LUÍZA DIAS CHAVES

Investigação de desvios extremos da inativação do cromossomo X em mulheres com deficiência intelectual idiopática como indicativo de variantes causais

Investigation of extreme skewing of X-chromosome inactivation in women with idiopathic intellectual disability as indicative of causal variants

São Paulo

2022

LUÍZA DIAS CHAVES

Investigação de desvios extremos da inativação do cromossomo X em mulheres com deficiência intelectual idiopática como indicativo de variantes causais

Investigation of extreme skewing of X-chromosome inactivation in women with idiopathic intellectual disability as indicative of causal variants

Exemplar corrigido

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, na Área de Genética.

Orientadora: Ana Cristina Victorino Krepischi

São Paulo

2022

Dias Chaves, Luiza
Investigação de desvios extremos da inativação do cromossomo X em mulheres com deficiência intelectual idiopática como indicativo de variantes causais / Luiza Dias Chaves ; orientadora Ana Cristina Victorino Krepischi ; coorientadora Angela Maria Vianna Morgante -- São Paulo, 2022. 108 p.

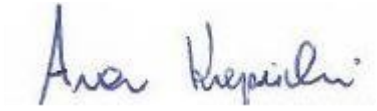
Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

1. Deficiência intelectual . 2. Deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X. 3. Inativação do cromossomo X. I. Victorino Krepischi, Ana Cristina , orient. II. Vianna Morgante , Angela Maria , coorient. III. Título.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).



_____

Prof(a). Dr.(a). Orientador(a) Ana Cristina Krepischi

A meus pais, Carla Gameiro Dias e Antônio Roberto Botelho Chaves, e minha irmã, Marina Dias Chaves pelo infindável apoio, amor e compreensão.

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Carla e Roberto, por me proporcionarem a vida que tive até hoje, sempre se dispondo a me oferecer o melhor disponível em todos os aspectos da mesma. Obrigada por permitirem que eu estudasse sempre em escolas que visassem meu crescimento acadêmico e intelectual; por incentivarem meus sonhos e metas, não importando quais fossem; e por estarem ao meu lado nesse marco tão importante da minha vida. É um prazer poder partilhar desse momento com vocês, tanto minha mãe fisicamente quanto meu pai em pensamento;

À minha irmã, e melhor amiga, Marina, por ter me incentivado a cada dia a seguir em frente, mesmo em momentos de dúvida, me encorajando a continuar dando sempre o meu melhor, e sendo minha maior fã. Eu não estaria aqui sem você ao meu lado;

Um agradecimento especial aos meus avós, Tujó, Li, Yvone e Sérgio. Eu não seria a mulher que sou hoje sem suas influências, incentivos e infindável amor. Mesmo não podendo compartilhar esse momento com todos, vocês estiveram comigo por todo o caminho, como sempre o fizeram;

Agradeço a todos os meus professores passados e presentes, por estenderem os limites do meu conhecimento, incentivando cada vez mais o meu crescimento, tanto pessoal quanto acadêmico, e por despertarem em mim o interesse pela área de genética. Aos meus professores da pós-graduação, agradeço por expandirem meu conhecimento na área que escolhi para a vida e por me prepararem para a entrada no mercado de trabalho.

Agradeço a minha orientadora, Prof.ª Dra. Ana Krepischi, por sua paciência, seriedade e direção durante o período no qual escrevi esse trabalho. Seu suporte, orientação e ajuda foram de suma importância para o desenvolvimento desse estudo, e eu lhe agradeço por ter aceitado realizá-lo ao meu lado;

Às Prof.ªs Dras. Carla Rosenberg e Angela Morgante, meus sinceros agradecimentos por enriquecerem tanto esse projeto com seus conhecimentos, e por me auxiliarem ao longo de seu desenvolvimento.

À Silvia, Lilian, Ligia, Maraisa, Laura, Giovana, Sara, e demais colegas do Laboratório de Genética Humana, agradeço por todo auxílio, aprendizado e experiência compartilhados, que fizeram do meu mestrado uma oportunidade única.

Por fim, agradeço à Universidade de São Paulo e a coordenação do curso de Mestrado de Aconselhamento Genético e Genômica Humana, principalmente as Profªs Célia Koiffmann e Regina Mongroni, por terem me acolhido e me permitido a chance de aprofundar meus estudos na área, fornecendo todas os meios necessários para a minha pós-graduação.

Lista de Figuras

- Figura 1. Processo de estabelecimento e manutenção da inativação aleatória do cromossomo X
- Figura 2. Curva de Distribuição do Padrão de Inativação do Cromossomo X
- Figura 3. Cromossomo X e suas Regiões de acordo com a Inativação de seus genes
- Figura 4. Inativação aleatória do cromossomo X, mostrando um padrão em que estão ativos cerca de 50% dos cromossomos paternos e de 50% dos maternos
- Figura 5. Desvio total de inativação do cromossomo X, no qual um dos cromossomos se encontra inativado em 100% das células
- Figura 6. Distribuição de 194 mulheres com DI idiopática quanto à informação referente ao lócus AR para estudo de inativação do cromossomo X
- Figura 7. Distribuição de 136 mulheres com DI quanto ao padrão de inativação do cromossomo X determinado com base no padrão de metilação de alelos do lócus *AR*
- Figura 8. Análise do padrão de inativação do cromossomo X

- Figura 9. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA de duas pacientes com variantes patogênicas no gene *DDX3X* - Pacientes 1 e 2
- Figura 10. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA da paciente P3 e de seus genitores para averiguar variante no gene PDHA1
- Figura 11. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA da paciente P4 e de seus genitores para averiguar variante no gene WDR45
- Figura 12. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA da paciente P5 e de seus genitores para averiguar variante no gene CTNNB1
- Figura 13. Sequenciamento de Sanger em amostras de DNA da paciente P6 e de seus genitores para variante no gene *YY1*
- Figura 14. Sequenciamento de Sanger em amostras de DNA da paciente P7 e de seus genitores para averiguar variante em ANKRD11
- Figura 15. Sequenciamento de Sanger em amostras de DNA da paciente P8 e de um controle selvagem não relacionado, para averiguar a variante em KCNB1

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO 11
I. 1 Deficiência intelectual 11
I. 2 Deficiência Intelectual com Herança ligada ao Cromossomo X 19
I. 3 A inativação do cromossomo X em mulheres e a Deficiência Intelectual 23
II. OBJETIVO GERAL **..... 44**
II. 1 Objetivos Específicos..... 44
III. CASUÍSTICA..... 45
IV. PACIENTES E MÉTODOS 46
IV. 1 Pesquisa do padrão de inativação do cromossomo X..... 51
IV. 2 Sequenciamento completo de exoma..... 57
IV. 3 Sequenciamento de Sanger..... 59
IV. 4 Análise cromossômica por microarranjo genômico (Chromosome Microarray Analysis - CMA)..... 63
IV.5 Análise Estatística..... 64
V. RESULTADOS 60
V. 1 Análise do padrão de inativação do cromossomo X..... 65
V. 2 Análise estatística..... 69
V. 3 Análise de sequenciamento completo do exoma..... 71
V. 4 Aconselhamento Genético das famílias com resultados positivos de exame de exoma completo..... 78
VI. DISCUSSÃO 78
VII. CONCLUSÕES 89
VIII. RESUMO 91
ABSTRACT..... 96
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 95

I. INTRODUÇÃO

I.1 Deficiência intelectual

A Deficiência intelectual (DI) é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um estado de desenvolvimento intelectual interrompido ou incompleto, o que significa que pode haver problemas de compreensão e aprendizado, bem como dificuldade para aplicar o conhecimento a novas situações (OMS, 2011). Antes dos 5 anos de idade, a condição recebe a denominação de atraso global de desenvolvimento sendo uma das principais razões do encaminhamento de crianças ao serviço genético pediátrico.

A DI, por definição, se manifesta antes dos 18 anos de idade (Ke e Liu, 2015) e pode ser classificada em categorias, de acordo com o quociente de inteligência do indivíduo (teste de QI), podendo ser leve (QI entre 50-69), moderada (QI entre 35-49), grave (QI entre 20-34) ou profunda (QI < 20) (OMS, 2002). Tais grupos representam cerca de 85%, 10%, 4%, e 2% das pessoas com DI, respectivamente (De Luca e col., 2020).

Alguns testes, como a Escala de Inteligência Wechsler para Adultos (WAIS), recomendada para adolescentes acima de 16 anos e adultos, e a Escala Wechsler de Inteligência para Crianças (WISC), recomendada para crianças de 6 a 16 anos de idade, foram padronizados para determinar a capacidade intelectual e habilidades cognitivas (Do Nascimento e De Figueiredo, 2002; Ropers, 2008). De acordo com estudos baseados em testes, Lehrke (1972, 1974) relatou que a disfunção verbal é a característica principal presente em homens com DI, que em

geral tem resultado inferior no teste verbal do que na performance do teste de QI, como detalhado na revisão de Frints e col. (2002).

A DI pode ocorrer como sinal clínico isolado ou associada a outros sinais. Quando a DI ocorre como sinal clínico único, é classificada como não-sindrômica; nos casos em que a DI aparece em associação a uma constelação de outros sinais clínicos congênitos ou problemas do desenvolvimento neuropsicomotor, é denominada de DI sindrômica. Entretanto, tal distinção nem sempre é facilmente determinada uma vez que os quadros sindrômicos podem apresentar manifestações clínicas nem sempre reconhecíveis e, em determinados casos, a manifestação sindrômica só se tornará evidente com o crescimento. Assim, diversos casos sindrômicos são erroneamente diagnosticados como não sindrômicos (Ropers e Hamel, 2005; Ropers, 2008; Wieczorek, 2018).

A frequência estimada de DI na população mundial é de aproximadamente 2-3% em países ocidentais desenvolvidos (Tzschach e col., 2015; Fieremans e col., 2016). A etiologia da DI é heterogênea. Suas causas podem ser ambientais, como infecções maternas, desnutrição, traumas de parto, serviço de saúde precário (revisão de Ropers, 2008) ou consumo materno de álcool durante a gravidez, ou ter associação primordial com fatores genéticos (Ke e Liu, 2015). Todavia, em 40-60% dos casos, a etiologia da condição é desconhecida, principalmente considerando os casos de DI leve (Ellison e col., 2012; De Ligt e col., 2012; Fieremans e col., 2016; Wieczorek, 2018; De Luca e col., 2020). A hipótese é que a maioria dos quadros de DI leve seja de origem provavelmente multifatorial, embora pouco se saiba sobre a arquitetura genética dessas formas mais leves.

Em países subdesenvolvidos, a frequência de DI é mais elevada, podendo chegar a ser 2-3 vezes maior que a de países desenvolvidos (Ropers, 2010). Tal discrepância é associada a um número maior de casos de DI leve, provavelmente relacionada a fatores socioeconômicos e ambientais, e não a fatores genéticos. A condição de DI leve pode não ser identificada devido à dificuldade de diagnóstico clínico. Famílias que vivem em condições financeiras e de moradia desfavoráveis teriam risco cerca de 4-5 vezes maior de terem crianças com DI, quando comparadas a famílias com boas condições sociais; os estudos de Emerson e colaboradores (2007) e de Musante e Ropers (2014) apontam que a pobreza seria a causa primária da DI, estando relacionada com a exposição a fatores ambientais, como toxinas e infecções maternas, assim como a aspectos psicossociais, como menor qualidade educacional e de serviços de saúde, além de privação cultural, que em conjunto impediriam o desenvolvimento intelectual completo.

A DI apresenta extensa heterogeneidade genética, de lócus e alélica, bem como expressividade variável. As causas genéticas mais comumente associadas a DI são as anomalias cromossômicas grandes, estruturais ou numéricas, detectáveis por técnicas de citogenética, representando quase 15% de todos os casos. Alterações cromossômicas numéricas foram primeiramente descritas como causadoras de DI em 1959, por Lejeune e colaboradores (revisão em Mefford e col., 2012; Ropers, 2008). A principal causa de DI é a trissomia do cromossomo 21, fator causativo da Síndrome de Down (OMIM #190685), correspondendo a 2/3 dos casos de DI de etiologia genética (Ellison e col., 2012) e afetando cerca de 1 em cada 1000 nascidos vivos. Em seguida, como causa mais frequente de DI herdada, está a Síndrome do X Frágil (OMIM #300624), causada por variantes no gene *FMR1* (*Fragile X Mental Retardation 1*), com prevalência de cerca de 1/1.500

homens e 1/2.500 mulheres, sendo o primeiro gene de DI ligado ao cromossomo X a ser identificado (Crawford e col., 2001; Ellison, 2012; Ke e Liu, 2015). Um outro fator causativo importante de DI são as alterações cromossômicas submicroscópicas. Quadros de DI grave ou profunda tiveram seus mecanismos genéticos investigados em diversas coortes; por exemplo, é reconhecido que cerca de 15-10% dos casos de DI com cariótipo normal são decorrentes de alterações cromossômicas detectadas no exame de cariótipo e análise de microarranjo cromossômico (Rosenberg e col., 2006; Ellison e col., 2012). Tais estudos, feitos com análise cromossômica baseada em CMA, mostraram que o número de genes afetados pelas CNVs estaria diretamente associado à gravidade do quadro de DI, conforme esperado (Vissers e col., 2016). Adicionalmente, a etiologia molecular de 35% dos casos de DI é esclarecida pelo sequenciamento completo do exoma (Savatt e Myers, 2021).

Na **Tabela 1** estão listadas as causas mais comuns de DI de acordo com Ke e Liu, 2015.

Tabela 1. Causas mais comuns de deficiência intelectual (Tabela adaptada de Ke e Liu, 2015).

CAUSAS COMUNS DE DI	
Alterações Cromossômicas	● Síndrome de Down ● Síndrome de Klinefelter/ Turner ● Síndrome de Prader-Willi
Alterações Monogênicas (exemplos)	● Síndrome do X Frágil ● Síndrome neurocutânea ● Síndrome de Rubistein-Taybi ● Síndrome de Cornélia de Lange
Fatores ambientais no período gestacional	● Desnutrição e deficiência de vitaminas e minerais ● Uso de substâncias químicas, como álcool e drogas ilícitas ● Exposição a produtos químicos ● Infecções ● Exposição à radiação

Variantes causativas de DI com herança monogênica foram identificadas em cerca de 800 genes até 2016, apresentando todos os padrões de herança (herança autossômica dominante, autossômica recessiva, ou ligada ao cromossomo X dominante e recessiva) (Chiurazzi e Pirozzi, 2016; Vissers e col., 2016). Entretanto, com a introdução e expansão de técnicas como sequenciamento completo de exoma (WES), esse número se expande continuamente. O banco de dados alemão SysNDD (https://sysndd.dbmr.unibe.ch/) já documenta mais de 1534 genes associados à DI e 1254 outros genes candidatos (pesquisa realizada em

março/2022). A identificação dos genes associados a DI é desafiadora devido à variabilidade genética subjacente (Ropers e col., 2011; Vissers e col., 2015; Wright e col., 2018). Um fator que poderia influenciar os diferentes fenótipos de DI seria a contribuição de variantes genéticas adicionais, que alterariam os padrões de penetrância e expressividade das variantes (Vissers e col., 2015).

De acordo com Vissers e col. (2016) e Wieczorek (2018), a prevalência de casos de DI leve seria diferente em países com alta frequência de consanguinidade, indicando causa genética e correlação com a herança recessiva. Como visto por Musante e Ropers (2014), em populações ocidentais as formas recessivas de DI tendem a ocorrer majoritariamente como casos esporádicos. No entanto, em países com maior frequência de casamentos consanguíneos, a taxa de casos de DI com herança autossômica recessiva é elevada, podendo ser até 3 vezes maior e representando a causa genética mais comum de DI nessas populações.

Evidências indicam que os quadros mais graves de DI apresentariam maior frequência de variantes *de novo* em genes com padrão de manifestação dominante. Tais variantes *de novo* em genes dominantes explicariam cerca de 42-60% dos casos graves de DI, que são formas mais raras (De Ligt e col., 2012; Vissers e col., 2016; Wieczorek, 2018).

Revisões de Vissers e col., 2016 e Wieczorek, 2018 relatam que a maioria das variantes *de novo* em pacientes com DI ocorrem no alelo de origem paterna. A taxa de ocorrência de variantes *de novo* aumentaria progressivamente com o aumento da idade paterna, enquanto anomalias cromossômicas são mais associadas ao avanço da idade materna.

Devido à grande heterogeneidade genética das condições clínicas que tem DI como manifestação (não-sindrômica ou sindrômica), a abordagem metodológica de diagnóstico e pesquisa genética se baseia em técnicas que permitem o estudo do genoma inteiro simultaneamente. Dentre estas, podemos citar as técnicas de cariótipo, microarranjos genômicos e o sequenciamento genômico paralelo massivo (genoma completo). Tais técnicas aperfeiçoaram a obtenção de diagnóstico genético pois permitem a detecção eficiente de alterações cromossômicas e variantes em genes conhecidos em grande parte dos casos, assim como levam à identificação de genes candidatos. Este incremento nas técnicas de diagnóstico molecular aumenta a taxa de diagnóstico, bem como permite o aconselhamento genético adequado para suas famílias (Rosenberg e col., 2006; Vissers e col., 2015; Wrigth e col, 2018).

A DI e outros distúrbios do neurodesenvolvimento têm mecanismos genéticos causativos em comum, que podem resultar em diferentes fenótipos devido a processos estocásticos durante os mecanismos de replicação celular, assim como eventos mutacionais ou epigenéticos, além do *background* genético de cada paciente e atuação de fatores ambientais. Genes relacionados a DI atuam em funções como controle da transcrição gênica, modificação proteica pós-traducional, remodelamento da cromatina, bem como têm ação direta no Sistema Nervoso Central, na neurogênese, migração neuronal e formação e transmissão de sinapses (revisão em Ellison e col., 2012; Vissers e col., 2015).

Embora a DI não tenha cura, diversas terapias são utilizadas para melhorar a qualidade de vida dos pacientes, direcionadas para os sintomas apresentados, como agitação e/ou agressividade, dificuldades de sono e de relacionamento.

Recentemente, alguns estudos vêm identificando intervenções terapêuticas que podem ser aplicadas, como reposição enzimática em casos de distúrbios metabólicos, ou reposição de receptores antagonistas de ácido gama-aminobutírico (GABA), como meio de amenizar alguns dos sintomas neuropsicomotores (Vissers e col, 2015).

I.2 Deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X

Durante os anos 90, ocorreu um grande número de estudos focados na associação entre DI e genes localizados no cromossomo X. Alguns fatores responsáveis por tal estímulo foram a maior frequência de DI em homens, diversas famílias exibindo DI com um padrão de herança ligado ao X, a percepção de que o cromossomo X poderia carrear um número desproporcional de genes expressos no sistema nervoso central, podendo estar relacionados a DI (Fieremans, 2016), assim como a descoberta da Síndrome do X Frágil, a causa mais comum de DI herdada (Ropers, 2010; Neri e col., 2018).

A expansão de trinucleotídeos CGG na região promotora do gene *FMR1,* causa a síndrome do X frágil, e tem frequência estimada de 1 em 1.500 e 1 em 2.500 nascimentos do sexo masculino e feminino, respectivamente, sendo considerada a causa mais frequente de DI herdada. A expansão das repetições do gene *FMR1* é altamente polimórfica, podendo ser classificada em 3 categorias: de 6 a 54 repetições é considerada normal, de 55 a 200 repetições é considerada uma pré-mutação, não causando o fenótipo da síndrome, mas estando mais propícia a futuras variações que aumentem seu tamanho, e acima de 200 é considerada uma mutação completa, resultando no fenótipo mutado de X frágil (Crawford e col., 2011; Santoro e col., 2011).

A DI reconhecidamente apresenta dimorfismo sexual, sendo diagnosticada com frequência 30% superior em homens (Fieremans e col., 2016). Em casos de DI moderada a grave, a razão de DI entre homens e mulheres seria de 4:1, enquanto nos casos mais leves essa razão chega a ser 9:1. As razões para tal

excesso de ocorrência em homens de casos leves ainda são incertas, mas foi proposto que seria o fato de que são hemizigotos quanto a genes localizados no cromossomo X e, portanto, irão sempre manifestar a condição para genes com padrão recessivo. Estima-se que a XLID (*X-linked intellectual disability* - Deficiência intelectual ligada ao cromossomo X) represente aproximadamente 5-10% dos casos em homens (Lubs e col., 2012), enquanto a DI de herança recessiva ligada ao cromossomo X é responsável por cerca de 8-12% desses casos, representando principalmente manifestações de grau moderado a grave (Ropers, 2008, 2010). Entretanto, Ropers e Hamel, 2005, assim como Mandel e Chelly, 2004, discutem que formas monogênicas de DI ligada ao cromossomo X, principalmente recessivas, explicariam menos de metade do excesso de DI moderada/grave em homens, e explicariam apenas uma pequena fração dos casos mais leves.

Outro fator proposto é o estado de mosaicismo funcional apresentado pelas mulheres em decorrência da inativação do cromossomo X, que pode minimizar a penetrância e expressividade de fenótipos com padrão dominante (Ropers, 2010). Além disso, em estudo realizado por Jacquemont e col, 2014, observou-se que mulheres com DI seriam portadoras de um número maior de variantes gênicas deletérias para a cognição em comparação a homens com DI, resultados que apoiam a hipótese de um modelo protetor no sexo feminino, no qual o limiar para manifestação da DI seria superior em mulheres, sendo necessário um conjunto maior de variantes deletérias para expressar o fenótipo.

Os dados mais recentes na plataforma Ensembl (Outubro, 2020) indicam que o cromossomo X possui 156,040,895 pares de bases, contendo 852 genes codificadores de proteínas, 667 genes não codificadores de proteínas e 891

pseudogenes. Diferentes estudos relatam números variáveis de genes do cromossomo X como causa de DI. Revisões mais recentes de Neri e col., 2018 e Ziats e col., 2019 listam 141 e 144 genes causativos de DI ligada ao cromossomo X, respectivamente. O *Greenwood Genetic Center* (GGC, https://www.ggc.org/;) (março/2022) lista um grupo de 160 genes relacionados à DI ligada ao cromossomo X, sendo 129 de DI sindrômica e 31 de DI não-sindrômica.

Cerca de 3-5% de todos os genes conhecidos do genoma humano estão localizados no cromossomo X, e até o momento ~8% desse total está relacionado com o fenótipo de DI. Tal percentual seria uma super-representação dentre todos os genes que causam DI (Inlow e Restifo, 2001; Gécz e col., 2009; Lubs e col., 2012; SysNDD https://sysndd.dbmr.unibe.ch/ março/2022). Em um estudo feito por Vicoso e Charlesworth, 2006, foi proposto que variantes benéficas são mais bem fixadas no cromossomo X do que nos autossomos pois serão sempre expressas em homens hemizigotos, mesmo tendo um padrão recessivo. Portanto o cromossomo X acumularia variantes benéficas em uma taxa maior que os autossomos, enquanto as variantes deletérias seriam mais acumuladas em autossomos. Assim, uma hipótese levantada seria a de que genes ligados ao X com seleção negativa estariam evoluindo mais lentamente do que os genes ligados ao X com seleção positiva. Tais achados poderiam explicar o acúmulo de genes com papel no desenvolvimento cerebral localizados no cromossomo X, pois estes teriam predisposição a sofrer seleção positiva, por serem essenciais para a evolução (Zechner e col., 2001; Vicoso e Charlesworth, 2006).

