

Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Andressa Cristina Giuliani Martins Bueno

Estudo da deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X: investigação de variantes causais em filhos de mulheres com desvios extremos da inativação do X

Investigation of X-linked intellectual disability: search for causative variants in sons of women with highly skewed X-inactivation

São Paulo

2022

EXEMPLAR CORRIGIDO
Universidade de São Paulo
Instituto de Biociências

Andressa Cristina Giuliani Martins Bueno

Estudo da deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X: investigação de variantes causais em filhos de mulheres com desvios extremos da inativação do X

Investigation of X-linked intellectual disability: search for causative variants in sons of women with highly skewed X-inactivation

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

Orientadora: Angela Maria Vianna Morgante

São Paulo

2022

Giuliani Martins Bueno, Andressa Cristina

Estudo da deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X/
Andressa Cristina Giuliani Martins Bueno; orientadora Angela Maria Vianna
Morgante -- São Paulo, 2022. – 51p.

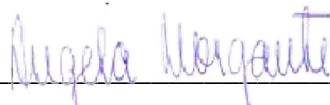
Dissertação (Mestrado Profissional) -- Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Programa de Mestrado Profissional em
Aconselhamento Genético e Genômica Humana.

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

Comissão Julgadora

Profa. Dra. Luciana A. Haddad

Profa. Dra. Juliana F. Mazzeu



Profa. Dra. Angela M. Vianna Morgante

Orientadora

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

Ao meu esposo Gabriel e aos meus pais João e Rita, pelo companheirismo, amor e compreensão.

“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

Eclesiastes 3:1

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me ter capacitado a todo momento.

Aos meus pais, João e Rita, que nunca mediram esforços para me incentivar nos estudos. Obrigada por acreditarem em mim e em meus sonhos e por sempre estarem ao meu lado.

Ao meu esposo, Gabriel, pelo companheirismo, amor, apoio e afeto, por nunca me deixar desistir e por sempre acreditar em mim.

À minha sogra, Maria Cristina, pelo incentivo constante e pelos conselhos, que sempre me ajudaram.

Agradeço a todos os professores que participaram direta ou indiretamente da minha caminhada. A eles, meu respeito e gratidão.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Angela M. Vianna Morgante pelos ensinamentos, pela paciência e compressão durante todos esses anos.

Às Profas. Dras. Ana Cristina Victorino Krepisch e Regina Celia Mingroni Netto e ao Prof. Dr. Paulo A. Otto, pelo apoio durante a realização deste trabalho.

A todos os colegas que durante o curso se propuseram a me auxiliar de alguma forma para que este trabalho fosse concluído.

À família dos pacientes, pela colaboração.

Por fim, agradeço ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realizar o curso Mestrado Profissional em Aconselhamento Genético e Genômica Humana, me permitindo aprofundamento na área e fornecendo todos os meios necessários para conclusão deste trabalho.

Índice

I. Introdução	
I.1. Deficiência intelectual	8
I.2. Deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X	10
I.3. Padrão de inativação do cromossomo X em portadoras de mutações do cromossomo X que causam deficiência intelectual em homens	13
II. Objetivos	18
III. Casuística e Métodos	20
III.1. Casuística	20
III.2. Métodos	20
III.2.1. Obtenção das amostras de DNA genômico	20
III.2.2. Análise do padrão de inativação do cromossomo X	21
III.2.3. Investigação de microdeleções e microduplicações no cromossomo X por microarranjo genômico (Chromosome Microarray Analysis - CMA)	22
III.2.4. Sequenciamento completo de exomas	22
III.2.5. Filtragem de variantes	23
III.2.6. Validação de variantes e análise de segregação	25
IV. Resultados e Discussão	27
V. Conclusão	39
VI. Resumo	40
Abstract	41
VII. Referências bibliográficas	42

I. Introdução

I.1 Deficiência intelectual

A Deficiência Intelectual (DI) é uma das condições mais comuns de encaminhamento para serviços de genética, constituindo importante problema na área da saúde pública. A função intelectual refere-se à capacidade mental geral - aprendizado, raciocínio e resolução de problemas - caracterizando-se a deficiência intelectual por limitações significativas na função intelectual e no comportamento adaptativo, que se manifestam nas habilidades conceituais, sociais e práticas, com início antes dos 18 anos de idade (*American Association on Intellectual and Developmental Disabilities*).

A DI é condição complexa e heterogênea, causada por fatores ambientais, fatores genéticos ou pela combinação de ambos. Convencionalmente, é classificada, de acordo com o Quociente de Inteligência (QI), em leve (QI entre 70 e 50), moderada (QI entre 50 e 35), grave (QI entre 35 e 20) e profunda (QI < 20). As formas moderadas a profunda têm frequência populacional de 0,3 a 0,5% e a leve, de 1 a 3%. Entretanto, a frequência de DI é maior nos países de baixa e média renda, onde as taxas são quase o dobro daquelas dos países de renda mais alta, aparecendo altos níveis de desnutrição como causa importante de DI (Chiurazzi e Oostra, 2000; Maulik e col., 2011). A DI leve compreende 80 a 85% dos casos e é geralmente multifatorial, resultando da interação de vários genes com fatores ambientais; está especialmente associada a níveis socioeconômicos baixos e a desnutrição aparece como importante causa ambiental; já a DI moderada a profunda, corresponde a 15-20% dos casos e tem frequência semelhante nos diferentes níveis socioeconômicos, o que evidencia o componente genético predominante em sua etiologia (Chiurazzi e Oostra, 2000; Ropers, 2010).

Do ponto de vista clínico, a DI é classificada em síndrômica, quando associada a outros sinais clínicos, e não síndrômica, em que a única característica evidente é a DI. Quanto mais grave a DI, geralmente mais frequente é sua associação com outros sinais clínicos, o que facilita o diagnóstico etiológico. No entanto, diferentes variantes em genes já associados a DI síndrômica podem levar a formas de DI não síndrômica,

como também há sobreposição de fenótipos, dificultando o diagnóstico (Chiurazzi e Pirozzi, 2016; Tejada e Ibarluzea, 2020). Mesmo aplicando todas as técnicas disponíveis, a causa é claramente identificada em 55% a 70% dos casos de DI moderada a grave, excluindo-se dessa estimativa a síndrome de Down, que compreende 6% a 8% dos casos (Vissers e col., 2016).

Os mecanismos genéticos causais de DI são mutações gênicas ou alterações cromossômicas numéricas e estruturais não equilibradas que afetam vários genes, resultando em síndromes associadas a DI. Entre pacientes que apresentam DI sindrômica, as alterações cromossômicas, identificadas por meio da análise cromossômica após bandamento G, explicam aproximadamente 15% dos casos de DI e 6 a 8% desses pacientes apresentam trissomia do cromossomo 21, a causa genética mais comum de DI, afetando 1:1000 nascidos vivos (Ropers, 2010; Vissers e col., 2016). Além das alterações cromossômicas detectadas por técnicas citogenéticas convencionais, os desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos, como microdeleções e microduplicações, identificados pela análise cromossômica por *microarray* (CMA, *Chromosome Microarray Analysis*), explicam 15 a 20% dos casos de pacientes com DI, que têm exame cromossômico convencional normal (Rosenberg e col., 2006; Miller e col., 2010). No caso de mutações gênicas, a DI pode ter herança autossômica ou ligada ao cromossomo X, dominante ou recessiva. Quando o fenótipo clínico já foi associado a determinado gene, o sequenciamento direto desse gene permite a confirmação do diagnóstico. O sequenciamento de nova geração ou sequenciamento massivo paralelo (NGS; *Next Generation Sequencing*) pode ser aplicado, usando painéis que incluem genes já associados ao quadro clínico ou a quadros semelhantes, ou sequenciando-se o exoma ou o genoma. Apesar de ser a técnica mais eficiente disponível para identificação de variantes patogênicas, é a mais difícil de gerenciar, devido a enorme quantidade de dados fornecidos, o que leva ao desafio da filtragem e da interpretação das variantes detectadas em um único paciente, a interpretação da variação genética exigindo a caracterização clínica detalhada do paciente e a coleta meticulosa das informações dos familiares (De Luca e col., 2020). De fato, foi demonstrado que o sequenciamento do exoma aumenta o rendimento diagnóstico em pacientes sem causa previamente identificada, destacando-se a importância das mutações de novo (Ibarluzea e col., 2020).

A identificação da causa da DI permite determinar se a alteração foi herdada, possibilitando sua investigação na família e o aconselhamento genético; pode ainda orientar o acompanhamento das manifestações clínicas, melhorando o manejo e a qualidade de vida do paciente (De Luca e col., 2020).

I.2. Deficiência intelectual com herança ligada ao cromossomo X.

Em 1938, Penrose relatou haver maior frequência de homens afetados em relação a mulheres entre pessoas com DI, o que levou Lehrke (1972) a propor, com base nas famílias em que a DI segregava claramente com herança recessiva ligada ao cromossomo X (DILX), que as mutações no cromossomo X eram a explicação para o excesso de homens afetados. Vários estudos posteriores, em coortes de pessoas com DI, confirmaram o excesso significativo de indivíduos do sexo masculino, indicando um número 1,4 vezes maior de homens afetados por DI moderada a grave. Admitindo-se que mutações no cromossomo X são as responsáveis por esse maior número de homens afetados, a frequência de DI com herança ligada ao X, com manifestação apenas em homens, teria que ser de aproximadamente 30% (Ropers e Hamel, 2005).

Entretanto, estimativas da frequência de DILX entre indivíduos do sexo masculino com DI estão abaixo da frequência de 30% necessária para explicação do excesso de homens afetados. Por exemplo, a síndrome do cromossomo X Frágil (SXF) é a causa laboratorialmente estabelecida de DILX em 2-3% da DI no sexo masculino; considerando que a síndrome representa 25% das famílias em que a DI tem herança ligada ao X, estima-se em 10-12% a frequência de DILX entre homens com DI; com base nas frequências de deficiência intelectual grave e de DILX em homens da população geral, a frequência de DILX entre indivíduos com DI foi estimada em 10-16% (Ropers e Hamel, 2005).

Como alternativa à herança monogênica ligada ao X para explicar o excesso de homens em relação a mulheres com DI, Mandel e Chelly (2004) propuseram que diferenças no desenvolvimento embrionário do homem e da mulher podem tornar os homens mais susceptíveis a agressões ambientais; ainda, polimorfismos no cromossomo X associados a outros fatores de predisposição genética, poderiam levar

à diminuição da habilidade cognitiva nos homens. Jacquemont e col. (2014) demonstraram excesso de variantes deletérias de número de cópias (CNV) autossômicas em mulheres, ao investigarem 9.206 homens e 6.379 mulheres com transtornos do neurodesenvolvimento; esse mesmo viés foi observado na análise dos genitores dos probandos, as variantes deletérias de tamanho acima de 400 kb sendo mais frequentemente herdadas via materna. Resultados no mesmo sentido foram obtidos na análise de variantes de número de cópias e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) autossômicos numa coorte de probandos com distúrbios do espectro autista. Esses resultados mostram que as mulheres necessitam de carga etiológica maior, não relacionada a variantes deletérias do cromossomo X, para a manifestação dos quadros clínicos investigados, apoiando o “modelo de proteção feminina” (*female protective model*).

