

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Busca de microrrearranjos no cromossomo X em meninos  
com deficiência intelectual.**

NAIARA BRAZ DA ROCHA

Brasília, 2014

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NAIARA BRAZ DA ROCHA

**Busca de microrrearranjos no cromossomo X em meninos  
com deficiência intelectual**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Mestre em  
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília

Orientadora. Prof. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo

Brasília, 2014

NAIARA BRAZ DA ROCHA

**Busca de microrrearranjos no cromossomo X em meninos  
com deficiência intelectual**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do Título de Mestre em  
Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília

Aprovada em 19 de fevereiro de 2014 .

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dra. Juliana Forte Mazzeu de Araújo  
Universidade de Brasília

---

Prof. Dra. Regina Célia Mingroni Netto.  
Universidade de São Paulo

---

Prof. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto  
Universidade de Brasília

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por dar-me força e garra para concluir essa etapa em minha vida.

Aos meus pais, Clever e Fatima que me deram uma base sólida e sempre me apoiaram e acreditaram nos meus sonhos sem questionamentos e repreensões. Ao meu irmão Cleyton que torce pelo meu sucesso.

A doutora Iris Ferrari que me acolheu como estagiária de graduação e me mostrou que sempre devemos fazer o nosso trabalho com todo amor e dedicação possível. Ajudou-me em momentos difíceis e incentiva cada dia mais a me aperfeiçoar. A Sra sabe que sou eternamente grata a todas as oportunidades que me proporcionou e a todos os ensinamentos que me passou. É o meu maior exemplo de perseverança, dedicação e idoneidade.

A minha orientadora Juliana que me deu a oportunidade de crescer um pouco mais e teve paciência com minhas crises alérgicas e meus momentos pessoais complicados.

A técnica e amiga Nilsa de Jesus que foi minha parceira de trabalho e ensinamentos e é também um exemplo de luta e dedicação.

A doutoranda e amiga Pollyanna que me ajudou muito com toda sua experiência e conhecimento.

A todos os estagiários que passaram pelo laboratório de Genética Clínica da UnB, Ribamar, Cleonice, Pedro Guilherme que me auxiliaram na bancada.

Aos amigos Cristina, Luis Simeoni e Estevão que fizeram dos nossos almoços um ótimo encontro e me passaram conhecimentos e experiências memoráveis. Em especial agradeço a Cristina por ser tão sensível e sempre perceber quando precisamos de um abraço e agradeço ao Prof Luis pelo imenso esforço e dedicação em nos dar aulas de Russo, foi muito gratificante.

Agradeço ao Prof Ricardo Titze e a toda sua equipe, Simoneide, Cátia, Thais, Fernando e Wesley, do laboratório de terapia gênica, por ter me aceitado como sua bolsista Reuni e me acolhido em seu laboratório. Cresci muito com seus ensinamentos e disposição.

As doutoras do ambulatório de genética do HUB que me ensinaram a prestar atenção aos pequenos detalhes numa consulta.

Ao Aluísio, Marcos e Claudiner que me ajudaram a realizar algumas técnicas do laboratório.

A todos aqueles que, de alguma forma, estiveram presentes durante a realização deste trabalho e puderam contribuir para o meu sucesso.

Aos pacientes por terem aceitado participar da pesquisa.

Muito obrigada.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO

A deficiência intelectual (DI) é considerada um estado incompleto ou inibido de desenvolvimento do intelecto, envolvendo prejuízo das funções cognitivas, linguísticas, motoras e sociais. Defeitos em genes do cromossomo X são considerados uma importante causa de DI, tanto sindrômica como não sindrômica. Estudos indicam que diversos genes do cromossomo X quando mutados levam a DI, pois, codificam proteínas que são expressas em alguma porção do sistema nervoso ou em vias relacionadas. O presente estudo realizou a busca de microrrearranjos em 16 genes do cromossomo X (*RPS6KA3*, *ARX*, *IL1RAPL1*, *TSPAN7*, *PQBP1*, *HUWE1*, *OPHN1*, *ACSL4*, *PAK3*, *DCX*, *AGTR2*, *ARHGEF6*, *FMR1*, *AFF2* (*FMR2*), *SLC6A8* e *GDI1*) previamente descritos como associados à DI, em 65 meninos com suspeita de DI. Usando o teste de MLPA com o kit *P106-MRX*, 64 pacientes (98,5%) apresentaram resultados normais. Em um caso identificamos uma duplicação do gene *AFF2* que engloba os exons 2 e 3 do gene, herdada da mãe fenotipicamente normal. Sugerimos que a duplicação no gene *AFF2* leve ao quadro de transtorno emocional e macrossomia apresentado pelo paciente. A taxa de detecção de alterações encontradas pelo MLPA (1,5%) é condizente com trabalhos anteriores na literatura e mostra que a frequência combinada de microrrearranjos nesses genes é baixa em pacientes com DI.

Palavras-chave: Deficiência intelectual ligada ao X, MLPA, duplicação, *AFF2*.

## ABSTRACT

Intellectual disability (ID) is considered an incomplete or inhibited state of intellectual development, involving deficit of cognitive, linguistic, motor and social functions. Defects of genes on the X chromosome are considered an important cause of ID, both syndromic and non-syndromic. Studies indicate that several genes on the X chromosome when mutated lead to ID because they codify proteins that are expressed in the nervous system or in related pathways. The present study searched for microrrearrangements in 16 genes on the X chromosome (*RPS6KA3*, *ARX*, *IL1RAPL1*, *TSPAN7*, *PQBP1*, *HUWE1*, *OPHN1*, *ACSL4*, *PAK3*, *DCX*, *AGTR2*, *ARHGEF6*, *FMR1*, *AFF2* (*FMR2*), *SLC6A8* and *GDI1*) previously described in associated with ID, in 65 boys diagnosed with ID. Using MLPA test with kit P106 - MRX, 64 patients (98.5%) presented normal results. In one case we identified a partial duplication of *AFF2* involving exons 2 and 3 of the gene, inherited from the phenotypically normal mother. We suggest that the *AFF2* duplication leads to the emotional impairment and macrosomia in the patient. The detection rate found by MLPA (1.5 %) is comparable to previous reports and show that the combined frequency of microrrearrangements in these genes is low in patients with ID.

Keywords: X-linked intellectual disability, MLPA, duplication, *AFF2*.



## LISTA DE FIGURAS

1 Alguns genes no cromossomo X que quando mutados causam deficiência intelectual.....	21
2 Par de cromossomos X.....	32
3 Resultado da PCR X-frágil em eletroforese de gel de agarose.....	42
4 Representação esquemática das sondas de MLPA.....	43
5 Resultado de uma análise de MLPA com o kit <i>P106-B1 MRX</i> com padrões normais.....	46
6 Resultado do MLPA com o kit P-106 MRX evidenciando duplicação da sonda correspondente ao exon 3 do gene <i>AFF2</i> .....	55
7 Resultado da pesquisa de inativação do cromossomo X.....	56
8 Resultado da análise cromossômica por <i>microarray</i> na plataforma Cytoscan HD (Affymetrix®).....	57
9 Paciente aos nove anos e cinco meses de idade.....	59

## LISTA DE TABELAS

- 1 Genes do cromossomo X investigados por MLPA com o kit *P106 MRX* com suas respectivas posições cromossômicas e localização das sondas.....44
  
- 2 Porcentagem de pacientes estudados de acordo com a manifestação clínica e histórico familiar de DI.....54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA - Acetilcoenzima A