Cerca de 2/3 dos casos de DI ligada ao cromossomo X são classificados como não sindrômicos. No entanto, quanto mais pacientes forem identificados com

as variantes nos mesmos genes, mais fácil será reconhecer fenótipos específicos, ainda que sutis; com isso, a taxa de casos considerados não sindrômicos deve diminuir (Ropers e Hamel, 2005; Ropers, 2008). Já foi salientado que a distinção entre casos sindrômicos e não-sindrômicos pode ser artificial, uma vez que depende do nível de detecção de sinais fenotípicos (Ropers, 2010), assim como da intensidade ou expressividade desses sinais clínicos.

I.3 A inativação do cromossomo X e a deficiência intelectual

Estudos sobre DI com herança ligada ao X sempre foram mais focados em coortes masculinas pela maior representação de pacientes, devido à hemizigose quanto a genes do cromossomo X. Na mulher, com a presença de dois cromossomos X, o alelo normal pode ser suficiente para a função normal (Fieremans e col, 2016; Ziats e col, 2019).

A inativação do X é um fenômeno de compensação de dose gênica, pelo qual um dos cromossomos X em mulheres é inativado, levando a maioria dos genes nele localizados a exibir níveis de expressão similares entre homens e mulheres (Lyon, 1961; Wutz, 2011; Galupa e Heard, 2016). Tal processo ocorre no início do desenvolvimento embrionário feminino, cerca de 7-10 dias após a fertilização (Bittel e col., 2007), durante a fase de blastocisto, ocasionando o silenciamento epigenético de genes de um dos cromossomos X (Lyon, 1961).

Mesmo ocorrendo em fêmeas de diversos mamíferos, existem diferenças entre o processo de inativação do X em humanos e outras espécies; citaremos os camundongos como exemplo, pois são mais estudados. Em camundongos, a inativação é bifásica e imprintada, tendo início durante a fase de duas células do embrião, com escolha preferencial do cromossomo X paterno para sofrer a inativação. Durante a fase de transição mórula-blastocisto, as células do trofectoderma e do endoderma mantém seu status de inativação do cromossomo X paterno, enquanto o restante das células do organismo reativa seus cromossomos X paternos previamente inativados. Então, a inativação ocorre novamente durante a fase de diferenciação celular, de maneira aleatória, tendo

uma distribuição normal de qual cromossomo se encontra inativo (Kay e col., 1994; Cantone, 2017).

Em humanos, a inativação contém apenas uma etapa e se dá apenas na fase de blastocisto (Migeon, 1994; Fan e Tran, 2011; Sado e Sakagushi, 2013; Migeon, 2017). A escolha de qual cromossomo será inativado é aleatória e como o padrão de inativação segue uma distribuição normal, uma proporção média de 50% das células terá o X paterno inativo e 50%, o X materno inativo. Nos extremos da curva, o cromossomo materno ou o paterno são predominantemente inativos. Um desvio acima de >80% ocorre em cerca de 14% das mulheres da população normal (Amos Landgraf e col., 2006). Assim, como consequência da inativação aleatória do cromossomo X, o fenótipo das mulheres pode ser muito variável. Alguns fatores, como a idade, também podem afetar o padrão de inativação do cromossomo X, e desvios da inativação parecem ser mais frequentes entre mulheres idosas (Amos-Landgraf e col, 2006).

Para que a inativação do cromossomo X ocorra é necessária a presença da região do centro de inativação do X (XIC), localizada na região Xq13.2, segmento de 800kb a 1 Mb, em ambos os cromossomos X. XIC contém genes de RNA, incluindo o gene de controle da inativação do X (*XIST)*, não codificador de proteínas, cujo transcrito é específico do X inativo. O gene *XIST* codifica um RNA longo não codificador (lncRNA), que atua em cis, associando-se à cromatina ao longo do cromossomo que irá sofrer inativação, formando uma espécie de nuvem de condensação que o recobre, condensando-o em um corpúsculo heterocromático, chamado de corpúsculo de Barr. Essa condensação, ao final, ocasiona o silenciamento gênico na maior parte do cromossomo. Esse estado

inativo é mantido e estabilizado por mecanismos como metilação das ilhas CpG, a constante transcrição de XIST e a modificação de histonas. O Xi (cromossomo X inativo) e o Xa (cromossomo X ativo) possuem conteúdos diferentes de histonas, pois o Xi apresenta maior composição de histonas desacetiladas e variantes de outras histonas, e essas modificações acabam alterando suas expressões gênicas e acabam resultando na menor transcrição daquelas regiões. As histonas também passam por etapas de repressão, que resultam na remodelação da cromatina. (Lock e col., 1987; Heard e col., 1997; Csankovszki e col., 2001; Mietton e col., 2009; Morey e Avner, 2011; Migeon, 2016; Balaton e col., 2018; Galupa e Heard, 2018; Posynick e Brown, 2019).

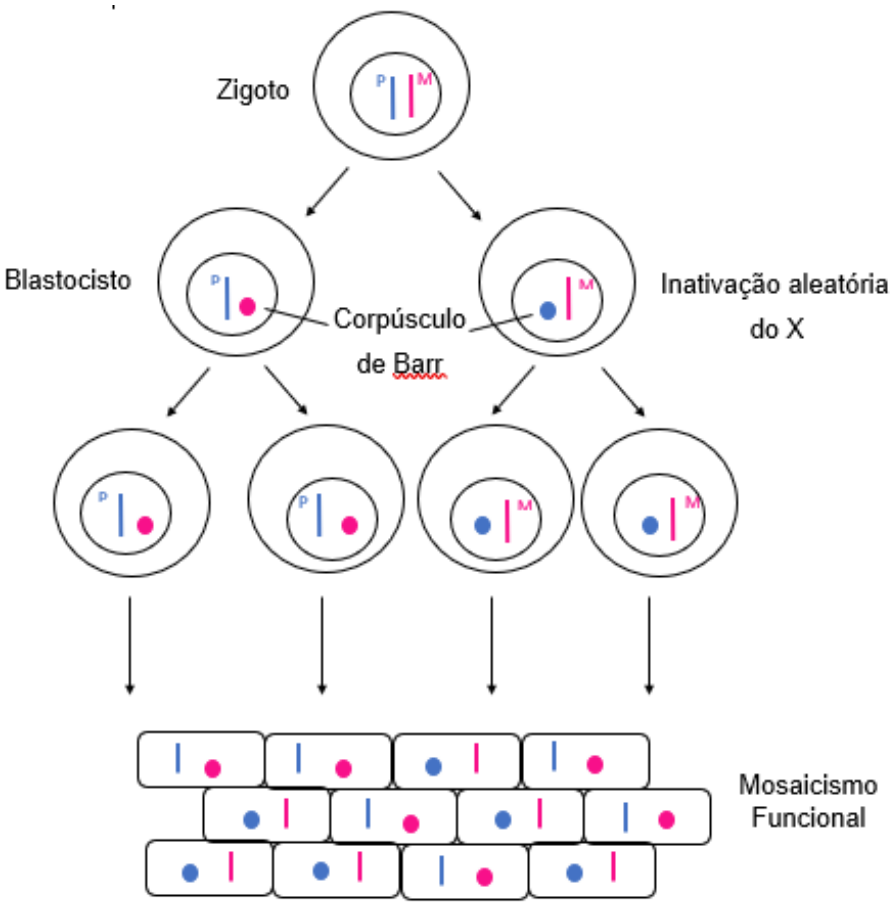
Imaginava-se que, uma vez inativado, o RNA *XIST* trabalharia sinergicamente com outras modificações adquiridas na cromatina para manter a estabilidade do estado inativo. Em um estudo feito por Brown e Willard (1994) foram feitos experimentos removendo genes de XIC de células híbridas de humanos e camundongos, com a observação de que a presença do gene *XIST* não seria necessária para a manutenção do estado inativo do X, apenas para o estabelecimento da inativação, como visto nas revisões de Yildirim e col. (2013) e Yang e col. (2011).

O cromossomo X é inativado por mecanismos epigenéticos, além da atuação do RNA não codificador *XIST*, ocorrem também alterações de metilação do DNA e modificação estrutural da cromatina (Balaton e col., 2018). De acordo com Boumil e Lee, 2001, o processo de inativação do cromossomo X pode ser dividido em cinco passos: Contagem, Escolha, Iniciação do Silenciamento, Estabelecimento e Manutenção. Tais passos são controlados por genes do XIC. Durante a fase de

Contagem, a célula quantifica o número de cromossomos X presentes de acordo com os conjuntos haplóides. Durante a fase de Escolha, todos menos um dos cromossomos X são escolhidos para sofrer o processo de inativação. O mecanismo de XIC garante que somente um cromossomo X permaneça ativo por núcleo diplóide, conhecido como regra n-1, mesmo em células com polissomia, como na síndrome de Klinefelter, que tem um Xi e um Xa, ou monossomia, como na síndrome de Turner, que tem um Xa). As fases restantes iniciam a inativação, estabelecem o cromossomo inativo, e o mantém inativado na célula parental e nas células filhas (Kay e col., 1994; Lyon, 1996; Lee e Jaenisch, 1997; Migeon, 2016).

A inativação do X é mantida durante o processo de mitose, tendo todas as células filhas com o mesmo padrão de inativação. No entanto, durante a oogênese, na meiose, o cromossomo X inativo é reativado e as marcas epigenéticas de sua inativação são apagadas. Portanto, o embrião tem 50% de chance de ter seus cromossomos X paternos, ou maternos, inativados (Kalantry, 2011; Fieremans, 2016; Strachan e Read, 2018; Posynick e Brown, 2019). A figura abaixo ilustra o processo de estabelecimento da inativação aleatória do cromossomo X.

Figura 1. Processo de estabelecimento e manutenção da inativação aleatória do cromossomo X.

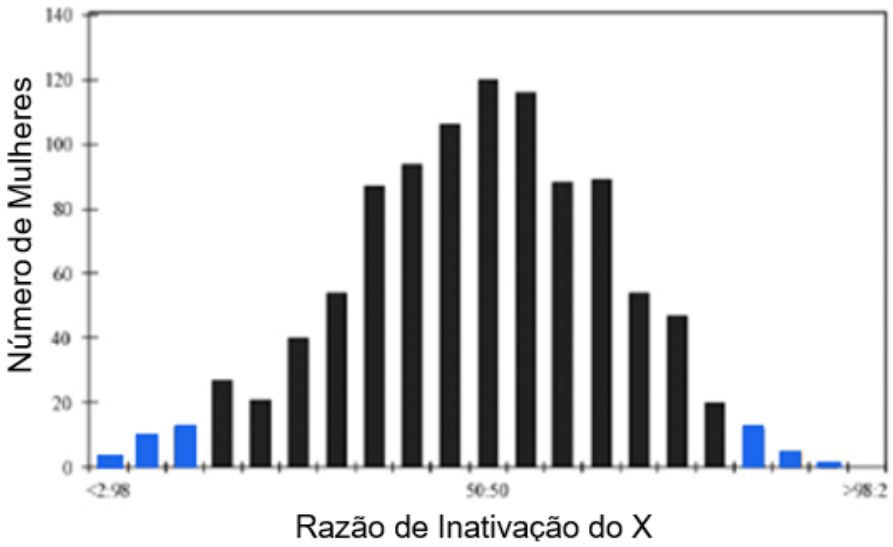


O processo em humanos tem início durante a fase de blastocisto, na qual se encontram ativos ambos os cromossomos X, tanto de origem paterna (indicado em azul, e com a letra “P”), quanto o de origem materna (indicado em rosa, e com a letra “M”). Em cada célula, um dos cromossomos X será selecionado aleatoriamente para sofrer a inativação - após estabelecida a inativação e condensação da cromatina desse cromossomo X inativo, a estrutura visualizada ao microscópio é denominada de Corpúsculo de Barr. Cada célula possuirá um cromossomo X ativo e um inativo e esse padrão de inativação será mantido e transmitido às células filhas durante o processo de divisão celular, resultando no mosaicismo funcional observado em mulheres.

A inativação do cromossomo X proporciona um estado de mosaicismo nas mulheres, com dois tipos celulares funcionalmente diferentes, um deles portando o

cromossomo X materno ativo e outro, o cromossomo X paterno ativo. Esse mosaicismo torna possível a expressão dos genes localizados em ambos os cromossomos. Em um estudo realizado, por Amos-Landgraf e col., em 2006, em 1005 mulheres da população geral (sendo 590 recém-nascidas e 415 adultas), foi observada a ocorrência de uma curva padrão normal em relação a qual cromossomo sofria inativação. Uma média de 25% das amostras tinha razão de inativação >70:30 ou <30:70; apenas 8% apresentavam um desvio >80:20 ou <20:80; e cerca de 1,8% tinham desvio de inativação >90:10 ou <10:90. Apenas 1,7% da amostra de mulheres adultas mostrou um desvio extremo na inativação ≥ 95:5 ou ≤5:95, enquanto um número ainda menor foi visto nas mulheres recém-nascidas, com 0,2%. Essa diferença entre mulheres é congruente com a hipótese de que ocorre o aumento do desvio com o avanço da idade em mulheres. O estudo concluiu que uma mulher da população geral, apresentando tal desvio extremo no padrão de inativação, possui probabilidades iguais de ser ou não portadora de uma anomalia no cromossomo X. Tal probabilidade deveria, portanto, ser investigada na família, no caso de doenças de herança ligada ao cromossomo X. A curva de distribuição encontrada por Amos-Landgraf e col., pode ser visualizada abaixo.

Figura 2. Curva de distribuição do padrão de inativação do cromossomo X.



Adaptado de Amos-Landgraf e col., 2006. No eixo X está indicada a razão de inativação do cromossomo X, enquanto no eixo Y, o número de mulheres. O padrão de inativação de 1.005 mulheres foi separado em 21 categorias (indicadas como colunas), variando entre <2:98 e >98:2, em incrementos de 5%. Foi visto que os valores seguem uma curva de distribuição normal, tendo a média em torno de 49:51 e a mediana em 50:50. Os grandes desvios de inativação se encontram em menor frequência, nos extremos da curva.

Caso um dos cromossomos possua um alelo mutado, a diferença na proporção em que esse cromossomo é inativado pode explicar o porquê de fenótipos distintos serem observados em mulheres com genótipos idênticos (Libert e col., 2010; Nussbaum e col., 2016). Adicionalmente, o cromossomo X com o alelo mutado pode ser predominantemente inativado por acaso. Em ambas as situações, a mulher heterozigota pode não manifestar o fenótipo ou manifestar de maneira mais branda (Fieremans e col, 2016; Ziats e col, 2019).

Em algumas mulheres, no entanto, o padrão de inativação final do cromossomo X pode resultar da seleção contra células que tenham ativo o

cromossomo X portador de um alelo mutante, ficando preferencialmente ativo o cromossomo X com o alelo normal (Muers e col., 2007). Por exemplo, cerca de 30% das mulheres normais portadoras de variantes em genes do cromossomo X que causam DI em homens apresentaram desvios extremos da inativação do cromossomo X (Plenge e col., 2002).

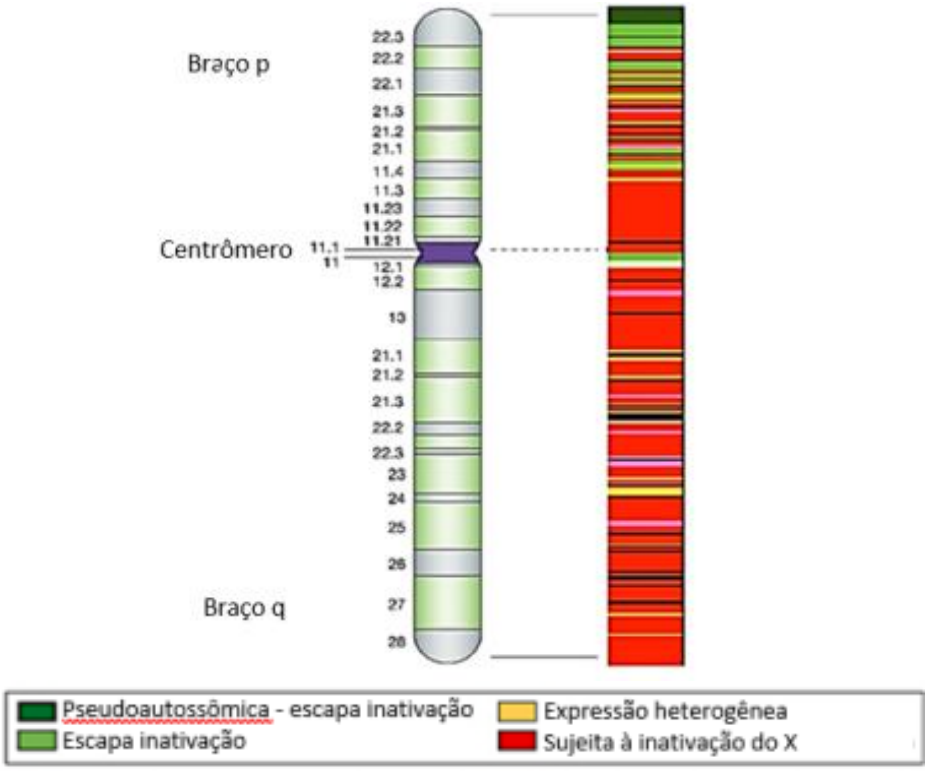
É importante notar que não são todos os genes do cromossomo X que são inativados. Os genes mapeados nas regiões pseudoautossômicas (PAR) dos cromossomos X e Y não são sujeitos à inativação. No total, cerca de 15% dos genes, localizados na PAR e em outras regiões do cromossomo X, escapam à inativação, podendo ser expressos bialélicamente, sendo chamados de constitutivos, enquanto outros 10% sofrem inativação parcial, ou seja, são expressos em diferentes proporções, a depender da célula e/ou do tecido avaliado, sendo chamados de facultativos (Wutz, 2011; Fieremans e col., 2016; Giorgetti e col., 2016; Strachan e Read, 2018; Balaton e col. 2018; Ziats e col., 2019). Esse cenário traz complexidade à manifestação fenotípica de genes ligados ao X em mulheres.

Diversas hipóteses já foram levantadas em relação a existência de genes de escape, uma delas sugere que determinados genes localizados nas PAR teriam a capacidade de escapar a inativação pela sua homologia com genes funcionais localizados no cromossomo Y (Slavney e col., 2015; Migeon, 2016). Uma segunda hipótese, criada a partir de estudos feitos por Giorgetti e col. (2016), sugere que os genes de escape surgem devido a formação de TADs (domínios de associação topológica), que modulam a cromatina local permitindo maior acesso à mesma e o escape de transcrição. O X inativo não apresentava TAD, no entanto, em regiões

com genes de escape, foram identificadas TADs em regiões altamente conservadas (Giorgetti e col., 2016; Posynick e col., 2019).

Na figura abaixo estão ilustradas as regiões do cromossomo X de acordo com o *status* de inativação do cromossomo X.

Figura 3. Cromossomo X e suas regiões de acordo com o padrão de inativação de seus genes.



Adaptado de Spatz e col., 2004. As faixas indicadas em verde mais escuro indicam as regiões pseudoautossômicas que escapam à inativação, assim como as regiões em verde claro, enquanto as regiões em amarelo indicam segmentos que sofrem inativação parcial; as regiões vermelhas são aquelas sujeitas à inativação.

Mesmo antes da identificação dos diversos mecanismos atuantes na inativação do X, Lyon em 1998 (Revisão em Balaton, 2018; Posynick e Brown, 2019) propôs que hipoteticamente existiriam elementos denominados *waystations*, que contribuiriam para o escape de genes da inativação do X. Lyon também supôs

que sequências LINE (longos elementos nucleares intercalados) seriam um possível exemplo de *waystation*, pois estariam presentes em maior frequência no cromossomo X do que nos autossomos. W*aystation* estariam mais enfraquecidas perto de genes que escapam à inativação (*escapee*) e mais enriquecidas perto de genes que sofrem inativação (*subject*). Tais *waystation* aumentariam o alcance do sinal de inativação ao longo do cromossomo X, além de recrutar o complexo PRC2 (complexo repressivo polycomb), relacionado à modificação da cromatina e silenciamento de genes (Balaton, 2018; Posynick e Brown, 2019).

As alterações no padrão de inativação podem ocorrer por aleatoriedade ou por desvio primário ou secundário. A desvio primário ocorreria antes do silenciamento do cromossomo escolhido ocorrer. Já o desvio secundário ocorreria após a inativação, sendo normalmente relacionada a células que apresentam uma anomalia cromossômica ou variante relacionada ao ciclo celular e a proliferação embrionária ou tecidual (Fieremans e col., 2016; Morey e Avner, 2011). Provavelmente o desvio secundário é a causa mais comum de desvios grandes do padrão de inativação do X (Fieremans e col., 2016). Células que têm o cromossomo X mutado ativo podem ter desvantagem em seu crescimento, transcrição e reparo do DNA, estando assim menos representadas no organismo adulto (Amos-Landgraf e col., 2006; Muers e col., 2007; Morey e Avner, 2011). O desvio causaria uma vantagem ao organismo pelo fato de selecionar negativamente células com o cromossomo mutado ativo, favorecendo assim as que possuem o cromossomo sem a variante como ativo.

Portanto, o desvio da inativação do cromossomo X pode resultar na manifestação fenotípica em mulheres heterozigotas por diversos mecanismos:

(a) Processo estocástico, resultado da própria curva de distribuição, tendo uma chance ao acaso de que o cromossomo X portador de uma alteração fique preferencialmente ativo, causando a manifestação do fenótipo;

(b) Avanço da idade; nesse caso, um cromossomo X mutado preferencialmente ativo só teria expressão fenotípica se fosse em doença de início tardio. Ainda não se sabe o motivo do aumento do desvio em decorrência do avanço da idade da mulher, mas estudos relatam que pode ser devido à perda clonal estocástica das células selvagens e/ou de células tronco dessas mulheres, assim como possíveis variantes ou SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) “escondidos” que afetem a função de genes ligados ao X, resultando na sua gradual seleção gênica e desvantagem de crescimento;

(c) Seleção positiva de cromossomo X com mutação. Na seleção positiva, um dos cromossomos X possui variantes patogênicas que levam a uma vantagem de crescimento por exemplo, como nos quadros de adrenoleucodistrofia, resultando nestes casos em manifestação fenotípica. A seleção negativa, ao contrário, favorece o cromossomo selvagem, não resultando em uma manifestação do fenótipo (Sharp e col., 2000; Van den Veyver, 2001; Amos Landgraf, 2006; Knudsen e col., 2007; de Hoon e col., 2015; Busque e col., 2016; Gribnau e Barakat, 2017; Shvetsova, 2018).