Atualmente são conhecidos 155 genes no cromossomo X cujas mutações são definitivamente responsáveis por DILX; em 100 desses genes, foram identificadas mutações exclusivamente responsáveis pelo quadro clínico de DI síndrômica e, em 27 genes, mutações causando exclusivamente DI não síndrômica; outros 28 genes estão associados tanto a DI síndrômica quanto a não síndrômica; mais sete genes foram relacionados a DI, estes porém, aguardando confirmação (Greenwood Genetic Center, CGC, XLID, janeiro de 2022). Considerando que 400 genes foram associados a DI síndrômica ou não síndrômica com herança dominante e 684, com padrão de herança recessiva (Wieczorek, 2018; Jamra, 2018), aproximadamente 15% dos genes já associados a DI encontram-se no cromossomo X, que contém apenas 5% dos genes humanos, evidenciando densidade proporcionalmente elevada de genes nesse cromossomo que influenciam a capacidade cognitiva (Hu e col., 2016; Vissers e col., 2016). Considerando os genes codificadores de proteínas mapeados no cromossomo X humano, cerca de 40% são expressos no cérebro (Ropers e Hamel, 2005; De Luca e col., 2020). Esse número relativamente elevado de genes com função cerebral no cromossomo X pode ser explicado pela seleção natural (*Faster X Hypothesis*): novas variantes recessivas, que ocorram no cromossomo X, se expõem à seleção mais rapidamente, pois se expressam no homem em dose simples, enquanto aquelas que ocorram nos autossomos precisam chegar à homozigose para serem expressas e, por sua vez, submetidas à seleção; novas variantes no cromossomo X podem assim ser

fixadas sob seleção positiva mais rapidamente do que aquelas que ocorrem nos autossomos (Vicoso e Charlesworth, 2006).

Apesar da identificação de 155 genes no cromossomo X cujas mutações estão definitivamente associadas a deficiência intelectual, a frequência de mutações em cada um desses genes é baixa e não explica os 10%-16% estimados de DILX. A exceção é a perda de função do gene *FMR1* (*Fragil X Messenger Ribonucleoprotein 1*), devida à expansão da repetição (CGG)_n em sua região 5', causa da síndrome do X Frágil (SXF), que constitui a causa monogênica mais frequente de DI, afetando cerca de 2,5% dos homens com deficiência intelectual e compreendendo cerca de 25% dos casos familiares de DILX (de Brower e col., 2007).

Estudos que buscam mutações no cromossomo X em séries de famílias em que a DI tem padrão de herança ligada ao X, aplicando sequenciamento de exoma ou análise cromossômica por *microarray*, têm deixado uma proporção significativa delas sem a causa da DI determinada (Tarpey e col., 2009; Tzschach e col., 2015; Martinez e col., 2017; Ibarluzea e col., 2020). Dois estudos incluíram as maiores casuísticas, Whibley e col. (2010) detectaram perdas ou ganhos de segmentos do cromossomo X em 10% das 251 famílias que investigaram por hibridação genômica comparativa, usando uma plataforma de alta densidade de oligonucleotídeos do cromossomo X. Os propósitos tinham cariótipos normais e a SXF foi afastada. Hu e col. (2016) sequenciaram os exons de todos os genes mapeados no cromossomo X, nos propósitos de 405 famílias com DILX, em que a SXF e perdas e ganhos de segmentos submicroscópicos do cromossomo X foram afastados; detectaram variantes causais da DI em 58% das famílias, inclusive associando novos genes a DILX. Considerando-se que, nesses estudos, a SXF fora previamente excluída e que essa síndrome é causa de 25% da DILX, as mutações conhecidas no cromossomo X explicam aproximadamente 68% da DILX. Portanto, cerca de um terço dos casos de DILX permanecem sem a causa determinada.

Hu e col. (2016) relacionam explicações para a não identificação da causa da DILX quando se associam o teste para a SXF e o sequenciamento do exoma do cromossomo X: (1) limitações técnicas do sequenciamento em algumas famílias, (2) variantes causais não codificadoras de proteínas ou não anotadas no cromossomo X,

(3) apesar do padrão de herança ligada ao X, em algumas famílias esta pode não ser realmente a herança da DI, (4) variantes de significado incerto podem na verdade ser patogênicas, (5) alguns casos podem ter como causa variantes em mais de um gene ou (6) as variantes deletérias podem estar localizadas em elementos reguladores, em regiões não codificadoras. Como salientam Rojano e col. (2019), estudos de associação genômica (GWAS; *Genome-Wide Association Studies*) mostram que variantes associadas a doenças se localizam frequentemente em regiões não codificadoras; para detectar variantes nessas regiões o sequenciamento do genoma total ou o sequenciamento genômico de intervalos de ligação devem ser combinados com técnicas computacionais sofisticadas, que os autores apresentam.

A busca por novas mutações no cromossomo X que causam DI tem sido o alvo de vários laboratórios de pesquisa, fazendo uso de diferentes estratégias. O grande interesse se deve ao fato de que o cromossomo X apresenta 15% dos genes atualmente associados a DI, o que leva ao interesse da pesquisa básica na compreensão da função desses genes no sistema nervoso central, suas implicações na inteligência e no comportamento, o que, por extensão, auxilia no diagnóstico da DI. Tem-se evidenciado que alterações genéticas que causam DILX estão também associadas a outros distúrbios neurológicos. Portanto, investigações sobre genes associados a DI no contexto de sua função e regulação deverão auxiliar não somente na compreensão da patogênese da DI, mas também contribuirão para o conhecimento da etiologia de outros distúrbios neurológicos e do desenvolvimento do cérebro humano (Hu e col., 2016).

I.3. Padrão de inativação do cromossomo X em portadoras de mutações do cromossomo X que causam deficiência intelectual em homens

A inativação do cromossomo X em células somáticas femininas ocorre como mecanismo de compensação de dose dos produtos gênicos entre homens e mulheres. É estabelecida durante o desenvolvimento embrionário inicial e ocorre de forma aleatória e clonal, pois uma vez tornado inativo, o mesmo cromossomo X mantém-se inativo nas células descendentes. A mulher é, portanto, mosaico quanto ao cromossomo X inativo que pode ser o materno ou o paterno em cada uma de suas

células, com igual probabilidade (Lyon,1961). Sendo assim, em média as mulheres se distribuem de acordo com uma curva normal quanto à porcentagem de células com o cromossomo X ativo materno ou paterno. Por se tratar de processo aleatório, a escolha de um ou de outro cromossomo X no início do desenvolvimento pode gerar desvio significativo do esperado (50:50), e a proporção dos cromossomos X paternos e maternos inativos pode chegar, em casos raros, a um desvio completo (100:0), estando o mesmo cromossomo X ativo em todas as células.

Amos-Landgraf e col. (2006), no estudo de 415 mulheres adultas da população geral, verificaram que apenas 1,8% dessas mulheres apresentavam padrões de inativação com desvios extremos (>95:5). Os autores concluem que uma mulher da população geral, que tenha desvio total de inativação do cromossomo X, tem alta probabilidade de ser portadora de variante no cromossomo X que impacta a razão de inativação, justificando a investigação de patologias de herança ligada ao X. Em um estudo semelhante, Shvetsova e col. (2019) realizaram análise da inativação do cromossomo X no sangue de 79 mulheres adultas e suas mães, pertencentes a trios do projeto Genoma Holanda. Diferentemente dos estudos anteriores que analisaram o padrão de inativação do X com base na metilação do gene *AR* (Teste HUMARA, Allen e col., 1992), esse estudo baseou-se na expressão gênica, analisando o RNA. Foi observado que 27% das mulheres tinham desvio de inativação $\geq 70:30$ e 10% apresentavam desvio $\geq 80:20$, resultados semelhantes aos obtidos por Amos-Landgraf e col. (2006).

Variantes no cromossomo X que causam deficiência intelectual aparecem frequentemente associadas a desvio de inativação do cromossomo X, detectado em células de sangue periférico das mulheres portadoras. Buscando compreender essa associação, Plenge e col. (2002) analisaram o padrão de inativação do cromossomo X em 155 mulheres pertencentes a 24 famílias em que segregavam 20 diferentes mutações associadas a DILX, sendo 94 portadoras da variante no cromossomo X e 61 não portadoras. Observaram que cerca de 50% das portadoras tinham desvio significativo de inativação (>80:20), comparado com as mulheres do grupo controle (9%). Um terço das mulheres portadoras apresentavam desvios >90:10, presente em apenas 3,9% do grupo controle. A distribuição das mulheres não portadoras das famílias com DILX não diferiu da distribuição das mulheres do grupo controle. Os

autores concluíram que o desvio de inativação é comum em portadoras de mutações no cromossomo X que causam deficiência intelectual em seus filhos, sendo específico para certas mutações. Esse padrão de desvio da inativação seria consequência da vantagem proliferativa das células com o alelo normal ativo.

Em estudo realizado por Giorgio e col. (2016) com o objetivo de identificar genes associados a DI, foram selecionados 18 indivíduos do sexo masculino, afetados por DI síndrômica ou não síndrômica (15 casos familiares com padrão sugestivo de herança ligada ao X pela presença de um ou mais irmãos afetados e / ou outros homens afetados na linhagem materna e fenótipo sugestivo de doença ligada ao X, em três casos isolados) e avaliado o padrão de inativação do X em suas mães. Após a exclusão de alterações cromossômicas pela análise do cariótipo e array-CGH, sete probandos cujas mães eram portadoras de desvio de inativação (>80:20; cinco delas com desvio $\geq 97\%$) foram submetidos ao sequenciamento do exoma para investigar a variante causadora do fenótipo. Em cinco pacientes foram identificadas variantes candidatas das quais: duas variantes explicavam totalmente o fenótipo, em casos familiares; uma variante em caso isolado explicava parcialmente o fenótipo; duas variantes encontradas em casos familiares não explicavam o fenótipo. Um rendimento diagnóstico de 42% (três dos sete pacientes submetidos a sequenciamento do exoma).

Ibarluzea e col. (2020), utilizaram um painel de 82 genes associados a DILX para investigar a causa da DI não síndrômica em 61 pacientes do sexo masculino, não aparentados. Dos 61 pacientes, 47 apresentavam histórico familiar sugestivo de DILX (tinham meio irmãos, primos ou tios maternos afetados) e 14 pacientes tinham irmãos afetados por DI e suas mães apresentavam desvio de inativação do cromossomo X >80:20. Foram filtradas variantes candidatas em 16 probandos (26%). Com base na análise de segregação realizada em sete famílias e nos dados clínicos dos pacientes, foi possível correlacionar as variantes ao fenótipo e considerá-las patogênicas em quatro probandos, sendo dois deles classificados entre os 14 pares de irmãos em que as mães apresentavam desvio de inativação >80:20. Um rendimento diagnóstico de 57% (quatro dos sete pacientes submetidos a sequenciamento do exoma).

Com o objetivo de investigar se os desvios extremos no padrão de inativação nas portadoras de variantes em genes do cromossomo X decorrem de efeito primário no padrão de inativação ou são secundários à seleção durante o desenvolvimento, Muers e col. (2007), analisaram os padrões da expressão do gene *Atrx* no desenvolvimento de fêmeas de camundongos. Mutações no gene *ATRX* humano causam DILX e as mulheres portadoras dessas mutações apresentam desvio total de inativação. Foram estudados os padrões de inativação do cromossomo X em fêmeas de camundongos heterozigóticas quanto a uma variante que impedia a expressão do gene *Atrx* e em fêmeas controle sem a variante. A presença ou não da proteína nas células foi avaliada por imuno-histoquímica. Nos embriões com oito dias de idade, não houve diferença entre o número de células *Atrx*-negativas e positivas, permitindo concluir que a inativação do cromossomo X foi casual quando foi estabelecida. A análise de diferentes tecidos durante o desenvolvimento embrionário mostrou declínio gradual das células que não expressavam a proteína. Esses resultados indicaram que houve seleção contra as células em que a variante estava no cromossomo X ativo durante a formação dos tecidos.

Entretanto, padrões extremos da inativação do cromossomo X podem estar associados à manifestação de doenças. Fieremans e col. (2016), analisaram o padrão de inativação do cromossomo X em um grupo de 288 mulheres, que apresentavam DI. Constataram que 22 mulheres (7,6%) apresentavam desvio extremo de inativação do X (>90%), valor significativamente maior do que o observado em mulheres da população por Amos-Landgraf e col. (2006). Dezenove delas foram submetidas ao sequenciamento do exoma; foram identificadas 11 variantes no cromossomo X, das quais seis eram variantes em genes associados a DILX, um rendimento diagnóstico de 30%. De forma semelhante, dois estudos feitos na população brasileira, identificaram aumento na frequência de desvio de inativação entre mulheres com DI idiopática. Vianna e col. (2020), analisaram 53 mulheres com DI e identificaram desvio extremo de inativação do cromossomo X em sete pacientes (13,21%), identificando variantes potencialmente relacionadas a DILX em cinco delas. No estudo de Chaves (2022), entre 136 mulheres com DI, 11 (8%) apresentaram desvio extremo de inativação do cromossomo X, e em oito delas foram encontradas variantes que justificavam o quadro clínico; quatro variantes estavam em genes do cromossomo X

e quatro em genes autossômicos, um deles influenciando diretamente o processo de inativação do cromossomo X.