*ACSL4 - ACYL-CoA SYNTHETASE LONG CHAIN FAMILY, MEMBER 4*

*AFF2 / FMR2 - AF4 FAMILY, MEMBER 2*

*AGTR2 - ANGIOTENSIN II RECEPTOR, TYPE 2*

*AMME - ALPORT SYNDROME, MENTAL RETARDATION, MIDFACE HYPOPLASIA, AND ELLIPTOCYTOSIS*

*ARHGEF6 - RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR 6*

*ARX - Aristaless-Related Homeobox*

CEP-FM - Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília

*ChAS - Chromosome Analysis Suite*

CLS - Síndrome de Coffin-Lowry

*CNV - Copy number variation*

*COL4A5 - COLLAGEN, TYPE IV, ALPHA-5*

*DCX – DOUBLECORTIN*

DI - deficiência intelectual

*DMSO - Dimethyl sulfoxide*

*DNTP - Deoxyribonucleotide triphosphate*

*EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid*

EIEE1 - Espasmos infantis sem malformações cerebrais

*FMR1 - FRAGILE X MENTAL RETARDATION -1*

*FMRP - Fragile X mental retardation 1 protein*

FRA XE - FRAGILE SITE, FOLIC ACID TYPE, RARE, FRA Xq28 E

*G6PD - GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE*

*GDI1 - GDP DISSOCIATION INHIBITOR 1*

HTP - *House, Tree, Person*

*HUWE1 - HECT, UBA, AND WWE DOMAINS-CONTAINING PROTEIN 1*

*IL1RAPL1 -INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ACCESSORY PROTEIN-LIKE 1*

LISX1 - síndrome de Lisencefalia ligada ao X

MLPA - *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NS-XLID - *nonsyndromic X linked intellectual disability*

*OPHN1 - OLIGOPHRENIN 1*

*PAK3 - P21-ACTIVATED KINASE 3*

pb - pares de base

PCR - Reação de Polimerização em Cadeia

*PQBP1 - POLYGLUTAMINE-BINDING PROTEIN 1*

QC - controle de qualidade

QI - quociente de inteligência

Rho GAPs - Rho GTPase-activating protein

rpm - rotações por minuto

*RPS6KA3 - RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE*

RSK - Ribossomal S6 Kinase

SCLH - Heterotopia laminar subcortical ligada ao X

SLC - solução de lise celular

*SLC6A8 - SOLUTE CARRIER FAMILY 6 MEMBER 8*

*SNP - Single nucleotide polymorphisms*

SXF - Síndrome do X-Frágil

S-XLID - *syndromic X linked intellectual disability*

TBE - Tris – Borato – EDTA

TDAH - transtorno de déficit de atenção com hiperatividade

*TSPAN7/TM4SF2 - TETRASPANIN 7*

*XLID - X linked intellectual disability*

## SUMÁRIO

### 1 INTRODUÇÃO

1.1 Deficiência intelectual.....	16
1.2 Deficiência intelectual ligada ao cromossomo x.....	17
1.3 Genes do cromossomo x que sofrem microrrearranjos associados a deficiência intelectual.....	20
1.3.1 Gene <i>RPS6KA3</i> .....	22
1.3.2 Gene <i>ARX</i> .....	23
1.3.3 Gene <i>IL1RAPL1</i> .....	24
1.3.4 Gene <i>TSPAN7</i> .....	25
1.3.5 Gene <i>PQBP1</i> .....	25
1.3.6 Gene <i>HUWE1</i> .....	26
1.3.7 Gene <i>OPHN1</i> .....	27
1.3.8 Gene <i>ACSL4</i> .....	27
1.3.9 Gene <i>PAK3</i> .....	28
1.3.10 Gene <i>DCX</i> .....	29
1.3.11 Gene <i>AGTR2</i> .....	30
1.3.12 Gene <i>ARHGEF6</i> .....	30
1.3.13 Gene <i>FMR1</i> .....	31
1.3.14 Gene <i>AFF2 (FMR2)</i> .....	34
1.3.15 Gene <i>SLC6A8</i> .....	35
1.3.16 Gene <i>GDI1</i> .....	36
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura de leucócitos e exame de cariótipo.....	39
3.2 Extração de dna.....	40
3.3 PCR x-frágil.....	41
3.4 Triagem de microrrearranjos no cromossomo X por MLPA.....	43

3.5 Análise cromossômica por microarray.....	47
3.6 Pesquisa de inativação do cromossomo X.....	51
<b>4 RESULTADOS</b>	
4.1 Pacientes.....	53
4.2 Resultados da triagem de microrrearranjos por MLPA.....	54
<b>5 DISCUSSÃO</b>	
5.1 Pacientes com resultados normais.....	60
5.2 Paciente com duplicação do gene <i>AFF2</i> .....	61
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>ANEXO A – Termo de consentimento livre e esclarecido.....</b>	<b>75</b>
<b>ANEXO B – Aprovação no comitê de ética.....</b>	<b>78</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

A deficiência intelectual (DI) ocorre em cerca de 1-3% da população sendo considerada um estado incompleto ou inibido de desenvolvimento do intelecto que se origina antes dos 18 anos de idade, envolvendo prejuízo das funções cognitivas, linguísticas, motoras e sociais, que são componentes da inteligência do indivíduo(1). A DI é heterogênea, o que torna difícil a investigação etiológica feita por geneticistas clínicos. Pode-se classificar a DI em leve, moderada, grave e profunda por meio de testes de quociente de inteligência (QI), onde o indivíduo que obtém um desempenho inferior ou próximo a 70, na curva de distribuição do QI na população, é considerado com déficit intelectual e superior a 130 é considerado superdotado (2,3).

A deficiência intelectual pode ser causada por fatores ambientais (isquemia cerebral perinatal, síndrome fetal alcoólica, infecções pré ou pós-natais), ou fatores genéticos como alterações cromossômicas ou doenças monogênicas (4). A DI também pode ser uma condição multifatorial que pode estar relacionada com o desenvolvimento sócio-econômico populacional. Entre as porções mais pobres, os fatores ambientais como nascimento prematuro, subnutrição, infecções pré parto e pós parto, alcoolismo etc estão mais relacionados a DI leve; as DIs de causa genética se manifestam em quaisquer classes independente de seu status social (5). A causa genética mais comum de DI é a Síndrome de Down, causada pela trissomia do cromossomo 21, uma alteração cromossômica numérica que, juntamente às demais alterações cromossômicas numéricas e alterações estruturais, formam um grupo importante de causas de DI.

A DI pode ser dividida em sindrômica (quando há associação com outros fenótipos como malformações, dismorfias, convulsões, etc) e não sindrômica quando a DI é a única manifestação clínica do paciente. Nos quadros de DI sindrômica a presença de outros sinais e sintomas associados pode permitir enquadrar o quadro clínico do paciente em uma síndrome genética conhecida.



Quadros mais graves de DI estão mais comumente associados a DI sindrômica. Cerca de 20-50% dos casos moderados a graves e até 80% das DI leves ainda permanecem sem diagnóstico genético (6).

## 1.2 DEFICIÊNCIA INTELECTUAL LIGADA AO CROMOSSOMO X

Desde o final do século XIX observações apontaram a preponderância significativa de homens em instituições para pessoas com comprometimento intelectual, o que despertou a atenção de médicos e pesquisadores. A frequência de homens, nessas instituições, chegava a ser 25% maior do que a de mulheres (7). Hoje sabe-se que o distúrbio é 30-40% mais freqüente em homens do que em mulheres, e a maior explicação é a alta frequência de DI ligada ao X.

Uma das explicações pode ser o fato de homens serem hemizigotos (46,XY), estes apresentam uma maior frequência de manifestações clínicas do que as mulheres. Porém, somente essa explicação não foi suficiente para elucidar tamanha proporção de casos. Mandel e Chely (4), sugeriram que pode ocorrer algumas diferenças entre os sexos principalmente na formação fetal dos homens, em que seu cérebro possa ser mais susceptível a danos precoces ou a presença de polimorfismos no cromossomo X que associados a alelos autossômicos, alelos ligados ao X ou a fatores ambientais poderiam levar a efeitos nas habilidades cognitivas.

Em virtude das mulheres terem dois cromossomos X (46,XX), um deles é inativado. A inativação de um dos cromossomos X é um evento aleatório, podendo ser inativado tanto o cromossomo de origem paterna, quanto o de origem materna. É um processo que ocorre em cada célula no início do desenvolvimento embrionário, tornando as mulheres mosaicos, podendo possuir duas linhagens celulares ativas. Espera-se que nas mulheres a inativação de um ou outro cromossomo X aconteça, em média, na mesma proporção. Porém, foi observado que mulheres portadoras de translocação X/autossomo apresentam inativação preferencial do X normal, evitando assim a propagação da inativação em genes autossômicos (8). Nas mulheres portadoras de mutações deletérias ou patogênicas há uma tendência de inativação

deste cromossomo X, as quais apresentam desvio grandes ou mesmo totais de inativação para compensar os efeitos do alelo mutado no cromossomo X (8).