Em um estudo feito por Ziats e colaboradores (2019), foram analisados 144 genes conhecidos em mulheres portadoras de variante, associados a DI ligada ao cromossomo X. Neste estudo, 31,3% dos genes com variante (45) não

apresentavam evidência de expressão fenotípica nas mulheres portadoras; 2,1% (3) tinham seu *status* de expressão fenotípica desconhecido, em 61,1% (88) dos genes foi observada expressão do fenótipo e déficit cognitivo, enquanto em 5,6% (8) havia expressão fenotípica de algum sinal clínico associado ao gene, porém sem comprometimento cognitivo. Na revisão dos autores, em 16,6% (24) dos genes, desvio extremo (90:10) de inativação do X foi observado em 90% das mulheres portadoras de variantes em genes XLID; 37,5% (54) genes apresentavam padrão de inativação do X variável; 22,9% (33) deles tinham predominantemente padrão de inativação randômica, enquanto em 22,9% (33) o padrão de inativação do X não foi investigado. Adicionalmente, 24,3% (35) dos genes avaliados não são expressos em leucócitos e 11,1% (16) apresentavam escape da inativação do X. Por fim, os autores ressaltam que a maior frequência de desvio extremo de inativação do cromossomo X em mulheres portadoras de variantes em genes XLID apoiaria a hipótese de que o desvio está associado ao padrão de manifestação fenotípica das mulheres portadoras (normal). Um resumo de alguns achados deste estudo pode ser encontrado na **Tabela 2** abaixo.

Tabela 2. Genes relacionados à deficiência intelectual ligada ao cromossomo X e respectivos padrões de inativação do X em mulheres heterozigota quanto às variantes, referente a análise de amostras de sangue periférico (Tabela adaptada de Ziats e col., 2019).

Padrão de Inativação do X	Principais XLID genes
Genes sujeitos à inativação *Desvio extremo de inativação (90:10) (n=24, 16%)*	*HDAC6 HDAC8 RLIM FTSJ1 DKC1 SMC1A/SMC1L1 RNF113A HCFC1 ACSL4 SRPX2 KLF8 OGT KLHL15 MTM1 ZDHHC15 RAB40AL HPRT SLC25A5 ZMYM3 SHROOM4 IDS CUL4B FANCB UBE2A*
Genes sujeitos à inativação *Padrão aleatório de inativação (n=54, 37,5%)*	*ALG13 PDHA1 CNKSR2 FAM50A ZDHHC9 MECP2 PCDH19 NDUFA1 RBM10 NXF5 GDI1 AP1S2 PLP1 SLC16A2 KIAA2022 FGD1 CLCN4 THOC2 SYP SLC6A8 OTC CLIC2 NDP ZNF711 SLC9A7*
Genes que escapam à inativação (n=16, 11,1%)	*NEMO OFD1 DDX3X MSL3 SMC1A/SMC1L1 USP9X PCDH19 AP1S2 IQSEC2 KDM5C KDM6A SSR4 EIF2S3 HS6ST2 MAOA TAF1*
Genes não expressos em sangue (n=35, 24,3%)	*MECP2 DLG3 SRPX2 PCDH19 CLCN4 DCX GRIA3 IL1RAPL1 KIAA2022 MID1 NHS OCRL1 SYN1 ARX DMD FRMPD4 NLGN4 PTCHD1 NDP KLF8 ZDHHC15 AGTR2 MID2 NLGN3 SLC16A2 SLC9A7*

Hipoteticamente, desvios extremos de inativação do cromossomo X em mulheres podem estar relacionados a quadros clínicos causados por variantes em genes localizados no X, inclusive em casos de DI (Amos-Landgraf e col., 2006; Fieremans e col., 2016). Manifestações de condições clínicas podem ser derivadas desse desvio significativo do padrão de inativação, inclusive de doenças ligadas ao cromossomo X ou anomalias citogenéticas ligadas ao mesmo; no entanto a presença de tais desvios extremos não necessariamente resulta na expressão de um fenótipo alterado (Amos-Landgraf e col., 2006).

Em um estudo, realizado por Fieremans e col., (2016) foi analisado o padrão de desvio extremo de inativação do X apresentado por mulheres com DI esporádica e sindrômica. Em uma coorte de 288 mulheres, 52 apresentavam desvio >80:20, e 22 apresentavam um desvio >90:10. Em 10 das 22 mulheres com desvio extremo (90:10), foram identificadas variantes patogênicas tanto no cromossomo X (9), quanto nos autossomos (2), estando todas localizadas em genes já conhecidos relacionados a DI. Sete das 11 variantes identificadas eram *de novo,* enquanto as outras três não tiveram sua origem parental avaliada, por ausência de amostra de DNA dos genitores. Em dez variantes identificadas em genes ligados ao X, três delas estavam localizadas no cromossomo X inativo, uma delas estava mapeada no cromossomo X ativo, enquanto nas outras 6 não foi possível determinar. De acordo com os pesquisadores, desvios extremos de inativação (90:0) seriam indicadores de alteração genética localizada no cromossomo X, devido ao aumento (quase o dobro) de mulheres com DI apresentado desvios extremos quando comparadas ao grupo controle.

Outro aspecto é que desvios extremos de inativação do X em heterozigotas podem contribuir para a gravidade do fenótipo. Se o desvio favorecer o alelo selvagem, menores serão as chances de desenvolver sintomas ou de manifestar fenótipos alterados; no entanto, se o desvio favorecer o alelo mutado, seus fenótipos serão agravados (Van den Veyver, 2001; Migeon, 2006; Fieremans e col., 2016), embora a correlação entre fenótipo e inativação do X em mulheres portadoras de variantes em genes XLID não seja muito clara (Ziats e col., 2019).

A seleção preferencial de um dos cromossomos X pela presença de uma variante patogênica em heterozigose foi observada em genes sujeitos à inativação,

como o gene da distrofina ou o *FMR1*, ou genes de escape, como o *DDX3X*. A presença de uma variante nesses genes pode causar um desvio de inativação favorecendo o cromossomo selvagem. Portanto, a manifestação de sinais clínicos da Síndrome do X Frágil em mulheres, por exemplo, apresenta diferentes expressões fenotípicas de acordo com o padrão de inativação do cromossomo X portador da variante. Quanto maior for o desvio de inativação, menor será a gravidade fenotípica. Assim, a maioria das mulheres portadoras apresentam apenas formas mais brandas da condição ou são assintomáticas. (Richards e col., 1990; Matthews e col., 1995; Van den Veyver, 2001; Blok e col., 2015; Fieremans, 2016; Vianna e col., 2020).

No caso do gene de escape *DDX3X,* mapeado em Xp11.4, possível fator causativo em cerca de 1%-3% dos casos de DI idiopática, este poderia desencadear a expressão do fenótipo independentemente de estar localizado no cromossomo X ativo ou inativo. Em um estudo realizado por Snijders Blok e col. (2015) (revisado por Fieremans e col., 2016), foi relatado que 46% de sua coorte composta por mulheres com variantes de novo deletérias em *DDX3X* apresentavam desvio extremo de inativação (>95:5), não tendo sido observada uma correlação significativa entre a gravidade do fenótipo e o desvio de inativação apresentado pelas pacientes afetadas. Wang e colaboradores (2018) relatam que variantes no *DDX3X* são uma causa frequente de DI em mulheres, e suas variantes causais normalmente são de perda de função.

Uma variante ou disfunção no complexo de inativação do X também poderia resultar em um desvio extremo não randômico, como por exemplo pela presença de uma variante patogênica em *XIST*, ou em sua região antisenso, *TSIX*, alterando

a expressão do mesmo. Se um dos alelos de *XIST* sofre uma mutação ou perde sua função, o cromossomo que contém aquele alelo permanecerá ativo, pois seu mecanismo de inativação não estará funcional. Nestes casos, o cromossomo X preferencialmente ativo não seria em princípio portador de nenhuma variante patogênica. Essas variantes são pouco descritas/identificadas, portanto pouco se sabe sobre seus desfechos. A expressão de um fenótipo alterado só irá ocorrer se houver outra alteração genética, localizada no cromossomo X ativo com as variantes de *XIST* (Nesterova e col., 2003, Migeon, 2007; revisado por Fieremans e col., 2014; Gribnau e Barakat, 2017; Migeon, 2020).

Uma alteração estrutural no cromossomo X poderia influenciar seleção celular negativa deste cromossomo desbalanceado, favorecendo a sobrevivência de células com inativação do mesmo; essa seleção diminui a expressão fenotípica das anomalias cromossômicas sexuais em mulheres, quando em comparação com as anomalias autossômicas.

No caso de translocações entre o cromossomo X e um autossomo, devemos considerar duas vertentes, uma envolvendo translocações equilibradas e outra considerando translocações não equilibradas. Se ocorrer uma translocação equilibrada, ocorre uma seleção favorecendo o cromossomo X translocado como ativo e o cromossomo X normal seria preferencialmente inativado, na maioria das células, em cerca de 95% dos casos (Fieremans e col., 2016). A seleção ocorreria para evitar a inativação de segmentos autossômicos, o que seria muito mais prejudicial ao organismo, podendo até ser incompatível com a vida. No caso de translocações entre o cromossomo X e um autossomo, a inativação do cromossomo X pode chegar a afetar a porção autossômica, o que indica que tanto

os genes de X quanto genes autossômicos são susceptíveis a regulação pela inativação do X (Disteche, 1995; Berletch e col., 2010). Nestes casos de translocação equilibrada, a mulher só irá expressar o fenótipo da DI se a translocação tiver pontos de quebra em genes relacionados a DI ou se houver a presença de outra variante no cromossomo X preferencialmente ativo. Um exemplo seria uma translocação com pontos de quebra no gene da distrofina, sendo normalmente esse o fator causativo da ocorrência de casos raros de manifestação fenotípica de DMD (Distrofia muscular de Duchenne) em mulheres. Já a translocação não equilibrada possui um padrão de inativação variável, dependente do segmento do autossomo que é translocado para o cromossomo X e de seu tamanho. A expressão do fenótipo nesse caso vai resultar da duplicação ou deleção de segmentos cromossômicos resultantes da translocação (Van den Veyver, 2001; Fieremans e col., 2016; Gribnau e Barakat, 2017; Migeon, 2020; Vianna e col., 2020).

Já no caso dos rearranjos intra-cromossômicos, como deleções e duplicações, o cromossomo X alterado é preferencialmente inativado, fazendo com que a mulher não expresse fenótipo, a princípio. No entanto, ela pode vir a expressar o fenótipo se a alteração afetar um gene de escape, ou se a mulher tiver uma segunda variante, localizada no cromossomo X ativo. Em raríssimos casos, uma mulher pode ser portadora de variantes deletérias diferentes, presentes uma em cada cromossomo X, fazendo com que o processo de inativação acabe favorecendo uma das variantes em detrimento da outra, e resultando na expressão de uma das variantes e seu fenótipo alterado em ambos os casos. Foram reportadas em um estudo de Fieremans e col., (2014) duas pacientes de DI, portadoras de duplicações no gene *MECP2* localizadas em seus cromossomos X

ativos, sendo proposta a presença de uma variante adicional, mais prejudicial, no cromossomo inativo, sendo esta a responsável pelo desvio da inativação (Fieremans e col., 2014, revisado em Vianna e col., 2020).

Um exemplo de exceção para os casos de deleção seria do quadro de adrenoleucodistrofia. Nessa condição ocorre seleção positiva, na qual as células com o cromossomo X mutado apresentam uma vantagem de crescimento, que se manifesta ao longo do tempo. Ao envelhecerem, as mulheres passam a apresentar maior desvio de inativação do X, com manifestação do fenótipo da doença. Essa é a única doença conhecida ligada ao cromossomo X que apresenta vantagem seletiva a favor da variante deletéria (Gribnau e Bakarat, 2017; Migeon, 2020).

Um outro modelo proposto foi por Fieremans e col., (2016) foi o do modelo *two-hits*, no qual há a presença de duas variantes em dois genes diferentes, podendo estar localizados no cromossomo X ou nos autossomos. Uma das variantes seria responsável pela DI e a outra pelo desvio da inativação, sendo independentes ou correlacionadas entre si, e a expressão fenotípica da DI seria uma consequência do desvio de inativação causado pela primeira variante.

Contrário aos casos de adrenoleucodistrofia, a maioria das condições ligadas ao cromossomo X apresentam uma vantagem de crescimento ou seleção preferencial do cromossomo X selvagem. Como visto por Muers e col., (2007) a Síndrome ATR-X (OMIM #301040) é causada pela mutação no gene *ATRX*, resultando em homens afetados por DI profunda. O estudo identificou em mulheres portadoras da mutação um padrão de desvio extremo de inativação do cromossomo X em diversos tecidos, ocorrendo seleção em favor do cromossomo X com o alelo não mutado (selvagem), o que resulta em fenótipo normal. Tal estudo demonstrou

a correlação entre desvio de inativação e um fator causativo presente no cromossomo X, atuando como um fator protetor ao efeito deletério da mutação.

Diversos estudos são realizados, globalmente, sobre o padrão de inativação do cromossomo X e sua relação com a DI ligada ao X em mulheres. Um exemplo de tais estudos, na população brasileira, seria do grupo de Vianna e col., (2020). A coorte do estudo foi composta por 53 casos esporádicos de mulheres afetadas por DI idiopática sindrômica. Desvio extremo de inativação foi detectado em sete das pacientes, representando cerca de 13% da coorte, significativamente maior em comparação ao estudo de Amos-Landgraf e col., (2006), que identificou apenas 1,8%, ou até mesmo em relação a um estudo prévio feito pelo grupo em mulheres da população normal, que não identificou nenhum caso de desvio extremo (Borges, 2018). As sete pacientes com desvios extremos de inativação do trabalho de Viana e colaboradores foram avaliadas; dois rearranjos estruturais foram detectados em duas pacientes, sendo uma deleção em um autossomo e uma translocação não equilibrada (X:2). Nas demais, o sequenciamento completo de exoma identificou em quatro pacientes variantes provavelmente associadas a DI ligada ao X, sendo dois genes de escape (*NLGN4X, USP9X, HDAC8* e *TAF1).* Na paciente restante foi identificada uma variante de mudança de nucleotídeo afetando o gene *DLV1*, mapeado no cromossomo 1. Dentre as cinco variantes genéticas encontradas ligadas ao X, em todos os casos ocorreu inativação preferencial do cromossomo paterno. Foram realizadas investigações de origem parental, portanto todas as variantes possivelmente causativas do quadro de DI identificadas foram consideradas raras, possivelmente *de novo* e patogênicas. Ainda neste estudo, a identificação de um desvio de inativação em uma paciente portadora de variante relacionada a DI autossômica (gene *DVL1,* cromossomo 1) sugere que o desvio do

padrão de inativação ocorreu aleatoriamente; alternativamente, poderia existir uma variante causal ligada ao X ainda não identificada. O artigo ressalta como o estudo do desvio de inativação do X é uma ótima abordagem metodológica para o aumento do conhecimento dos mecanismos subjacentes à DI ligada ao X em mulheres.

O teste molecular mais utilizado para a detecção do padrão de inativação do cromossomo X é o estudo de metilação de polimorfismo no gene de receptor androgênico humano (*AR*) (Allen e col., 1992), mapeado em Xq12 (chrX:67544021-67730619, GRCh38). O gene *AR* possui uma região exônica altamente polimórfica com repetições de trinucleotídeos CAG, sendo esse o foco desse teste molecular. Os alelos inativos estarão metilados e, portanto, não serão digeridos pelas enzimas HpaII ou Hhal, sensíveis à metilação, enquanto os alelos ativos estarão não metilados e sofrerão a digestão. Apenas os alelos metilados serão amplificados pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Tal diferença entre alelos pode ser quantificada pela altura/área de seus picos (Allen e col., 1992; Bittel e col., 2007).

Tais testes moleculares normalmente utilizam amostras de sangue periférico, ou mucosa oral, para análise do padrão de inativação. No entanto, existe a dúvida sobre a representatividade dessas amostras em relação a outros tecidos, principalmente do tecido cerebral, nos casos de DI. Em um estudo feito por Bittel e col., 2008, foram avaliados 34 diferentes tecidos de 26 mulheres, entre as idades de 20 semanas gestacionais e 82 anos de idade (280 amostras no total, tendo em média 11 tipos de tecido por paciente), pelo uso do estudo de metilação de polimorfismo do gene *AR* para identificação do padrão de inativação de cada amostra. Os autores então calcularam o desvio padrão entre as amostras de cada

paciente; ao comparar os tecidos sanguíneo e do baço, verificaram que o padrão era similar ao encontrado no cérebro, com uma diferença de ≤10%. Tais resultados indicam que mulheres apresentam altos níveis de concordância entre o padrão de inativação do cromossomo X de tecidos do sistema nervoso central e hematopoiéticos, assim como entre tecidos hematopoiéticos e diversos outros tecidos, como pele, pulmões, fígado e músculos. A maior discrepância foi observada em mulheres com idade mais avançada. Como relatado por de Hoon e col. (2015), o uso de amostras de mucosa oral também seria uma alternativa viável, pois em suas análises foi verificado que a mucosa oral teria uma maior correlação do padrão de inativação do X com tecido cerebral do que o tecido sanguíneo. Adicionalmente, as amostras de mucosa oral podem ser obtidas de modo não invasivo, portanto os autores a consideram o melhor e mais conveniente método para investigação do padrão de inativação do cromossomo X.

II. OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo investigar se há frequência aumentada de desvio extremo de inativação do cromossomo X em mulheres com DI idiopática e pesquisar a presença de variantes patogênicas no cromossomo X nos casos com desvios extremos.

II.1 Objetivos específicos

a) Avaliar o padrão de inativação do cromossomo X em mulheres com DI idiopática pelo estudo da metilação dos alelos do gene *AR*;

b) Determinar a frequência de desvios extremos de inativação do cromossomo X (>90:10) nesse grupo;

c) Em casos com desvio extremo de inativação, investigar a presença de mutações no cromossomo X por sequenciamento de exoma completo.

III. CASUÍSTICA

O grupo estudado foi composto por 194 mulheres com DI (> 5 anos) e/ou atraso global de desenvolvimento (< 5 anos)idiopáticos. O critério de inclusão foi a existência de amostras de DNA genômico de qualidade, remanescentes de exames genéticos previamente realizados.

Sessenta mulheres haviam sido previamente avaliadas no Serviço de Aconselhamento Genético do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, a maioria delas com exame prévio de cariótipo e teste molecular para síndrome do X Frágil, com resultados negativos. Cento e trinta e quatro mulheres são pacientes que foram encaminhadas especificamente para investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por CMA. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP, Parecer 4.214.168 de 14 de agosto de 2020.

IV. PACIENTES E MÉTODOS

As amostras de DNA genômicas haviam sido previamente obtidas de linfócitos de sangue periférico de pacientes do sexo feminino para exames de diagnóstico genético no Laboratório de Genética Humana (LGH), do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. A concentração e a qualidade das amostras genômicas foram avaliadas pelo uso de NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). As amostras que não possuíam concentração adequada ou estavam com alto grau de impurezas foram purificadas e então quantificadas novamente.

IV. 1 Pesquisa do padrão de inativação do cromossomo X

A investigação do padrão de inativação do cromossomo X foi realizada por meio da análise da metilação do gene *AR (Androgen Receptor)*, localizado em Xq12 (GRCh38:chrX:67544021-67730619), que apresenta polimorfismo do número de repetições do trinucleotídeo CAG no éxon 1 (Allen e col.,2002). O gene *AR* é membro de uma superfamília de receptores de esteroides e possui, em seu exon 1, um número variável de repetições CAG, traduzida em uma cadeia de poliglutaminas de comprimento variável, no domínio aminoterminal de transativação da proteína. Além de a repetição CAG ser altamente polimórfica (heterozigose de 0,9), existe, próximo a ela, um sítio de restrição das enzimas HpaII e Hhal, que se encontra metilado no X inativo. Como tais enzimas são sensíveis à metilação, serão clivados apenas sítios que se encontram desmetilados, ou seja, aqueles localizados no cromossomo X ativo. Dessa maneira, pode-se determinar o

padrão de inativação do cromossomo X. Os *primers* que amplificam a repetição CAG do gene AR (Allen e col., 1992) flanqueiam o sítio de restrição da enzima, o que impede que os alelos digeridos pela enzima HpaII sejam amplificados. Isso permite a determinação do padrão de inativação do cromossomo X, a partir da análise comparativa dos alelos amplificados antes e após a digestão com a enzima sensível à metilação.

Para cada amostra, 1.000 ng de DNA genômico foram digeridos com 10 U da enzima HpaII (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), em volume final de 20 µl, overnight (18h), a 37ºC e 1.000 ng de DNA foram incubados em tampão. Após o período de incubação, as amostras foram mantidas em banho-maria a 65ºC por 10 minutos, para ocorrer neutralização da enzima.

A Tabela 3 mostra o protocolo padrão seguido durante a realização da digestão do DNA pelas enzimas Hpall ou Hhal.

Tabela 3. Protocolo para realização da digestão do DNA.

Registro	DNA 500ng/µL	H_20	BSA 100x	Buffer 10x	Hpall ou Hhal	Volume Final
Amostra não digerida	*	**	0.2µL	2 µL	-	20 µL
Amostra digerida	*	**	0.2 µL	2 µL	2 µL	20 µL

*As quantidades de DNA a serem submetidas a digestão dependem da concentração do DNA.

**As quantidades de H_20 a serem adicionadas dependem da quantidade de DNA que foi adicionado, para o volume final de 20 µL.

Cerca de 300 ng de DNA genômico digerido e não digerido foram amplificados por PCR, em volume final de reação de 30 µL, contendo Tris 300 mM (pH 8,5), Hepes 100 mM, MgCl 25 mM, (NH4)2SO4 100 mM, dNTP 200 µM, 15 pmoles de primers forward e reverse e 1 U de Taq polimerase (Invitrogen). Uma amostra de DNA de homem normal foi utilizada como controle da atividade enzimática.

O programa do termociclador consistiu em uma primeira etapa em que o primeiro ciclo teve temperatura de 94ºC por 1 min, de 69ºC por 30 s e 72ºC para a extensão, seguido de 13 ciclos em que a temperatura de hibridação desceu 0,5ºC por ciclo, até atingir a temperatura de 62ºC.

A segunda etapa consistiu em 16 ciclos com temperatura de desnaturação de 94ºC, hibridação de 62ºC e extensão de 72ºC, seguidos de extensão final a 72ºC por 20 min. O programa de ciclos do PCR utilizado foi adaptado de Allen e col. (1992) (**Tabelas 4 e 5**).

Tabela 4. Protocolo da reação de PCR.