Fieremans e col. (2016) discutem os diversos mecanismos que podem levar ao quadro clínico de DI em mulheres que apresentam desvio de inativação do cromossomo X. A primeira hipótese é a de que haja apenas um gene alterado no cromossomo X e, nesse caso, pode-se considerar que: a variante pode levar ao fenótipo de DI e também influenciar a inativação do cromossomo X; há uma translocação entre o cromossomo X e um autossomo, favorecendo a seleção contra o cromossomo X normal; há desvio ao acaso, favorecendo as células com a variante no cromossomo X ativo. A segunda hipótese é a de que variantes estejam presentes em dois genes com efeitos independentes, podendo ser: uma variante em um gene autossômico, que causa DI, e uma variante no cromossomo X, que causa o desvio; ou duas variantes ligadas ao X, em cromossomos diferentes, neste caso, uma variante pode ter influência na expressão da outra, levando o gene alterado que causa DI a ser expresso. Outro fator a ser considerado é uma variante em um gene de escape da inativação no cromossomo X, que se manifesta independentemente de estar localizada no X ativo ou inativo. A observação de uma prevalência duas vezes maior de desvio extremo da inativação do X em pacientes do sexo feminino com DI, em comparação com a coorte controle, é um bom indicador de uma variante causal em um gene ligado ao X. Além disso, padrões desfavoráveis de inativação do cromossomo X podem contribuir para a gravidade do fenótipo da doença, e assim, a análise do desvio de inativação em mulheres com DI, pode auxiliar na compreensão do efeito da inativação em mulheres com doenças ligadas ao cromossomo X.

A investigação de variantes genéticas que causam DI pode levar à identificação de novos genes ou de variantes novas em genes já conhecidos, contribuindo para a compreensão do papel dessas variantes no desenvolvimento da inteligência. A caracterização dos quadros clínicos associados a variantes novas ou conhecidas de um mesmo gene permite o delineamento da variabilidade clínica. Uma vez identificada a variante patogênica é possível realizar o aconselhamento genético com precisão.

II. Objetivos

A investigação de genes do cromossomo X que causam DILX constitui linha de pesquisa do Laboratório de Genética Humana do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências – USP. Um dos estudos realizados, que investigou o padrão de inativação do cromossomo X em mães de pacientes do sexo masculino com DI de causa não determinada, constituindo casos isolados em suas famílias, mostrou que a frequência de desvios extremos da inativação era significativamente maior do que o observado em mulheres da população geral, sugerindo que essas mulheres são potencialmente portadoras de variantes do cromossomo X que causavam DI em seus filhos.

Este trabalho teve como objetivo investigar, por meio de sequenciamento completo do exoma, variantes no cromossomo X que causem DI nesses pacientes. Uma vez identificada a variante causal, poderá ser realizado o aconselhamento genético da família, diagnosticando-se portadoras.

III. Casuística e Métodos

III.1 Casuística

Foram selecionados para o presente estudo indivíduos do sexo masculino, casos isolados de DI, cujas mães apresentavam desvios extremos da inativação do cromossomo X ($\geq 95:5$). Esses pacientes foram encaminhados ao Serviço de Aconselhamento Genético do Laboratório de Genética Humana, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências – USP para diagnóstico e aconselhamento genético das famílias. O estudo da inativação do cromossomo X foi objeto da Dissertação de Mestrado de Coqueti (2011), que incluiu a análise de 100 mulheres; o estudo continuou permitindo a inclusão de mais 51 mães de casos isolados. Dentre as 151 mães de casos isolados de DI, 17 apresentaram desvios de inativação do cromossomo X $\geq 95:5$ (Tabela 1). Essa frequência - $17:151 = 0.113$; IC 95% = $0.067 - 0.174$, é significativamente maior do que aquela observada por Amos-Landgraf e col. (2006), em mulheres adultas da população - $7:415, 0,017$; IC 95% = $0,007 - 0,035$ ($P < 0.00005$; teste exato de Fisher).

Os pacientes apresentavam DI moderada a grave, avaliada com base em suas limitações cognitivas e comportamentais, em associação ou não com outros sinais. Foram selecionados pacientes que não tinham diagnóstico clínico definido e que tiveram resultados normais em exame cromossômico, realizado após bandamento G, e em teste molecular para a síndrome do cromossomo X frágil.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - Seres Humanos, do Instituto de Biociências - USP (Protocolo 218/2017- CAAE na Plataforma Brasil: 80993317.7.0000.5464).

III.2. Métodos

III.2.1. Obtenção das amostras de DNA genômico

As amostras de DNA foram extraídas de leucócitos de sangue periférico, utilizando-se o aparelho *Autopure LS* (*Gentra Systems*, Minneapolis, USA). As amostras foram quantificadas, utilizando-se o *NanoDrop ND-1000* (*Nanodrop Technologies*, Rockland, USA).

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

A investigação do padrão de inativação do cromossomo X nas genitoras dos afetados foi realizada com base no padrão de metilação do gene *AR* - *Androgen Receptor* (Allen col. 1992). A eletroforese foi realizada no analisador MegaBACE TM 1000 (*Amersham Biosciences*, New Jersey, USA) ou no analisador ABI 3700 (*Applied Biosystems*, Massachusetts, USA) e para as análises foram utilizados, respectivamente, o *software* Genetic Profiler, v 2.2. e o *software* GeneMapper v 4.1. Essa etapa foi realizada inicialmente como parte da Dissertação de Mestrado de Karen Coquetti (Coquetti, 2011) e, na continuação do estudo, pela Dra. Silvia Souza da Costa, Técnica de Nível Superior do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB - USP.

Tabela 1. Desvios de inativação do cromossomo X detectados em sangue periférico das mães dos pacientes do sexo masculino com DI incluídos neste estudo.

Paciente	Padrão de inativação do cromossomo X da mãe do propósito
1	100:0
2	100:0
3	100:0
4	100:0
5	98:2
6	100:0
7	100:0
8	100:0
9	100:0
10	100:0
11	100:0
12	100:0
13	100:0
14	100:0
15	100:0
16	96:4
17	100:0

Diante da tendência de as mulheres mais velhas apresentarem maior frequência de desvio de inativação do X (Amos-Landgraf e col., 2006; Mengel-From e col., 2021), as idades das mulheres com desvio (média $41,536 \pm 7,305$; mediana 41,6) foram comparadas com as daquelas que não apresentaram esse desvio (média $37,064 \pm 7,950$; mediana 37,1); a diferença foi apenas marginalmente significativa (Teste de Mann-Whitney: $P = 0,053$).

III.2.3. Investigação de microdeleções e microduplicações no cromossomo X por microarranjo genômico (*Chromosome Microarray Analysis - CMA*)

Desequilíbrios genômicos submicroscópicos no cromossomo X foram investigados por microarranjo genômico pela Dra. Silvia Souza da Costa, Técnica de Nível Superior do Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, IB-USP. Foram utilizadas as plataformas Cytosure™, Chromosome X HD microarray 105K e 44K (customized) (Oxford Gene Technology, OGT, UK; Agilent Technologies Inc., USA).

III.2.4. Sequenciamento completo de exomas

O sequenciamento massivo paralelo do exoma foi realizado para pacientes cujas genitoras apresentaram desvios extremos no padrão de inativação do X ($\geq 95:5$). Sete pacientes (3, 4, 5, 6, 12, 13 e 14; Tabela 1) tiveram o sequenciamento realizado pela Oxford Gene Technology (OGT) por meio de seu serviço de sequenciamento Genefficiency™, que incorpora as plataformas Agilent SureSelect V4+UTR (captura e enriquecimento de exons), Illumina HiSeq™2000 (sequenciamento com cobertura de 50x) e OGT-software (análise de imagens e *base-calling*). São fornecidas planilhas, que incluem informações sobre *read depth*, posição genômica, alteração em relação à sequência referência, ocorrência anterior e frequência (dbSNP132), gene, transcrito e proteína, alteração de aminoácidos e predição de patogenicidade (PolyPhen, SIFT e CONDEL). Para a visualização das sequências o *browser* é o IGV (Integrative Genomics Viewer - Broad Institute). O software fornecido pela OGT permite filtrar as variantes, segundo critérios estabelecidos pelo usuário. Os outros dez pacientes (1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 15, 16 e 17; Tabela 1) submetidos a sequenciamento massivo paralelo do exoma tiveram a construção da biblioteca de DNA, captura dos fragmentos

da biblioteca, sequenciamento de nova geração (NGS) e análise de bioinformática realizados no Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células Tronco - CEGH-CEL- IBUSP. As bibliotecas foram preparadas por meio do kit *Nestera DNA Library Prep Kits* (Illumina INC, San Diego, California). Na etapa de captura dos fragmentos foi utilizado o kit *Sure Select QXT Target Enrichment* (Agilent Technologies, Santa Clara, California). O sequenciamento foi realizado no equipamento HiSeq 2500 (Illumina INC, San Diego, California). As sequências resultantes foram alinhadas por meio do *software* Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>). O realinhamento de regiões indel, chamada de variantes de recalibração de qualidade das bases foram realizadas pelo *software* Genome Analysis Tool Kit (GATK) (<https://software.broadinstitute.org/gatk/>) para a produção de arquivos Variant Call Format (VCF). A anotação das variantes foi realizada utilizando o *software* Annovar (<http://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>).

III.2.5. Filtragem de variantes

A partir do arquivo computacional VCF, uma série de filtrações foram realizadas com a seleção de variantes raras em bancos de dados populacionais, de acordo com pacotes computacionais. Numa primeira análise dos 17 pacientes, os programas de predição de patogenicidade utilizados foram *Polyphen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), *SIFT* (<http://sift.jcvi.org/>) e *Mutation Taster* (<http://www.mutatotaster.org/>). Na análise das frequências populacionais das variantes, utilizamos os bancos de dados públicos: ExAC (<http://exac.broadinstitute.org/>), gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org>), ABraOM (<http://abraom.ib.usp.br/>), 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org/>) e ESP6500 (<https://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Adotamos como critério de seleção as variantes presentes em genes do cromossomo X com base na localização e no tipo da variante (*Nonsynonymous*, *INDELS*, *Unknow*, *stopgain* e *stoploss*); variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas por pelo menos dois programas de predição de patogenicidade; variantes presentes no *Allelic Count* (contagens de cada alelo alternativo para cada local em todas as amostras) com valor menor ou igual a 2 e frequência menor ou igual a 0,01 nos bancos de dados populacionais. Avaliamos a classificação clínica das variantes usando a ferramenta InterVar (<http://wintervar.wglab.org/>), que segue os critérios do *American College of Medical*

Genetics and Genomics (ACMG) (Richards e col., 2015). InterVar gera avaliação inicial atualizada a partir da anotação do ANNOVAR, classificando as variantes em benigna, provavelmente benigna, significado incerto, provavelmente patogênica e patogênica. Os genes considerados candidatos foram selecionados com base na expressão no cérebro, tendo sido ou não anteriormente associados a deficiência intelectual. Ao final da filtragem foram detectadas variantes candidatas em quatro pacientes (Pacientes 9,11,15 e 17; Tabela 2).