Desvios extremos no padrão de inativação do cromossomo X em mulheres estão frequentemente associados a mutações que levam a DI. Estas mutações foram encontradas nos cromossomos X inativos de mulheres portadoras de diversos tipos de DI, sugerindo assim que o desvio de inativação ocorra preferencialmente no X mutado (9). Acredita-se que haja uma vantagem proliferativa das células com alelo normal ativo levando aos quadros clínicos normais na maioria das portadoras (9).

Defeitos nos genes do cromossomo X, localizados principalmente no braço longo, são uma importante causa de deficiência intelectual. O cromossomo X possui cerca de 155 milhões de pares de bases e contem aproximadamente 1155 genes, dos quais 868 já foram identificados como codificadores de proteínas (www.ensembl.org, acessado em 10/01/2014); essas proteínas desempenham funções, como regulação da transcrição de outros genes ou transdução de sinais. Vários estudos evidenciam que genes do cromossomo X estão intimamente ligados à função cerebral. Nguyen e Distèche (10) observaram maior expressão de genes do cromossomo X em relação aos genes autossômicos no cérebro dos mamíferos estudados.

A DI ligada ao X, denominada XLID (*X linked intellectual disability*), é dividida nas formas síndrômica (S-XLID) e não síndrômica (NS-XLID) (2), sendo que dois terços dos casos de XLID são não síndrômicos (2). Cerca de 140 formas de XLID síndrômicas já foram descritas, sendo que em aproximadamente 50% o defeito genético foi identificado. Em vários casos observou-se heterogeneidade alélica e de locus (1).

Em meados do século XX, Martin e Bell (11) estudaram 11 homens com DI de uma mesma família, provenientes de duas gerações e advindos de mães intelectualmente normais, sugerindo herança ligada ao cromossomo X. Lehrke (12), após estudar várias famílias com DI de herança ligada ao X, postulou a provável influência de genes localizados no cromossomo X atuando sobre a inteligência.

Ao estudar os cromossomos dos indivíduos afetados de uma família onde a mãe e seus dois filhos possuíam comprometimento intelectual, Lubs (13) observou uma falha distinta (sítio frágil) próxima à extremidade distal do braço longo do cromossomo X, sendo este denominado de cromossomo X marcador. Richards et al

(14) em análise citogenética detectou o sítio frágil característico no cromossomo X na família estudada por Martin e Bell (1943), sugerindo que a síndrome até então chamada Martin-Bell, usada para identificar os quadros clínicos associados ao cromossomo marcador, passasse a ser chamada de Síndrome do X-Frágil (SXF), como é conhecida hoje.

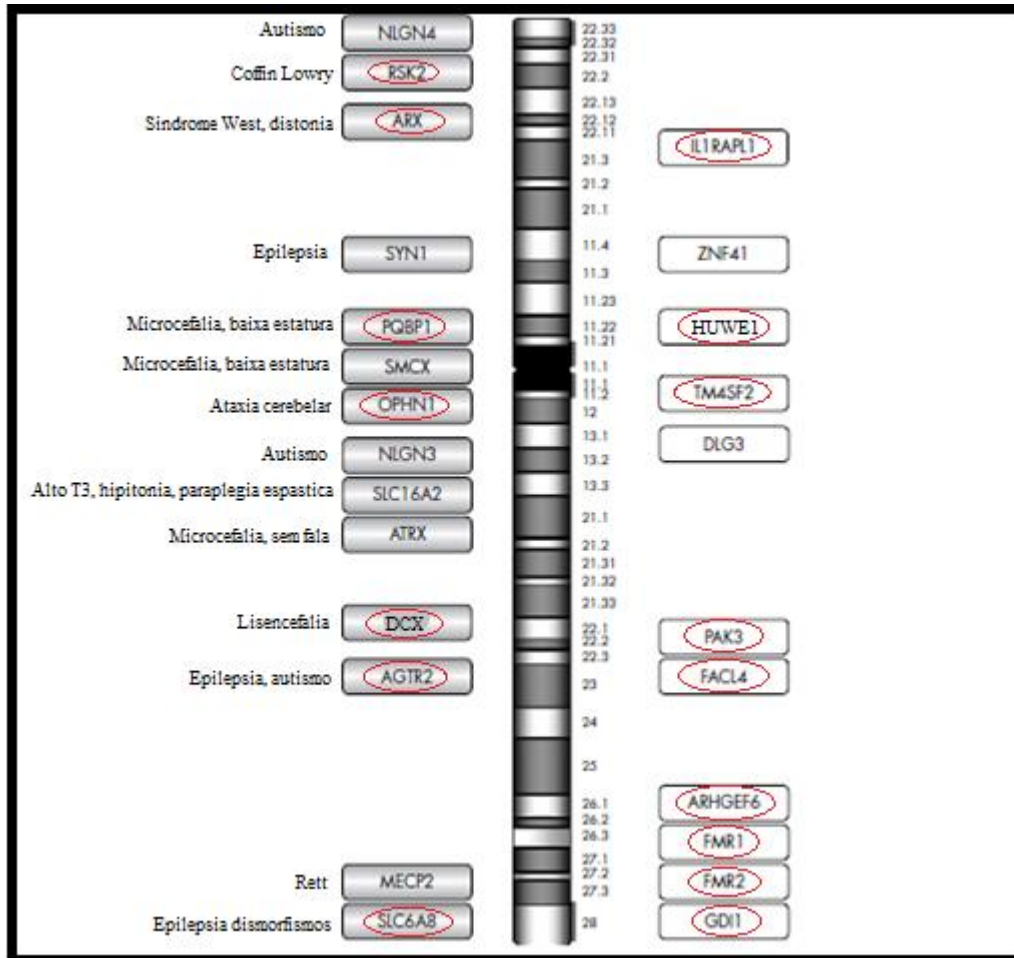
Esta síndrome é a segunda causa genética mais frequente de DI sendo precedida apenas pela síndrome de Down. A síndrome do cromossomo X Frágil é a causa mais comum de DI herdada, e sua manifestação é moderada a profunda nos homens afetados e, geralmente, leve nas mulheres afetadas. Os afetados podem apresentar quadros não sindrômicos ou sindrômicos que incluem além da DI transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, hipotonia, face alongada, estrabismo, orelhas em abano, palato alto, mandíbula e fronte proeminente, má-oclusão dentária, hiperextensibilidade articular, prega palmar única, macroorquidia, pés planos e escoliose (15,16).

Na última atualização de genes relacionados ao XLID (1), já se conheciam 90 genes do cromossomo X mutados em pacientes com XLID. Porém, em alguns genes foram identificadas mutações em pacientes com DI sindrômica como não sindrômica, indicando que essa classificação revela apenas dois extremos fenotípicos de um amplo espectro de manifestações clínicas (1).

As buscas por mutações no cromossomo X que causam deficiência intelectual têm movimentado diversas pesquisas, não só para elucidar a grande quantidade de homens afetados, mas também para compreender as ações desses genes no sistema nervoso central e sua atuação no desenvolvimento da inteligência e de habilidades cognitivas e sociais. Conhecer a causa da DI auxilia no aconselhamento genético, no diagnóstico pré-natal e na identificação de portadoras.

### 1.3. GENES DO CROMOSSOMO X QUE SOFREM MICRORREARRANJOS ASSOCIADOS À DEFICIÊNCIA INTELECTUAL

Deleções e duplicações de segmentos do cromossomo X já foram descritas em diversos pacientes com DI sindrômica ou não sindrômica e são, portanto, uma importante causa de XLID. Apesar de isoladamente essas alterações serem raras, algumas se destacam sendo encontradas mais frequentemente em pacientes com DI. Algumas deleções genômicas, duplicações e outros vários rearranjos estruturais são fatores condicionantes nas doenças genéticas que envolvem processos de desordem neurológica (17) (**Figura 1**). A seguir trataremos de dezesseis genes mapeados no cromossomo X e previamente relacionados a DI. Os genes citados a seguir são aqueles pesquisados no presente trabalho.



**Figura 1:** Alguns genes no cromossomo X que quando mutados causam deficiência intelectual. Os genes à esquerda (box cinza) estão relacionados à XLID síndrômica. Os genes à direita (box branco) estão relacionados à XLID não síndrômica ou ambas. Os genes marcados com o círculo são os dezesseis genes pesquisados nesse estudo. Adaptada de (18).