Reagente	Volume
H_20	8,2µL
Buffer 10x	3µL 1x
$MgCl_2$ 50mM	1,5µL 2.5mM
dNTP 2,5mM	3µL 250µM
Primer AR-F 30µL	1,5µL
Primer AR-R 30 µL	1,5µL
DMSO 100%	3µL 10%
Taq 5U	0,3µL 1,5U
DNA	8µL
Volume Final	**30µL**

Tabela 5. Ciclos da reação de PCR.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
01	95ºC	5min	1x
02	95ºC	45seg	1x
03	60ºC	30seg	28x
04	72ºC	30seg	1x
05	72 ºC	5min	1x
06	4ºC	∞	

A amplificação da sequência que contém o polimorfismo CAG foi feita pelo uso dos *primers* primer 1, 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCTCAT-3'; and primer 2, 5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' (Allen e col., 1992).

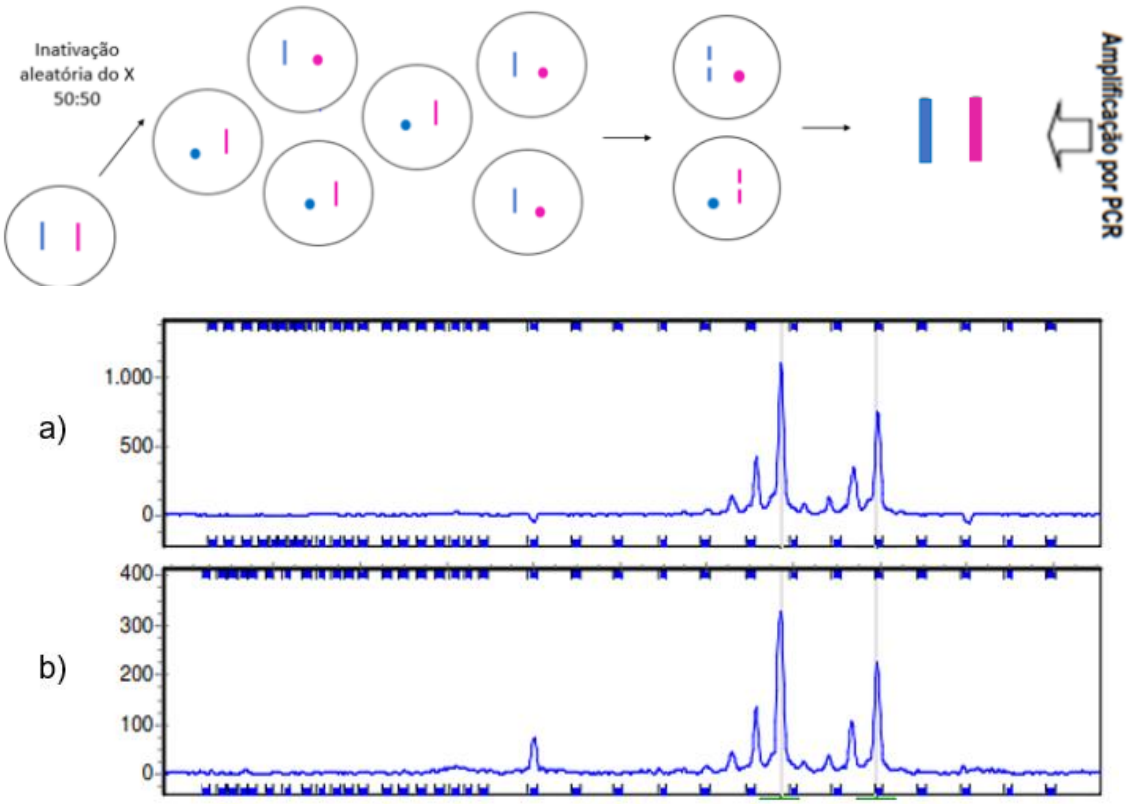
Após a reação de PCR, as amostras foram diluídas 60 vezes em água Milli-Q. A eletroforese foi realizada no analisador ABI 3730 (*Applied Biosystems*), utilizando 1 µL da amostra diluída, 0,1 µL de Liz 550 e 9 µL de formamida. O reagente LIZ serve para dimensionamento dos fragmentos de DNA *(sizing),* e a formamida Hi-Di serve para ressuspender a amostra. A cada tubo foi adicionado 9µL do mix e 1µL do DNA diluído, tendo um volume final de 10µL.

Para análise foi utilizado o software *GeneMarker*. O desvio de inativação foi quantificado de acordo com a relação entre a altura do pico do menor alelo, pela soma dos picos dos dois alelos. Para correção da amplificação preferencial dos alelos menores, valores para o DNA digerido foram normalizados com os do DNA não digerido, de acordo com a fórmula: (phd1/phu1) / (phd1/phu1) + (phd2/phu2), em que phd1 é a altura do pico do menor alelo após digestão, phd2 é a altura do pico do maior alelo após digestão, phu1 é a altura do pico do menor alelo não digerido, e phu2 é a altura do pico do alelo maior não digerido (Bittel e col., 2008).

Em cada experimento foram utilizadas duas amostras controle, negativo e positivo. A amostra de DNA masculino serve como controle da digestão, pois no único cromossomo X sempre ativo, o sítio de restrição está desmetilado e, portanto, após a digestão enzimática (Hpall ou Hhal), não se obtém produto de amplificação. A amostra de DNA controle feminino é de uma mulher, previamente investigada, que tem desvio total de inativação (100:0). Quando o teste de uma mulher revelou desvio total de inativação, realizou-se repetição do experimento para confirmação.

A **Figura 4** esquematiza o padrão de inativação em que cerca de 50% dos alelos paternos e 50% dos alelos maternos estão inativos. De acordo com a inativação aleatória do cromossomo X, as mulheres se distribuem na população segundo uma curva normal (ver Amos-Landgraf e col, 2006). Assim o padrão 50:50 é o mais frequente, mas desvios extremos ocorrem ao acaso.

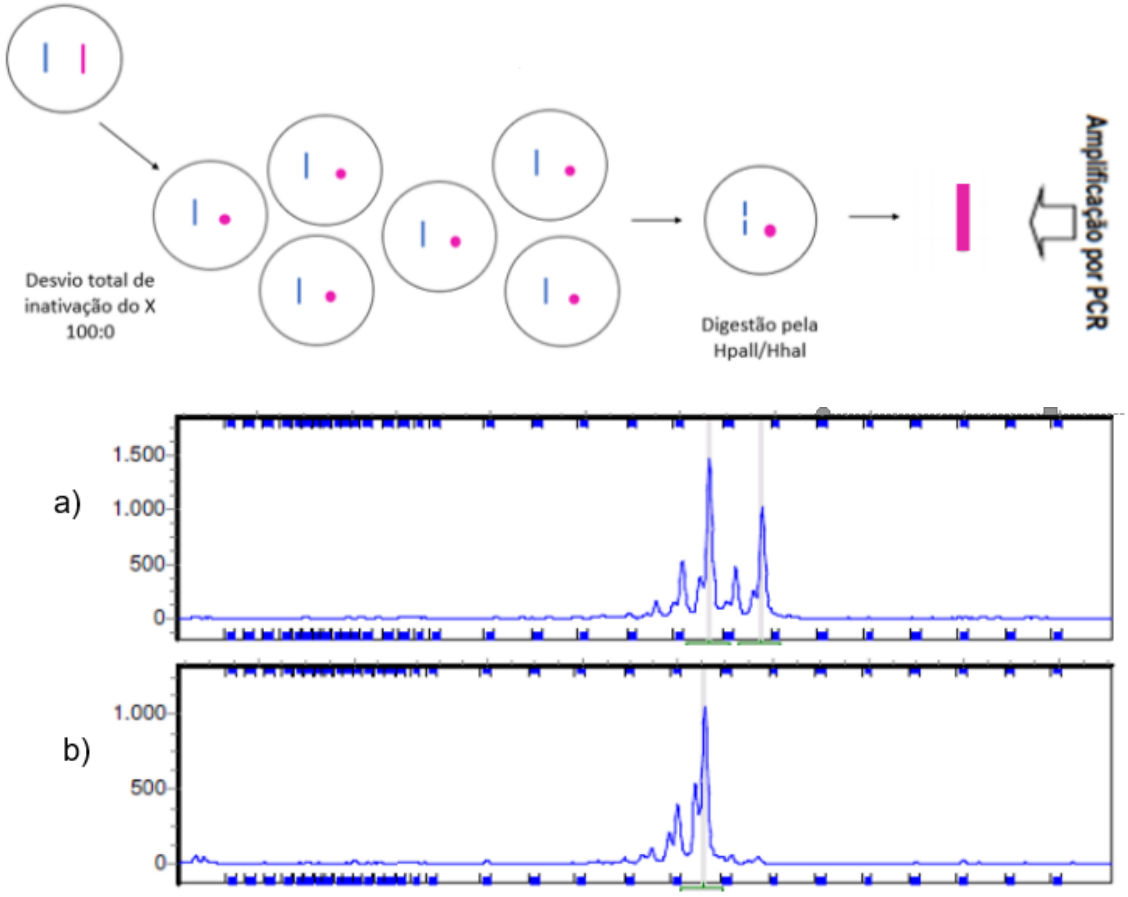
Figura 4. Inativação aleatória do cromossomo X, mostrando um padrão em que estão ativos cerca de 50% dos cromossomos paternos e de 50% dos maternos.



Após a digestão enzimática, os alelos do gene *AR* dos cromossomos ativos serão digeridos e os inativos não, devido à metilação, portanto teremos uma razão de cerca de 50:50, com dois picos igualmente amplificados pela PCR. Após corrida no ABI 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystems*), é possível identificar os dois alelos como picos de altura aproximadamente igual na amostra não digerida (a) e digerida (b), correspondendo a um padrão de inativação de ~50% de cromossomos paternos e ~50% de cromossomos paternos.

Mulheres com desvio total de inativação apresentariam resultado semelhante ao esquema apresentado na **Figura 5**.

Figura 5. Desvio total de inativação do cromossomo X, no qual um dos cromossomos se encontra inativado em 100% das células.



Após a digestão com a enzima, os alelos do gene AR nos cromossomos ativos serão digeridos e os inativos não, portanto teremos uma razão de cerca de 0:100, tendo apenas um pico amplificado pela PCR. Após corrida no ABI 3730 DNA Analyser (*Applied Biosystem*), é possível identificar dois alelos na amostra não digerida (a), e um único alelo, como um único pico, na digerida (b), correspondendo a um padrão de inativação de 100% de um dos cromossomos, sendo o materno no esquema.

IV. 2 Sequenciamento completo de exoma

Foi realizado o sequenciamento completo de exoma em amostras de DNA genômico de 10 mulheres com desvios extremos de inativação do cromossomo X em colaboração com a empresa 3billion (https://3billion.io/). Brevemente, as bibliotecas foram construídas com todas as regiões exônicas de todos os genes humanos codificadores de proteína, utilizando o kit de captura xGen Exome Research Panel v2 (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, EUA). As bibliotecas exômicas foram sequenciadas no equipamento Novaseq 6000 (Illumina, San Diego, CA, EUA).

A análise dos dados, incluindo o alinhamento com o genoma humano de referência GRCh37/hg19, bem como anotações de variantes, foi conduzido com ferramentas de bioinformática *open-source*. O software de interpretação automática de variantes denominado EVIDENCE (3billion Inc., Seoul, South Korea)(Seo e col., 2020) foi desenvolvido pela empresa para priorizar variantes com base nas diretrizes do ACMG (*American College of Human Genetic*s) (Richards e col., 2015), em associação com o fenótipo de cada paciente e provável padrão de herança. Esse sistema de análise tem três etapas principais: filtragem de variantes, classificação e pontuação de similaridade para fenótipo do paciente. O banco de dados gnomAD (http://gnomad.broadinstitute.org/) foi utilizado para verificar a frequência das variantes; aquelas com frequência alélica >5% foram excluídas, de acordo com o critério BA1 (evidência para suporte de benignidade, classificadas como *benign stand-alone*) das diretrizes do ACMG. Dados acerca da patogenicidade de variantes são derivados de literatura científica e bancos de dados de doenças, incluindo ClinVar (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/) e UniProt (https://www.uniprot.org/). Em seguida, avaliamos a patogenicidade de

cada variante em relação às condições clínicas associadas ao gene. Os fenótipos clínicos de cada paciente foram transformados em termos ontológicos padronizados (https://hpo.jax.org/) e acessados para avaliar a sobreposição (Greene e col., 2016; Kohler e col., 2009), com cada uma das aproximadamente 7.000 doenças genéticas raras humanas (https://omim.org/ e https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php). À similaridade entre o fenótipo de cada paciente e os sinais clínicos associados a uma doença, identificada pela priorização de variantes no respectivo gene, foi conferido um *score* de 0 a 10. Por fim, variantes candidatas com altos *scores* foram avaliadas em relação às respectivas condições clínicas associadas.

IV. 3 Sequenciamento de Sanger

Variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas de nucleotídeo único (*single nucleotide variant* - SNV), que não atendiam às métricas de qualidade para exoma ou do tipo inserção ou deleção (indel), foram confirmadas pela própria empresa 3billion, utilizando o sequenciamento bidirecional de Sanger. Em outros casos, a validação dos resultados positivos e, quando disponíveis amostras dos genitores, a análise de segregação, foram realizadas também por meio do sequenciamento bidirecional de Sanger em conjunto com a equipe do Laboratório de Genética Humana do IBUSP. Foram desenhados *primers* para cada região de interesse, utilizando a plataforma Primer3 (https://primer3.ut.ee/). As sequências dos pares de *primers* utilizados estão na **Tabela 6**.

Tabela 6. Sequências de *primers* - Sequenciamento Sanger.

Variante*	Região de Amplificação	Tamanho do produto	Sequência *forward*	Sequência *reverse*
***CTNNB1*: 3-41275708-C-T - NM_001098209.2:c.1603C>T**	chr3:41,275,485-41,275,986	502pb	TGGCTGCGATAGGGGTAAGA	GGAAATATCACTGGGGCCACA
***WDR45:* X-48934128-G-A - NM_001029896.2:c.397C>T**	chrX:48,934,019-48,934,313	295pb	TCCTCATCTCTGCCCCTCTG	GCCATGACAAGTGAGCCTGA
***YY1:* 14-100742986-G-A - NM_003403.5:c.1062+1G>A**	chr14:100,742,864-100,743,150	287pb	GAAAACATCTGCACACCCACG	GGCAACCCTTCTAAGCGACT
***ANKRD11:* 16-89341551-G-A - NM_001256182.1:c.7519C>T**	chr16:89,341,376-89,341,748	373pb	AGAGGAGTAGAGTGAGCTGGG	GTGTGTCTGTTGCTGGGACT
***PDHA1:* X-19377590-TGTTACCTAATTTTTAGGA-T - NM_000284.4:c.1009-16_1010del**	chrX:19,377,224-19,377,715	492pb	CCTCCAAGCCCAGAAAGTGA	GGTCGCTGGAGTAGATGTGG
***DDX3X:* X-41198298-A-G - NM_001356.5:c.113A>G**	chrX:41,198,149-41,198,531	383pb	CCCCTCTCAGTGTCCAGGTA	CCGAATTTCCCACTGCGTAAC
***DDX3X:* X-41204655-A-G – NM_001356.5:c.1171-2A>G**	chrX:41,204,529-41,204,880	352pb	TGTCCGCCACACTATGATGTT	GTGAATAACCCCTGCACTCCA
***KCNB1:* 20-47990875-G-A - NM_004975.4:c.1222C>T**	chr20:47,990,756-47,991,035	280pb	GGATACGATGCTGCCATTCCT	GGATGAGGACGACACCAAGTT

*mapeamento em hg19

Foi realizada a amplificação das amostras por PCR convencional com volume final de 30µL. O protocolo de reação e o programa de ciclagem em termociclador estão apresentados nas **Tabelas 7 e 8**.

Tabela 7. Protocolo da reação de PCR convencional.

Reagente	Volume
H_20	14,6µL
Buffer 10x	3µL
$MgCl_2$ 50mM	1µL 2.5mM
dNTP 2,5mM	3µL 250µM
Primer F 10uM	2µL
Primer R 10uM	2µL
DMSO 100%	3µL 10%
Taq 5U*	0,4µL 1,5U
DNA	1µL
Volume Final	**30µL**

*Platinum™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen™ - Massachusetts, EUA)

Tabela 8. Ciclos da reação de PCR convencional.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
01	95ºC	5min	1x
02	95ºC	1min	
03	(Tm-5)	1min	35x
04	72ºC	1min	
05	72 ºC	4min	1x
06	4ºC	∞	

*Temperatura de anelamento em aberto, sendo realizada a padronização de acordo com a amostra com o intuito de aumentar a especificidade ou o rendimento

Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,01% de Sybr safe. A corrida foi realizada utilizando como referência um padrão de peso molecular de 100 pb. Foi realizada, então, a purificação dos produtos de PCR por ExoSap-IT™ (Thermo Fischer Scientific – Massachusetts, EUA), utilizando *Exonuclease 1* (Exo), para digestão de primers em excesso, e *Shrimp Alkaline Phospatase* (Sap), para degradação de nucleotídeos em excesso, seguindo o protocolo descrito na **Tabela 9.**

Tabela 9. Protocolo de Reação ExoSap.

Reagente	Volume
Exo	0,5uL
Sap	1uL
Amostra	8uL
Volume Final	**9,5µL**

Após o preparo das reações de purificação, as amostras foram incubadas no termociclador por 30 min a 37ºC e, em seguida, a 80ºC por 15 min para inativação das enzimas. Os produtos amplificados e purificados foram então preparados para o sequenciamento (**Tabelas 10 e 11**).

Tabela 10. Protocolo de reagentes para Realização do Sequenciamento de Sanger.

Reagente	Volume
H_20	3µL
Buffer 10x	1µL
Big Dye™	2uL
Primer F ou R*	1µL
Produto purificado	3µL
Volume Final	**10µL**

*São preparadas duas reações de sequenciamento para cada produto, cada uma contendo um dos primers (F ou R), para obter as sequências de ambas as fitas de DNA.

Tabela 11. Protocolo de ciclagem para Sequenciamento de Sanger.

Etapa	Temperatura	Duração	Ciclos
01	96ºC	1min	1x
02	96ºC	10seg	
03	50ºC	5seg	25x
04	60ºC	4min	
05	4ºC	∞	

Foi preparado então o mix de precipitação com 1 parte de NaOAc 3Mm com pH 5.3 (23uL) e 1 parte de Glicogênio 1mg/mL (23uL) para 25 partes de etanol 100%, gelado (573uL), tendo um volume final de 30uL para cada tubo. O volume

de *BigDye*™ adicionado foi 1/3 da solução do mix (10uL). A solução foi agitada em vórtex e colocada no freezer -20ºC por 1 hora, sendo então centrifugada a 4000 rpm a 4ºC por 20min. O sobrenadante foi descartado e adicionados 50ul de etanol 70% gelado. O tubo foi invertido e procedeu-se a centrifugação 4000rpm por 10 min a 4ºC. O sobrenadante foi novamente desprezado. Os tubos foram inseridos no termociclador aberto a 96ºC para secagem e as amostras enviadas ao Centro de Pesquisa sobre Genoma Humano e Células Tronco – IBUSP para eletroforese capilar.

Para realizar a análise foi utilizado o programa BioEdit 7.2.

IV. 4 Análise cromossômica por microarranjo genômico (*Chromosome Microarray Analysis - CMA*)

Nas amostras com desvios extremos de inativação do X (≥90:10), negativas após sequenciamento de exoma, foi realizada a investigação de alterações cromossômicas submicroscópicas por microarranjo genômico, se a paciente ainda não havia sido investigada aplicando essa técnica. Foi utilizada a plataforma Oligonucleotide Array-Based CGH (Agilent Technologies – California, EUA), contendo 180.000 sondas (180K). O procedimento e a análise foram realizados pela Dra. Silvia Souza da Costa, técnica especializada do Laboratório de Genética Humana do IBUSP, sob supervisão da Dra. Ana Krepischi. Na análise, foi utilizado o programa *Genomic Workbench* (Agilent Technologies – California, EUA), considerando apenas alterações de no mínimo três sondas consecutivas e com $\log_2$ teste/controle ≥ 0,35 para ganhos e ≤ -0,35 para perdas. CNVs comuns, descritas em três ou mais estudos realizados em população controle depositados

no banco de dados *Database of Genomic Variants* – DGV (http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home), foram desconsideradas.

IV. 5 Análise estatística

A análise foi feita pelo Prof. Dr. Paulo A. Otto, do Laboratório de Genética Humana do Instituto de Biociências, USP. As frequências de mulheres com desvio de inativação nos diversos grupos (saudáveis e afetadas por DI) foram comparadas por meio de testes exatos de Fisher e análise de *odds ratio.* Também foram estimados os intervalos exatos e aproximados dessas frequências. Com essa finalidade, empregamos programas computacionais/scripts desenvolvidos em linguagem R (*Copyright 2018 The R Foundation for Statistical Computing*), em QBasic (Copyright Microsoft Co.) Ó e em *Liberty Basic* (*Copyright 1992 – 2010 Shoptalk Systems*). Os métodos empregados encontram-se descritos em detalhe em textos básicos de estatística como o de Zar (2010).

V. RESULTADOS

O padrão de inativação do cromossomo X foi investigado em amostras de DNA de sangue periférico de 194 mulheres. Dentre estas, 154 já possuíam resultado de aCGH, não apresentando alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas; apenas uma delas tinha variante de significado indeterminado. Sessenta e oito mulheres tinham realizado previamente exame molecular para diagnóstico da síndrome do X Frágil, com resultado negativo.

Na casuística, 37 pacientes apresentavam outros casos de DI na família, sendo 157 casos esporádicos. Setenta pacientes apresentavam DI não associada com outros sinais clínicos, enquanto 124 pacientes tinham quadro de DI sindrômica. (**Tabela 12)**.

Tabela 12. Descrição da casuística de 194 mulheres estudadas.

Características	Número (%)
Casos familiares	37 (19,07%)
Casos esporádicos	157 (80,92%)
DI não sindrômica	70 (36,08%)
DI sindrômica	124 (63,91%)

V. 1 Análise do padrão de inativação do cromossomo X

Na análise, 136 pacientes (70%) foram informativas quanto aos alelos do gene *AR* (**Figura 6**). Vinte e seis mulheres (13,4%) eram homozigotas e, portanto, não informativas. Adicionalmente, 32 pacientes (16,5%) possuíam alelos no lócus

AR de tamanhos muito semelhantes, impedindo a avaliação do padrão de inativação, sendo consideradas também não informativas.

Dentre as 136 pacientes informativas, em 99 (73%) a razão de inativação foi < 80:20; 26 (19%) apresentaram razão de inativação entre ≥80:20 e < 89:11; sete (5%) tinham razão de inativação ≥90:10 e < 99:1; em quatro delas (3%) foi detectado desvio total de inativação (100:0). Portanto, em 11 pacientes (8%) foram detectados desvios extremos (≥90%) ou total de inativação do cromossomo X, em linfócitos de sangue periférico (**Figura 7)**.

