keren B, Mignot C, Héron D, Mandel JL, Gecz J, Kalscheuer VM, Horsthemke B, Piton A, Depienne C - Systematic analysis and prediction of genes associated with monogenic disorders on human chromosome X. **Nat Commun** **13**: 6570, 2022.

- Lejeune J, Gautier M, Turpin R - Etude des chromosomes somatiques de neuf enfants mongoliens [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. **C R Hebd Seances Acad Sci** **248**: 1721-1722, 1959.
- Lenhard W, Breitenbach E, Ebert H, Schindelbauer-Deutscher HJ, Henn W - Psychological benefit of diagnostic certainty for mothers of children with disabilities: lessons from Down syndrome. **Am J Med Genet A** **133A**: 170-175, 2005.
- Li D, Strong A, Shen KM, Cassiman D, Van Dyck M, Linhares ND, Valadares ER, Wang T, Pena SDJ, Jaeken J, Vergano S, Zackai E, Hing A, Chow P, Ganguly A, Scholz T, Bierhals T, Philipp D, Hakonarson H, Bhoj E - *De novo* loss-of-function variants in X-linked *MED12* are associated with Hardikar syndrome in females. **Genet Med** **23**: 637-644, 2012.
- Lubs HA - A marker X chromosome. **Am J Hum Genet** **21**: 231-244, 1969.
- Lyon MF - Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature** **190**: 372-373, 1961.
- Macnamara EF, Schoch K, Kelley EG, Fieg E, Brokamp E; Undiagnosed Diseases Network; Signer R, LeBlanc K, McConkie-Rosell A, Palmer CGS - Cases from the Undiagnosed Diseases Network: The continued value of counseling skills in a new genomic era. **J Genet Couns** **28**: 194-201, 2019.
- Maia N, Nabais Sá MJ, Melo-Pires M, de Brouwer APM, Jorge P - Intellectual disability genomics: current state, pitfalls and future challenges. **BMC Genomics** **22**: 909, 2021.
- 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.
- Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S - Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. **Res Dev Disabil** **32**: 419-436, 2011.
- Mckenzie K, Milton M, Smith G, Ouellette-kuntz H - Systematic review of the prevalence and incidence of intellectual disabilities: current trends and issues. **Curr Dev Disord Rep** **3**: 104-115, 2016.

- Mendell JT, Sharifi NA, Meyers JL, Martinez-Murillo F, Dietz HC - Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. **Nat Genet** **36**: 1073-1078, 2004.
- Mignot C, McMahon AC, Bar C, Campeau PM, Davidson C, Buratti J, Nava C, Jacquemont ML, Tallot M, Milh M, Edery P, Marzin P, Barcia G, Barnerias C, Besmond C, Bienvenu T, Bruel AL, Brunga L, Ceulemans B, Coubes C, Cristancho AG, Cunningham F, Dehouck MB, Donner EJ, Duban-Bedu B, Dubourg C, Gardella E, Gauthier J, Geneviève D, Gobin-Limballe S, Goldberg EM, Hagebeuk E, Hamdan FF, Hančárová M, Hubert L, Ioos C, Ichikawa S, Janssens S, Journal H, Kaminska A, Keren B, Koopmans M, Lacoste C, Laššuthová P, Lederer D, Lehalle D, Marjanovic D, Métreau J, Michaud JL, Miller K, Minassian BA, Morales J, Moutard ML, Munnich A, Ortiz-Gonzalez XR, Pinard JM, Prchalová D, Putoux A, Quelin C, Rosen AR, Roume J, Rossignol E, Simon MEH, Smol T, Shur N, Shelihan I, Štěrbová K, Vyhnálková E, Vilain C, Soblet J, Smits G, Yang SP, van der Smagt JJ, van Hasselt PM, van Kempen M, Weckhuysen S, Helbig I, Villard L, Héron D, Koeleman B, Møller RS, Lesca G, Helbig KL, Nabbout R, Verbeek NE, Depienne C - *IQSEC2*-related encephalopathy in males and females: a comparative study including 37 novel patients. **Genet Med** **21**: 837-849, 2019.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH - Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum Genet** **86**: 749-764, 2010.
- Mokalled MH, Johnson A, Kim Y, Oh J, Olson EN - Myocardin-related transcription factors regulate the Cdk5/Pctaire1 kinase cascade to control neurite outgrowth, neuronal migration and brain development. **Development** **137**: 2365-2374, 2010.
- Moreira de Mello JC, Fernandes GR, Vibranovski MD, Pereira LV - Early X chromosome inactivation during human preimplantation development revealed by single-cell RNA-sequencing. **Sci Rep** **7**: 10794, 2017.