### 1.3.1 Gene *RPS6KA3*

O gene *RIBOSOMAL PROTEIN S6 KINASE (RPS6KA3)* está localizado em Xp22.12 e contém 22 exons (19). Codifica uma proteína membro da família Ribossomal S6 Kinase (RSK), também conhecida como P90 (20). As RSKs possuem um papel importante na progressão do ciclo celular, diferenciação e sobrevivência celular (21). Em ratos o gene *RPS6KA3* possui uma alta expressão no desenvolvimento neural e em tecidos sensoriais (21).

Esse gene já é bem conhecido por ser responsável pela síndrome de Coffin-Lowry (CLS). As manifestações clínicas na síndrome incluem morte prematura, estenose espinhal, cifoescoliose progressiva, ataques de gota, dentição anormal, perda auditiva, alterações oculares e função cognitiva alterada (22). A CLS pode ser causada por vários tipos de mutações, desde mutações de ponto até deleções de vários exons. Além da forma síndrômica, mutações em *RPS6KA3* podem também levar a DI não síndrômica. Indivíduos com mutações no gene *RPS6KA3* e NS- XLID produzem uma proteína com atividade seis vezes menor acredita-se que o restante de proteína seja suficiente para a sinalização da via MAPK-*RPS6KA3* envolvida no desenvolvimento do esqueleto e resultando em um fenótipo mais leve do que a CLS (23). Duplicação de sete genes incluindo o gene *RPS6KA3* foram descritas em uma família com pelo menos quatro afetados. As mulheres portadoras não apresentavam DI ou qualquer outra manifestação clínica (24). Uma duplicação de 1Mb contendo três genes dentre eles o *RPS6KA3* foi observada em homens com DI inespecífica, dismorfias faciais e dislexia (25). Recentemente uma microduplicação de 584 kb incluindo o gene *RPS6KA3* foi encontrada em uma família com DI leve, transtorno de déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) e epilepsia (26).

### 1.3.2 Gene *ARX*

O gene *ARISTALESS-RELATED HOMEBOX (ARX)* está localizado em Xp21.3, é composto por 5 exons codificantes em aproximadamente 12,5Kb e codifica uma proteína de 562 aminoácidos (27). Tem expressão predominante no cérebro fetal, adulto e nos músculos esqueléticos (27); em embriões de ratos foi encontrado especialmente no telencéfalo e tálamo ventral com ausência de expressão no cerebelo durante o desenvolvimento. *ARX* atua em neurônios maduros essenciais para o desenvolvimento de habilidades cognitivas (28). Homens portadores da mutação possuem fenótipos mais graves e mulheres portadoras podem apresentar ou não fenótipos moderados a leves (29). Fulp et al. (30) em estudos com camundongos identificaram 84 genes que na ausência de *ARX* foram desregulados, esses genes estavam envolvidos na migração celular, orientação axonal, neurogênese e regulação da transcrição.

Várias mutações já foram encontradas nesse gene, levando a fenótipos de DI não síndromicos ou a quadros síndromicos. Dentre as patologias síndromicas podemos destacar lisencefalia ligada ao X, agenesia de corpo caloso com genitália anormal (Síndrome de Proud), DI e distúrbios de movimentos variáveis (Síndrome de Partington) e Espasmos Infantís sem malformações cerebrais (EIEE1) que pode evoluir para a Síndrome de West (MIM # 300215 ; # 300419; # 309510; # 300004). Existe uma heterogeneidade muito grande com relação aos diversos fenótipos e as diversas mutações.

A lisencefalia ligada ao X afeta mais homens podendo levar a morte nos primeiros dias de vida. Dentre as mutações já relacionadas estão deleções de nucleotídeos principalmente no exon 2 resultando em proteínas truncadas (31).

Na agenesia de corpo caloso com genitália anormal (Proud Syndrome) foi encontrada uma transição no exon 2 dando origem a uma proteína mutante T333N com menor afinidade ao DNA (Ácido Desoxirribonucleico) do que a proteína selvagem (29). A síndrome de DI e distúrbios de movimentos variáveis (Síndrome de Partington) está relacionada até então a duplicação de 24 pares de base (pb) no gene *ARX* causando uma expansão de polialaninas (26,30).

Existem várias famílias já relatadas que não se encaixam nos quadros sindrômicos descritos a cima, porém possuem mutação no gene *ARX*. O fenótipo de DI é de moderado a grave podendo incluir ou não quadro de convulsões ou dismorfias leves. Duplicações de 24 pb no exon 2 foram identificadas em indivíduos com NS-XLID. Existem também relatos de mutações de ponto em diferentes famílias com quadro de DI inespecífico (28). Duplicação completa do gene *ARX* já foi encontrada juntamente a outros genes da região (34).

### 1.3.3 Gene *IL1RAPL1*

O gene *INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ACCESSORY PROTEIN-LIKE 1 (IL1RAPL1)* está mapeado na posição Xp21.3 do cromossomo X. *IL1RAPL1* tem 1,37Mb e possui 11 exons (35). É uma proteína do grupo das interleucinas composta por 696 aminoácidos expressa nos neurônios cerebrais; participa ativamente na regulação de neuritos e excitose por regulação de sensores de cálcio (36,37).

Mutações nesse gene levam a DI não sindrômica com espectros de deficiências neurológicas cognitivas variando de DI moderada a autismo (35). Homens são mais gravemente afetados e mulheres portadoras apresentam fenótipos mais leves a normais. A maior parte das mutações descritas no gene são mutações de ponto que ocasionam troca de aminoácidos ou códon de parada prematuro. Em estudos realizados em duas famílias distintas com DI, foram encontradas grandes deleções incluindo os exons 2, 3, 4, e 5; ambas mutações são semelhantes porém seus pontos de interrupção não foram precisamente relatados (38,39). Também há descrição de deleção dos exons 3 a 7 sendo causa de DI moderada a leve em dois irmãos de mãe portadora fenotipicamente normal (35). Em estudo de triagem em meninos com DI inespecífica, *IL1RAPL1* foi encontrado duplicado junto a mais 40 genes na porção Xp11.4 - p21.3 (40).



#### 1.3.4 Gene *TSPAN7* (*TM4SF2*)

*TETRASPANIN 7* (*TSPAN7* ou *TM4SF2*) é um gene localizado na região Xp11.4, contém 7 exons dispostos em aproximadamente 127Kb que codifica uma proteína da família tetraspanin com 244 aminoácidos, quatro domínios putativos na região transmembranar (41). É especulado que este gene possa ter importante papel no controle do crescimento de neurônios, sendo altamente expresso no Sistema Nervoso Central (42).

Até o momento mutações nesse gene foram relatadas em homens com DI não sindrômica. Um estudo demonstrou em dois meninos de famílias distintas com DI inespecífica, foi encontrada mutação de ponto sem sentido gerando uma inativação da proteína do gene e uma troca de aminoácidos não conservativa na proteína (P172H) (42). Em uma triagem feita nos 7 exons do gene *TSPAN7* em 105 homens com DI se encontrou a mesma substituição P172H em apenas um afetado. Mãe e irmã também possuíam a mesma substituição, porém tinham fenótipos normais (43). *TSPAN7* também já foi encontrado duplicado em dois irmãos juntamente a 40 outros genes, em Xp11.4 - p21.3 e duplicado em um menino juntamente com o gene *OPHN1* (40). Recentemente, em triagem de 100 meninos com NS-XLID foi encontrada uma duplicação do exon 5 no gene *TSPAN7* (44).

#### 1.3.5 Gene *PQBP1*

O gene *POLYGLUTAMINE-BINDING PROTEIN 1* (*PQBP1*) se localiza na porção Xp11.23 e contém 6 exons dispostos em 4,6 Kb (45). Produz uma proteína que se liga a poliglutamina encontrada no núcleo celular com maior expressão no cerebelo, hipocampo e bulbo olfatório.