Posteriormente, nos pacientes em que não foram encontradas variantes candidatas, uma nova filtragem foi realizada, utilizando o software VarSeq versão 2.2.5 (Golden Helix, Inc., Bozeman, MT, www.goldenhelix.com), com base nos arquivos VCF. Em uma primeira etapa foram selecionadas variantes de alta qualidade no cromossomo X e também nos autossomos, evitando a presença de falsos positivos e artefatos com base em: *Phred quality score* >20 (Medida da qualidade da identificação das nucleobases geradas pelo sequenciamento automatizado de DNA); *read depth* >10 (número de vezes que uma base específica é representada em todas as leituras do sequenciamento); frequência da variante (VAF) > 0,25 (variante detectada em >25% do total de leituras) e exclusão de genes hipervariáveis. Posteriormente, foi avaliada a frequência populacional da variante: foram consideradas variantes com frequência <0,01 em bancos de dados populacionais - *1000 Genomes*; *gnomAD exomes and genomes database*; *ABraOM* (Naslavsky e col., 2017; Naslavsky e col., 2022). Como terceiro critério, foram selecionadas variantes com base na localização e tipo - variantes não sinônimas (*missense*), mutações sem sentido (*nonsense*), mutações que afetam o processamento do RNAm (*splicing*), e mutações de mudança de quadro de leitura (*frameshift*), essas últimas causadas por inserções ou deleções (*indels*).

A priorização das variantes foi realizada em duas etapas: Em um primeiro momento, foram priorizadas variantes em genes relacionados a doenças que incluem atraso do neurodesenvolvimento/deficiência intelectual, com base na análise do HPO (*Human Phenotype Ontology*) e variantes mapeadas em genes já relacionados a doenças (OMIM/PubMed). Foram avaliadas as variantes mapeadas nesses genes e classificadas pelo ClinVar como patogênicas/ provavelmente patogênicas/ VUS (variantes de significado incerto) / ou conflitantes. Para variantes não depositadas no ClinVar, priorizamos aquelas que tinham como efeito previsto a perda de função (LoF)

ou que fossem *missense* com score REVEL $\geq 0,5$ (REVEL é método utilizado para prever a patogenicidade de variantes missense com base em uma combinação de pontuações de 13 ferramentas individuais: MutPred, FATHMM v2.3, VEST 3.0, PolyPhen-2, SIFT, PROVEAN, MutationAssessor, MutationTaster, LRT, GERP++, SiPhy, phyloP e phastCons; Loannidis e col., 2016). Em uma segunda etapa, priorizamos variantes em genes do cromossomo X, expressos no cérebro, independentemente de terem sido associados a doença. Concluímos as análises in silico classificando as variantes por meio das ferramentas online Varsome (<https://varsome.com/>) e Franklin (<https://franklin.genoox.com/>). O Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>) foi utilizado na pesquisa da expressão em cérebro dos genes candidatos. Ao final da filtragem encontramos variantes candidatas em três pacientes (Pacientes 1, 2 e 4; Tabela 2).

III.2.6. Validação de variantes e análise de segregação

A validação de variantes candidatas e a análise de segregação nas famílias foram realizadas por sequenciamento de Sanger. Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>).

Para a amplificação do DNA por PCR utilizamos por amostra 2,5 μ L de buffer (Tris pH~8,5; Hepes; MgCl₂; KCl; (NH₄)₂SO₄); 2,5 μ L de dNTP; 0,5 μ L Primer F; 0,5 μ L Primer R; 0,3 μ L Taq 5U*; 16,8 μ L de água MilliQ e 2 μ L de DNA. O programa de ciclagem no termociclador incluiu as seguintes etapas: 95°C por 4 minutos, 95°C por 40 segundos, 68°C por 40 segundos, 72°C por 1:30 minutos (o ciclo é repetido 14 vezes da etapa 2 a 4); seguido de 24 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto (o ciclo é repetido 24 vezes); extensão final de 7 minutos a 72°C e resfriamento a 4°C. Os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,01% de Sybr safe.

Para a purificação dos produtos de PCR foi empregado ExoSap-IT™ (Thermo Fischer Scientific – Massachusetts, EUA), Exo (Exonuclease 1) para digestão dos primers em excesso na reação, e SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase), para degradação dos nucleotídeos em excesso: 0,5 μ L de Exo; 1,0 μ L de SAP e 8 μ L da amostra, totalizando 9,5 μ L da reação. A reação foi incubada no termociclador por 30 minutos a 37°C e, em seguida, por 15 minutos a 80°C.

Os produtos da amplificação purificados foram preparados para o sequenciamento, segundo protocolo do analisador ABI 3730 DNA Analyser (Life Technologies- Applied Biosystems): 1µL do primer F ou R; 1µL BigDyeTerminator v3.1(Thermo Fisher Scientific); 1,5 µL Buffer; 9,5 µL de água MilliQ; 2µL da amostra. Após a realização do mix para o sequenciamento as reações foram submetidas a um protocolo de ciclagem com as seguintes etapas: 96°C por 2 minutos, 25 ciclos a 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos, e 60°C por 4 minutos, com resfriamento a 4°C. O mix de precipitação foi preparado com 1 parte de NaOAc 3Mm pH 5.2 e 1 parte de Glicogênio 1mg/mL para 25 partes de Etanol 100% gelado. Aos 15 uL da reação de sequenciamento foram adicionados 25 µL do mix de precipitação, agitado em vórtex e levado ao freezer à -20°C por 15 minutos. Seguiu-se centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados 50 µL de etanol 70% gelado e realizada nova centrifugação por 10 minutos, seguida de nova drenagem dos tubos. As amostras foram inseridas no termociclador aberto, à 96°C, para secagem e, posteriormente, enviadas para o Centro de Estudos sobre o Genoma Humano e Células Tronco (CEGH-CEL IB-USP) para eletroforese capilar. Para a análise, utilizou-se o programa BioEdit 7.2.

IV. Resultados e Discussão

Este estudo teve o objetivo de investigar variantes causais de deficiência intelectual em genes do cromossomo X, em uma coorte de 17 indivíduos do sexo masculino com deficiência intelectual, casos isolados em suas famílias, selecionados a partir do padrão de desvios extremos da inativação do cromossomo X em suas mães. Identificamos variantes candidatas em sete pacientes, seis em genes do cromossomo X e uma variante em gene autossômico (Tabela 2). Dentre as sete variantes encontradas, quatro puderam ser definitivamente associadas à deficiência intelectual (Pacientes 9, 11, 15 e 17), chegando-se a um rendimento diagnóstico de 23,5% (4/17). A seguir, detalhamos as variantes encontradas, discutindo sua relação com o fenótipo dos pacientes.

Pacientes em que foram detectadas variantes causais da deficiência intelectual

Paciente 9 (Tabela 2): O paciente foi encaminhado, aos 14 anos de idade, com a solicitação de teste para a síndrome do X Frágil. Segundo informação de sua mãe nasceu a termo, após cesariana, por ausência de dilatação; houve atraso na aquisição da fala, requerendo terapia fonoaudiológica iniciada aos 3 anos de idade, mas continuava articulando mal as palavras. A deficiência intelectual aparentava ser moderada. Não conseguia ler; era capaz de escrever, copiando textos. Ao exame físico, apresentava peso de 32 kg (percentil 1), estatura de 1,54 cm (percentil 12) e perímetro cefálico de 54 cm (percentil 33); orelhas levemente em abano, com hélices simplificadas, rosto triangular, sinófris, ponte nasal alta, hipoplasia malar, filtro curto, palato alto; grau moderado de hiperextensibilidade articular; era pré-púbere e a genitália normal. O exame cromossômico após bandamento G não revelou alterações e o teste molecular afastou a síndrome do X frágil. Não foram detectados ganhos ou perdas patogênicos de segmentos submicroscópicos (*microarrays* Agilent X 44K e 60K).

Na análise do sequenciamento do exoma foi identificada uma variante patogênica no gene *MED12* [NM_005120.3:c.3833A>G(p.Tir1278Cis)], gene já

Tabela 2. Variantes detectadas após sequenciamento completo do exoma, que explicam/podem explicar a deficiência intelectual dos pacientes selecionados pelos desvios extremos de inativação do cromossomo X em suas mães.

Paciente	Padrão materno da inativação do X*	Gene	Variante**	Consequência molecular	Significado Clínico	MIM
1	100:0	<i>AMMECR1</i>	NC_000023.10:g.109561053T>C NM_015365.3:c.247A>G (NP_056180.1:p.Ile83Val)	<i>Missense</i>	<i>VUS</i> ***	300195
2	100:0	<i>OCRL</i>	NC_000023.10:g.128710007G>A NM_000276.4:c.1847G>A (NP_000267.2:p.Arg616Gln)	<i>Missense</i>	Patogênica	300535
4	100:0	<i>GRIK2</i>	NC_000006.11:g.102124570CTG NM_021956.5:c.617_619delCTG (NP_068775.1:p.Ala206del)	<i>Inframe deletion</i>	<i>VUS</i> *** /Provavelmente Patogênica	619580
9	100:0	<i>MED12</i>	NC_000023.10:g.70349671A>G NM_005120.3:c.3833A>G (NP_005111.2:p.Tir1278Cis)	<i>Missense</i>	Patogênica	300188
11	100:0	<i>HPRT1</i>	NC_000023.10:g.133632442C>T NM_000194.3:c.508C>T (NP_000185.1:p.Arg170Ter)	<i>Nonsense</i>	Patogênica	308000
15	100:0	<i>NEXMIF</i>	NC_000023.10:g.73965475T>C NM_001008537:c.11A>G (NP_001008537.1:p.Gln4Arg)	<i>Missense</i>	<i>VUS</i> ***	300524
17	100:0	<i>UBE2A</i>	NC_000023.10:g.118708696C>T NM_003336:c.22C>T (NP_003327:p.Arg8Cis)	<i>Missense</i>	Patogênica	312180

*Critério de seleção – Razão de inativação do X \geq 95:5; ** h19, GRCh37; ***VUS: Variante de significado incerto.

associado a DI. O gene *MED12* está localizado em Xq13.1 e codifica uma das unidades do complexo Mediator, complexo multiprotéico que inclui 31 unidades, em quatro módulos, com papel na transcrição pela RNA polimerase II; a proteína MED12 está envolvida na regulação da maioria dos genes que dependem da RNA polimerase II (revisão em Plassche e Brouwer, 2021).

Variantes patogênicas do gene *MED12* são a causa de três síndromes de DILX com herança recessiva: Opitz-Kaveggia (síndrome FG; MIM305450), Lujan-Fryns (MIM 309520) e Ohdo (tipo OSMKB; MIM 300895); variantes patogênicas foram também descritas como causa de DI associada ou não a características dismórficas, predominantemente afetando homens; mais recentemente, foram identificadas mulheres portadoras com DI (revisão em Graham e Schwartz, 2013 e Rubinato e col. 2020). As análises do padrão de inativação do X mostrou que desvios extremos da inativação nem sempre ocorrem nas portadoras de mutações no gene *MED12*, que mesmo sem esses desvios podem não apresentar DI, enquanto outras, com desvios extremos podem apresentar comprometimento intelectual (Rubinato e col., 2019). Mais recentemente, variantes patogênicas de *MED12*, com ocorrência de novo, foram identificadas como causa da síndrome de Hardikar (MIM 612726), que afeta apenas mulheres; o quadro clínico inclui fenda labial e palatina, retinopatia pigmentar, anormalidades genitourinárias e malformações gastrointestinais, mas sem comprometimento intelectual; desvio total da inativação do X foi detectado no sangue nessas mulheres e as variantes patogênicas permitiram prever *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Esses mecanismos explicam a ausência de homens afetados, as variantes, que levam à haploinsuficiência, sendo neles letais.

Na família que estudamos, foi possível determinar a presença da variante de *MED12*, na mãe do paciente e também em sua avó materna, ambas clinicamente normais. A mãe do paciente tem desvio total da inativação do cromossomo X; sua avó tem padrão de inativação 68:32, padrão que ocorre em cerca de 35% das mulheres adultas da população (Amos-Landgraf e col., 2006). Assim, a avó do paciente exemplifica a variabilidade do padrão de inativação do X documentado em portadoras de variantes patogênicas do gene *MED12*.

Paciente 11 (Tabela 2): O paciente apresentou atraso discreto do desenvolvimento até os seis meses de idade, quando passou a haver involução das aquisições. A hipótese diagnóstica foi de encefalopatia mitocondrial. Aos 18 meses de

idade, foi diagnosticada retinite pigmentosa. Aos 3 anos, os exames laboratoriais e neurológicos levaram ao diagnóstico de síndrome de Lesch-Nyhan em associação com retinite pigmentosa, num quadro clínico complexo.