- Muers MR, Sharpe JA, Garrick D, Sloane-Stanley J, Nolan PM, Hacker T, Wood WG, Higgs DR, Gibbons RJ - Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. **Am J Hum Genet 80**: 1138-1149, 2007.
- Neri G, Schwartz CE, Lubs HA, Stevenson RE - X-linked intellectual disability update 2017. **Am J Med Genet A 176**: 1375-1388, 2018.
- Nesterova TB, Johnston CM, Appanah R, Newall AE, Godwin J, Alexiou M, Brockdorff N - Skewing X chromosome choice by modulating sense transcription across the Xist locus. **Genes Dev 17**: 2177-2190, 2003.
- Nguyen DK, Disteche CM - Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. **Nat Genet 38**: 47-53, 2006.
- Ozercan HI, Ileri AM, Ayday E, Alkan C - Realizing the potential of blockchain technologies in genomics. **Genome Res 28**: 1255-1263, 2018.
- Patrat C, Ouimette JF, Rougeulle C - X chromosome inactivation in human development. **Development 147**: dev183095, 2020.
- Penrose LS - A clinical and genetic study of 1,280 cases of mental retardation defect. **Special Report Series, Medical Research Council 229**: 159. Her Majesty's Stationary Office, London, 1938.
- Petterson B, Bourke J, Leonard H, Jacoby P, Bower C - Co-occurrence of birth defects and intellectual disability. **Paediatr Perinat Epidemiol 21**: 65-75, 2007.
- 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.
- Polder JJ, Meerding WJ, Bonneux L, van der Maas PJ - Healthcare costs of intellectual disability in the Netherlands: a cost-of-illness perspective. **J Intellect Disabil Res 46(Pt 2)**: 168-178, 2002.
- Quartier A, Chatrousse L, Redin C, Keime C, Haumesser N, Maglott-Roth A, Brino L, Le Gras S, Benchoua A, Mandel JL, Piton A - Genes and pathways regulated by androgens in human neural cells, potential candidates for the male excess in autism spectrum disorder. **Biol Psychiatry 84**: 239-252, 2018.

- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee - Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med** **17**: 405-424, 2015.
- Rojano E, Seoane P, Ranea JAG, Perkins JR - Regulatory variants: from detection to predicting impact. **Brief Bioinform** **20**: 1639-1654, 2019.
- Ropers HH - Genetics of early onset cognitive impairment. **Annu Rev Genomics Hum Genet** **11**: 161-187, 2010.
- Ropers HH - Genetics of intellectual disability. **Curr Opin Genet Dev** **18**: 241-250, 2008.
- Ropers HH, Hamel BC - X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** **6**: 46-57, 2005.
- 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.
- Ross MT, Grafham DV, Coffey AJ, Scherer S, McLay K, Muzny D, Platzer M, Howell GR, Burrows C, Bird CP, Frankish A, Lovell FL, Howe KL, Ashurst JL, Fulton RS, Sudbrak R, Wen G, Jones MC, Hurler ME, Andrews TD, Scott CE, Searle S, Ramser J, Whittaker A, Deadman R, Carter NP, Hunt SE, Chen R, Cree A, Gunaratne P, Havlak P, Hodgson A, Metzker ML, Richards S, Scott G, Steffen D, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Ainscough R, Ambrose KD, Ansari-Lari MA, Aradhya S, Ashwell RI, Babbage AK, Bagguley CL, Ballabio A, Banerjee R, Barker GE, Barlow KF, Barrett IP, Bates KN, Beare DM, Beasley H, Beasley O, Beck A, Bethel G, Blechschmidt K, Brady N, Bray-Allen S, Bridgeman AM, Brown AJ, Brown MJ, Bonnin D, Bruford EA, Buhay C, Burch P, Burford D, Burgess J, Burrill W, Burton J, Bye JM, Carder C, Carrel L, Chako J, Chapman JC, Chavez D, Chen E, Chen G, Chen Y, Chen Z, Chinault C, Ciccodicola A, Clark SY, Clarke G, Clee CM, Clegg S, Clerc-Blankenburg K, Clifford K, Copley V, Cole CG, Conquer JS, Corby N, Connor RE, David R, Davies J, Davis C, Davis J, Delgado O, Deshazo D, Dhami P, Ding Y, Dinh H, Dodsworth S, Draper H, Dugan-Rocha S, Dunham A, Dunn M, Durbin KJ, Dutta I, Eades T, Ellwood M, Emery-Cohen A, Errington H, Evans KL, Faulkner L, Francis F, Frankland J, Fraser AE,

Galgoczy P, Gilbert J, Gill R, Glöckner G, Gregory SG, Gribble S, Griffiths C, Grocock R, Gu Y, Gwilliam R, Hamilton C, Hart EA, Hawes A, Heath PD, Heitmann K, Hennig S, Hernandez J, Hinzmann B, Ho S, Hoffs M, Howden PJ, Huckle EJ, Hume J, Hunt PJ, Hunt AR, Isherwood J, Jacob L, Johnson D, Jones S, de Jong PJ, Joseph SS, Keenan S, Kelly S, Kershaw JK, Khan Z, Kioschis P, Klages S, Knights AJ, Kosiura A, Kovar-Smith C, Laird GK, Langford C, Lawlor S, Leversha M, Lewis L, Liu W, Lloyd C, Lloyd DM, Loulseged H, Loveland JE, Lovell JD, Lozado R, Lu J, Lyne R, Ma J, Maheshwari M, Matthews LH, McDowall J, McLaren S, McMurray A, Meidl P, Meitinger T, Milne S, Miner G, Mistry SL, Morgan M, Morris S, Müller I, Mullikin JC, Nguyen N, Nordsiek G, Nyakatura G, O'Dell CN, Okwuonu G, Palmer S, Pandian R, Parker D, Parrish J, Pasternak S, Patel D, Pearce AV, Pearson DM, Pelan SE, Perez L, Porter KM, Ramsey Y, Reichwald K, Rhodes S, Ridler KA, Schlessinger D, Schueler MG, Sehra HK, Shaw-Smith C, Shen H, Sheridan EM, Shownkeen R, Skuce CD, Smith ML, Sotheran EC, Steingruber HE, Steward CA, Storey R, Swann RM, Swarbreck D, Tabor PE, Taudien S, Taylor T, Teague B, Thomas K, Thorpe A, Timms K, Tracey A, Trevanion S, Tromans AC, d'Urso M, Verduzco D, Villasana D, Waldron L, Wall M, Wang Q, Warren J, Warry GL, Wei X, West A, Whitehead SL, Whiteley MN, Wilkinson JE, Willey DL, Williams G, Williams L, Williamson A, Williamson H, Wilming L, Woodmansey RL, Wray PW, Yen J, Zhang J, Zhou J, Zoghbi H, Zorilla S, Buck D, Reinhardt R, Poustka A, Rosenthal A, Lehrach H, Meindl A, Minx PJ, Hillier LW, Willard HF, Wilson RK, Waterston RH, Rice CM, Vaudin M, Coulson A, Nelson DL, Weinstock G, Sulston JE, Durbin R, Hubbard T, Gibbs RA, Beck S, Rogers J, Bentley DR - The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature** **434**: 325-337, 2005.