Mutações nesse gene são a principal causa da DI sindrômica conhecida como síndrome de Renpenning. Os sinais clínicos da síndrome incluem baixa estatura, microcefalia, dismorfias faciais e testículos pequenos na puberdade. As mutações mais relatadas até o momento incluem inserção e deleção de nucleotídeos em

quantidades e posições diferentes (46). Um paciente com DI grave e várias características que se assemelham a síndrome de Renpenning apresentou duplicação do gene inteiro além de outros genes em Xp11.22 - p11.23 (47). Uma duplicação de 5Mb incluindo o gene PQBP1 foi descrita em um menino com DI moderada, comportamento autista, baixa estatura e características dismórficas leves (48).

### 1.3.6 Gene *HUWE1*

O gene *HECT, UBA, AND WWE DOMAINS-CONTAINING PROTEIN 1*; (*HUWE1*) está na posição Xp11.22, possui 84 exons em aproximadamente 154Kb e produz uma proteína ubiquitina ligase do tipo E3 (49). Em modelo animal possui expressão em vários tecidos de rato, incluindo o córtex cerebral e o hipocampo (49).

Há uma forma sindrômica de DI classificada por Turner et al (50) que é causada por mutações de ponto do tipo transição. Os principais fenótipos são DI moderada a grave em homens e leve nas mulheres portadoras, macrocefalia e características variáveis como extensão limitada dos cotovelos e dedos afilados (50). Formas de DI não sindrômica estão descritas e relacionadas a microduplicações envolvendo o gene *HUWE1*. Algumas duplicações grandes variam de 0,4 a 0,8 Kb podendo incluir mais genes da região (49). Deleção do gene *HUWE1* foi encontrada juntamente a outras deleções também em pacientes com sinais clínicos do espectro autista (51).

### 1.3.7 Gene *OPHN1*

O gene *OLIGOPHRENIN 1 (OPHN1)* contém 25 exons, está localizado na região Xq12 contendo 391Kb, codificando uma proteína de 802 aminoácidos de domínio Rho GAPs, que controla alterações do citoesqueleto (52). Estudo em modelo animal mostrou sua ação no controle da maturação das espinhas dendríticas e importância em todas as fases do desenvolvimento (53).

Pacientes com S-XLID apresentando DI, hipoplasia cerebelar e outros fenótipos distintos apresentaram mutações nesse gene (54). Em meninos com DI, hipoplasia cerebelar e distúrbios observou-se deleção dos exons 21 e 22 do gene *OPHN1* (25,55). No exon 7 já foram descritas deleções de ponto do tipo transição em três meninos afetados com DI não específica (56). Duplicação do gene inteiro foi descrita numa família extensa juntamente a outros genes dentro da porção Xq12 - q13.3 (57). Uma duplicação de 800Kb em Xq12 - q13.1, incluindo o gene *OPHN1* mais dois outros genes, também foi descrita em meninos com DI (58).

### 1.3.8 Gene *ACSL4 (FACL4)*

O gene *ACYL-CoA SYNTHETASE LONG CHAIN FAMILY, MEMBER 4 (ACSL4)* está localizado na porção Xq22.3 possuindo 17 exons dispostos em 104 Kb (59). Produz uma proteína de cadeia longa de Acetilcoenzima (Acetil-CoA) sintase formada por 670 aminoácidos (60). Em estudos em humanos a proteína era altamente expressa no cérebro humano adulto, mais na porção do cerebelo e no hipocampo demonstrando ser 97% semelhante à encontrada em ratos (60,61).

*ACSL4* é um gene que, quando mutado, causa DI não sindrômica. Os fenótipos vão desde DI moderada a grave em homens e mulheres portadoras, podem apresentar capacidades cognitivas variadas, desde DI moderada a inteligência normal (62). As principais mutações já descritas são de ponto do tipo transição no intron 10 e transversão no exon 15 que causam troca de proteínas ou um códon de parada prematura. Também há DI sindrômica relacionada a esse gene

conhecida como *Alport Syndrome, Mental Retardation, Midface Hypoplasia, and Elliptocytosis* (AMME). Esta síndrome está caracterizada principalmente pela deleção contínua de vários genes em Xq22.3, incluindo principalmente o gene *COLLAGEN, TYPE IV, ALPHA-5 (COL4A5)* e gene *ACSL4*, levando aos fenótipos específicos da síndrome e a DI moderada a grave dependendo do tamanho deletado no gene *ACSL4* (63). DI sindrômica sem características da síndrome Alport já foi relacionada em uma deleção de 9 genes incluindo o *ACSL4* na região Xq22.3 - q23, sem deleção do gene *COL4A5* (64).

### 1.3.9 Gene *PAK3*

*P21-ACTIVATED KINASE 3 (PAK3)* é um gene ativador de quinases localizado em Xq22.3 que possui 16 exons em 276Kb. Faz parte de uma família de quinases do tipo serina/treonina que são críticas na transdução de sinais e regulação celular (65). Essa família gênica está envolvida em uma variedade de processos celulares, incluindo a dinâmica do citoesqueleto, motilidade celular, a transcrição de genes, morte e sobrevivência de sinalização e progressão do ciclo celular (65).

Já foram encontradas diversas mutações de ponto levando a troca de aminoácidos ou criando códons de parada prematuros sendo a causa de NS-XLID (66,67). As mães portadoras não apresentam DI e foi observado que possuem desvio total de inativação do cromossomo X (68). Há relatos de pacientes com S - XLID envolvendo a deleção de vários genes na porção Xq22.3 - q23, incluindo o gene *PAK3*; as características clínicas variam de acordo com a quantidade de genes envolvidos (69).

### 1.3.10 Gene *DCX*

*DOUBLECORTIN (DCX)* é um gene que está localizado em Xq23 abrangendo mais de 100 Kb de DNA contendo 9 exons dos quais 6 são codificantes (70). Codifica a proteína duplacortina que tem expressão exclusiva no cérebro fetal; atua na migração neural podendo também estar envolvida com a transdução de sinal; especula-se que a proteína de *DCX* possa pertencer a uma nova classe de proteínas intracelulares que auxiliam a migração neural através da sinalização de cálcio (70).

As mutações descritas nesse gene levam a um quadro de DI sindrômica onde a lisencefalia clássica é o principal fenótipo podendo resultar em DI grave e convulsões (71). Os homens afetados possuem fenótipos mais graves e a estes chamamos a síndrome de Lisencefalia ligada ao X (LISX1) enquanto mulheres portadoras apresentam fenótipos mais leves conhecidos como Heterotopia laminar subcortical ligada ao X (SCLH), também conhecida como síndrome do duplo cortex (71).

Estudos em diversas famílias com LISX1 e SCLH descrevem mutações de ponto do tipo transição e transversão resultando em troca de aminoácidos (70,72), inserção e deleção de 2 pares de bases gerando proteína truncada (72). Além destas há relatos de microdeleções encontradas em três mulheres com SCLH, duas excluindo os exons 3 e 4 e uma excluindo o exons 6 e 7 (73). No pré-natal de um menino o exon 4 do gene *DCX* foi encontrado mosaicismo para deleção do gene (74).

### 1.3.11 Gene *AGTR2*

O gene *ANGIOTENSIN II RECEPTOR, TYPE 2 (AGTR2)* se encontra na posição Xq24 compreendendo cerca de 5 Kb e possui 3 exons (75). Produz uma proteína de aproximadamente 363 resíduos de aminoácidos que expressa seus receptores AT2 altamente em tecidos fetais e em tecidos adultos como cérebro, medula adrenal e ovário (76). Este receptor leva a morte celular programada (apoptose celular), um indicativo de sua importante ação em transtornos neurais e patologias de rins e trato urinários (76).

Algumas mutações encontradas dentro do gene *AGTR2* foram relacionadas a casos de DI não sindrômica. Os fenótipos incluíam DI moderado a grave, podendo apresentar quadros convulsivos (75). Contudo, posteriormente essas mutações foram identificadas em vários grupos controle e consideradas como sem significado clínico (77). Dessa forma, o verdadeiro papel do gene *AGTR2* na DI ainda não está estabelecido.

### 1.3.12 Gene *ARHGEF6*

O gene *RHO GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR 6 (ARHGEF6)* se encontra no cromossomo X em Xq26.3. Esse gene contém 22 exons dispostos em 116Kb e produz uma proteína envolvida no ciclo Rho GTPase, com função de organização do citoesqueleto, forma celular e motilidade (78). Kutsche et al. (78) sugeriram que mutações no gene *ARHGEF6* possam atrapalhar as vias de transdução de sinais envolvidas na migração celular e no crescimento axonal, uma vez que proteínas Rho GTPases também estão envolvidas no crescimento de axônios, e controle da forma e tamanho dos dendritos.