Figura 6. Distribuição de 194 mulheres com DI idiopática quanto à informação referente ao lócus *AR* para estudo de inativação do cromossomo X.

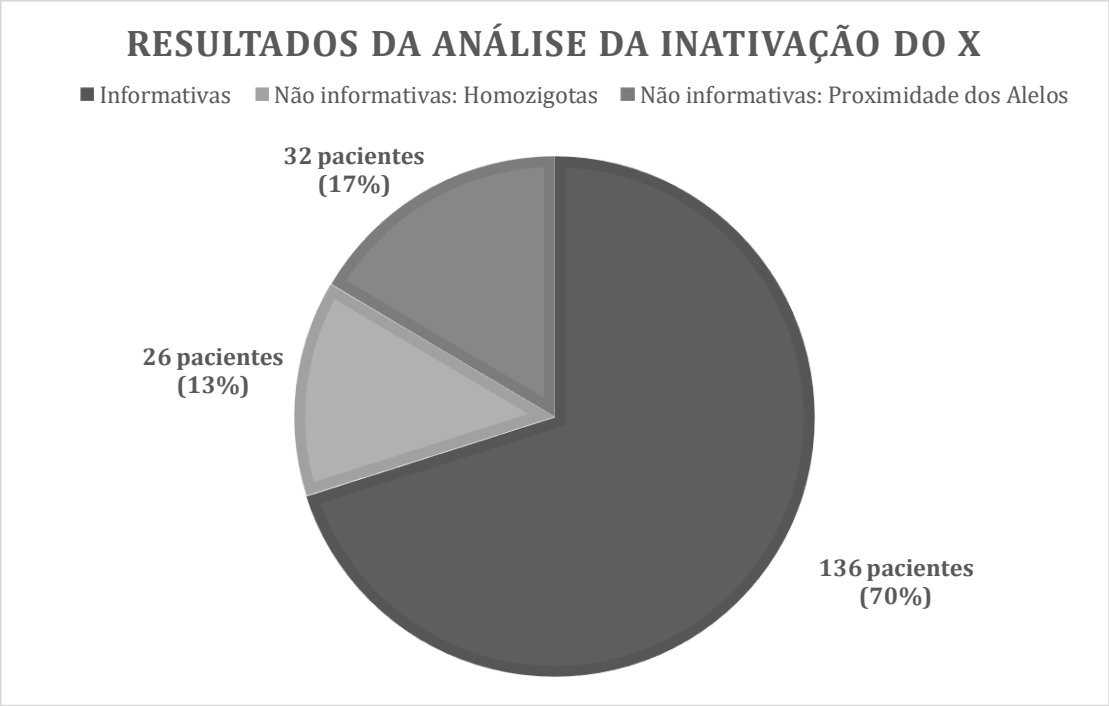
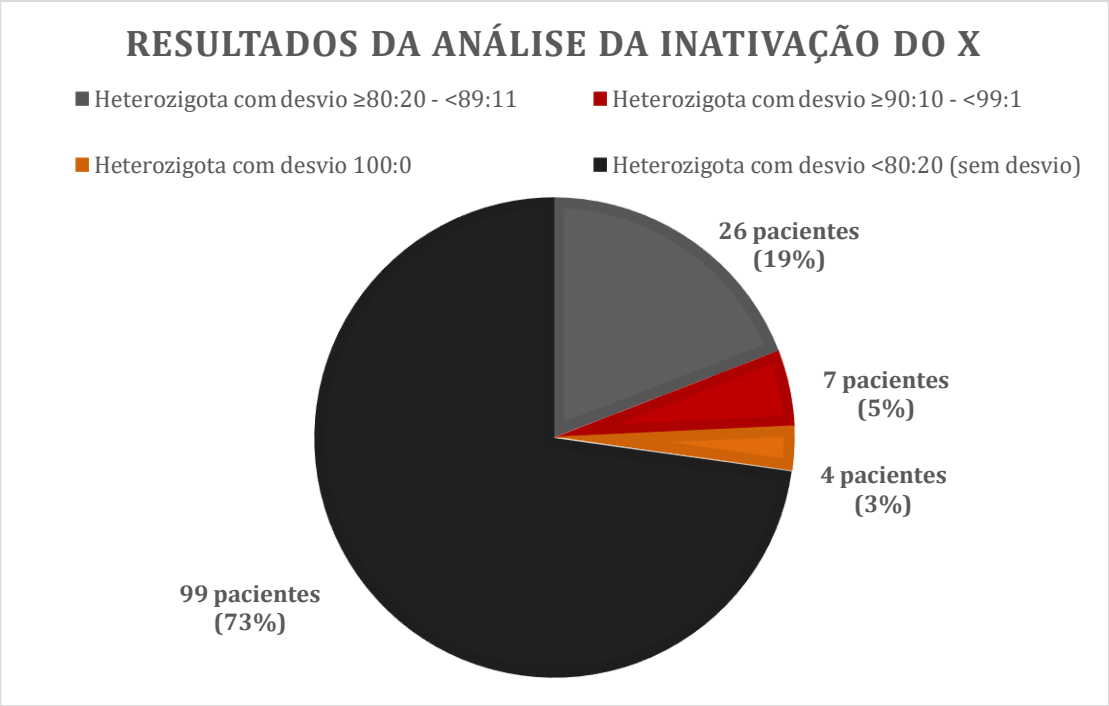
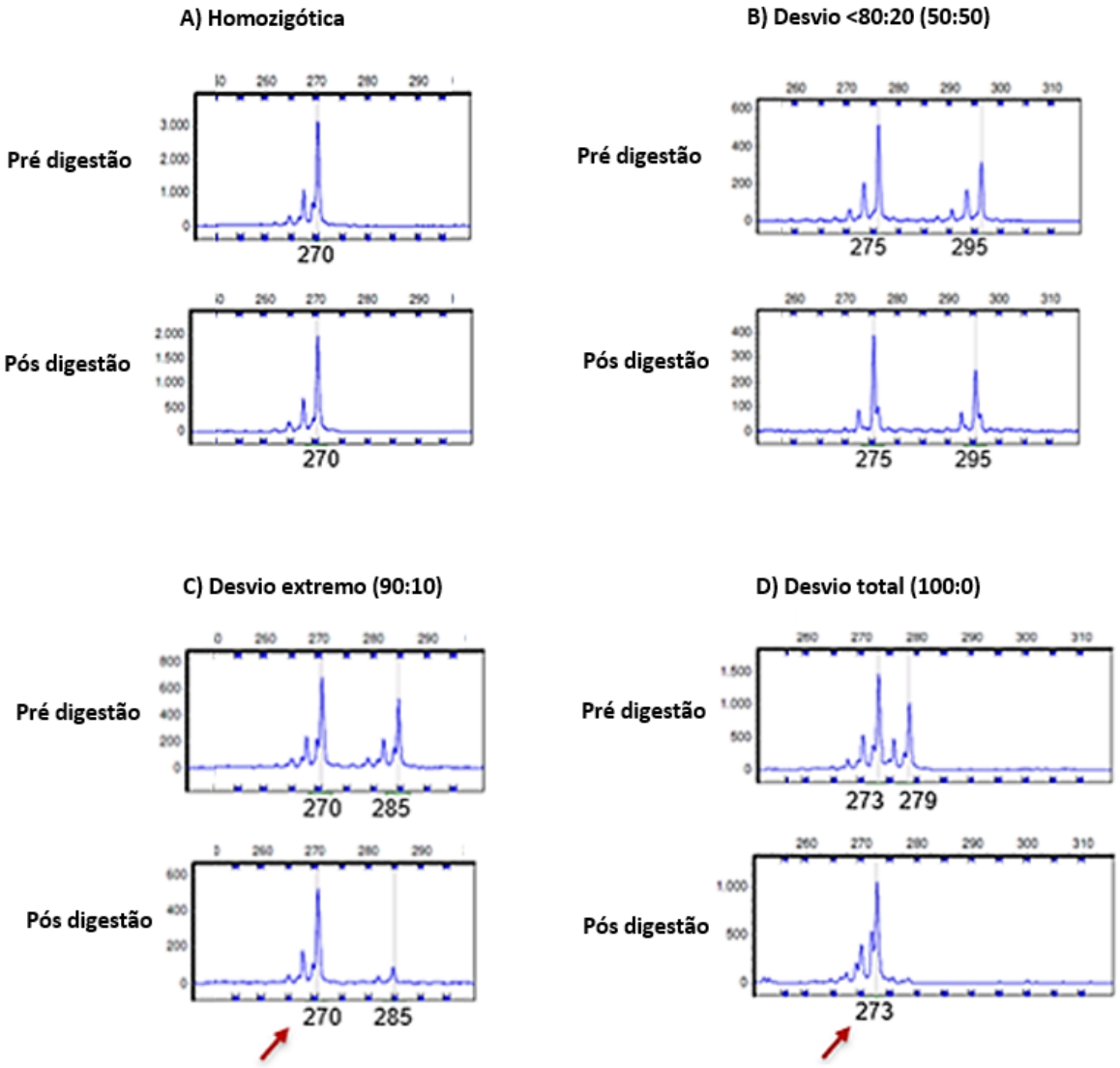


Figura 7. Distribuição de 136 mulheres heterozigotas com DI quanto ao padrão de inativação do cromossomo X determinado com base no padrão de metilação de alelos do lócus AR.



A **Figura 8** ilustra exemplos dos tipos de padrão de inativação observados.

Figura 8. Análise do padrão de inativação do cromossomo X.



(A) Mulher homozigota no lócus AR: apenas um pico (marcado em cinza, tamanho 287 pb), representando ambos os alelos, foi detectado nas análises pré e pós digestão.

(B) Mulher heterozigota com razão de inativação 50:50. É possível visualizar ambos os alelos (marcados em cinza) nas análises pré e pós digestão, sem diferença significativa de intensidade entre eles.

(C) Mulher heterozigota com razão de inativação 90:10: É possível visualizar ambos os alelos nas análises pré e pós digestão; porém a diferença de altura dos picos pós-digestão indica que um dos cromossomos está preferencialmente inativo (traço vermelho ou seta).

(D) Mulher heterozigota com razão de inativação 100:0: É possível visualizar ambos os alelos na análise pré digestão, mas apenas um deles é detectado pós-digestão, representando o alelo que está no cromossomo X inativo (traço vermelho ou seta).

Entre as 11 mulheres com desvios extremos (≥90%) ou total de inativação, seis já haviam realizado o exame de cariótipo, dez tinham resultado negativo no teste molecular para a síndrome do X frágil e nove foram investigadas por microarranjo (CMA). No presente estudo, o teste para a síndrome do X frágil e a investigação de CNV foram realizados nas pacientes restantes **(Tabela 13).**

Tabela 13. Exames realizados nas 11 pacientes com desvios extremos do padrão de inativação do cromossomo X.

ID*	Razão de Inativação	Idade no momento da coleta	Array	Cariótipo	Fra(X)
P1	100:0	8a3m	Negativo	Normal	Negativo
P2	100:0	5a3m	Negativo	---	Negativo
P3	98:2	1a9m	Negativo	Normal	Negativo
P4	90:10	5a2m	Negativo	---	Negativo
P5	100:0	10a	Negativo	---	Negativo
P6	94:6	8a11m	Negativo	Normal	Negativo
P7	92:8	11a1m	Negativo	---	Negativo
P8	100:0	2a8m	Negativo	Normal	Negativo
P9	92:8	9a11m	Negativo	---	Negativo
P10	92:8	7a	Negativo	Normal	Negativo
P11	90:10	16a9m	Negativo	Normal	Negativo

V. 2 Análise estatística

A frequência de mulheres normais com desvio de inativação do cromossomo X (90% ou mais ou 10% ou menos) em uma amostra da literatura (Amos Landgraf e col., 2006) foi q1 = x1/n1 = 18/1005 = 0,0179, com um intervalo exato de 95% de confiança de 0,0107 - 0,0281; a aproximação correspondente (aproximação normal) 95% c.i. é 0,0097 - 0,0261, obtida de q1 1,96 s.e.(q1). A frequência observada em uma amostra brasileira de mulheres normais foi q2 = x2/n2 = 0/118 = 0,000, com um intervalo de confiança exato de 95% de 0,0000 - 0,0308 (Vianna

e col., 2020). A virtual sobreposição dos dois intervalos de confiança indica que estas duas frequências não são estatisticamente diferentes. Isto é confirmado pelo teste exato da Fisher: P = 0,2447 (não significativo) e uma análise de odds ratio correspondente: odds ratio = 0,23, com um intervalo de confiança de 95% de 0,03 a 1,70, incluindo unidade (1) e, portanto, indicando um resultado não significativo).

Os resultados mostrados nos parágrafos anteriores indicam que as duas amostras podem ser aglutinadas a fim de serem comparadas com um desvio de frequência de inativação obtido em um grupo de mulheres afetadas com deficiência intelectual. Obtivemos então a frequência geral (combinada) de mulheres normais com desvio de inativação: q3 = (x1+x2)/(n1+n2) = x3/n3 = 18/1123 = 0,0160, com um intervalo de confiança exato de 95% de 0,0096 - 0,0252; o valor aproximado de 95% c.i. correspondente é 0,0087 - 0,0234.

Em uma amostra de 136 mulheres informativas afetadas por deficiência intelectual, 11 (onze) apresentaram desvio de inativação do cromossomo X: q4 = x4/n4 = 11/136 = 0,0809, com um intervalo de confiança exato de 95% de 0,0411 - 0,1401; o c.i. correspondente a 95% é de 0,0351 - 0,1267.

A clara não sobreposição de ambos os intervalos de confiança (na amostra normal combinada e entre as mulheres afetadas) indicam fortemente que estas duas frequências são estatisticamente diferentes. Isto é confirmado pelo teste exato da Fisher: P = 0,0001 (fortemente significativo) e uma análise de *odds ratio* correspondente: *odds ratio* = 5,40, com um intervalo de confiança de 95% de 2,49 a 11,70, excluindo a unidade (1) e, portanto, confirmando o resultado (altamente) significativo obtido do teste exato de Fisher.

V. 3 Análise de Sequenciamento Completo do Exoma

Uma das 11 pacientes com desvios extremos do padrão de inativação do X (P10) já havia sido encaminhada previamente para análise de exoma, não tendo sido detectadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas - os dados foram reanalisados e o resultado negativo confirmado. Amostras das outras dez pacientes foram submetidas ao sequenciamento completo de exoma no presente estudo.

Nas pacientes P9 e P11 não foram identificadas variantes com relevância clínica que pudessem explicar o quadro clínico. Em oito pacientes foram encontradas variantes classificadas como patogênicas. Todas as variantes identificadas (descritas em mapeamento na versão GRCh37/hg19 do genoma humano) foram mapeadas em genes com padrão de herança dominante, quatro deles localizados no cromossomo X e quatro, em autossomos. Variantes patogênicas no gene *DDX3X* foram identificadas em duas das pacientes.

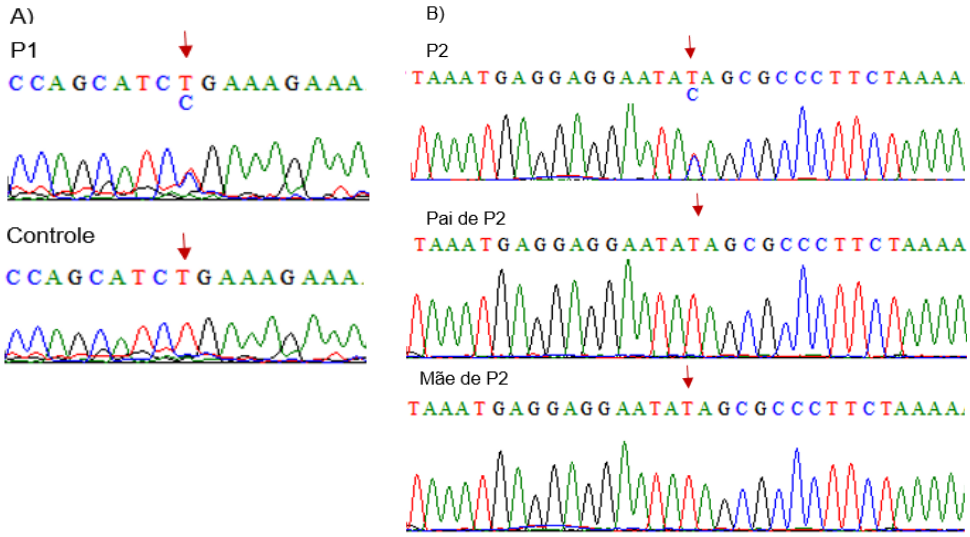
Realizamos a validação de variantes em todas as pacientes. Adicionalmente, foi feita a análise de segregação nos casos em que tínhamos disponíveis amostras de DNA de ambos os genitores (P2, P3, P4, P5, P6, P7). As amostras parentais estavam indisponíveis para os casos P1, e P8.

Na paciente P1 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *DDX3X*, mapeado em Xp11.4. A variante hg19:ChrX-41204655-A-G, NM_001356.5:c.1171-2A>G (NP_001347.3:p.?) introduz um sítio aceptor *de splicing* no intron 11. A variante foi validada na paciente, em heterozigose, por sequenciamento Sanger (**Figura 9a**). Não foi possível realizar a análise de segregação na família por indisponibilidade de amostras dos genitores.

Na paciente P2 também foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *DDX3X*. A variante hg19:ChrX-41198298-A-G, NM_001356.5:c.113A>G (NP_001347.3:p.Tyr38Cys) resulta numa mudança de aminoácido (*missense*) no éxon 3. A variante foi validada por sequenciamento Sanger, em heterozigose, na paciente (**Figura 9b**).

Variantes patogênicas de *DDX3X* causam o distúrbio de desenvolvimento intelectual sindrômico do tipo Snijders Blok (OMIM #300958), com padrão de herança ligado ao X.

Figura 9. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA de duas pacientes com variantes patogênicas no gene *DDX3X* - Pacientes 1 e 2.

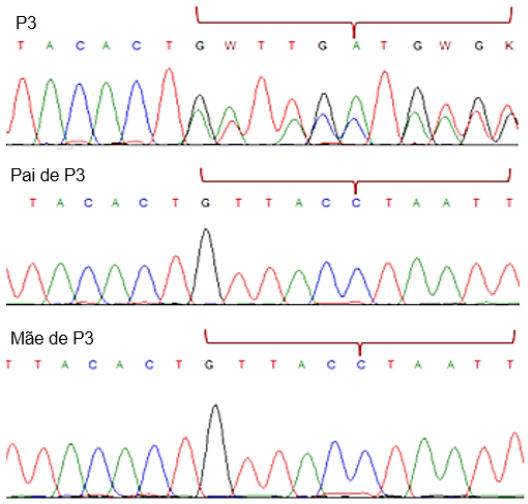


(a) Paciente 1 - validada a presença da variante hg19:ChrX-41204655-A-G, NM_001356.5:c.1171-2A>G, (NP_001347.3:p.?) em heterozigose (seta vermelha).

(b) Paciente 2 - validada a variante hg19:ChrX-41198298-A-G, NM_001356.5:c.113A>G (NP_001347.3:p.Tyr38Cys) em heterozigose (seta vermelha) na paciente (indicada pela chave); não foi detectada a variante nos genitores, indicando tratar-se de uma mutação nova.

Na paciente P3 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *PDHA1*, mapeado em Xp22.12. A variante hg19:ChrX-19377590-TGTTACCTAATTTTTAGGA-T, NM_000284.4:c.1009-16_1010del, (NP_000275.1:p.?) ocorre em um sítio canônico aceptor de *splicing* no íntron 10/éxon 11. A variante foi validada em heterozigose na paciente e pela análise de segregação foi possível identificar que é uma mutação nova (**Figura 10**); sendo assim, esta variante foi reclassificada como patogênica. O gene *PDHA1* quando mutado causa o quadro clínico de deficiência de piruvato desidrogenase E1-Alfa (OMIM #312170), com padrão de herança ligado ao X dominante.

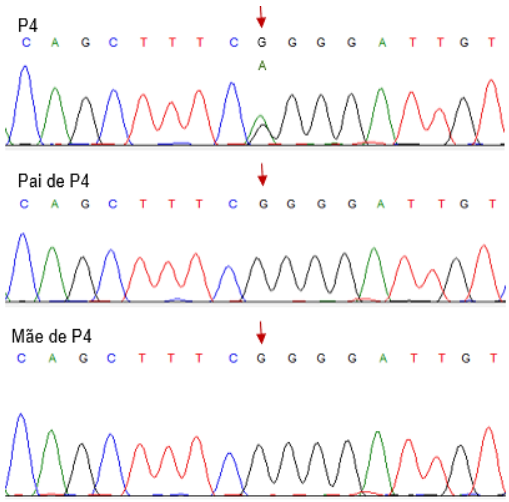
Figura 10. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA da paciente P3 e de seus genitores para averiguar variante no gene *PDHA1*.



Foi validada a presença da variante hg19:ChrX-19377590-TGTTACCTAATTTTTAGGA-T, (NM_000284.4:c.1009-16_1010del) em heterozigose na paciente (indicada pela chave); não foi detectada a variante nos genitores, indicando tratar-se de mutação nova.

Na paciente P4 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *WDR45*, mapeado em Xp11.23. A variante hg19:ChrX-48934128-G-A, NM_001029896.2:c.397C>T, (NP_001025067.1:p.Arg133Ter) introduz um códon de parada de tradução (*nonsense)* no éxon 6. Sua validação e análise de segregação a identificaram como variante em heterozigose *de novo* (**Figura 11**). Variantes patogênicas em *WDR45* causam o quadro clínico de Neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro, tipo 5 (OMIM #300894), com padrão de herança ligado ao X dominante.

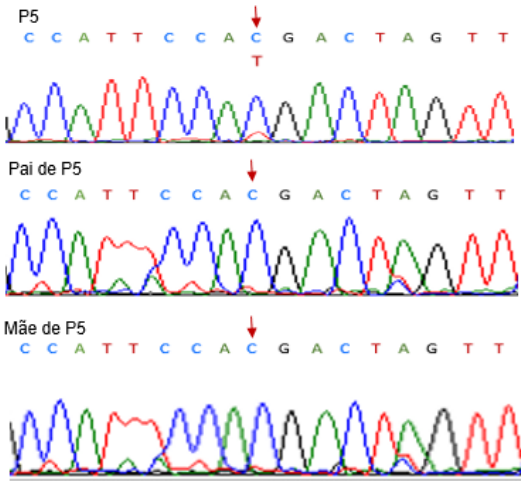
Figura 11. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA da paciente P4 e de seus genitores para averiguar variante no gene *WDR45*.



Foi validada a presença da variante hg19:ChrX-48934128-G-A, (NM_001029896.2:c.397C>T) em heterozigose na paciente (indicada pela seta vermelha); não foi detectada a variante nos genitores, indicando tratar-se de mutação nova.