Santos JO - Estudo da deficiência mental de herança ligada ao cromossomo X. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Satterstrom FK, Kosmicki JA, Wang J, Breen MS, De Rubeis S, An JY, Peng M, Collins R, Grove J, Klei L, Stevens C, Reichert J, Mulhern MS, Artomov M, Gerges S, Sheppard B, Xu X, Bhaduri A, Norman U, Brand H, Schwartz G, Nguyen R, Guerrero EE, Dias C; Autism Sequencing Consortium; iPSYCH-Broad Consortium; Betancur C, Cook EH, Gallagher L, Gill M, Sutcliffe JS, Thurm A, Zwick ME, Børglum AD, State MW, Cicek AE, Talkowski ME, Cutler DJ, Devlin B, Sanders SJ, Roeder K, Daly MJ,

- Buxbaum JD - Large-scale exome sequencing study implicates both developmental and functional changes in the neurobiology of autism. **Cell** **180**: 568-584.e23, 2020.
- Schalock RL, Luckasson R, Tassé MJ - An overview of intellectual disability: definition, diagnosis, classification, and systems of supports (12th ed.). **Am J Intellect Dev Disabil** **126**: 439-442, 2021.
- Scionti F, Di Martino MT, Pensabene L, Bruni V, Concolino D - The Cytoscan HD array in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. **High Throughput** **7**: 28, 2018.
- Scott DA, Sherr EH - *RERE*-Related Disorders. 2019 Mar 21. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, Amemiya A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2023.
- Seegmiller JE, Rosenbloom FM, Kelley WN - Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. **Science** **155**: 1682-1684, 1967.
- Serajee FJ, Mahbulul Huq AH - Association of Y chromosome haplotypes with autism. **J Child Neurol** **24**: 1258-1261, 2009.
- Shehata SN, Hunter RW, Ohta E, Peggie MW, Lou HJ, Sicheri F, Zeqiraj E, Turk BE, Sakamoto K - Analysis of substrate specificity and cyclin Y binding of PCTAIRE-1 kinase. **Cell Signal** **24**: 2085-2094, 2012.
- Shvetsova E, Sofronova A, Monajemi R, Gagalova K, Draisma HHM, White SJ, Santen GWE, Chuva de Sousa Lopes SM, Heijmans BT, van Meurs J, Jansen R, Franke L, Kielbasa SM, den Dunnen JT, 't Hoen PAC - Skewed X-inactivation is common in the general female population. **Eur J Hum Genet** **27**: 455–465, 2019.
- Sisdelli L, Vidi AC, Moysés-Oliveira M, Di Battista A, Bortolai A, Moretti-Ferreira D, da Silva MR, Melaragno MI, Carvalheira G - Incorporation of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) as a novel strategy for identification of the skewed X inactivation pattern in balanced and unbalanced X-rearrangements. **Hum Genet** **135**: 185-192, 2016.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, Repping S, Pyntikova T, Ali J, Bieri T, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou SF, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang SP, Waterston RH, Wilson RK,