O exame cromossômico após bandamento G não revelou alterações; também não foram detectadas perdas ou ganhos patogênicos de segmentos submicroscópicos no cromossomo X (*microarray* Agilent X 44K), exames realizados, considerando a hipótese de alteração afetando genes contíguos. O sequenciamento completo do exoma revelou variante patogênica *stopgain* no éxon 7 do gene *HPRT1* (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1) [NM_000194.3:c.508C>T(p.Arg170Ter)], localizado em Xq26. Variantes nesse gene são causa da síndrome de Lesch-Nyhan (MIM 308000). A variante encontrada foi validada por sequenciamento de Sanger e está presente em heterozigose na mãe do paciente, clinicamente normal, que apresenta desvio total de inativação do cromossomo X. Essa variante foi descrita como causal em 13 trabalhos, segundo o grupo de estudo internacional da síndrome de Lesch-Nyhan (*Lesch-Nyhan Disease International Study Group* - <http://www.lesch-nyhan.org/en>). Em trabalho recente, foi identificada a mesma variante como causa da síndrome, reforçando sua patogenicidade (Li e col., 2022).

A priorização das variantes de retinite pigmentosa foi realizada mantendo os critérios de filtragem que se aplicaram à investigação de DI. Em uma primeira etapa avaliamos genes já associados a retinite pigmentosa descritos no OMIM; as variantes filtradas não apresentaram efeito patogênico, provavelmente patogênico ou significado incerto, inviabilizando sua associação ao fenótipo. Em seguida, avaliamos individualmente cada um dos genes associados a retinite pigmentosa/degeneração hereditária da retina listados nos trabalhos de Nishiguchi e Rivolta (2012) e Xu e col. (2014), não encontrando variante potencialmente causal do fenótipo. Solicitamos novo exame oftalmológico do paciente para confirmação do diagnóstico. Não podemos, entretanto, afastar a possibilidade de variante patogênica em região não coberta pelo sequenciamento realizado.

Paciente 15 (Tabela 2): Aos cinco anos de idade, o paciente apresentava atraso global do neurodesenvolvimento com ausência de fala e andar atáxico; interação social limitada; crises epilépticas controladas por medicação; *upsweep* frontal dos cabelos, estreitamento bitemporal, ponte nasal baixa, hipoplasia das asas do nariz, hipotonia oral. Em exames anteriores, a análise cromossômica após

bandamento G não revelara alteração e não foram detectados ganhos ou perdas de segmentos submicroscópicos pela técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*). A síndrome do X frágil foi afastada por meio de teste molecular. O sequenciamento completo do exoma revelou uma variante missense no éxon 2 do gene *NEXMIF* (*KIAA2022*) [NM_001008537:c.11A>G (p.Gln4Arg)] cujas mutações já foram associadas a DI (MIM 300912). O conjunto de sinais clínicos apresentados pelo paciente inclui-se no espectro clínico dos indivíduos do sexo masculino que possuem variantes no gene *NEXMIF* (Stamberger e col.,2021).

O gene *NEXMIF* (*Neurite EXtension and MIgration Factor*), está localizado em Xq13.3. Associação do gene *NEXMIF* a deficiência intelectual foi feita por Cantagrel e col. (2004) no estudo de uma família em que segregava uma inversão pericêntrica no cromossomo X - inv(X)(q13; p22). Os homens portadores da inversão apresentavam deficiência intelectual grave, enquanto suas mães apresentavam a inversão, porém, não eram afetadas. A inversão pericêntrica interrompia dois genes, *P2RY8* e *NEXMIF*; o gene *P2RY8*, porém, não é expresso no cérebro, levando os pesquisadores a concluir que a deficiência intelectual era causada pela ruptura do gene *NEXMIF*. Cantagrel e col. (2009), avaliaram a expressão do *NEXMIF* em camundongos; o estudo mostrou que a expressão do gene atinge o pico durante o período perinatal e que é reduzida logo após o nascimento, indicando um papel do *NEXMIF* no desenvolvimento do cérebro.

A função neurobiológica do *NEXMIF* foi investigada por Van Maldergem e col. (2013), em estudo in vitro, utilizando neurônios de ratos. No início da morfogênese neuronal, a supressão da expressão de *NEXMIF* causou grande redução no crescimento de neuritos, incluindo dendritos e axônios. Essa redução e as anomalias estruturais dos neurônios ocasionados pela supressão da expressão do gene podem levar a deficiências na estrutura do axônio e na formação das sinapses durante o amadurecimento cerebral, ocasionando perda da função neuronal. Em camundongos nocautes quanto ao *NEXMIF*, Gilbert e col. (2020) observaram redução da densidade sináptica e supressão da transmissão sináptica em neurônios, indicando o papel do *NEXMIF* no desenvolvimento das sinapses e em sua função.

Aplicando o sequenciamento de Sanger, confirmamos a presença da variante na mãe do paciente, clinicamente normal. Não houve ainda retorno da família para

receber o resultado e aconselhamento genético. O propósito tem um único irmão clinicamente normal.

Paciente 17 (Tabela 2): O paciente foi encaminhado com suspeita de síndrome de Börjeson-Forssman-Lehmann, causada por mutações no gene *PHF6* no cromossomo X (MIM 301900), com solicitação de avaliação do padrão de inativação do cromossomo X materno, que revelou desvio total. Tinha exame cromossômico após bandamento G normal e desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos afastados (Agilent Microarray 4x180K). O sequenciamento do exoma revelou variante patogênica no gene *UBE2A* [(NM_003336:c.22C>T(p.Arg8Cis)]. Mutações no gene *UBE2A* (*Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 A*) causam a síndrome *X-linked intellectual disability type Nascimento* (MIM 300860; Nascimento e col. 2006). O quadro clínico do paciente é típico da síndrome: deficiência intelectual grave; ausência de fala; baixa estatura (< percentil 3), macrocefalia (> percentil 97); sinófris, hipertelorismo ocular, hipoplasia da porção média da face, boca larga, pescoço curto e largo, hipoplasia de genitália, oncodistrofia, hirsutismo generalizado.

O gene *UBE2A* codifica uma enzima de conjugação de ubiquitina (E2). As enzimas E2 atuam em conjunto com enzimas ativadoras de ubiquitina (E1) e ligases de ubiquitina (E3) envolvidas na via do proteassoma, no processo de ubiquitinação e degradação proteica. A ubiquitinação de proteínas e o processo de degradação constituem mecanismo importante na regulação dos níveis de proteína em células de mamíferos. Além disso, a ubiquitinação é reconhecida por ter funções pleiotrópicas na regulação de vários processos celulares, como o controle da atividade de fator de transcrição, internalização de receptor e modificações em histonas, que modulam a estrutura da cromatina.

Na análise da função neuronal do gene *UBE2A*, Haddad e col. (2013) mostraram que drosófilas deficientes quanto a *dRad6* (*dUbe2a*) apresentavam transmissão sináptica alterada devido a falha mitocondrial. Do mesmo modo, camundongos nocautes quanto a *mRad6a* (*Ube2a*) e células humanas com mutações em *UBE2A* nas quais a proteína não tinha sido detectada, apresentavam mitocôndrias defeituosas. Os autores mostraram que o gene *UBE2A* atua como uma enzima conjugadora de ubiquitina E2 que, em combinação com uma ligase de ubiquitina E3, como a Parkina, ubiquitina proteínas mitocondriais para facilitar a eliminação de mitocôndrias disfuncionais nas células. Assim, foi identificado que o gene *UBE2A* atua

como regulador da mitofagia dependente de Parkina, estabelecendo um papel crítico do *UBE2A* na função neuronal. Portanto, a manutenção de um conjunto de mitocôndrias saudáveis in vivo é fundamental para manter a transmissão sináptica normal, o que é potencialmente um elemento importante na etiologia da DI. Bruinsma e col. (2016) observaram que os camundongos nocaute quanto ao gene *UBE2A*, ao contrário do observado em pacientes com mutações em *UBE2A*, não têm atraso motor ou epilepsia. Porém, consistentemente com o que foi observado em pacientes com mutações em *UBE2A*, os camundongos apresentam déficits cognitivos claros, evidenciando seu papel no desenvolvimento da aprendizagem e em alterações na plasticidade do hipocampo, considerada essencial para a aprendizagem normal. Em conjunto, os resultados desse trabalho demonstram o papel essencial do *UBE2A*, na aprendizagem e na plasticidade sináptica.

A variante do gene *UBE2A*, que identificamos no paciente, estava presente em sua mãe, mas não em suas duas irmãs, como evidenciado pelo sequenciamento de Sanger. O aconselhamento genético foi realizado, indicando-se que as tias maternas do paciente procurassem serviço de genética, pois podiam ser portadoras da variante patogênica.

Pacientes em que foram identificadas variantes potencialmente causais da deficiência intelectual

Paciente 1 (Tabela 2): O paciente apresenta quadro clínico que inclui atraso global do neurodesenvolvimento, deficiência intelectual, baixa estatura, microcefalia, alterações esqueléticas (limitação das articulações de cotovelos, joelhos e quadril, exigindo correção cirúrgica) e comunicação interatrial. O exame cromossômico após bandamento G não revelou alterações; também não foram detectadas perdas ou ganhos patogênicos de segmentos submicroscópicos no cromossomo X. O sequenciamento do exoma revelou uma variante *missense* classificada como *VUS* - NM_015365.3:c.247A>G(p.Ile83Val) no gene *AMMECR1*. Variantes de perda de função no gene *AMMECR1* foram associadas a quadros clínicos semelhantes aos apresentados pelo paciente, como alterações de crescimento, ósseas, cardíacas e atraso do neurodesenvolvimento (Moysés-Oliveira e col., 2018), o que nos levou a considerar a variante no gene *AMMECR1* (MIM 300195) como candidata.

Não estava disponível material adequado a fim de realizarmos o sequenciamento de Sanger, no paciente e em sua mãe, para confirmação da variante que potencialmente está associada ao quadro clínico.

Paciente 2 (Tabela 2): O paciente foi encaminhado, aos 17 anos de idade, devido a deficiência intelectual aparentemente moderada e atraso global do desenvolvimento, com solicitação de teste para a síndrome do X Frágil. Segundo informações de sua mãe, nasceu de parto normal a termo, após gravidez sem intercorrências; andou com 1 ano e 6 meses de idade e demorou para falar; até os cinco anos de idade não controlava esfíncteres. Ao exame físico, foram observados palato alto e estreito, hiperplasia gengival e hipotonia oral; pés planos. O exame cromossômico após bandamento G não revelou alterações, não foram detectados ganhos e perdas de segmentos submicroscópicos (*microarrays* Agilent 44K e Agilent X 44K) e o teste molecular afastou a síndrome do X Frágil. O sequenciamento do exoma revelou uma variante *missense* patogênica no éxon 17 do gene *OCRL* (*OCRL Inositol Polyphosphate-5-Phosphatase*) - NM_000276.4:c.1847G>A (p.Arg616Gln).

O gene *OCRL*, localizado em Xq26.1, é altamente conservado nos vertebrados; codifica a enzima fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato-5-fosfatase, que atua na regulação do tráfego de membrana, sendo encontrada na rede trans-Golgi, em vesículas revestidas de clatrina, nos endossomos e na membrana plasmática. Variantes patogênicas do gene *OCRL* causam a síndrome Óculo-Cérebro-Renal de Lowe e a Doença de Dent 2. A ausência em nosso paciente de catarata congênita, manifestação ocular típica da síndrome de Lowe, levou à hipótese diagnóstica de Doença de Dent 2 (MIM 300555; revisão em Giancesello e col., 2021). A doença de Dent foi caracterizada por Fisher e col. (1994) como um distúrbio tubular renal ligado ao cromossomo X, que incluía proteinúria, hipercalciúria, nefrocalcinose, cálculos renais e insuficiência renal; o trabalho associou o fenótipo a uma microdeleção em Xp11.22, que incluía o gene *CLCN*. Anos mais tarde Hoopes e col. (2005) identificaram variantes no gene *OCRL*, anteriormente associado à síndrome de Lowe, como também causais de Doença de Dent, os pacientes, porém, apresentando sintomas extra-renais, caracterizando-se a Doença de Dent 2.