Em estudo com homens afetados de uma grande família holandesa, todos portadores de DI, foi encontrada uma mutação de troca de base que interferiu no *splicing*, havendo a exclusão da tradução do exon 2 nos afetados gerando uma proteína de menor tamanho (78). Kutsche e colaboradores (78) também relataram

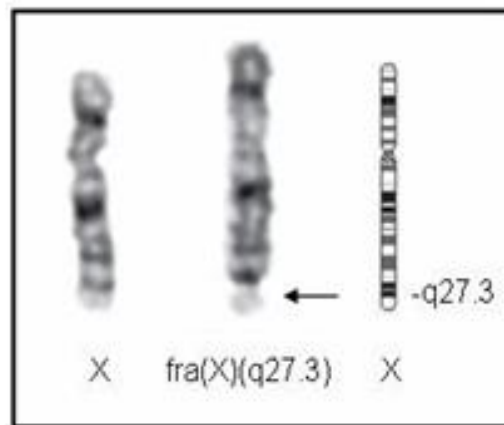
um homem com DI grave, algumas dismorfias e perda auditiva possuindo uma translocação não equilibrada herdada de sua mãe, t(X; 21) (q26;p11), causando uma deleção de 10pb no cromossomo X e deleção de 9 pb no cromossomo 22. A quebra e deleção no cromossomo X tornou o gene *ARHGEF6* inativo. DI sindrômica já foi relacionada a duplicação de 24 genes englobando *ARHGEF6*, na região Xq26.2-Xq26.3, em dois irmãos com DI grave, hipotonia, atraso no crescimento, desproporção craniofacial e má oclusão dentária (79). Duplicação do gene *ARHGEF6* foi encontrada em dois irmãos com DI moderada e dismorfias (25).

### 1.3.13 Gene *FMR1*

O gene *FRAGILE X MENTAL RETARDATION -1 (FMR1)* localiza-se no braço longo do cromossomo X na região Xq27.3 e apresenta 17 exons num segmento genômico de aproximadamente 38 kb (80). *Fragile X mental retardation 1 protein (FMRP)* é a proteína do gene *FMR1* que está presente no tecido fetal e no adulto. A proteína FMRP é encontrada em abundância nos neurônios e em menor quantidade no citoplasma de vários tipos celulares. Possui dois domínios de ligação KH, que geralmente são encontrados em proteínas que funcionam como ligantes ao RNA e que interagem com um conjunto de RNAs mensageiros de motivos quaternários. FMRP contém tanto sinal de localização nuclear quanto sinal de exportação nuclear, indicando uma função de proteína núcleo citoplasmática que se liga a muitos RNAs mensageiros, inclusive ao seu próprio RNA mensageiro; forma complexos de ribonucleoproteínas mensageiras; e se associa a ribossomos na tradução. Esta proteína também está envolvida na maturação estrutural e funcional de sinapses servindo como um supressor traducional nos espaços pós-sinápticos (81,82).

Ao estudar os cromossomos dos indivíduos afetados de uma família onde a mãe e seus dois filhos possuíam comprometimento intelectual, Lubs (13) observou uma falha distinta (sítio frágil) próxima a extremidade distal do braço longo do cromossomo X (**Figura 2**), sendo este denominado de cromossomo X marcador. Richards et al., (14) em análise citogenética detectou o sítio frágil característico no cromossomo X na família estudada por Martin e Bell em 1943, sugerindo que a

síndrome até então chamada Martin-Bell, usada para identificar os quadros clínicos associados ao cromossomo marcador, passasse a ser chamada de Síndrome do X-Frágil, como é conhecida hoje. Esta síndrome é a segunda causa genética, mais importante, de DI sendo precedida apenas pela síndrome de Down. A síndrome do cromossomo X Frágil é a causa mais comum de DI ligada ao X, e sua manifestação é moderada a profunda nos homens afetados e geralmente, leve nas mulheres afetadas. As características fenotípicas encontradas em pacientes com SXF são bastante variáveis e incluem aspectos morfológicos e comportamentais.



**Figura 2:** Par de cromossomos X. A seta indica o sítio frágil na região Xq27.3, local das expansões CGG no gene *FMR1* que geram a síndrome do X-frágil. À direita, o ideograma do cromossomo X. Modificado de [www.genetics.com.au/pdf/factSheets/FS32.pdf](http://www.genetics.com.au/pdf/factSheets/FS32.pdf).

Essa síndrome é causada pela expansão de trinucleotídeos CGG dentro da região 5' não traduzida do gene *FMR1*. Em indivíduos normais essa repetição ocorre de 5-40 vezes. Indivíduos com 55-200 repetições são considerados portadores de pré-mutação, não apresentando sinais da síndrome, mas podendo transmiti-la para seus descendentes. Indivíduos afetados têm mais de 200 repetições que ocasionam a inativação do gene *FMR1* e conseqüentemente deficiência intelectual (83,84).

A expansão da repetição CGG na mutação completa causa a hipermetilação da ilha CpG na região reguladora 5' do gene *FMR1*. Este aumento na metilação e a diminuição da acetilação das histonas 3 e 4 na região 5' do gene, levam à perda da



expressão do gene e conseqüente não produção de FMRP (85). O silenciamento da transcrição do gene *FMR1* leva a não produção da proteína FMRP, causando a síndrome (84,86,87).

Em alguns casos ocorre simultaneamente, além da mutação completa, alelos pré-mutados em suas células, ou podem apresentar regiões metiladas e não metiladas e, por isso, são considerados mosaicos. Estes, são afetados com menos gravidade que os indivíduos com mutação completa, possuem uma freqüência de 12% para mosaico de expansão e 6% para mosaico de metilação (88).

Expansões não metiladas de 55-200 repetições CGG são chamadas de pré-mutação e, embora não causem DI são instáveis na meiose, podendo dessa forma expandir para uma mutação completa quando transmitidas maternamente para as próximas gerações (83,89). Alguns autores classificam as repetições CGG entre 40 e 55 como *Gray zone*, por estarem inseridos numa faixa intermediária pouco relacionada à transmissão instável entre gerações (90). O menor número observado de repetições CGG capaz de se expandir numa mutação completa na geração seguinte é de 56 repetições (91).

Deleções e duplicações do gene *FMR1* foram descritas em pacientes com DI, mostrando que a dosagem de *FMR1* é importante para a função cognitiva (92). Duplicação de 28 genes incluindo o gene *FMR1* foi encontrada em três homens de uma família francesa que possuíam DI leve e eram sindrômicos (93). Em um caso atípico de um menino com DI, obesidade e atresia anal, foi evidenciada uma deleção na região Xq26.3 –q27.3 onde todo o gene *FMR1* foi excluído, mostrando assim uma variabilidade fenotípica envolvendo o gene *FMR1*.

### 1.3.14 Gene *AFF2* (*FMR2*)

O *AF4 FAMILY, MEMBER 2 (AFF2 / FMR2)* é composto por 22 exons, dispostos em aproximadamente 650kb em Xq28 e tem um padrão complexo de *splicing* alternativo (94). Os exons 2, 3, 7 e 21 sofrem vários *splicings* alternativos podendo adicionar uma quantidade extra de 12 a 66 pb ao RNA mensageiro dependendo do exon (95) *AFF2* faz parte de uma família de reguladores de transcrição, sendo traduzido numa proteína de cadeia longa com 1311 aminoácidos ricos em serina e treonina encontradas no núcleo celular (95). Possui uma alta expressão na placenta de embriões com duas semanas, presente em vilosidades coriônicas, fibroblastos, pulmão, tendo alta expressão no cérebro em regiões responsáveis pela aprendizagem, cognição e memória bem como na interação do hipocampo e amígdala (96,97).