Na paciente P5 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *CTNNB1,* mapeado em 3p22.1. A variante hg19:Chr3-41275708-C-T, NM_001098209.2:c.1603C>T, (NP_001091679.1:p.Arg535Ter) introduz um códon de parada de tradução (*nonsense*) no éxon 10. O sequenciamento Sanger mostrou que essa variante é *de novo* e confirmou que ocorre em mosaico baixo (**Figura 12**) – a frequência da variante alélica observada no exoma foi 18%. Variantes patogênicas no gene *CTNNB1* causam o distúrbio de neurodesenvolvimento com diplegia espástica e defeitos visuais (OMIM #615075), com padrão de herança autossômico dominante.

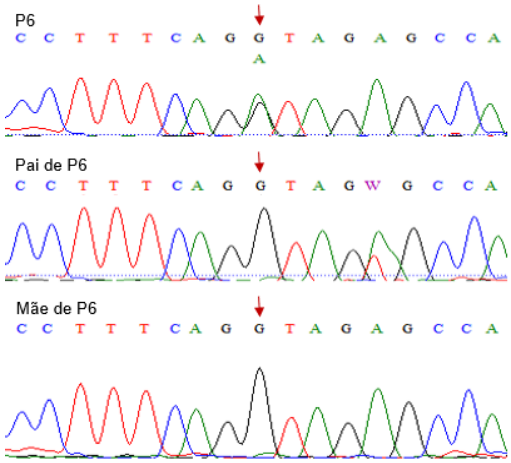
Figura 12. Sequenciamento Sanger em amostras de DNA da paciente P5 e de seus genitores para averiguar variante no gene *CTNNB1*.



Foi validada a presença da variante hg19:Chr3-41275708-C-T, (NM_001098209.2:c.1603C>T) em heterozigose na paciente (indicada pela seta vermelha); não foi detectada a variante nos genitores, indicando tratar-se uma mutação nova.

Na paciente P6 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *YY1*, mapeado em 14q32.2. A variante hg19:Chr14-100742986-G-A, NM_003403.5:c.1062+1G>A,(NP_003394.1:p.?) ocorre em um sítio canônico aceptor de *splicing* no íntron 4. A paciente P6 é heterozigota quanto à variante investigada; o estudo de segregação mostrou que se trata de mutação nova (**Figura 13**); dessa forma, a variante foi reclassificada como patogênica. Variantes patogênicas nesse gene estão associadas ao quadro clínico da Síndrome de Gabriele-de Vries (OMIM#617557), que tem padrão de herança autossômico dominante.

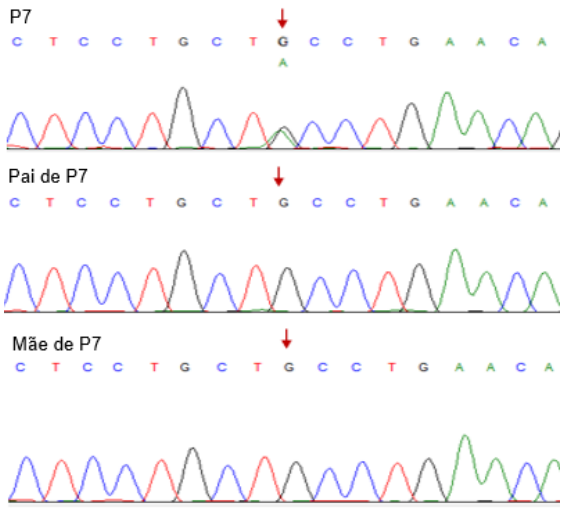
Figura 13. Sequenciamento de Sanger em amostras de DNA da paciente P6 e de seus genitores para averiguar variante no gene *YY1*.



Foi validada a presença da variante hg19:Chr 14-100742986-G-A, (NM_003403.5:c.1062+1G>A) em heterozigose na paciente (indicada pela seta vermelha); não foi detectada a variante nos genitores, indicando tratar-se de mutação nova.

Na paciente P7 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *ANKRD11*, mapeado em 16q24.3. A variante hg19:Chr16-89341551-G-A, NM_001256182.1:c.7519C>T, (NP_001243111.1:p.Gln2507Ter) introduz um códon de parada de tradução (*nonsense*) no éxon 11. O sequenciamento Sanger confirmou a variante em heterozigose na paciente e mostrou que é *de novo*, não tendo sido identificada em seus genitores (**Figura 14**). Variantes patogênicas em *ANKRD11* causam o quadro clínico da Síndrome KGB (OMIM #148050), com padrão de herança autossômico dominante.

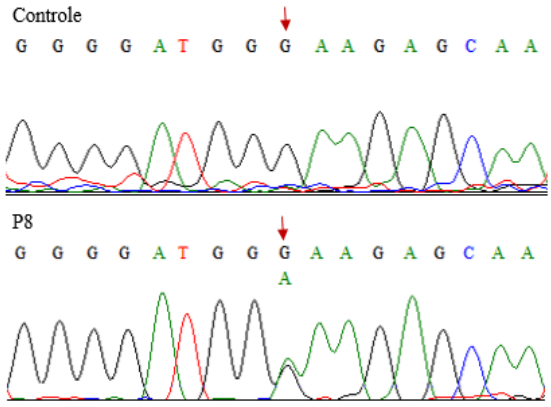
Figura 14. Sequenciamento de Sanger em amostras de DNA da paciente P7 e de seus genitores para averiguar variante em *ANKRD11*.



Foi validada a presença da variante hg19:Chr16-89341551-G-A, (NM_001256182.1:c.7519C>T) em heterozigose na paciente (indicada pela seta vermelha); não foi detectada a variante nos genitores, indicando tratar-se de mutação nova.

Na paciente P8 foi identificada uma variante patogênica em heterozigose no gene *KCNB1,* mapeado em 20q13.13. A variante hg19:Chr20-47990875-G-A, NM_004975.4:c.1222C>T, (NP_004966.1:p.Pro408Ser) é do tipo *missense* e ocorre no éxon 2. A variante foi validada em heterozigose na paciente; não havia material dos pais para realização do estudo de segregação (**Figura 15**). Variantes patogênicas em *KCNB1* são associadas à encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento (OMIM #616056), com padrão de herança autossômico dominante.

Figura 15. Sequenciamento de Sanger em amostras de DNA da paciente P8 e de um controle selvagem não relacionado, para averiguar a variante em *KCNB1.*



Foi validada a presença da variante hg19:Chr20-47990875-G-A, (NM_004975.4:c.1222C>T) em heterozigose na paciente (indicada pela seta vermelha).

O detalhamento dos achados da análise dos exomas encontra-se na **Tabela 14.** Os sinais clínicos das pacientes e a sobreposição com as síndromes associadas com o gene identificado encontram-se na **Tabela 15**.

Em duas das pacientes (P4 e P8) foram identificados achados secundários. Na paciente P8 foram identificadas duas variantes em heterozigose provavelmente

patogênicas: uma no gene *TNN*, associado a diversos quadros clínicos, como cardiomiopatia dilatada 1G (OMIM #604145), e outra no gene *PALB2*, mapeado em 16p12.2, associado a quadros clínicos como susceptibilidade a câncer de mama (OMIM #114480). Na paciente P4 foi identificada uma variante também no gene *TTN*, em heterozigose, classificada como patogênica, associada ao quadro de cardiomiopatia dilatada 1G (OMIM #604145). Os achados secundários estão descritos na **Tabela 16**.

Tabela 14. Variantes patogênicas detectadas pelo sequenciamento completo de exoma de oito pacientes com desvios extremos do padrão de inativação do cromossomo X.

Paciente	Padrão de Inativação	Gene	Variante*	Tipo	Classificação	Padrão de Herança	Condição clínica	#OMIM
P1	100:0	*DDX3X*	chrX-41204655-A-G NM_001356.5:c.1171-2A>G (NP_001347.3:p.?)	*Splicing*	Patogênica	Dominante /recessivo	Distúrbio do desenvolvimento intelectual sindrômico do tipo Snijders Blok	300958
P2	100:0	*DDX3X*	chrX-41198298-A-G NM_001356.5:c.113A>G (NP_001347.3:p.Tyr38Cys) *Mutação nova*	*Missense*	Patogênica	Dominante /recessivo	Distúrbio do desenvolvimento intelectual sindrômico do tipo Snijders Blok	300958
P3	98:2	*PDHA1*	chrX-19377590-TGTTACCTAATTTTTAGGA-T NM_000284.4:c.1009-16_1010del (NP_000275.1:p.?) *Mutação nova*	*Splicing*	Patogênica	Dominante	Deficiência de piruvato desidrogenase E1-Alfa	312170
P4	90:10	*WDR45*	chrX-48934128-G-A NM_001029896.2:c.397C>T (NP_001025067.1:p.Arg133Ter) *Mutação nova*	*Nonsense*	Patogênica	Dominante	Neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro, tipo 5	300894

Paciente	Padrão de Inativação	Gene	Variante*	Tipo	Classificação	Padrão de Herança	Condição clínica as	#OMIM
P5	100:0	*CTNNB1*	chr3-41275708-C-T NM_001098209.2:c.1603C>T (NP_001091679.1:p.Arg535Ter) *Mutação nova em mosaico*	*Nonsense*	Patogênica	Dominante	Distúrbio do neurodesenvolvimento com diplegia espástica e defeitos visuais	615075
P6	94:6	*YY1*	chr14-100742986-G-A NM_003403.5:c.1062+1G>A (NP_003394.1:p.?) *Mutação nova*	*Splicing*	Patogênica	Dominante	Síndrome de Gabriele-de Vries	617557
P7	92:8	*ANKRD11*	chr16-89341551-G-A NM_001256182.1:c.7519C>T (NP_001243111.1:p.Gln2507Ter) *Mutação nova*	*Nonsense*	Patogênica	Dominante	Síndrome KGB	148050
P8	100:0	*KCNB1*	chr20-47990875-G-A NM_004975.4:c.1222C>T (NP_004966.1:p.Pro408Ser)	*Missense*	Patogênica	Dominante	Encefalopatia epiléptica e do desenvolvimento 26	616056

*Coordenadas de acordo com hg19.

Tabela 15. Sinais clínicos das oito pacientes com desvio >90% do padrão de inativação do cromossomo X e variantes patogênicas detectadas no sequenciamento do exoma.

ID	Gene mutado	Quadro clínico
P1	*DDX3X*	**AGD*, DI,** timidez
P2	*DDX3X*	**DI leve**,** dificuldade de fala, **puberdade precoce,** sindactilia dedos do pé esquerdo, **dismorfismos faciais,** timidez
P3	*PDHA1*	**Nascida pequena para a idade gestacional, microcefalia,** micrognatia, clinodactilia 5º dedo bilateral, filtro naso-labial longo
P4	*WDR45*	**AGD, atraso no desenvolvimento da fala, com linguagem comprometida**
P5	*CTNNB1*	**AGD, microcefalia, déficit cognitivo, dismorfismos faciais** (sinofre, microstomia, filtro naso-labial longo e marcado), pés e mãos com afilamentos distais e braquidactilia
P6	*YY1*	**AGD,** hipoplasia**, dificuldade escolar**, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, fosseta auricular.
P7	*ANKRD11*	Hipotonia, **AGD,** agitação psicomotora, agressividade e dificuldade na aprendizagem, **dismorfismos faciais** (irregularidade nas sobrancelhas, ptose palpebral esquerda, orelhas rotadas posteriormente, filtro longo), afastamento entre os incisivos centrais superiores e encurtamento de quinto metacarpo em ambas as mãos.
P8	*KCNB1*	**DI,** transtorno do espectro autista, agressividade, hiperatividade, autoagressão

AGD =Atraso global de desenvolvimento

Características em negrito estão em concordância com a sinopse clínica da condição no OMIM.

Tabela 16. Achados secundários no sequenciamento completo do exoma

Paciente	Gene	Variante*	Classificação	Condição clínica	OMIM
P8	*TTN*	2-179614349-CG-C, NM_133379.5:c.12777del, (NP_596870.2:p.Phe4259LeufsTer24)	Provavelmente patogênica	Cardiomiopatia dilatada 1G	604145
P8	*PALB2*	16-23646453-G-A, NM_024675.4:c.1414C>T, (NP_078951.2:p.Gln472Ter)	Provavelmente patogênica	Susceptibilidade a câncer de mama	114480
P4	*TTN*	2-179417969-G-T, NM_001267550.2:c.89658C>A, (NP_001254479.2:p.Tyr29886Ter	Patogênica	Cardiomiopatia dilatada 1G	604145

*mapeamento em hg19

V. 4 Aconselhamento Genético das famílias com resultados positivos de exame de exoma completo

Em todos os casos com resultados positivos no estudo de exoma completo, as mutações identificadas eram *de novo*. É importante ressaltar que, embora a mutação detectada não tenha sido identificada no exame de sangue dos genitores e, por isso, esteja sendo considerada como mutação nova, não se pode afastar definitivamente a possibilidade de mosaicismo gonadal. Entretanto, o risco empírico de recorrência do quadro clínico em futura prole do casal nesses casos é muito baixo, sendo estimado como inferior a 1%. Apenas um caso não pode ainda ser avaliado quanto à segregação por falta de material dos genitores; porém, trata-se de variante patogênica em *DDX3X* e todos os casos descritos até o momento são mutações novas.

Até o momento, foram elaborados os laudos genéticos para todas as oito pacientes com resultados positivos no exame de exoma completo. Estes laudos foram encaminhados para realização de aconselhamento genético para as médicas geneticistas responsáveis (Dra. Liane de Rosso Giuliani e Dra. Debora Bertola) em quatro dos casos. Nos casos remanescentes, faremos a entrega do laudo e respectivo aconselhamento genético no serviço de genético do Laboratório de Genética Humana. O agendamento de uma das famílias já foi realizado e estamos tentando contatar três famílias remanescentes.

DISCUSSÃO

Este estudo investigou o padrão de inativação do cromossomo X em uma coorte de 194 pacientes com deficiência intelectual. Cento e trinta e seis mulheres (70%) foram informativas com relação ao *lócus AR*, base para a determinação do padrão de inativação do X. Nesse grupo, sete mulheres (5%) foram identificadas com desvios extremos de inativação, com razão ≥90:10 - < 100:0, enquanto quatro outras (3%) exibiram desvio total de inativação 100:0.

Amos-Landgraf e col., (2002) identificaram que cerca de 1,8% das 1.005 mulheres da população geral apresentam desvio extremo ou total de inativação (ou seja, >90%), sendo 415 mulheres adultas (3,6%) e 590 recém-nascidos (0,5%), ocorrendo devido ao processo estocástico da inativação do X que gera uma curva de distribuição normal. Em nosso estudo, foram identificadas 11 mulheres com DI idiopática e desvio extremo ou total, representando 8% da coorte, das quais 7 apresentavam desvio extremo (≥90:10-99:1) e 4 apresentavam desvio total (100%). Considerando os 2% de desvio extremo/total ao acaso observado por Amos-Landgraf e col. na população feminina, seria esperado que 2-3/136 mulheres informativas de nosso estudo apresentassem desvio extremo ou total de inativação. No entanto, observamos um valor ~4 vezes maior que o esperado, com enriquecimento de mulheres com desvio extremo/total da inativação do cromossomo X. Adicionalmente, a frequência em uma amostra brasileira de mulheres normais com desvio extremo de inativação do cromossomo X foi zero (Vianna e col., 2020). Essas duas amostras foram aglutinadas a fim de serem comparadas com a frequência de desvio de inativação obtida no grupo aqui estudado de mulheres com deficiência intelectual (8,09%). O resultado mostrou que

estas duas frequências (de mulheres da população e de pacientes com DI) são estatisticamente diferentes (P = 0,0001). Portanto, a frequência observada de desvio de inativação do cromossomo X em mulheres com DI idiopática foi significativamente maior do que aquela encontrada em mulheres da população geral.

A hipótese mais plausível para explicar o aumento de frequência de desvio de inativação em mulher em DI quando em comparação à população normal é a presença de uma variante patogênica no cromossomo X, simultaneamente associada ao quadro de deficiência intelectual e à ocorrência do desvio de inativação. Se a variante estiver localizada em um gene que escapa do XCI, ela resultará na manifestação do fenótipo, independentemente da ocorrência do desvio.

Dois outros estudos, realizados por Szelinger e col. (2014) e Bader e col. (2020), também realizaram a análise de inativação do X seguida pela análise de WES. O grupo de Szelinger encontrou uma deleção *de novo*, intersticial, de 1,7 Mb no Xp22.31 em uma mulher com leve deficiência cognitiva e uma razão de inativação 83:20. O grupo de Bader, por sua vez, identificou uma variante *de novo* missense no gene *NAA10* e um desvio de 95:5 em uma menina de 10 anos de idade, afetada por DI sindrômica grave.

Após o sequenciamento de exoma das onze pacientes com desvio de inativação do cromossomo X, em oito pacientes (73%) foram encontradas variantes classificadas como patogênicas. As variantes detectadas nas pacientes P2 (VCV000545446.2), P4 (VCV000212592.19), P5 (VCV000265085.10), P7 (VCV001031774.1) e P8 (VCV000800948.1) foram previamente descritas no

ClinVar como P/PP. Existe uma variante de *splicing* classificada como provavelmente patogênica mapeada para a mesma posição da variante detectada na paciente P1 (VCV001251939.1). Por outro lado, as variantes detectadas nas pacientes P3 (NM_000284.4:c.1009-16_1010del) e P6 (NM_003403.5:c.1062+1G>A) são inéditas, nunca previamente descritas, assim como a variante P1. Todas as variantes estão mapeadas em genes relacionados a doenças que tem fenótipos com padrão de herança dominante. Quatro pacientes têm mutações em genes localizados no cromossomo X (*DDX3X, WDR45, PDHA1*); variantes patogênicas no gene *DDX3X* foram identificadas em duas das pacientes. Dos três genes ligados ao X identificados como mutados, apenas um deles, *DDX3X,* é um gene descrito como não sujeito à inativação do X (Snijders Blok e col., 2015). Como para todos os casos de mutações no cromossomo X em genes com padrão dominante de manifestação, a inativação do X pode ser considerada um fator contribuinte para a grande heterogeneidade de fenótipos e graus de acometimento entre as afetadas. Quatro variantes foram identificadas em diferentes genes mapeados em autossomos (*KCNB1, CTNNB1, YY1, ANKRD11*).

O gene *DDX3X* (OMIM *300160) localizado no cromossomo X pertence ao grupo de genes que escapam à inativação, ou seja, genes que se comportam como aqueles das regiões pseudoautossômicas X/Y, com expressão bialélica em mulheres, não sofrendo compensação de dose. Assim, em tese, *DDX3X* teria níveis de expressão diferentes entre homens e mulheres e não seria esperado haver desvio de expressão em mulheres portadoras de mutação (Park e col., 2010). Entretanto, o padrão é mais complexo para esses genes que escapam da inativação, pois muitos desses genes têm expressão mais baixa no X inativo em relação ao X ativo, além de poder ter expressão variável entre diferentes mulheres

e entre diferentes tecidos de uma mesma mulher. Esses genes seriam, portanto, essencialmente também "*dosage compensated*", como os genes sujeitos à inativação, porém com padrão de expressão mais heterogêneo. Tais genes de escape representariam cerca de 15% de todo o conteúdo gênico localizado no cromossomo X (Carrel e Willard, 2005), e, somados aos 10% de genes que apresentam expressão heterogênea, possibilitam uma grande variabilidade de expressão de tais genes independentemente da inativação do X em mulheres. Esse padrão foi descrito no estudo de Fieremans e colaboradores (2016);em trabalho recente de nosso grupo (Fonseca e col., 2021), um desvio total de inativação também foi identificado em paciente com mutação nova em *DDX3X*.

Outro aspecto interessante a ser citado é o de mutações *missense de novo* em *DDX3X* em homens, como descrito por Nicola e col. (2019); nesse estudo foram relatados os dois primeiros homens com DI e variantes *missense* patogênicas *de novo* no *DDX3X*, localizadas em códons previamente identificados em mulheres afetadas, sugerindo que variantes patogênicas podem ter manifestações fenotípicas similares tanto em mulheres quanto em homens, e que determinadas mutações são compatíveis com a vida em homens. Tal achado acaba sendo acrescentado à hipótese de que variantes patogênicas de perda de função no *DDX3X* sejam letais em homens (Snijders Blok e col., 2015), mas que determinadas variantes *missense* em *DDX3X*, que geram uma proteína alterada, não são necessariamente letais. Um estudo feito por Wang e col.(2018) expandiu o fenótipo encontrado em mulheres portadoras de mutações no *DDX3X*, incluindo hipotonia e características dismórficas como os achados mais comuns, seguidos de anomalias estruturais cerebrais, distúrbios de movimento, deficiências visuais, e microcefalia.

Um novo quadro clínico identificado por esse estudo é o declínio neurológico tardio, dentre outros fenótipos neuro cognitivos.

Adicionalmente, o gene *DDX3X* possui um parálogo homólogo no cromossomo Y, o gene *DDX3Y*, sendo específico aos homens. Diversos estudos relatam que a presença de um homólogo no cromossomo Y indica um quadro de alta preservação evolucionária desses genes (*DDX3X* pode ser encontrado expresso em levedura e *C.elegans*). Enquanto variantes em *DDX3X* estão associadas a síndromes cognitivas, variantes em *DDX3Y* resultam em infertilidade. No entanto, ambos os genes são intolerantes a variantes de perda de função, fator esse que acrescenta à hipótese de maior conservação gênica (Rauschendorf e col., 2014; Shen e col., 2022; Venkataramanan e col., 2022)

Assim como o gene *DDX3X,* os genes *WDR45* e *PDAH1* estão localizados no cromossomo X, no entanto, esses estão sujeitos à inativação; portanto, uma hipótese plausível é a de que o alelo mutado, identificado nas pacientes, estaria localizado no cromossomo X ativo (Belmont, 1996, em revisão de Kutsche e Brown, 2000; Saitsu e col. 2013). Um aspecto importante de ser discutido seria a ocorrência de manifestações de fenótipos alterados em mulheres com variantes patogênicas localizadas no cromossomo preferencialmente inativado; como mencionado anteriormente, mulheres normalmente apresentam fenótipos mais brandos com relação a variantes ligadas ao cromossomo X, mesmo ocorrendo desvio importante de inativação. É importante ressaltar que isso indica que a inativação nem sempre é total (100:0) e pode resultar em uma expressão residual do alelo patogênico.