- Rozen S, Page DC - The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature** **423**: 825-837, 2003.
- Slavin TP, Manjarrez S, Pritchard CC, Gray S, Weitzel JN - The effects of genomic germline variant reclassification on clinical cancer care. **Oncotarget** **10**: 417-423, 2019.
- Spatz A, Borg C, Feunteun J - X-chromosome genetics and human cancer. **Nat Rev Cancer** **4**: 617-629, 2004.
- Strehlow V, Heyne HO, Vlaskamp DRM, Marwick KFM, Rudolf G, de Bellescize J, Biskup S, Brilstra EH, Brouwer OF, Callenbach PMC, Hentschel J, Hirsch E, Kind PC, Mignot C, Platzer K, Rump P, Skehel PA, Wyllie DJA, Hardingham GE, van Ravenswaaij-Arts CMA, Lesca G, Lemke JR; GRIN2A study group - *GRIN2A*-related disorders: genotype and functional consequence predict phenotype. **Brain** **142**: 80-92, 2019.
- Sugawara Y, Mizuno T, Moriyama K, Ishiwata H, Kato M, Nakashima M, Mizuguchi T, Matsumoto N - Cerebrospinal fluid abnormalities in developmental and epileptic encephalopathy with a *de novo* *CDK19* variant. **Neurol Genet** **6**: e527, 2020.
- Tang WW, Dietmann S, Irie N, Leitch HG, Floros VI, Bradshaw CR, Hackett JA, Chinnery PF, Surani MA - A unique gene regulatory network resets the human germline epigenome for development. **Cell** **161**: 1453-1467, 2015.
- Tarpey PS, Raymond FL, Nguyen LS, Rodriguez J, Hackett A, Vandeleur L, Smith R, Shoubridge C, Edkins S, Stevens C, O'Meara S, Tofts C, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Halliday K, Hills K, Jones D, Mironenko T, Perry J, Varian J, West S, Widaa S, Teague J, Dicks E, Butler A, Menzies A, Richardson D, Jenkinson A, Shepherd R, Raine K, Moon J, Luo Y, Parnau J, Bhat SS, Gardner A, Corbett M, Brooks D, Thomas P, Parkinson-Lawrence E, Porteous ME, Warner JP, Sanderson T, Pearson P, Simensen RJ, Skinner C, Hoganson G, Superneau D, Wooster R, Bobrow M, Turner G, Stevenson RE, Schwartz CE, Futreal PA, Srivastava AK, Stratton MR, Gécz J - Mutations in *UPF3B*, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. **Nat Genet** **39**: 1127-1133, 2007.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler

- A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. . **Nat Genet 41**: 535-543, 2009.
- Tejada MI, Ibarluzea N - Non-syndromic X linked intellectual disability: current knowledge in light of the recent advances in molecular and functional studies. **Clin Genet 97**: 677-687, 2020.
- Tejada MI, Villate O, Ibarluzea N, de la Hoz AB, Martínez-Bouzas C, Beristain E, Martínez F, Friez MJ, Sobrino B, Barros F - Molecular and clinical characterization of a novel nonsense variant in exon 1 of the *UPF3B* gene found in a large spanish basque family (MRX82). **Front Genet 10**: 1074, 2019.
- Thevenon J, Duffourd Y, Masurel-Paulet A, Lefebvre M, Feillet F, El Chehadeh-Djebbar S, St-Onge J, Steinmetz A, Huet F, Chouchane M, Darmency-Stamboul V, Callier P, Thauvin-Robinet C, Faivre L, Rivière JB - Diagnostic odyssey in severe neurodevelopmental disorders: toward clinical whole-exome sequencing as a first-line diagnostic test. **Clin Genet 89**: 700-707, 2016.
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. **Pharmacol Rev 62**: 405-496, 2010.
- Tukiainen T, Villani AC, Yen A, Rivas MA, Marshall JL, Satija R, Aguirre M, Gauthier L, Fleharty M, Kirby A, Cummings BB, Castel SE, Karczewski KJ, Aguet F, Byrnes A; GTEx Consortium; Laboratory, Data Analysis & Coordinating Center (LDACC)—Analysis Working Group; Statistical Methods groups—Analysis Working Group; Enhancing GTEx (eGTEx) groups; NIH Common Fund; NIH/NCI; NIH/NHGRI; NIH/NIMH; NIH/NIDA; Biospecimen Collection Source Site—NDRI; Biospecimen Collection Source Site—RPCI; Biospecimen Core Resource—VARI; Brain Bank Repository—University of Miami Brain Endowment Bank; Leidos Biomedical—Project Management; ELSI Study; Genome Browser Data Integration & Visualization—