Por meio do sequenciamento de Sanger, confirmamos a presença da variante no paciente e demonstramos estar presente em sua mãe, clinicamente normal e que apresenta desvio total de inativação do cromossomo X (100:0).

Ainda não foi possível conseguir o retorno do paciente para solicitar avaliação renal, necessária para fundamentar o diagnóstico de síndrome de Dent 2, e realizar o aconselhamento genético. No encaminhamento do paciente para exames genéticos, o serviço médico não relatou comprometimento da função renal, que pode não se ter manifestado de maneira a levar a investigação. Vale ressaltar que a literatura relata o diagnóstico clínico de síndrome de Dent 2, variando de 3 meses a 15 anos de idade (Gianesello e col., 2021).

Paciente 4 (Tabela 2): O paciente foi encaminhado para investigação de síndrome do X frágil aos 14 anos; apresentava atraso global do desenvolvimento; era capaz de ler palavras isoladas; tinha dificuldade de socialização, interagindo com adultos, quando solicitado; apresentava comprometimento na articulação das palavras, puberdade atrasada, dolicocefalia, orelhas de implantação baixa, hipoplasia malar, palato alto e estreito; criptorquidia foi cirurgicamente corrigida. O exame cromossômico após bandamento G e a investigação de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos submicroscópicos no cromossomo X (*microarray* Agilent X 44K) não revelaram alterações patogênicas. A síndrome do X frágil foi afastada por teste moleculares. O sequenciamento completo do exoma foi realizado e, em filtragem inicial, considerando apenas genes do cromossomo X, não detectamos variante candidata. Em nova filtragem, considerando como um dos critérios de priorização a associação do gene com quadros clínicos que incluíam deficiência intelectual, encontramos variante candidata [NM_021956.5:c.617_619delCTG(p.Ala206del)] no gene *GRIK2* (*Glutamate Ionotropic Receptor Kainate Type Subunit 2*). O gene *GRIK2* codifica a subunidade GluK2 do cainato, receptor ionotrópico de glutamato. Variantes patogênicas no *GRIK2*, em heterozigose, como detectada em nosso paciente, foram associadas a alterações comportamentais e do neurodesenvolvimento (Stolz e col., 2021).

Não conseguimos ainda validar a presença da variante no paciente e investigar sua mãe, devido a não disponibilidade de amostra de DNA adequada para realizar o sequenciamento de Sanger.

Neste estudo, buscamos variantes gênicas causais em 17 pacientes, casos isolados de DI em suas famílias, selecionados com base nos desvios extremos de inativação do cromossomo X em suas mães. Em estudos anteriores, o padrão de inativação das mães desses pacientes fora determinado e neles, possíveis alterações

cromossômicas e desequilíbrios genômicos submicroscópicos, já haviam sido descartados. O sequenciamento completo do exoma dos pacientes foi realizado com o objetivo de detectar as variantes patogênicas ou possivelmente patogênicas responsáveis pela DI. Apesar da limitação de excluir alelos não-codificadores da análise, o sequenciamento do exoma é estratégia muito utilizada na identificação de variantes de nucleotídeo único (SNVs) responsáveis por fenótipos mendelianos (Wright e col., 2015).

Outros estudos da DILX utilizaram os desvios extremos de inativação do X presente nas mães dos afetados como um dos critérios de seleção para o sequenciamento, ao lado de indicações de tratar-se de herança ligada ao X, pela presença de afetados relacionados via materna, com o objetivo de aumentar o rendimento diagnóstico (Giorgio e col., 2016; Ibarluzea e col., 2020), tendo em vista a grande heterogeneidade genética relacionada a DI associada à ausência de um padrão de herança específico, principalmente quando há apenas um membro da família afetado, dificultando a seleção das variantes candidatas (Maia e col., 2021).

O tecido sanguíneo é comumente usado para testar o desvio de inativação do cromossomo X e sua correspondência com outros tecidos tem sido avaliada. Bittel e col. (2008) avaliaram a concordância entre os padrões de inativação do cromossomo X, comparando o tecido sanguíneo e outros 34 tecidos, que representavam as três camadas germinativas embrionárias, em 26 mulheres de diferentes idades; verificaram que o padrão de inativação dos tecidos hematopoiéticos avaliados, como sangue e baço, eram semelhantes ao encontrado no cérebro e em outros tecidos, com uma variação $\leq 10\%$. Esses resultados, indicam que há um alto nível de concordância entre o padrão de inativação do cromossomo X em tecidos do sistema nervoso central e em tecidos hematopoiéticos. Em outro estudo em que foram utilizados tecidos obtidos de autópsias, o epitélio bucal mostrou correspondência maior com tecidos inacessíveis do que o sangue (De Hoon e col. 2015)

A identificação da alteração do cromossomo X associada ao desvio de inativação é um desafio. Vários estudos têm demonstrado correlação entre o desvio de inativação do cromossomo X em mães de pacientes com DI e a variante causadora da DI em seus filhos. No estudo feito por Ibarluzea, e col. (2020), foi avaliada uma coorte de 14 pacientes do sexo masculino com pelo menos um irmão afetado selecionados com base no desvio de inativação do cromossomo X de suas mães

(X>80:20). Foram encontradas 5 variantes candidatas nesses probandos, gerando um rendimento diagnóstico de 35% (5/14). De forma semelhante, Giorgio e col., (2016) selecionaram 7 homens com padrão de DILX com base no desvio de inativação encontrado em suas mães (>80:20) identificando variantes candidatas em 71% dos pacientes. Estes estudos reforçam que há correlação entre a DILX e o desvio de inativação do cromossomo X nas mães dos probandos. Apesar do desvio extremo de inativação materno, não encontramos variantes causais ou potencialmente causais no cromossomo X, em 11 dos 17 probandos analisados, indicando que em alguns casos o desvio de inativação do cromossomo X pode ser resultado do processo estocástico de inativação. Além disso, devemos considerar que a identificação de variantes nos casos não familiares é mais difícil e agravada pela falta de informação sobre o tipo de herança subjacente ao fenótipo.

A validação das variantes pelo sequenciamento de Sanger realizada nos probandos e em suas mães, a associação com o padrão de desvio de inativação e o quadro clínico dos pacientes, nos ajudaram a estabelecer a patogenicidade das variantes encontradas. Cabe ressaltar que a maioria das variantes detectadas nos pacientes eram *missense* e ainda não descritas. Apesar de não termos encontrado variantes candidatas no cromossomo X em 12 pacientes, a DI pode ter origem autossômica, como observamos no Paciente 4, que possui uma deleção em um gene já relacionado a DI, o *GRIK2* (NM_021956.5:c.617_619delCTG), tendo o desvio materno da inativação do X uma associação casual. Hu e col. (2016) listam explicações para não serem identificadas as variantes causais de DI em famílias com provável DILX, pelo sequenciamento do exoma; limitações técnicas; variantes em regiões não codificadoras ou em regiões ainda não anotadas do cromossomo X; variantes causais em genes autossômicos; variantes *missense* com patogenicidade até o momento não associada; variações multigênicas ou variante em elementos reguladores.

Um dos desafios atuais na detecção de variantes associadas a DILX, tem sido a avaliação da patogenicidade ao invés da identificação. Idealmente, um teste funcional com o objetivo de avaliar vários genes visando o diagnóstico, poderia contribuir para a superação desse problema. A estratégia de diagnóstico da DI também deve incluir uma reanálise de dados, reinterpretando variantes classificadas como *VUS* em período posterior à análise inicial, à luz de novas informações, como

atualização de bancos de dados, identificação de novos genes e de doenças, novas características clínicas e informações moleculares, o que comprovadamente aumenta o rendimento diagnóstico (Maia e col.,2021, Álvarez-Mora e col. 2022).

V. Conclusão

Este trabalho investigou genes candidatos a deficiência intelectual de herança ligada ao cromossomo X (DILX) em pacientes selecionados pelos desvios extremos de inativação do cromossomo X em suas mães (razão de inativação $\geq 95:5$). Essa estratégia foi adotada devido às indicações de que desvios extremos do padrão de inativação do cromossomo X têm alta probabilidade de estar relacionados à presença de variantes patogênicas nesse cromossomo. Estudamos 17 pacientes casos isolados em suas famílias de DI moderada a grave, associada a outros sinais clínicos. A síndrome do X Frágil e alterações cromossômicas foram afastadas como causa da deficiência intelectual.

A metodologia utilizada para investigação das variantes candidatas nos probandos foi o sequenciamento completo do exoma realizada nos 17 pacientes e, em sete deles, foram detectadas variantes causais ou potencialmente causais, em sete genes diferentes, anteriormente associados a DI. Em cinco pacientes, confirmamos a presença da variante candidata no probando e em sua mãe; em quatro pacientes conseguimos associar definitivamente a variante encontrada ao fenótipo, levando a rendimento diagnóstico de 23,5%. Identificamos duas variantes patogênicas e uma *VUS*, que podem ser causais em três pacientes, mas exigem análise da variante na família e dados clínicos adicionais.

Assim, reforçamos a conclusão de que o desvio extremo de inativação do cromossomo X nas mães é indicador importante da presença de variantes patogênicas que causam DILX em seus filhos e deve ser considerado na investigação da DI, particularmente em casos não familiares.

VI. Resumo

A Deficiência Intelectual (DI) é condição complexa e heterogênea que afeta 1% a 3% dos indivíduos nas populações, representando importante problema de saúde pública. Vários estudos mostram frequência significativamente maior de indivíduos do sexo masculino afetados por DI moderada a grave do que de mulheres, parte podendo ser explicada pela DI com herança ligada ao X. Este estudo teve o objetivo de identificar variantes causais de DI em genes do cromossomo X. Realizamos o sequenciamento completo do exoma em 17 pacientes do sexo masculino, casos isolados de DI em suas famílias, selecionados pelos desvios extremos da inativação do cromossomo X (razão de inativação $\geq 95:5$) em suas mães, indicativo de serem elas portadoras de variantes em genes do X que causam DI em seus filhos. Variantes candidatas foram identificadas em sete pacientes; em quatro deles (23,5%), as variantes foram confirmadas pelo sequenciamento de Sanger, estando também presentes em suas mães; essas variantes estão em genes já associados a DI (*MED12*, *HPRT1*, *NEXMIF* e *UBE2A*) e a relação causal com o fenótipo pôde ser estabelecida. Em três pacientes, as variantes, encontradas em genes também relacionados a DI (*AMMECR1* e *OCRL*, no cromossomo X e *GRIK2*, no cromossomo 6), não puderam ser definitivamente associadas ao fenótipo, sendo necessário estudo da segregação nas famílias e dados clínicos adicionais. Esses resultados confirmam o desvio de inativação do cromossomo X nas mães como indicativo da presença de variantes patogênicas que causam DI em seus filhos, devendo ser considerado no estudo da DI, particularmente de casos isolados.

Abstract

Intellectual disability (ID) is a complex and heterogeneous condition affecting 1% to 3% of the population worldwide, being a major public health problem. The frequency of males with moderate to severe ID is significantly higher than the frequency of affected females, and this difference may be in part explained by X-linked ID. The present study aimed at identifying causative variants of ID in X-linked genes. We performed whole exome sequencing in 17 patients, isolated cases of ID in their families, and selected on the basis of highly skewed X-inactivation (inactivation ratios $\geq 95:5$) in their mothers, indicative of being carriers of X-linked causative variants of ID in their sons. Candidate variants were detected in seven patients; in four of them (23.5%), these variants were validated after Sanger sequencing, and were found to be carried by their mothers. These variants were mapped to genes that had been associated to ID (*MED12*, *HPRT1*, *NEXMIF* e *UBE2A*), and a causal relationship with the clinical signs could be established. In three patients, the variants, also in ID-associated genes (X-linked *AMMECR1* and *OCRL*, and autosomal *GRIK2*), could not be definitively related to their clinical features. These results confirm X-inactivation skewing in mothers as indicative of being carriers of ID causative variants in their sons, and to be considered particularly in the study of isolated cases.