O gene *WDR45* (OMIM *300526) está relacionado ao controle e à regulação do processo de autofagia celular, portanto, variantes patogênicas ou provavelmente

patogênicas podem resultar em acúmulo de resíduos intracelulares, afetando o funcionamento do tecido. Tais acúmulos tendem a prejudicar principalmente o sistema nervoso central, devido ao acúmulo de ferro no tecido cerebral, podendo afetar o desenvolvimento neuropsicomotor e causar deficiência intelectual e degeneração cognitiva, similar ao processo patofisiológico de doenças neurodegenerativas, como doença de Parkinson e demência (Noda e col., 2021; Ji e Zhao, 2021; NCBI, acesso em Dezembro/2021). A presença do desvio de inativação do cromossomo X em mulheres portadoras de variantes do gene *WDR45* foi relatada previamente em estudo de Saitsu e col. (2013), que identificaram a expressão apenas do alelo mutado em quatro de cinco pacientes investigadas, e também em estudo de Fieremans e col. (2016), que identificaram a presença de uma variante patogênica *de novo* em *WDR45* em uma paciente com DI grave, baixa estatura orelhas de baixa implantação e espasticidade progressiva dos membros inferiores e desvio de inativação de 93%. Haack e col. (2012) identificaram desvio leve de inativação (75%-90%) em seis pacientes e desvio extremo (≥90%) em quatro pacientes, em grupo de 12 mulheres com mutação no gene *WDR45*, sendo também previamente descrito também por Fieremans e col. (2016), corroborando a relação entre a presença de mutações nesse gene e desvios de inativação do X.

O gene *PDAH1* (OMIM *300502) atua na via energética de produção de ATP. Variantes em *PDAH1* já foram associadas com o acúmulo de piruvato intracelular, que, consequentemente, causa acúmulo de ácido lático, resultando em um estado de acidose no organismo. Tal estado pode causar danos cerebrais e neurológicos (Pavlu-Pereira e col., 2020; Ganetzky e col., 2021; NCBI, acesso em Dezembro/2021). Um estudo prévio de Willemsen e col. (2006) realizou a investigação do padrão de inativação do cromossomo X em fibroblastos de uma

coorte de quatro mulheres afetadas por deficiência de piruvato desidrogenase, com mutações no gene *PDAH1,* observando um desvio de inativação de 90% em todas as pacientes.

Nossos resultados são apoiados por estudos anteriores, como o de Fieremans e col. (2016) e Vianna e col.(2020). Fieremans e col. (2016), realizaram a análise do padrão de inativação do cromossomo X em uma coorte de 288 mulheres com DI, verificando que 22 (7,6%) mulheres apresentavam desvios ≥90:10; em 10 (~45%) dessas 22 mulheres foram identificadas variantes patogênicas, sendo nove mapeadas no cromossomo X (genes ***DDX3X****, SMC1A,* ***WDR45****, NHS, MECP2, MED12, HDAC8 e TAF9B*) e duas em autossomos (genes *EP300, SYNGAP1*). Na população brasileira, Vianna e col. (2020) também identificaram aumento na frequência de mulheres com desvios de inativação entre 53 mulheres afetadas por DI (11% com desvio ≥90:10) representando apenas casos esporádicos; dentre estas seis pacientes identificadas com desvios, duas tinham rearranjos cromossômicos estruturais (deleção de 1,2 Mb no cromossomo 3 e translocação não equilibrada t(X;2)), enquanto em quatro foram identificadas mutações no sequenciamento do exoma: três apresentavam variantes patogênicas em genes mapeados no cromossomo X (*NLGN4X, USP9X e TAF1*) e uma tinha variante patogênica em gene autossômico (*DVL1*). A menor frequência observada em nosso estudo em comparação com o estudo realizado por Vianna e col. (2020), com pacientes brasileiras, poderia ser explicada pelo fato de que excluímos de nosso grupo casos com resultado positivo de CMA. Por outro lado, se considerarmos apenas casos esporádicos e informativos, como no trabalho de Vianna e col. (2020), em nosso estudo foram investigadas 157 casos esporádicos, das quais 98 eram informativas, e 11 apresentaram desvio extremo ou total de

inativação do cromossomo X (≥90%), representando no grupo de casos esporádicos uma frequência de 11.22%.

Um achado interessante em nosso estudo foi que, em quatro casos, os genes com mutações associadas ao quadro de DI estão localizados em autossomos (*KCNB1, CTNNB1, YY1, ANKRD11*). Nesses casos, o desvio de inativação pode ocorrer sem influência da mutação causadora de DI, ou mesmo pela presença de alguma outra variante no cromossomo X que não foi detectada; entretanto, não se pode descartar a possibilidade de que mutações em genes mapeados em autossomos possam ter algum impacto no padrão de inativação do X. Mutações nestes genes autossômicos aqui identificados não foram documentadas em estudos anteriores que utilizaram a mesma abordagem, como os de Fieremans e col. (2016) e Vianna e col. (2020). Adicionalmente, não identificamos na literatura científica relação entre os genes identificados *CTNNB1, ANKRD11* e *KCNB1* e o processo de inativação do X.

Há uma exceção relacionada ao gene *YY1* (OMIM *600013), um fator de transcrição em embriogênese, diferenciação e proliferação celular (Gabriele e col., 2017), que estaria diretamente correlacionado ao processo de inativação do X. De acordo com diversos trabalhos (Thorvaldsen e col., 2011, Makhlouf e col., 2014 e Chen e col. 2016), *YY1* tem papel essencial na inativação do cromossomo X, pois sua proteína participa da associação entre o RNA Xist e o DNA no cromossomo X inativo, agindo como ponte entre os dois. *YY1* se liga ao Xist ativo, apresentando fixação monoalélica, apenas no cromossomo X inativo e, em estudo funcional realizado por Makhlouf e col., (2014), foi relatado que o gene também seria indispensável na regulação e na manutenção da transcrição e da expressão de *Xist*, uma vez que *knockdown* de *YY1* diminui os níveis do RNA Xist em 80%, em

células somáticas de camundongos, após o estabelecimento da inativação do X, assim como o número de células com a nuvem de condensação de Xist, durante a diferenciação celular. Assim, *YY1* é o primeiro fator identificado a controlar a expressão monoalélica de *Xist* durante a iniciação e a manutenção da inativação do X. Portanto, podemos supor que uma variante patogênica *de novo* no gene *YY1*, como aquela identificada em nossa coorte, poderia ser a causa do desvio extremo primário encontrado na paciente P6.

Em três das pacientes com desvio extremo de inativação do cromossomo X não foram detectadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas no exoma. Levando em consideração a frequência de desvio extremo decorrente apenas do padrão randômico do processo de inativação do X, esperaríamos que parte do grupo de 136 mulheres tivesse esse padrão de desvio extremo ou total. Assim, ao menos parte do grupo de 11 pacientes com desvio extremo ou total, como as três pacientes sem mutações identificadas no exoma, assim como no mínimo três das portadoras de mutações patogênicas em autossomos, podem representar exemplos de detecção de desvio apenas como resultado do processo estocástico da inativação do X.O presente estudo apresenta algumas limitações, como a utilização de apenas um lócus, o gene *AR,* para avaliar o padrão de inativação do X. A utilização de mais de um marcador aumentaria nossa capacidade de identificar mulheres informativas para o padrão de inativação e validaria o padrão identificado, nos casos informativos para ambos os *lócus*. Uma segunda limitação seria o fato de utilizarmos DNA extraído de amostras de sangue periférico, sendo esse não completamente representativo do padrão de inativação do cromossomo X encontrado no sistema nervoso central. Uma amostra de mucosa oral teria maior correlação com o tecido cerebral do que o tecido sanguíneo,

considerando o padrão de inativação do X (de Hoon e col., 2015). No entanto, estudo mais recente demonstrou que amostras de sangue podem ser utilizadas para estimar o padrão de inativação de outros tecidos, como o cerebral (Tukiainen e col., 2017). Por fim, o estudo de metilação do gene *AR* para determinação o status de inativação do cromossomo X pode representar um método indireto, devido a seu caráter não totalmente preditivo de tal status de inativação do lócus que se encontra mutado, não determinando qual alelo se encontra preferencialmente inativo na paciente. Uma alternativa mais direta e consistente seria a utilização de análise de expressão de RNA por PCR-RT para estudo do padrão de inativação (Shvetsova e col, 2019).Contudo, usando esta abordagem, identificamos oito pacientes com desvio de inativação e portadoras de variantes patogênicas, em quatro casos em genes mapeados no X, e em uma paciente, em gene autossômico associado ao próprio processo de inativação X, apoiando nossa hipótese de que um desvio extremo de inativação do cromossomo X em mulheres com DI é um indicativo da presença de variantes em genes ligados ao X ou autossômicos relacionados ao processo de inativação X.

Baseado nos resultados encontrados por esse estudo, podemos concluir que a frequência de desvio de inativação do cromossomo X em sangue periférico de mulheres com DI é significativamente maior do que a da população geral. Também verificamos que a análise do padrão de inativação do cromossomo X em mulheres com DI é útil para detecção de desvio extremo ou total (>90%), seria um fator indicativo de variantes causais localizadas no cromossomo X ou mesmo em autossomos, em modelo de herança mendeliano e condições com fenótipos de manifestação dominante.

VII. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo investigar a relação entre DI (> 5 anos) e/ou atraso global de desenvolvimento (< 5 anos) idiopáticos em mulheres e a ocorrência de desvios extremos de inativação do cromossomo X. A metodologia utilizada foi a análise da metilação diferencial da região polimórfica da repetição CAG em alelos do gene *AR*, em amostras de DNA extraído de sangue periférico.

O padrão de inativação do cromossomo X foi avaliado em 194 mulheres com DI (> 5 anos) e/ou atraso global de desenvolvimento (< 5 anos), das quais 136 foram informativas. Onze mulheres (8%) apresentaram desvio extremo ou total de inativação do cromossomo X. Tal frequência de desvio da inativação ≥90% (8%) é significativamente maior que aquele observado em estudos prévios realizados em coortes de mulheres da população geral. Dados de sequenciamento completo de exoma foram obtidos para 10 das 11 mulheres com desvio ≥90%; uma dessas pacientes tinha resultado prévio negativo de exoma. Variantes patogênicas foram identificadas em oito pacientes (73%), afetando sete diferentes genes, associados com quadros clínicos com padrão de herança dominante. Quatro casos foram de variantes mapeadas em genes localizados no cromossomo X (*DDX3X, WDR45, PDHA1*) e quatro em genes localizados em autossomos (*KCNB1, CTNNB1, YY1, ANKRD11)*. Variantes patogênicas em *DDX3X* foram detectadas em duas pacientes. Um dos genes mapeados em autossomo (*YY1*) está diretamente associado ao processo de inativação do cromossomo X.

Assim, em nosso estudo o desvio extremo ou total de inativação do cromossomo X (>90%) foi um fator indicativo da presença de mutações patogênicas localizadas no cromossomo X ou em gene associado ao processo de investigação;

o papel das mutações detectadas nos demais genes mapeados em autossomos, se existente, no desvio detectado, permanece por ser investigado.

VIII. RESUMO

A Deficiência Intelectual (DI) é uma condição que apresenta grande heterogeneidade clínica e etiológica, afetando aproximadamente 2-3% dos indivíduos da população mundial. Grande parte dos casos tem etiologia genética e em 40-60% dos casos a causa é desconhecida. A DI apresenta dimorfismo sexual, tendo uma frequência 30% superior em homens, podendo essa discrepância ser causada pelo fato de que são hemizigotos quanto a genes localizados no cromossomo X e, portanto, irão sempre manifestar a condição de herança recessiva. Outra hipótese associada seria o estado de mosaicismo funcional apresentado pelas mulheres em decorrência da inativação do cromossomo X, que pode minimizar a penetrância e expressividade de fenótipos com padrão dominante.

A inativação do X é um fenômeno de compensação de dose gênica, no qual um dos cromossomos X de mulheres é inativado de maneira estocástica, resultando em níveis similares de expressão gênica entre ambos os sexos. Hipoteticamente, parte das pacientes com DI e desvio extremo de inativação do cromossomo X pode ser portadora de variantes deletérias no cromossomo X. Para investigar a hipótese de que o desvio extremo de inativação do cromossomo X é um fator indicativo de presença de variante patogênica no cromossomo X, foi analisado o padrão de inativação do X em um grupo de pacientes com DI da população brasileira e realizado sequenciamento de exoma completo em todas aquelas nas quais foi observado desvio extremo de inativação (≥90%).

Foram avaliadas 194 mulheres afetadas por DI (> 5 anos) e/ou atraso global de desenvolvimento (< 5 anos) idiopáticos isolado (36%) ou sindrômico (64%), de

grau leve a grave, sendo casos familiares (19%) ou esporádicos (81%). Das 194 mulheres, 136 foram informativas para a análise de inativação do X, permitindo estabelecer o padrão de inativação com base na metilação dos alelos do gene *AR*. Onze mulheres (8%, apenas casos isolados) apresentaram desvio extremo ou total de inativação do cromossomo X (≥90%), sendo essa uma frequência de desvio significativamente maior do que aquela descrita em estudos prévios realizados em coorte de mulheres adultas da população geral.

Em análise de exoma, variantes patogênicas foram identificadas em oito das 11 pacientes com desvio extremo ou total de inativação do X (73%), afetando sete diferentes genes associados a quadros clínicos com padrão de herança dominante. Quatro pacientes possuíam variantes mapeadas em genes do cromossomo X (*DDX3X, WDR45, PDHA1*) e quatro, em genes localizados em autossomos (*KCNB1, CTNNB1, YY1, ANKRD11)*. Variantes patogênicas no gene *DDX3X* foram identificadas em duas pacientes. Um dos genes mapeados em autossomos (*YY1*) está diretamente associado ao processo de inativação do cromossomo X.

Assim, confirmamos que a frequência de desvios extremos da inativação do cromossomo X em mulheres com DI é estatisticamente superior à da população geral de mulheres e que o desvio extremo ou total é fator indicativo de mutações patogênicas causais localizadas no cromossomo X ou em genes em autossomos associados à inativação. O papel das mutações detectadas nos demais genes autossômicos no desvio de inativação, se existente, permanece por ser investigado.

ABSTRACT

Intellectual Disability (ID) is a condition with great clinical and causal heterogeneity, affecting approximately 2-3% of individuals in the world population, and having genetic and environmental etiology. However, in 40-60% of cases, the etiology of the condition is unknown. ID presents sexual dimorphism, with a frequency 30% higher in males, and this discrepancy may be caused by the fact that they are hemizygous for X- chromosome genes and will always manifest X-linked conditions; The state of functional mosaicism presented by women due to X-chromosome inactivation, can minimize penetrance and expressiveness of phenotypes with a dominant pattern. X chromosome inactivation is a gene dose compensation phenomenon, in which one of the X chromosomes in women is inactivated, resulting in similar levels of gene expression between men and women. Hypothetically, such extreme deviations of X-chromosome inactivation in women would be related to clinical pictures, including ID, caused by mutations in genes located on the X chromosome.

To investigate this hypothesis, we analyzed the pattern of X chromosome inactivation in 194 women affected by isolated (36%) or syndromic (64%) idiopathic ID, mild to severe, familial (19%) or sporadic (81%), evaluated in the Genetic Counseling Service of the Human Genetics Laboratory of the Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo. Of the 194 women, 136 were informative for alleles in the AR locus, and had the X-inactivation pattern determined. Eleven women (8%) had extreme or complete X-chromosome inactivation deviation, this being a deviation frequency ≥90% significantly higher than that described in previous studies conducted in a cohort of

adult women in the general population, at 3.6%, with a statistically relevant difference.

Whole exome sequencing data were obtained for the 11 women with inactivation ratios ≥90%. Pathogenic or likely pathogenic variants were identified in seven genes in eight patients (73%). The genes had been previously associated with conditions having a dominant pattern of inheritance and affected women had been described. Four variants were mapped on X-chromosome genes (*DDX3X, WDR45, PDHA1*), and four variants on autosomal genes (*KCNB1, CTNNB1, YY1, ANKRD11*). The autosomal gene *YY1* has a role in X-inactivation.

We confirmed that the frequency of extreme or total X-inactivation skewing (>90%) is statistically higher among women with ID than in the female general population and is indicative of causative X-chromosome mutations. The role of mutations in most autosomal genes, if any, in the detected skewing remains to be investigated.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen, R.C.; Zoghbi, H.Y.; Moseley, A.B.; Rosenblatt, H. M.; Belmont, J.W. Methylation of Hpall and Hhal Sites Near the Polymorphic CAG Repeat in the Human Androgen-Receptor Gene Correlates with X Chromosome Inactivation. **The American Journal of Human Genetics, (**51): 1229-1239, 1992.

Amos-Landgraf J.M.; Cottle A.; Plenge R.M.; Friez M.; Schwartz C.E.; Longshore J. Willard H.F. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. **The American Journal of Human Genetics** (79): 493-499, 2006.

Bader, I.; McTiernan, N.; Darbakk, C.; Boltshauser, E.; Ree. R.; Ebner, S.; Mayr, J. A.; Arnesen, T. Severe syndromic ID and skewed X-inactivation in a girl with NAA10 dysfunction and a novel heterozygous de novo NAA10 p.(His16Pro) variant - a case report. **BMC Medical Genetics**, 21(1):153, 2020.

Balaton, B. P.; Dixon-McDougall, T.; Peeters, S.B.; Brown, C. J. The eXceptional nature of the X chromosome. **Human Molecular Genetics**, (27): 242-249, 2018.

Barr, M. L.; Bertram, E. G. A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. **Problems of Birth Defects,** 101–102, 1949.

Berletch, J. B.; Yang, F.; Disteche, C. M. Escape from X inactivation in mice and humans. **Genome Biology**, (11) 213, 2010.

Bittel, D.C.; Theodoro, M.F.; Kibiryeva, N.; Fischer, W.; Talebizadeh, Z.; Butler, M.G. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. **Journal of Medical Genetics,** (45): 309-313, 2008.

Blok, L. S. e col. Mutations in DDX3X Are a Common Cause of Unexplained Intellectual Disability with Gender-Specific Effects on Wnt Signaling. **The American Journal of Human Genetics**, (97): 1–10, 2015.

Borges, B.P.C.N. Investigação de padrões de inativação do cromossomo X em mulheres saudáveis residentes no Estado do Rio de Janeiro. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2018.

Boumil, R.M.; Lee, J.T. Forty years of decoding the silence in X-chromosome inactivation. **Human Molecular Genetics,** (10): 2225-2232, 2001.

Brown, J. C.; Huntington, F. W. The human X-inactivation centre is not required for maintenance of X-chromosome inactivation. **Nature**, 368, 1994.

Busque, L.; Mio, R.; Mattioli, J.; Brais, E.; Blais, N.; Lalonde, N.; Maragh, M.; Gilliland, D. G. Nonrandom X-Inactivation Patterns in Normal Females: Lyonization Ratios Vary With Age. **Blood Journal**, 88(1): 59-65, 1996.

Cantone, I. Reversal of X chromosome inactivation: lessons from pluripotent reprogramming of mouse and human somatic cells. Journal of Translational Genetics and Genomics,1:1-14, 2017.

Carrel, L., & Willard, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**, 434(7031): 400–404, 2005.

Catino, G.; Genovese, S.; Tommaso, S.; Orlando, V.; Petti, M. T.; Bernardi, M. L.; Dallapiccola, B.; Novelli, A.; Ulgheri, L.; Piscopo, C.; Alesi, V. Reciprocal Xp11.4p11.3 microdeletion/microduplication spanning USP9X , DDX3X , and CASK genes in two patients with syndromic intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics Part A.** 2022.

Chen, C.; Shi, W.; Balaton, B. P.; Matthews, A. M.; Li, Y.; Arenillas, D. J.; Wasserman, W. W. YY1 binding association with sex-biased transcription revealed through X-linked transcript levels and allelic binding analyses. **Scientific Reports**, 6(1), 2016.

Chiurazzi, P.; Pirozzi, F. Advances in Understanding - Genetic Basis of Intellectual Disability. **F1000 Research, (**5) 599, 2016.

Chelly, J.; Mandel, J. L. Monogenic causes of X-linked mental retardation. **Nature Reviews Genetics**, 2(9), 669–680, 2001

Crawford, D. C.; Acuna, J. M.; Sherman, S. L. FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. **Genetics in Medicine,** (3): 359-371, 2001.

Csankovszki, G.; Nagy, A.; Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA Methylation, and Histone Hypoacetylation in Maintaining X Chromosome Inactivation. **The Journal of Cell Biology**, 153(4), 773–783, 2001.

De Hoon, B.; Monkhorst, K.; Riegman, P.; Laven, J. S. E.; Gribnau, J. Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. **Journal of Medical Genetics, (**52) 784–790, 2015.

De Ligt, J.; Willemsen, M. H.; van Bon, B. W. M.; Kleefstra, T.; Yntema, H. G.; Kroes, T.; Vissers, L. E. L. M. Diagnostic Exome Sequencing in Persons with Severe Intellectual Disability. **New England Journal of Medicine**, 367(20), 2012.

De Luca, C.; Race, V.; Keldermans, L.; Bauters, M.; Van Esch, H. Challenges in Molecular Diagnosis of X-linked Intellectual Disabilities. **British Medical Bulletin,** 2020.

Desjardins, P.; Conklin, D. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. **Journal of Visualized Experiments**, 2010.

Des Portes, V. X-linked mental deficiency. **Pediatric Neurology Part I**, 297–306, 2013.

Disteche, C. M. Escape from X inactivation in human and mouse. **Trends in Genetics**, 11(1), 17-22, 1995.

Do Nascimento, E.; De Figueiredo, V. L. M., WISC-III e WAIS-III: Alterações nas Versões Originais Americanas Decorrentes das Adaptações para Uso no Brasil. **Psicologia: Reflexão e Crítica**, 603-612, 2002.

Ellison, J. W.; Rosenfeld, J. A.; & Shaffer, L. G. Genetic Basis of Intellectual Disability. **Annual Review of Medicine**, 64(1): 441–450, 2012.

Emerson, E. Poverty and People with Intellectual Disabilities. **Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews**, (13) 107 – 113, 2007.

Fan, G.; Tran, J. X chromosome inactivation in human and mouse pluripotent stem cells. **Human Genetics,** 130(2): 217–222, 2011.

Fieremans, N.; Bauters, M.; Belet, S.; Verbeeck, J.; Jansen, A. C.; Seneca, S.; Roelens, F.; de Baere, E.; Marynen, P.; Froyen, G. De novo MECP2 duplications in two females with intellectual disability and unfavorable complete skewed X-inactivation. **Human Genetics**, 133(11): 1359–1367, 2014.

Fieremans, N.; Van Esch, H.; Holvoet, M.; Van Goethem, G.; Devriendt, K.; Rosello, M.; Froyen, G. Identification of Intellectual Disability Genes in Female Patients with a Skewed X-Inactivation Pattern. **Human Mutation**, 37(8): 804–811, 2016.