- EBI; Genome Browser Data Integration & Visualization—UCSC Genomics Institute, University of California Santa Cruz; Lappalainen T, Regev A, Ardlie KG, Hacohen N, MacArthur DG - Landscape of X chromosome inactivation across human tissues. **Nature** **550**: 244-248, 2017.
- Turriff A, Macnamara E, Levy HP, Biesecker B - The Impact of Living with Klinefelter Syndrome: A Qualitative Exploration of Adolescents and Adults. **J Genet Couns** **26**: 728-737, 2017.
- Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl S, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, Evers C, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Di Donato N, Maiwald R, Jung C, Kuechler A, Schulz S, Meinecke P, Spranger S, Kohlhase J, Seidel J, Reif S, Rieger M, Riess A, Sturm M, Bickmann J, Schroeder C, Dufke A, Riess O, Bauer P - Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. **Eur J Hum Genet** **23**: 1513-1518, 2015.
- van Bokhoven H - Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. **Annu Rev Genet** **45**: 81-104, 2011.
- Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang FP, Eussen BE, Ommen GJB, Blonden L, Riggins G, Chastain J, Kunst C, Galjaard H, Caskey C, Nelson D, Oostra BA, Warren ST - Identification of a gene (*FMR-1*) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell** **65**: 905-914, 1991.
- Vianna EQ, Piergiorgio RM, Gonçalves AP, Dos Santos JM, Calassara V, Rosenberg C, Krepischki ACV, Boy da Silva RT, Dos Santos SR, Ribeiro MG, Machado FB, Medina-Acosta E, Pimentel MMG, Santos-Rebouças CB - Understanding the Landscape of X-linked Variants Causing Intellectual Disability in Females Through Extreme X Chromosome Inactivation Skewing. **Mol Neurobiol** **57**: 3671-3684, 2020.
- Vicoso B, Charlesworth B - Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. **Nat Rev Genet** **7**: 645-653, 2006.
- Vilhais-Neto GC, Maruhashi M, Smith KT, Vasseur-Cognet M, Peterson AS, Workman JL, Pourquoié O - *RERE* controls retinoic acid signalling and somite bilateral symmetry. **Nature** **463**: 953-957, 2010.
- Vissers LE, Bonetti M, Paardekooper Overman J, Nillesen WM, Frints SG, de Ligt J, Zampino G, Justino A, Machado JC, Schepens M, Brunner HG, Veltman JA, Scheffer H, Gros P,

- Costa JL, Tartaglia M, van der Burgt I, Yntema HG, den Hertog J - Heterozygous germline mutations in *A2ML1* are associated with a disorder clinically related to Noonan syndrome. **Eur J Hum Genet** **23**: 317-324, 2015.
- Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA - Genetic studies in intellectual disability and related disorders. **Nat Rev Genet** **17**: 9-18, 2016.
- Webber BR, Osborn MJ, McElroy AN, Twaroski K, Lonetree CL, DeFeo AP, Xia L, Eide C, Lees CJ, McElmurry RT, Riddle MJ, Kim CJ, Patel DD, Blazar BR, Tolar J - CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. **NPJ Regen Med** **1**: 16014–, 2016.
- Wieczorek D - Autosomal dominant intellectual disability. **Med Genet** **30(3)**: 318-322, 2018.
- Wright M, Menon V, Taylor L, Shashidharan M, Westercamp T, Ternent CA - Factors predicting reclassification of variants of unknown significance. **Am J Surg** **216**: 1148-1154, 2018.
- Wu H, Luo J, Yu H, Rattner A, Mo A, Wang Y, Smallwood PM, Erlanger B, Wheelan SJ, Nathans J - Cellular resolution maps of X chromosome inactivation: implications for neural development, function, and disease. **Neuron** **81**: 103-119, 2014.
- Xu X, Zhang L, Tong P, Xun G, Su W, Xiong Z, Zhu T, Zheng Y, Luo S, Pan Y, Xia K, Hu Z - Exome sequencing identifies *UPF3B* as the causative gene for a Chinese non-syndrome mental retardation pedigree. **Clin Genet** **83**: 560-564, 2013.
- Yang S, Yu W, Chen Q, Wang X - A novel variant of *CDK19* causes a severe neurodevelopmental disorder with infantile spasms. **Cold Spring Harb Mol Case Stud** **7**: a006082, 2021.
- Yeargin-Allsopp M, Murphy CC, Cordero JF, Decouflé P, Hollowell JG - Reported biomedical causes and associated medical conditions for mental retardation among 10-year-old children, metropolitan Atlanta, 1985 to 1987. **Dev Med Child Neurol** **39**: 142-149, 1997.
- Zarate YA, Uehara T, Abe K, Oginuma M, Harako S, Ishitani S, Lehesjoki AE, Bierhals T, Kloth K, Ehmke N, Horn D, Holtgrewe M, Anderson K, Viskochil D, Edgar-Zarate CL, Sacoto MJG, Schnur RE, Morrow MM, Sanchez-Valle A, Pappas J, Rabin R, Muona M, Anttonen AK, Platzer K, Luppe J, Gburek-Augustat J, Kaname T, Okamoto N, Mizuno S, Kaido Y, Ohkuma Y, Hirose Y, Ishitani T, Kosaki K - *CDK19*-related