VII. Referências Bibliográficas

- Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW - Methylation of *HpaII* and *HhaI* sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **Am J Hum Genet** **51**: 1229-39, 1992.
- Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, Willard HF - X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. **Am J Hum Genet** **79**:493-99, 2006.
- Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeva N, Fischer, W, Talebizadeh Z, Butler MG- Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. **J Med Genet** **45**: 309-13, 2008.
- Bruinsma CF, Salverberd EMC, Kool MJ, Aghadavoud J, Van Woerden GM, Baarends WM, Elgersma Y - An essential role for UBE2A/HR6A in learning and memory and mGLUR-dependent long-term depression. **Hum Mol Genet** **25**: 1-8, 2015.
- Cantagrel V, Haddad MR, Ciofi P, Andrieu D, Lossi AM, Maldergem LV, Roux JC, Villard L. Spatiotemporal expression in mouse brain of Kiaa2022, a gene disrupted in two patients with severe mental retardation. **Gene Expr Patterns** **9**: 423-9, 2009.
- Cantagrel V, Lossi AM, Boulanger S, Depetris D, Mattei MG, Gecz J, Schwartz CE, Van Maldergem L, Villard L - Disruption of a new X linked gene highly expressed in brain in a family with two mentally retarded males. **J Med Genet** **10**: 736-42, 2004.
- Chiurazzi P, Oostra BA - Genetics of mental retardation. **Curr Opin Pediatr** **12**: 529-35, 2000.
- Chiurazzi P, Pirozzi F- Advances in understanding the genetic basis of intellectual disability. **F1000Res** **5**, 2016.
- Coqueti, KN - O Cromossomo X e a Deficiência Mental no Sexo Masculino. Tese de Mestrado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2011.
- De Brouwer AP, Yntema HG, Kleefstra T, Lugtenberg D, Oudakker AR, de Vries BB,

- van Bokhoven H, Van Esch H, Frints SG, Froyen G, Fryns JP, Raynaud M, Moizard MP, Ronce N, Bensalem A, Moraine C, Poirier K, Castelnaud L, Saillour Y, Bienvenu T, Beldjord C, des Portes V, Chelly J, Turner G, Fullston T, Gecz J, Kuss AW, Tzschach A, Jensen LR, Lenzner S, Kalscheuer VM, Ropers HH, Hamel BC - Mutation frequencies of X-linked mental retardation genes in families from the EuroMRX consortium. **Hum Mutat** 28: 207-8, 2007
- De Hoon B, Monkhorst K, Riegman P, Laven JSE, Gribnau J - Buccal swab as a reliable predictor for X inactivation ratio in inaccessible tissues. **J. Med. Genet.** 52: 784–90, 2015.
- De Luca C, Race V, Keldermans L, Bauters M, Van Esch H - Challenges in molecular diagnosis of X-linked Intellectual disability. **Br Med Bull** 133: 36-48, 2020.
- Fieremans N, Van Esch H, Holvoet M, Van Goethem G, Devriendt K, Rosello M, Mayo S, Martinez F, Jhangiani S, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR, Vermeesch JR, Marynen P, Froyen G - Identification of Intellectual Disability Genes in Female Patients with a Skewed X-Inactivation Pattern. **Hum Mutat.** 37:804-11, 2016.
- Gianesello L, Arroyo J, Del Prete D, Priante G, Ceol M, Harris PC, Lieske JC, Anglani F - Genotype Phenotype Correlation in Dent Disease 2 and Review of the Literature: *OCRL* Gene Pleiotropism or Extreme Phenotypic Variability of Lowe Syndrome? **Genes** 12:1597, 2021.
- Gilbert J, O'Connor M, Templet S, Moghaddam M, Di Via Ioschpe A, Sinclair A, Zhu LQ, Xu W, Man HY - NEXMIF/KIDLIA knock-out mouse demonstrates lutism-like behaviors, memory deficits, and Impairments in synapse formation and function. **J Neurosci.** 40:237-54, 2020.
- Giorgio E, Brussino A, Biamino E, Belligni EF, Bruselles A, Ciolfi A, Caputo V, Pizzi S, Calcia A, Di Gregorio E - Exome sequencing in children of women with skewed X-inactivation identifies atypical cases and complex phenotypes. **Eur J Paediatr Neurol** 21: 475-84, 2016.
- Graham JM, Schwartz CE. *MED12* related disorders. **Am J Med Genet** 161A:2734–40, 2013.
- Haddad DM, Vilain S, Vos M, Esposito G, Matta S, Kalscheuer VM, Craessaerts K, Leyssen M, Nascimento RM, Vianna-Morgante AM, De Strooper B, Van Esch H, Morais VA, Verstreken P - Mutations in the intellectual disability gene *Ube2a* cause neuronal dysfunction and impair parkin-dependent mitophagy. **Mol Cell**

50: 831- 43, 2013.

Hoopes RR Jr, Shrimpton AE, Knohl SJ, Hueber P, Hoppe B, Matyus J, Simckes A, Tasic V, Toenshoff B, Suchy SF, Nussbaum RL, Scheinman SJ - Dent Disease with Mutations in OCRL1. **Sou J. Hum. Genet.** **76**: 260-67, 2005.

Hu H, Haas SA, Chelly J, Van Esch H, Raynaud M, de Brouwer AP, Weinert S, Froyen G, Frints SG, Laumonier F, Zemojtel T, Love MI, Richard H, Emde AK, Bienek M, Jensen C, Hambrock M, Fischer U, Langnick C, Feldkamp M, Wissink-Lindhout W, Lebrun N, Castelnau L, Rucci J, Montjean R, Dorseuil O, Billuart P, Stuhlmann T, Shaw M, Corbett MA, Gardner A, Willis-Owen S, Tan C, Friend KL, Belet S, van Roozendaal KE, Jimenez-Pocquet M, Moizard MP, Ronce N, Sun R, O'Keeffe S, Chenna R, van Bömmel A, Göke J, Hackett A, Field M, Christie L, Boyle J, Haan E, Nelson J, Turner G, Baynam G, Gillesen-Kaesbach G, Müller U, Steinberger D, Budny B, Badura-Stronka M, Latos-Bieleńska A, Ousager LB, Wieacker P, Rodríguez Criado G, Bondeson ML, Annerén G, Dufke A, Cohen M, Van Maldergem L, Vincent-Delorme C, Echenne B, Simon-Bouy B, Kleefstra T, Willemsen M, Fryns JP, Devriendt K, Ullmann R, Vingron M, Wrogemann K, Wienker TF, Tzschach A, van Bokhoven H, Gecz J, Jentsch TJ, Chen W, Ropers HH, Kalscheuer VM - X-exome sequencing of 405 unresolved families identifies seven novel intellectual disability genes. **Mol Psychiatry.** **21**: 133-48, 2016.

Ibarluzea N, De la Hoz AB, Villate O, Llano I, Ocio I, Martí I, Guitart M, Gabau E, Andrade F, Gener B, Tejada MI- Targeted Next-Generation Sequencing in Patients with Suggestive X-Linked Intellectual Disability. **Genes.** **11**:51, 2020.

Jacquemont S, Coe BP, Hersch M, Duyzend MH, Krumm N, Bergmann S, Beckmann JS, Rosenfeld JA, Eichler EE - A Higher Mutational Burden in Females Supports a “Female Protective Model” in Neurodevelopmental Disorders, **Am J Hum Genet.** **94**: 415–25, 2014.

Jamra R - Genetics of autosomal recessive intellectual disability. **Medgen** **30**: 323–27, 2018.

Lehrke R - A theory of X-linkage of major intellectual traits. **Am J Ment Defic** **78**:611-19, 1972.

- Li D, Strong A, Shen KM, Cassiman D, Van Dyck M, Linhares ND, Valadares ER, Wang T, Pena SDJ, Jaeken J, Vergano S, Zackai E, Hing A, Chow P, Ganguly A, Scholz T, Bierhals T, Philipp D, Hakonarson H, Bhoj E - De novo loss-of-function variants in X-linked *MED12* are associated with Hardikar syndrome in females. *Genet Med* 23: 637-44, 2021.
- Li L, Qiao X, Liu F, Wang J, Shen H, Fu H, Mao JH - Description of the Molecular and Phenotypic Spectrum of Lesch-Nyhan Disease in Eight Chinese Patients. *Front Genet* 13:868942, 2022.
- Loannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, Musolf A, Li Q, Holzinger E, Karyadi D, Cannon-Albright LA, Teerlink CC, Stanford JL, Isaacs WB, Xu J, Cooney KA, Lange EM, Schleutker J, Carpten JD, Powell IJ, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Giles GG, MacInnis RJ, Maier C, Hsieh CL, Wiklund F, Catalona WJ, Foulkes WD, Mandal D, Eeles RA, Kote-Jarai Z, Bustamante CD, Schaid DJ, Hastie T, Ostrander EA, Bailey-Wilson JE, Radivojac P, Thibodeau SN, Whittemore AS, Sieh W = REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet* 99: 877-85, 2016.
- Lyon MF - Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus L.*). *Nature* 190: 372-73, 1961.
- Maia N, Nabais Sá MJ, Melo-Pires M. et al.- Intellectual disability genomics: current state, pitfalls and future challenges. *BMC Genomics* 22: 909, 2021.
- Mandel JL, Chelly J - Monogenic X-linked mental retardation: is it as frequent as currently estimated? The paradox of the ARX (Aristaless X) mutations. *Eur J Hum Genet* 12: 689-93, 2004.
- Martínez F, Caro-Llopis A, Roselló M, Oltra S, Mayo S, Monfort S, Orellana C - High diagnostic yield of syndromic intellectual disability by targeted next-generation sequencing. *J Med Genet* 54: 87-92, 2017.
- Maulik PK, Mascarenhas MN, Mathers CD, Dua T, Saxena S - Prevalence of intellectual disability: a meta-analysis of population-based studies. *Res Dev Disabil* 32: 419-36, 2011.
- Mengel-From J, Lindahl-Jacobsen R, Nygaard M, Soerensen M, Ørstavik KH, Hertz JM, Andersen-Ranberg K, Tan Q, Christensen K - Skewness of X-Chromosome

- inactivation increases with age and varies across birth cohorts in elderly Danes women. **Sci Rep 11**: 4326, 2021.
- Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, Church DM, Crolla JA, Eichler EE, Epstein CJ, Faucett WA, Feuk L, Friedman JM, Hamosh A, Jackson L, Kaminsky EB, Kok K, Krantz ID, Kuhn RM, Lee C, Ostell JM, Rosenberg C, Scherer SW, Spinner NB, Stavropoulos DJ, Tepperberg JH, Thorland EC, Vermeesch JR, Waggoner DJ, Watson MS, Martin CL, Ledbetter DH - Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. **Am J Hum Genet 86**: 749-64, 2010.
- Moysés-Oliveira M, Giannuzzi G, Fish RJ, Rosenfeld JA, Petit F, Soares MF, Kulikowski LD, Di-Battista A, Zamariolli M, Xia F, Liehr T, Kosyakova N, Carvalheira G, Parker M, Seaby EG, Ennis S, Gilbert RD, Hagelstrom RT, Cremona ML, Li WL, Malhotra A, Chandrasekhar A, Perry DL, Taft RJ, McCarrier J, Basel DG, Andrieux J, Stumpp T, Antunes F, Pereira GJ, Neerman-Arbez M, Meloni VA, Drummond-Borg M, Melaragno MI, Reymond A - Inactivation of *AMMECR1* is associated with growth, bone, and heart alterations. **Hum Mutat 39**: 281-91, 2018.
- Muers MR, Sharpe JA, Garrick D, Sloane-Stanley J, Nolan PM, Hacker T, Wood WG, Higgs DR, Gibbons RJ - Defining the cause of skewed X-chromosome inactivation in X-linked mental retardation by use of a mouse model. **Am J Hum Genet 80**: 1138-49, 2007.
- Nascimento RMP, Otto PA, de Brouwer APM, Vianna-Morgante AM. *UBE2A*, which encodes a ubiquitin-conjugating enzyme, is mutated in a novel X-linked mental retardation syndrome. **Am J Hum Genet 79**: 549-55, 2006.
- Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Wang JYT, Zverinova S, Karp T, Nunes K, Ceroni JRM, de Carvalho DL, da Silva Simões CE, Bozoklian D, Nonaka R, Dos Santos Brito Silva N, da Silva Souza A, de Souza Andrade H, Passos MRS, Castro CFB, Mendes-Junior CT, Mercuri RLV, Miller TLA, Buzzo JL, Rego FO, Araújo NM, Magalhães WCS, Mingroni-Netto RC, Borda V, Guio H, Rojas CP, Sanchez C, Caceres O, Dean M, Barreto ML, Lima-Costa MF, Horta BL, Tarazona-Santos E, Meyer D, Galante PAF, Guryev V, Castelli EC, Duarte