Já é de grande conhecimento que o gene *AFF2* pode sofrer mutações do tipo expansão de trinucleotídeos CCG causando um sítio frágil na porção terminal do braço longo do cromossomo X na região Xq28. Um estudo demonstrou que pessoas que possuem o sítio frágil apresentam amplificação da repetição CCG adjacente a ilha CPG de Xq28 (98). Sua incidência é em torno de 1 em 50 000 homens (99). A repetição CCG é polimórfica variando entre 6 – 20 repetições em pessoas normais e até 200 em pessoas afetadas (98). A clínica é uma DI leve sem traços típicos dismórficos podendo incluir dificuldades de aprendizagem, déficit de comunicação, problemas de atenção, hiperatividade e espectro autista (100). Translocações (101) e deleções submicroscópicas de introns e exons do gene *AFF2* já foram descritas; quanto maior o tamanho da deleção mais grave será o quadro de DI e nas deleções menores o paciente pode apresentar um quadro mais leve variando desde autismo até DI (102). Acredita-se que a deleções de exons cause função reduzida do gene levando ao quadro clínico de susceptibilidade de autismo e DI e a perda total da função do gene gera DI não sindrômica leve conhecida como FRAXE (*FRAGILE SITE, FOLIC ACID TYPE, RARE, FRA Xq28 E*) (103). Uma duplicação parcial do gene também foi descrita, porém sem detalhes do quadro clínico relacionado (104).

### 1.2.15 Gene *SLC6A8*

O gene *SOLUTE CARRIER FAMILY 6 MEMBER 8 (SLC6A8)* está mapeado em Xq28, contém 13 exons abrangendo um segmento de 8,5Kb (105). Codifica uma proteína de 732 aminoácidos e os primeiros estudos em animais já apontavam sua importância na fisiologia do músculo e transporte de creatina no hipocampo (106).

*SLC6A8* é bem conhecido por apresentar mutações associadas à Síndrome de deficiência de creatina cerebral - 1. Os fenótipos mais comuns são DI, atraso grave na fala, distúrbios comportamentais e convulsões com prevalência de 0,3 a 3,5% em homens e as mulheres portadoras podem apresentar leve prejuízo neuropsicológico (revisão em 76). Os homens afetados podem ser mais rapidamente diagnosticados em teste de urina, que demonstra elevada quantidade de creatina e teste de diminuição de creatina em fibroblastos. Ambos demonstram a deficiência no transporte de creatina. Em uma reavaliação dos fenótipos e dos genótipos de 101 homens já relatados em estudos anteriores como portadores da síndrome de deficiência de creatina cerebral -1, 1/3 dos pacientes apresentavam mutações novas do tipo missense com atividade residual levando a um fenótipo mais leve e deleções grandes que levam a um quadro clínico mais grave (108). Duplicação envolvendo partes dos exons 11 e 12 do gene *SLC6A8* foi identificada em um menino com S-XLID e deficiência de creatina (109). Uma grande deleção de 19 kb envolvendo os exons 5 a 13 de *SLC6A8*, foi descrita em um menino com DI grave, surdez neurosensorial, distonia grave e deficiência de creatina cerebral (110).

### 1.3.16 Gene *GDI1*

O gene *GDP DISSOCIATION INHIBITOR 1 (GDI1)* é um regulador dos membros da família Rab, que são pequenas proteínas envolvidas no tráfego vesicular de moléculas lipídicas entre organelas celulares (111). Estudos em modelo animal mostraram duas sequências de GDI: a alfa e a beta. Bachner et al. (111) mostrou em ratos que na fase embrionária GDI alfa (*GDI1*) é expresso em tecidos neurais e sensoriais, tendo função predominante na transmissão dos sinais neurais; já GDI beta é expresso em vários tecidos e em todas as fases de desenvolvimento.

*GDI1* está mapeado em uma região rica em genes em Xq28, contendo 11 exons dispostos em 7Kb (112). Mutações em *GDI1* tem sido relacionados a NS-XLID onde homens podem apresentar DI leve a grave e mulheres portadoras podem ter dificuldade de aprendizado e déficit de atenção (113). Diversas mutações de ponto foram descritas desde substituições até mutações levando a códons de parada prematuros. Quando duplicado, juntamente com mais 17 genes na mesma região Xq28, o gene *GDI1* é relacionado à síndrome de duplicação Xq28. Nessa síndrome, além de DI moderado a grave, os homens podem possuir dismorfias físicas e faciais leves, podem apresentar malformação de Dandy-Walker com hipoplasia e agenesia do corpo caloso e dilatação ventricular. O aumento da expressão de *GDI1* com a duplicação é sugestivo de que seja ele o responsável pelo atraso mental observado nessa síndrome (114).

Todos os dezesseis genes aqui relatados (*RPS6KA3*, *ARX*, *IL1RAPL1*, *TSPAN7*, *PQBP1*, *HUWE1*, *OPHN1*, *ACSL4*, *PAK3*, *DCX*, *AGTR2*, *ARHGEF6*, *FMR1*, *AFF2 (FMR2)*, *SLC6A8* e *GDI1*) codificam proteínas que são expressas em alguma porção do sistema nervoso ou vias relacionadas. Todos são associados a casos clínicos já descritos com deficiência intelectual síndrômica ou não síndrômica, relacionadas a mutações de ponto ou a rearranjos em um desses genes. Devido a estas características, selecionamos o kit MLPA *P106-B1 MRX*, que possui sondas para várias exons destes 16 genes, para triarmos nossas amostras de pacientes com DI síndrômica e não síndrômica em casos isolados ou com padrão de herança sugestivo de herança ligada ao X.

## **2. OBJETIVOS**

Investigar a frequência de microdeleção ou microduplicação de genes do cromossomo X ligados a Deficiência Intelectual, em amostras de pacientes do sexo masculino com suspeita de DI do Hospital Universitário da Universidade de Brasília.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para esse estudo foram selecionados 65 pacientes do sexo masculino com suspeita de deficiência intelectual, atendidos no Ambulatório de Genética Clínica do Hospital Universitário da Universidade de Brasília. Os pacientes foram encaminhados à consulta na genética clínica por médicos de outras especialidades, psicólogos ou pedagogos. O primeiro critério para a escolha dos pacientes foi a apresentação ou a suspeita de deficiência intelectual leve, moderada ou grave, avaliada com base em suas limitações cognitivas e comportamentais. Tanto em casos síndrômicos como não síndrômicos, selecionamos os que fossem sugestivos de herança ligada ao X ou casos isolados na família. Foram incluídos apenas aqueles que apresentaram cariótipo normal, e que não possuíam a mutação de expansão de trinucleotídeos responsável pela síndrome do cromossomo X frágil.

Os responsáveis pelos pacientes preencheram termo de consentimento livre e esclarecido. O presente projeto faz parte do projeto aprovado junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (CEP-FM 081/2009; 25/11/09).

Rotineiramente foram coletados 4 a 8 ml de sangue periférico em tubo heparinizado e em tubo contendo *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) como anticoagulante. As amostras foram submetidas ao exame de cariótipo e ao teste de PCR para exclusão da síndrome do X-frágil e só após resultados normais para ambos, foram incluídos no estudo.

### 3.1 CULTURA DE LEUCÓCITOS E EXAME DE CARIÓTIPO.

Com o sangue heparinizado foi realizada cultura de sangue total para realização do exame de cariótipo. O protocolo utilizado desenvolvido por Moorhead et al. em 1960 (com modificações) e dura cerca 72h após incubação das amostras. Para o crescimento dos leucócitos misturamos 1mL de sangue total fresco a 8mL de meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), 1,5mL de soro fetal bovino, 300µL de Fitohemaglutinina, 100µL de antibiótico penicilina/ estreptomicina e 100 µL de L-Glutamina. Após mais ou menos 70h na estufa a 37°C adicionamos 100 µL de Colchicina e retornamos para a estufa por mais 45min a 37°C. Terminado o período de crescimento e feita a parada das células na metáfase realizamos a fase de hipotonização. Nesta transferimos o material da estufa para dois falcons deixando cada um com 5,5mL que foram centrifugados por 6 min a 2000 rotações por minuto (rpm). Após, retiramos o sobrenadante e acrescenta-se aos poucos a solução de KCL a 37°C até completar 12mL. Depois de bem homogeneizado deixamos 15 min na estufa a 37°C. Da estufa seguiu para a centrifuga por 6 min a 2000 rpm. Depois foi retirado o sobrenadante deixando mais ou menos 2mL. Para a Fixação utilizamos a solução 1:3 de ácido acético e metanol, nessa fase colocamos com auxílio de vortex o fixador aos poucos até completar 10mL. Homogeneizar bem e levar a centrifuga por 6 min a 2000 rpm. Retirado o sobrenadante foi repetido o processo de fixação por mais 4 vezes. O material pingado nas lâminas foi tratado por bandeamento G utilizando tripsina em solução salina e corado com Giemsa. O cariótipo foi analisado pela Professora Doutora Iris Ferrari do Laboratório de Genética Clínica da UnB e feito com auxílio de microscópio, sendo entregue resultado posteriormente a cada paciente.