disorder results from both loss-of-function and gain-of-function *de novo* missense variants. **Genet Med** **23**: 1050-1057, 2021.

Zhou Q, Wang T, Leng L, Zheng W, Huang J, Fang F, Yang L, Chen F, Lin G, Wang WJ, Kristiansen K - Single-cell RNA-seq reveals distinct dynamic behavior of sex chromosomes during early human embryogenesis. **Mol Reprod Dev** **86**: 871-882, 2019.

Ziats CA, Schwartz CE, Gecz J, Shaw M, Field MJ, Stevenson RE, Neri G - X-linked intellectual disability: Phenotypic expression in carrier females. **Clin Genet** **97**: 418-425, 2019.

Ziccardi L, Cordeddu V, Gaddini L, Matteucci A, Parravano M, Malchiodi-Albedi F, Varano M - Gene Therapy in Retinal Dystrophies. **Int J Mol Sci** **20**: 5722, 2019.

Fontes da Internet:

1000 Genomes Project. Disponível em: <<https://www.internationalgenome.org>>. Acesso em: janeiro de 2020.

ABraOM: Brazilian genomic variants. Disponível em: <<http://abraom.ib.usp.br>>. Acesso em: julho de 2022.

American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AIDD). Disponível em: <<https://www.aaid.org/intellectual-disability/definition#.Wgd5cGhSziU>>. Acesso em: abril de 2023.

AnnoVar. Disponível em: <<https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>>. Acesso em: novembro de 2019.

ClinVar. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>>. Acesso em: dezembro de 2022.

ESP6500. Disponível em: <<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>>. Acesso em: agosto de 2022.

Franklin. Disponível em: <<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>>. Acesso em: abril de 2023.

Genome Browser. Disponível em: <<https://genome.ucsc.edu/>>. Acesso em: dezembro de 2022.

GGC - Greenwood Genetic Center. Disponível em: <<https://www.ggc.org/xlid-geneticresearch>>. Acesso em: janeiro de 2022.

gnomAD. Disponível em: <<https://gnomad.broadinstitute.org/>>. Acesso em: agosto de 2022.

HPO - The Human Phenotype Ontology. Disponível em: <<https://hpo.jax.org/app/>>. Acesso em: janeiro de 2022.

IGV - Integrative Genomics Viewer. Disponível em: <<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>>. Acesso em: agosto de 2022.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: abril de 2023.

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em <<https://www.omim.org/>>. Acesso em: abril de 2023.

PubMed - Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: abril de 2023.

The Human Protein Atlas. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/>>. Acesso em: dezembro de 2022.

VarSeq™ (Versão 8.x) [Software]. Bozeman, MT: Golden Helix, Inc. Disponível em <<http://www.goldenhelix.com>>. Acesso em: julho de 2022.

Varsome database: Disponível em: <<https://varsome.com/>>. Acesso em: abril de 2023.