- YAO, Passos-Bueno MR, Zatz M. - Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from São Paulo, Brazil. **Nat Commun**13:1004, 2022.
- Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M, Bernardo DV, Amaro E Jr, Duarte YAO, Lebrão ML, Passos-Bueno MR, Zatz M.- Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat** 38:751-763, 2017.
- Nishiguchi KM, Rivolta C - Genes associated with retinitis pigmentosa and allied diseases are frequently mutated in the general population. **PLoS One** 7:e41902, 2012.
- Penrose LS - A clinical and genetic study of 1,280 cases of mental retardation defect. **Special Report Series, Medical Research Council 229**: 159. Her Majesty's Stationary Office, London, 1938.
- Plassche SV, Brouwer AP- *MED12*-Related (Neuro)Developmental Disorders: A Question of Causality. *Genes*12: 663-68, 2021.
- Plenge RM, Stevenson RA, Lubs HA, Schwartz CE, Willard HF – Skewed X-Chromosome inactivation is a common feature of X-linked mental retardation disorders. **Am J Hum Genet** 71:168-73, 2002.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL - ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med** 17:405-24, 2015.
- Rojano E, Seoane P, Ranea JAG, Perkins JR - Regulatory variants: from detection to predicting impact. **Brief Bioinform.** 20:1639-54, 2019.
- Ropers HH - Genetics of early onset cognitive impairment. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 11: 161-87, 2010.
- Ropers HH, Hamel BC. X-linked mental retardation. **Nat Rev Genet** 6:46-57, 2005.
- Rosenberg C, Knijnenburg J, Bakker E, Vianna-Morgante AM, Sloos W, Otto PA, Kriek M, Hansson K, Krepischi-Santos AC, Fiegler H, Carter NP, Bijlsma EK, van Haeringen A, Szuhai K, Tanke HJ - Array-CGH detection of micro rearrangements in mentally retarded individuals: clinical significance of

- imbalances present both in affected children and normal parents. **J Med Genet** **43**:180-6, 2006.
- Rubinato E, Rondeau S, Giuliano F, Kossorotoff M, Parodi M, Gherbi S, Steffan J, Jonard L, Marlin S. *MED12* missense mutation in a three-generation family. Clinical characterization of *MED12*-related disorders and literature review. **Eur J Med Genet** **63**:103768, 2020
- Shvetsova E, Sofronova A, Monajemi R, Gagalova K, Draisma HHM, White SJ, Santen GWE, Chuva de Sousa Lopes SM, Heijmans BT, van Meurs J, Jansen R, Franke L, Kielbasa SM, den Dunnen JT, 't Hoen PAC, & BIOS Consortium. Skewed X-inactivation is common in the general female population. **Eur J Hum Genet.** **27**:455–65, 2019.
- Stamberger H, Hammer TB, Gardella E, Vlaskamp DRM, Bertelsen B, Mandelstam S, de Lange I, Zhang J, Myers CT, Fenger C, Afawi Z, Almanza Fuerte EP, Andrade DM, Balcik Y, Ben Zeev B, Bennett MF, Berkovic SF, Isidor B, Bouman A, Brilstra E, Busk ØL, Cairns A, Caumes R, Chatron N, Dale RC, de Geus C, Edery P, Gill D, Granild-Jensen JB, Gunderson L, Gunning B, Heimer G, Helle JR, Hildebrand MS, Hollingsworth G, Kharytonov V, Klee EW, Koeleman BPC, Koolen DA, Korff C, Küry S, Lesca G, Lev D, Leventer RJ, Mackay MT, Macke EL, McEntagart M, Mohammad SS, Monin P, Montomoli M, Morava E, Moutton S, Muir AM, Parrini E, Procopis P, Ranza E, Reed L, Reif PS, Rosenow F, Rossi M, Sadleir LG, Sadoway T, Schelhaas HJ, Schneider AL, Shah K, Shalev R, Sisodiya SM, Smol T, Stumpel CTRM, Stuurman K, Symonds JD, Mau-Them FT, Verbeek N, Verhoeven JS, Wallace G, Yosovich K, Zarate YA, Zerem A, Zuberi SM, Guerrini R, Mefford HC, Patel C, Zhang YH, Møller RS, Scheffer IE - NEXMIF encephalopathy: an X-linked disorder with male and female phenotypic patterns. **Genet Med** **23**:363-73, 2021.
- Stolz JR, Foote KM, Veenstra-Knol HE, Pfundt R, Ten Broeke SW, de Leeuw N, Roht L, Pajusalu S, Part R, Rebane I, Öunap K, Stark Z, Kirk EP, Lawson JA, Lunke S, Christodoulou J, Louie RJ, Rogers RC, Davis JM, Innes AM, Wei XC, Keren B, Mignot C, Lebel RR, Sperber SM, Sakonju A, Dosa N, Barge-Schaapveld DQCM, Peeters-Scholte CMPCD, Ruivenkamp CAL, van Bon BW, Kennedy J, Low KJ, Ellard S, Pang L, Junewick JJ, Mark PR, Carvill GL, Swanson GT. Clustered mutations in the GRIK2 kainate receptor subunit gene underlie

- diverse neurodevelopmental disorders. **Am J Hum Genet**108:1692-709,2021.
Correction in Am J Hum Genet 108:2206, 2021.
- Stuck MW, Conley SM, Naash MI. PRPH2/RDS and ROM-1: Historical context, current views and future considerations. **Prog Retin Eye Res** 52:47-63, 2016.
- Tarpey PS, Smith R, Pleasance E, Whibley A, Edkins S, Hardy C, O'Meara S, Latimer C, Dicks E, Menzies A, Stephens P, Blow M, Greenman C, Xue Y, Tyler-Smith C, Thompson D, Gray K, Andrews J, Barthorpe S, Buck G, Cole J, Dunmore R, Jones D, Maddison M, Mironenko T, Turner R, Turrell K, Varian J, West S, Widaa S, Wray P, Teague J, Butler A, Jenkinson A, Jia M, Richardson D, Shepherd R, Wooster R, Tejada MI, Martinez F, Carvill G, Goliath R, de Brouwer AP, van Bokhoven H, Van Esch H, Chelly J, Raynaud M, Ropers HH, Abidi FE, Srivastava AK, Cox J, Luo Y, Mallya U, Moon J, Parnau J, Mohammed S, Tolmie JL, Shoubridge C, Corbett M, Gardner A, Haan E, Rujirabanjerd S, Shaw M, Vandeleur L, Fullston T, Easton DF, Boyle J, Partington M, Hackett A, Field M, Skinner C, Stevenson RE, Bobrow M, Turner G, Schwartz CE, Gecz J, Raymond FL, Futreal PA, Stratton MR - A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. **Nat Genet** 41:535-43, 2009.
- Tejada MI, Ibarluzea N - Non-Syndromic X Linked Intellectual Disability: current knowledge in light of the recent advances in molecular and functional studies. **Clin Genet** 97:677-87, 2020.
- Tzschach A, Grasshoff U, Beck-Woedl ST, Dufke C, Bauer C, Kehrer M, Evers C, Moog U, Oehl-Jaschkowitz B, Di Donato N, Maiwald R, Jung C, Kuechler A, Schulz S, Meinecke P, Spranger S, Kohlhase J, Seidel J, Reif S, Rieger M, Riess A, Sturm M, Bickmann J, Schroeder C, Dufke A, Riess O, Bauer P - Next-generation sequencing in X-linked intellectual disability. **Eur J Hum Genet** 23: 1513–18, 2015.
- Van Maldergem L, Hou Q, Kalscheuer VM, Rio M, Doco-Fenzy M, Medeira A, de Brouwer AP, Cabrol C, Haas SA, Cacciagli P, Moutton S, Landais E, Motte J, Colleaux L, Bonnet C, Villard L, Dupont J, Man HY - Loss of function of KIAA2022 causes mild to severe intellectual disability with an autism spectrum disorder and impairs neurite outgrowth. **Hum Mol Genet** 22:3306-14, 2013.

Vicoso B, Charlesworth B - Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. **Nat Rev Genet** 7:645-53, 2006.

Vissers LE, Gilissen C, Veltman JA, Genetic studies in intellectual disability and related disorders. **Nat Rev Genet** 17: 9-18, 2016. Shvetsova E, Sofronova A, Monajemi R, Gagalova K, Draisma HHM, White SJ, Santen GWE, Chuva de Sousa Lopes SM, Heijmans BT, van Meurs J, Jansen R, Franke L, Kielbasa SM, den Dunnen JT, 't Hoen PAC, & BIOS Consortium. Skewed X-inactivation is common in the general female population. **Eur J Hum Genet** 27:455–65, 2019.

Whibley AC, Plagnol V, Tarpey PS, Abidi F, Fullston T, Choma MK, Boucher CA, Shepherd L, Willatt L, Parkin G, Smith R, Futreal PA, Shaw M, Boyle J, Licata A, Skinner C, Stevenson RE, Turner G, Field M, Hackett A, Schwartz CE, Gecz J, Stratton MR, Raymond FL - Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. **Am J Hum Genet** 87:173-88, 2010.

Wieczorek D - Autosomal dominant intellectual disability. **Med Genet** 30:318–22, 2018.

Xu Y, Guan L, Shen T, Zhang J, Xiao X, Jiang H, Li S, Yang J, Jia X, Yin Y, Guo X, Wang J, Zhang Q - Mutations of 60 known causative genes in 157 families with retinitis pigmentosa based on exome sequencing. **Hum Genet** 133:1255-71, 2014.

Fontes da Internet:

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

American Association on Intellectual and Developmental Disabilities (AIDD). Disponível em: < <https://aidd.org/intellectual-disability/definition#.Wgd5cGhSziU>>. Acesso em: janeiro de 2017.

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

BioEdit. Disponível em: <<https://bioedit.software.informer.com>>. Acesso em: agosto de 2022.

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

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

ExAC. Disponível em: < <http://exac.broadinstitute.org/>>. Acesso em: novembro de 2019.

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

Franklin. Disponível em: <<https://franklin.genoox.com/clinical-db/home>>. Acesso em: agosto de 2022.

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

HPO- <https://hpo.jax.org/app/>

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

InterVar. Disponível em: <<https://wintervar.wglab.org/>>. Acesso em: janeiro de 2020.

Lesch-Nyhan Disease International Study Group- Disponível em: <<http://www.lesch-nyhan.org/en>>. Acesso em: outubro de 2022

Mutation Taster. Disponível em: <<http://www.mutationtaster.org/>>. Acesso em: janeiro de 2020.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nih.gov/>>. Acesso em: outubro de 2022

OMIM- Online Mendelian Inheritance in Man. Disponível em < <https://www.omim.org/>>. Acesso em: outubro de 2022.

Polyphen. Disponível em: < <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>>. Acesso em: Acesso em janeiro de 2020

Primer3. Disponível em: <<https://primer3.ut.ee/>>. Acesso em: junho de 2022

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

PubMed- Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>> · Acesso em: Outubro de 2022.

REVEL- Rare Exome Variant Ensemble Learner. Disponível em <<https://sites.google.com/site/revelgenomics/>>. Acesso em: julho de 2022.

SIFT. Disponível em: < <http://sift.jcvi.org/>>. Acesso em: janeiro de 2020.

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

Varsome database: Disponível em: < <https://varsome.com/>>. Acesso em: julho de 2022.

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