Fonseca, C. M.; de Oliveira, J. F.; Araujo, B. H. S.; Canateli, C.; do Prado, P. F. V.; Amorim Neto, D. P.; Bosque, B. P.; Rodrigues, P. V.; de Godoy, J. V. P.; Tostes, K.; Filho, H. V. R.; Nascimento, A. F. Z.; Saito, A.; Tonoli, C. C. C.; Batista, F. A. H.; de Oliveira, P. S. L.; Figueira, A. C.; Souza da Costa, S.; Krepischi, A. C. V.; Rosenberg, C.; Westfahl, H. Jr.; da Silva, A. J. R.; Franchini, K. G. Molecular and cellular basis of hyperassembly and protein aggregation driven by a rare pathogenic mutation in DDX3X**. iScience**, 24(8):102841, 2021.

Frints, S. G. M.; Froyen, G.; Marynen, P.; Fryns, J-P. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. **Clinical Genetics,** (62): 423-432, 2002.

Gabriele, M.; Vulto-van Silfhout, A. T.; Germain, P. L.; Vitriolo, A.; Kumar, R.; Douglas, E.; Rauch, A. YY1 Haploinsufficiency Causes an Intellectual Disability Syndrome Featuring Transcriptional and Chromatin Dysfunction. **The American Journal of Human Genetics**, 100(6): 907–925, 2017.

Galupa, R.; Heard, E. X-Chromosome Inactivation: A Crossroads Between Chromosome Architecture and Gene Regulation. **Annual Review of Genetics**, 52 (1), 2016.

Ganetzky, R.; McCormick, EM.; Falk. MJ. Primary Pyruvate Dehydrogenase Complex Deficiency Overview. GeneReviews® [Internet], Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK571223/, 993, 2021.

Garibyan, L.; Avashia. N. Polymerase chain reaction. J Invest Dermatol, 133(3): 1-4, 2013.

Gécz, J., Shoubridge, C., & Corbett, M. The genetic landscape of intellectual disability arising from chromosome X. **Trends in Genetics**, 25(7): 308–316, 2009.

Giorgetti, L.; Lajoie, B. R.; Carter, A. C.; Attia, M.; Zhan, Y., Xu, J.; Chen, C. J.; Kaplan, N.; Chang, H. Y.; Heard, E.; Dekker, J. Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. **Nature**, 535(7613): 575–579, 2016.

Gribnau, J.; Barakat, T. S. X-chromosome inactivation and its implications for human disease. **bioRxiv**, 2017.

Haack, T. B.; Hogarth, P.; Kruer, M. C.; Gregory, A.; Wieland, T.; Schwarzmayr, T.; Hayflick, S. J. Exome Sequencing Reveals De Novo WDR45 Mutations Causing a Phenotypically Distinct, X-Linked Dominant Form of NBIA. **The American Journal of Human Genetics**, 91(6): 1144–1149, 2012.

Heard, E.; Clerc, P.; Avner, P. X-Chromosome Inactivation In Mammals. **Annual Review of Genetics**, 31, 571–610, 1997.

Inlow, J. K. Molecular and Comparative Genetics of Mental Retardation. **Genetics**, 166(2): 835–881, 2004.

Jacquemont, S.; Coe, B. P.; Hersch, M.; Duyzend, M. H., Krumm, N.; Bergmann, S.; Beckmann J. S.; Rosenfeld, J. A.; Eichler, E. E. A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders. **The American Journal of Human Genetics**, 94(3): 415–425, 2014.

Ji, C.; Zhao, Y. G. The BPAN and intellectual disability disease proteins WDR45 and WDR45B modulate autophagosome-lysosome fusion. **Autophagy**, 17(7): 1783–1784, 2021.

Jorde, B. L.; Carey, J. C.; Bamshad, M.J; White, R. L. Genética Médica. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

Kalantry, S. Recent Advances in X-Chromosome Inactivation. **Journal of Cellular Physiology**, 226(7): 1714–1718, 2011.

Kay, G, F.; Barton, S. C.; Surani, M. A.; Rastan, S. Imprinting and X Chromosome Counting Mechanisms Determine Xist Expression in Early Mouse Development**. Cell**, 77, 639-650, 1994.

Ke, X.; Liu, J. Deficiência Intelectual. In Rey JM (ed), IACAPAP e-Textbook of Child and Adolescent Mental Health (edição em português; Dias Silva F, ed). Genebra: **International Association for Child and Adolescent Psychiatry and Allied Professions**, 2015.

Knudsen, G. P. S.; Pedersen, J.; Klingenberg, O.; Lygren, I.; Ørstavik, K. H.; Increased skewing of X chromosome inactivation with age in both blood and buccal cells. **Cytogenetic and Genome Research,** 116(1-2): 24-28, 2007.

Kutsche, R.; Brown, C. J. Determination of X-Chromosome Inactivation Status Using X-Linked Expressed Polymorphisms Identified by Database Searching. **Genomics**, 65(1): 9–15, 2000.

Lee, T. J.; Jaenisch, R. The (epi)genetic control of mammalian X-chromosome inactivation**. Current Opinion in Genetics & Development**, (7): 274-280, 1997.

Lehrke, R. G. Theory of X-linkage of major intellectual traits**. American Journal of Mental Deficiency**, (76): 611–619, 1972.

Lehrke, R. G. X-linked mental retardation and verbal disability. **Birth Defects Orig Artic Series**, (10): 1–100, 1974.

Libert, C.; Dejager, L.; & Pinheiro, I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. **Nature Reviews Immunology**, 10(8): 594–604, 2010.

Lock, L. F.; Takagi, N.; Martin, G. R. Methylation of the Hprt Gene on the Inactive X Occurs after Chromosome Inactivation. **Cell**, (46): 39-46, 1987.

Lubs, H. A.; Stevenson, R. E.; & Schwartz, C. E. Fragile X and X-Linked Intellectual Disability: Four Decades of Discovery. **The American Journal of Human Genetics**, 90(4): 579–590, 2012.

Lyon, M. F.; Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.). **Nature**, 190: 372–373, 1961.

Lyon, M. F.; Sex chromatin and gene action in the mammalian X chromosome. **The American Journal of Human Genetics,** 14: 135–148, 1961.

Makhlouf, M.; Ouimette, J.F.; Oldfield, A.; Navarro, P.; Neuillet, D.; Rougeulle, C. A prominent and conserved role for YY1 in Xist transcriptional activation**. Nature Communications**, 5(1), 2014.

Mandel, J. L.; Chelly, J. Monogenic X-linked mental retardation: is it a frequent as current estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. **European Journal of Human Genetics,** 12: 689-693, 2004.

Matthews, P. M.; Benjamin, D.; Van Bakel, I.; Squier, M.V.; Nicholson, L. V. B.; Sewry, C.; Barnes, P. R. J.; Hopkin, J.; Brown, R.; Hilton-Jones, D.; Boyd, Y.; Karpati, G.; Brown, G. K. Muscle X-Inactivation Patterns And Dystrophin Expression In Duchenne Muscular Dystrophy Carriers. **Neuromuscular Disorders**, 5(3): 209-220, 1995.

Mefford, H. C.; Batshaw, M. L.; & Hoffman, E. P. Genomics, Intellectual Disability, and Autism. **New England Journal of Medicine**, 366(8): 733–743, 2012.

Mietton, F.; Sengupta, A. K.; Molla, A.; Picchi, G.; Barral, S.; Heliot, L.; Grange, T.; Wutz, A.; Dimitrov, S. Weak but Uniform Enrichment of the Histone Variant macroH2A1along the Inactive X Chromosome. **Molecular and Cellular Biology**, 29(1): 150–156, 2009.

Migeon, R. B. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. **Elsevier Science**, 10(7): 230-235, 1994.

Migeon, R. B. The Role of X Inactivation and Cellular Mosaicism in Women's Health and Sex-Specific Diseases. **American Medical Association**, 295(12): 1428-1433, 2006.

Migeon, R. B. Why Females Are Mosaics, X-Chromosome Inactivation, and Sex Differences in Disease. **GENDER MEDICINE,** 4(2): 97-105, 2007.

Migeon, R, B. An overview of X inactivation based on species differences. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, 2016.

Migeon, R. B. Choosing the Active X: The Human Version of X Inactivation. **Trends in Genetics,** 2017.

Migeon, R. B. X-linked diseases: susceptible females. **Genetics in Medicine**, (22): 1156–1174, 2020.

Morrey, C.; Avner, P. The Demoiselle of X-Inactivation: 50 Years Old and As Trendy and Mesmerising As Ever. **PLoS Genetics**, 7(7), 2011.

Muers, M. R.; Sharpe, J. A.; Garrick, D.; Sloane-Stanley, J.; Nolan, P. M.; Hacker, T.; Wood, W. G.; Higgs, D. R.; Gibbons, R. J. Defining the Cause of Skewed X-Chromosome Inactivation in X-Linked Mental Retardation by Use of a Mouse Model. **The American Journal of Human Genetics**, 80(6): 1138–1149, 2007.

Musante, L.; & Ropers, H. H. Genetics of recessive cognitive disorders. **Trends in Genetics**, 30(1): 32–39, 2014.

Neri, G.; Schwartz, C. E.; Lubs, H. A.; & Stevenson, R. E. X-linked intellectual disability update 2017. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 176(6): 1375–1388, 2018.

Nesterova, T. B.; Johnston, C. M.; Appanah, R.; Newall, A. E. T.; Godwin, J.; Alexiou, M.; Brockdorff, N. Skewing X chromosome choice by modulating sense transcription across the Xist locus. **GENES & DEVELOPMENT**, 17, 2177–2190, 2003.

Nicola, P.; Blackburn, P. R.; Rasmussen, K. J.; Bertsch, N. L.; Klee, E. W.; Hasadsri, L.; Pichurin, P. N.; Rankin, J.; Raymond, F. L.; Clayton-Smith, J. De novo DDX3X missense variants in males appear viable and contribute to syndromic intellectual disability. **American Journal of Medical Genetics Part A**, 179(4): 570-578, 2019.

Noda, M.; Ito, H.; Nagata, Ki. Physiological significance of WDR45, a responsible gene for β-propeller protein associated neurodegeneration (BPAN), in brain development. **Scientific Reports**, 11(22568), 2021.

Nussbaum, R. L; McInnes, R. R.; Willard, H. F. Thompson & Thompson: Genética Médica, 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

Organização Mundial de Saúde, The World Health Report 2001. Mental Health: New Understanding, New Hope. 1 ed. Lisboa: Direcção-Geral da Saúde, 2002.

Organização Mundial de Saúde, World report on disability 2011. São Paulo: Organização Mundial da Saúde, 2011.

Pavlu-Pereira, H.; Silva, MJ.; Florindo, C.; Sequeira, S.; Ferreira, AC.; Duarte, S.; Rodrigues, AL.; Janeiro, P.; Oliveira, A.; Gomes, D.; Bandeira, A.; Martins, E.; Gomes, R.; Soares, S.; Tavares de Almeida, I.; Vicente, JB.; Rivera, I. Pyruvate dehydrogenase complex deficiency: updating the clinical, metabolic and mutational landscapes in a cohort of Portuguese patients. **Orphanet Journal of Rare Diseases**.15(1): 298, 2020.

Posynick B. J.; Brown, C. J. Escape From X-Chromosome Inactivation: An Evolutionary Perspective. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**. (7): 241, 2019.

Plenge, R. M.; Stevenson, R. A.; Lubs, H. A.; Schwartz, C. E.; Willard, H. F. Skewed X-Chromosome Inactivation Is a Common Feature of X-Linked Mental Retardation Disorders. **The American Journal of Human Genetics**, 71(1), 168–173, 2002.

Rauschendorf, M-A.; Zimmer, J.; Ohnmacht, C.; Vogt, P. H. DDX3X, the X homologue of AZFa gene DDX3Y, expresses a complex pattern of transcript variants only in the male germ line. **Molecular Human Reproduction**, 20(12), 1208–1222, 2014.

Richards, C. S.; Watkins, S. C.; Hoffman, E. P.; Scheneider, N. R.; Milsark, W.; Katz, K. S.; Cook, J. D.; Kunkel, L. M.; Cortada, J. M. Skewed X Inactivation in a Female MZ Twin Results in Duchenne Muscular Dystrophy. **The American Journal of Human Genetics**. 46, 672-681, 1990,

Ropers, H. H.; Derivery, E.; Hu, H.; Garshasbi, M.; Karbasiyan, M.; Herold, M.; Nurnberg, G.; Ullmann, R.; Gautreau, A.; Sperling, K.; Varon, R.; Rajab, A.

Identification of a novel candidate gene for non-syndromic autosomal recessive intellectual disability: the WASH complex member SWIP. **Human Molecular Genetics**, Vol. 20 (13), 2585–2590, 2011.

Ropers, H. H. Genetics of Early Onset Cognitive Impairment. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, 11(1): 161–187, 2010.

Ropers, H. H. Genetics of intellectual disability**. Current Opinion in Genetics & Development,** 18, 241-250, 2008.

Ropers, H. H.; Hamel, B. C. J. X-linked mental retardation. **Nature Reviews Genetics**, 6(1): 46–57, 2005.

Rosenberg, C.; Knijnenburg, J.; Bakker, E.; Vianna-Morgante, A. M.; Sloos, W.; Otto, P.A.; Kriek, M.; Hansson, K.; Krepischi-Santos, A.C.; Fiegler, H.; Carter, N.P.; Bijlsma, E.K.; van Haeringen, A.; Szuhai, K.; Tanke, H.J. Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of imbalances present both in affected children and normal parents**. Journal of Medical Genetics,** 43, 180-186, 2006.

Ross, M. T.; Grafham, D. V.; Coffey, A. J.; Scherer, S.; McLay, K.; Muzny, D.; Bird, C. P. The DNA sequence of the human X chromosome. **Nature**, 434(7031): 325–337, 2005.

Sado, T.; Sakaguchi, T.; Species-specific differences in X chromosome inactivation in mammals. **Reproduction**, 146, 131–139, 2014.

Saitsu, H.; Nishimura, T.; Muramatsu, K.; Kodera, H.; Kumada, S.; Sugai, K.; Matsumoto, N. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. **Nature Genetics**, 45(4): 445–449, 2013.

Santoro, M. R.; Bray, S; M.; Warren, S. T. Molecular Mechanisms of Fragile X Syndrome: A Twenty-Year Perspective. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, 7(1), 219-245, 2012.

Savatt, J. M.; Myers, S. M. Genetic Testing in Neurodevelopmental Disorders. **Frontiers in pediatrics**, 9: 526779, 2021.

Seo, G. H.; Kim, T.; Choi, I. H.; Park, J. Y.; Lee, J.; Kim, S.; Won, D. G.; Oh, A.; Lee, Y.; Choi, J.; Lee, H.; Kang, H. G.; Cho, H. Y.; Cho, M. H.; Kim, Y. J.; Yoon, Y. H.; Eun, B. L.; Desnick, R. J.; Keum, C.; & Lee, B. H. Diagnostic yield and clinical utility of whole exome sequencing using an automated variant prioritization system, EVIDENCE. **Clinical genetics**, 98(6), 562–570, 2020.

Sharp, A.; Robinson, D.; Jacobs, P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. **Human Genetics**, 107, 343–349, 2000.

Shen, H.; Yanas, A.; Owens, M. O.; Zhang, C.; Fritsch, C.; Fare, C. M.; Copley, K. E.; Shorter, J.; Goldman, Y. E.; Fange Liu, K. F. Sexually dimorphic RNA helicases DDX3X and DDX3Y differentially regulate RNA metabolism through phase separation. **Molecular Cell,** 2022.

Shvetsova, E.; Sofronova, A.; Monajemi, R.; Gagalova, K.; Draisma, H. H. M.; White, S. J.; Santen, G. W. E.; Lopes S. M. C. de S.; Heijmans, B. T.; van Meurs, J.; Jansen, R.; Franke, L.; Kielbasa, S. M.; den Dunnen, J. T.; Hoen, P. A. C.; BIOS consortium; GoNL consortium. Skewed X-inactivation is common in the general female population. **European Journal of Human Genetics**, 27(3): 455-465, 2019.

Slavney, A.; Arbiza, L.; Clark, A. G.; Keinan, A. Strong Constraint on Human Genes Escaping X-Inactivation Is Modulated by their Expression Level and Breadth in Both Sexes. **Molecular Biology and Evolution.** 33(2): 384–393, 2015.

Spatz, A.; Borg, C.; Feunteun, J. X-Chromosome Genetics and Human Cancer. **Nature Reviews Cancer** (4): 617-624, 2004.

Stevenson, R. E.; Schwartz, C, E.; Rogers, R, C. Atlas of X-Linked Intellectual Disability Syndromes: 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

Strachan, T. E.; Read, A. P. Genética Molecular Humana. 4 ed. São Paulo: Artmed, 2013.

Szelinger, S.; Malenica, I.; Corneveaux, J. J.; Siniard, A. L.; Kurdoglu, A. A.; Ramsey, K. M.; Schrauwen, I.; Trent, J. M.; Narayanan, V.; Huentelman, M. J. Craig, D. W. Characterization of X Chromosome Inactivation Using Integrated Analysis of Whole-Exome and mRNA Sequencing. **PLoS One,** 9(12):e113036, 2014.

Thorvaldesen, J. L.; Weaver, J. M.; Bartolomei, M. S. A YY1 Bridge for X Inactivation, 146(1): 11-13, 2011.

Tsuchiya, K. D.; & Willard, H. F. Chromosomal domains and escape from X inactivation: comparative X inactivation analysis in mouse and human. **Mammalian Genome**, 11(10): 849–854, 2000.

Tukiainen, T.; Villani, A. C.; Yen, A.; Rivas, M. A.; Marshall, J. L.; Satija, R.; Aguirre, M.; Gauthier, L.; Fleharty, M.; Kirby, A.; Cummings, B. B.; Castel, S. E.; Karczewski, K. J.; Aguet, F.; Byrnes, A. Landscape of X chromosome inactivation across human tissues**. Nature,** 550(7675):244–8, 2017.

Tzschach, A.; Grasshoff, U.; Beck-Woedl, S.; Dufke, C.; Bauer, C.; Kehrer, M.; Bauer, P. Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. **European Journal of Human Genetics**, 23 (11): 1513–1518, 2015.

Van den Veyver, I. B. Skewed X Inactivation in X-Linked Disorders. **Seminars in Reproductive Medicine**, 19(2), 2001.

Venkataramanan. S.; Calviello, L.; Wilkins, K.; Floor, S. N. DDX3X and DDX3Y are redundant in protein synthesis. RNA**.** 2021.

Vianna, E. Q.; Piergiorge, R. M.; Gonçalves, A. P.; dos Santos, J. M.; Calassara, V.; Rosenberg, C.; Krepischi, A. C. V.; da Silva, R. T. B.; dos Santos, S. R.; Ribeiro, M. G.; Machado, F. B.; Medina-Acosta, E.; Pimentel, M. M. G.; Santos-Rebouças, C. B. Understanding the Landscape of X-linked Variants Causing Intellectual Disability in Females Through Extreme X Chromosome Inactivation Skewing. **Molecular Neurobiology,** 2020.

Vicoso, B.; & Charlesworth, B. Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. **Nature Reviews Genetics**, 7(8): 645–653, 2006.

Vissers, L. E. L. M.; Gilissen, C.; & Veltman, J. A. Genetic studies in intellectual disability and related disorders. **Nature Reviews Genetics**, 17 (1): 9–18, 2015.

Wang, X.; Posey, J. E.; Rosenfeld, J. A.; Bacino, C. A.; Scaglia, F.; Immeken, L.; Harris, J. M.; Hickey, S. E.; Moshier, T. M.; Slavotinek, A. Phenotypic expansion

in DDX3X - a common cause of intellectual disability in females. **Annals Of Clinical and Translational Neurology**, 5(10): 1277-1285, 2018.

Wieczorek, D. Autosomal dominant intellectual disability. **Medizinische Genetik**, 30 (3): 318–322, 2018.

Willemsen, M.; Rodenburg, R. J. T.; Teszas, A.; van den Heuvel, L.; Kosztolanyi, G.; Morava, E. Females with PDHA1 gene mutations: A diagnostic challenge. **Mitochondrion**, 6(3): 155–159, 2006.

Wright, C. F.; FitzPatrick, D, R.; Firth, H, V., Paediatric genomics: diagnosing rare disease in children. **Nature Reviews Genetics**, 19, 253-268, 2018.

Wutz, A. Gene silencing in X-chromosome inactivation: advances in understanding facultative heterochromatin formation. **Nature Reviews Genetics**, 12(8): 542–553, 2011.

Yang, C.; Chapman, A. G.; Kelsey, A. D.; Minks, J.; Cotton, A. M.; Brown, C. J. X-chromosome inactivation: molecular mechanisms from the human perspective. **Human Genetics,** 130:175–185, 2011.

Yildirim, E.; Kirby, J. E.; Brown, D. E.; Mercier, F. E.; Sadreyev, R. I.; Scadden, D. T.; Lee, J. T. Xist RNA Is a Potent Suppressor of Hematologic Cancer in Mice. **Cell** 152: 727–742, 2013.

Zar, J.; H. Biostatistical Analysis (Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, 2010).

Zechner, U.; Wilda, M.; Kehrer-Sawatzki, H.; Vogel, W.; Fundele, R.; Hameister, H. A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? **Trends in Genetics**, 17(12): 697–701, 2001.

Ziats, C, A.; Schwartz, C, E.; Gecz, J.; Shaw, M.; Field, M, J.; Stevenson, R, E.; Neri, G. X-linked intellectual disability: Phenotypic expression in carrier females. **Clinical Genetics**, 1-8, 2019.

Acessos online:

ABraOM: Brazilian genomic variants. Disponível em: <http://abraom.ib.usp.br/>. Acesso em: jul.2021.

Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G4410-90020_CGH_ULS_3.5.pdf>. Acesso em: jul.2020.

ClinVar. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Acesso em: jul.2021.

DGV: Database of Genomic Variants. Disponível em: <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>. Acesso em: jul.2021.

dbSNP. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>. Acesso em: jul.2021.

Ensembl Genome Browser. Disponível em: <https://www.ensembl.org/index.html>. Acesso em: jul.2021.

Exac Browser. Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org/>. Acesso em: jul.2021.

gnomAD Browser - The Genome Aggregation Database. Disponível em: <https://gnomad.broadinstitute.org/>. Acesso em: jul.2021.

Greenwood Genetic Center XLID Genetic Research. Disponível em: <https://www.ggc.org/xlid-genetic-research>. Acesso em jul.2021.

National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: dez.2021.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man: Disponível em: <https://www.omim.org/>. Acesso em: jul.2021.

SysID database: Disponível em: <https://sysid.cmbi.umcn.nl/>. Acesso em: jan.2021.

The MegaMANUAL A Guide for Sequencing with the MegaBACE 1000 DNA Sequencing System. **Artisan Technology Group.** Disponível em: <https://www.artisantg.com/Scientific/50165-

2/GE_Healthcare_Amersham_Biosciences_MegaBACE_1000_Sequencing_System_Blue>. Acesso em: out.2019.

Varsome database: Disponível em: < https://varsome.com/>. Acesso em: jul.2021.

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

3 billion. Disponível em: <https://3billion.io/>. Acesso em: jul.2021.