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada com o método Puregene (www.puregene.com). Na etapa de lise celular colocamos 3 mL de sangue total com 9mL de solução de lise RBC (5mM MgCl<sub>2</sub> -1mM EDTA pH 8,0), invertemos e incubamos por 10 min a temperatura ambiente. Após, centrifugamos por 10 min a 3400 rpm, removemos o sobrenadante e vortexamos o pellet para o ressuspender. Foi adicionado ao tubo 3 mL de solução de lise celular (SLC) (10mM Tris pH 7,5 – 1mM EDTA pH 8,0 – 1% SDS) misturando bem com pipeta até ficar homogêneo. Na etapa de precipitação da proteína adicionamos 1mL da solução de precipitação de proteína (NH<sub>4</sub>Ac 7,5 M ) ao lisado celular. A mistura foi vortexada por 20 seg e centrifugada por 10min a 3400 rpm. Para a fase de precipitação do DNA transferimos o sobrenadante para outro tubo contendo 3mL de isopropanol 100%, nessa etapa podemos observar o “novelo” de DNA. Centrifugamos novamente por 3min a 3400 rpm, e após retiramos o sobrenadante. Adicionamos 3 mL de etanol 70% invertendo o tubo para melhor homogeneizar, centrifugamos por 1 min por 3400 rpm e retiramos o sobrenadante mais uma vez. Deixamos secando por 20 min e adicionamos 200 µL de TE (Tris-HCL 10 mM - EDTA 1mM pH 8,0). O DNA foi armazenado em freezer de 2 a 8°C.

As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Healthcare Life Sciences, EUA) em concentração de ng/µL.



### 3.3 PCR X-FRÁGIL

Em todas as amostras com cariótipo normal foi feito o teste para X- Frágil. Foi realizada Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) para amplificação da região CGG do gene *FMR1*. Na reação de PCR foi utilizado *primer c* 5'-GCT CAG CTC CGT TTC GGT TTC ACT TCC GGT-3' e o *primer f* 5'-AGC CCC GCA CTT CCA CCA CCA GCT CCT CCA-3'. A amplificação foi realizada num volume total de 25µl contendo entre 50-100 ng de DNA genômico, 0.75 pmol de cada primer, Deoxyribonucleotide triphosphate (DNTP) 200µM, 10 µl de 5x Q-solution (Qiagen), 2.5 µl de 10x PCR Buffer e 1u de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). A amplificação consistiu de 34 ciclos iniciados com desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguidos de desnaturação a 98 °C por 45 segundos, anelamento a 64°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose para verificação da amplificação ou não do produto. Se após o processo de migração no gel for visualizada banda na mesma altura ou abaixo da banda de amostra controle (com 49 repetições CGG), este paciente foi considerado como apresentando alelo de tamanho normal. Se a amostra não apresentar nenhuma banda ou possuir banda superior a amostra controle, este seria triado como provável portador de pré-mutação ou mutação completa do gene *FMR1* (**Figura 3**).

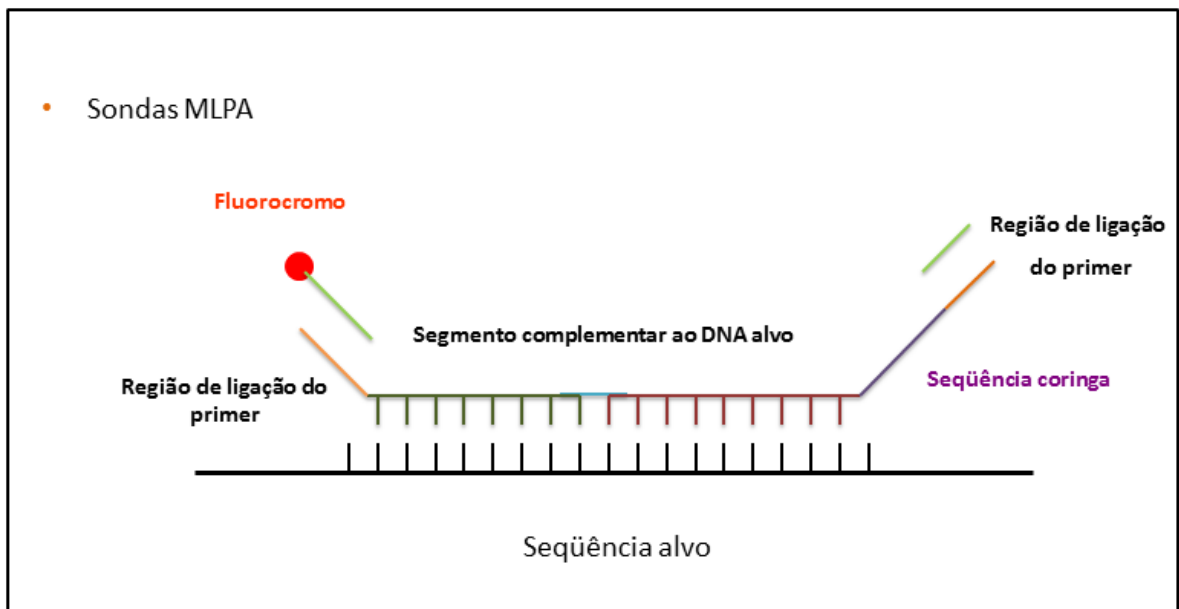


**Figura 3:** Resultado da PCR X-frágil em eletroforese de gel de agarose. Poço 1 é o marcador de peso molecular de 100pb. Poço 2 é a amostra controle com 49 repetições da trinca CGG. Poço 3, 4, 6 e 7 são amostras consideradas normais, pois suas bandas ficaram abaixo do tamanho da amostra controle. Poço 5 é uma amostra com possível mutação completa pois não houve amplificação da região. Poço 8 é o controle da reação, usada água ao invés de DNA.

Para a análise foi utilizado 5 $\mu$ l do material amplificado, juntamente com 3 $\mu$ l de tampão de corrida (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 31% e glicerol 30%). Desta mistura 8 $\mu$ l foram depositados em cada poço do gel, e no primeiro poço foi colocada alíquota padrão de peso molecular de 100 pb. O gel de agarose foi preparado a 1,5% de concentração com 100 ml de tampão TBE (Tris – Borato – EDTA) 1x e 1,5g de agarose e 3 $\mu$ l de brometo de etídio 1mg/ml. O gel foi submetido à eletroforese em cuba horizontal contendo tampão TBE 1x para a corrida à 100V e 50A por aproximadamente 30 minutos. Todos os géis foram fotografados em fotodocumentador e as fotos mantidas em ata para registro dos resultados das amostras.

### 3.4 TRIAGEM DE MICRORREARRANJOS NO CROMOSSOMO X POR MLPA.

Para a investigação de deleções ou duplicações nos genes candidatos utilizamos a técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA). Essa técnica é um método simples, sensível, rápido e econômico que visa a quantificação relativa quanto ao número de cópias de até 50 seqüências de ácidos nucleicos em um experimento (**Figura 4**).



**Figura 4:** Representação esquemática das sondas de MLPA.

Para as reações de MLPA, selecionamos o kit *P106-B1 MRX* que inclui sondas para 16 genes diferentes do cromossomo X (*RPS6KA3*, *ARX*, *IL1RAPL1*, *TSPAN7*, *PQBP1*, *HUWE1*, *OPHN1*, *ACSL4*, *PAK3*, *DCX*, *AGTR2*, *ARHGEF6*, *FMR1*, *AFF2* (*FMR2*), *SLC6A8* e *GDI1*) (**Tabela 1**). A técnica MLPA permite a identificação do número de cópias de uma dada seqüência de DNA por meio da hibridação de sondas específicas e amplificação por PCR. Essas sondas

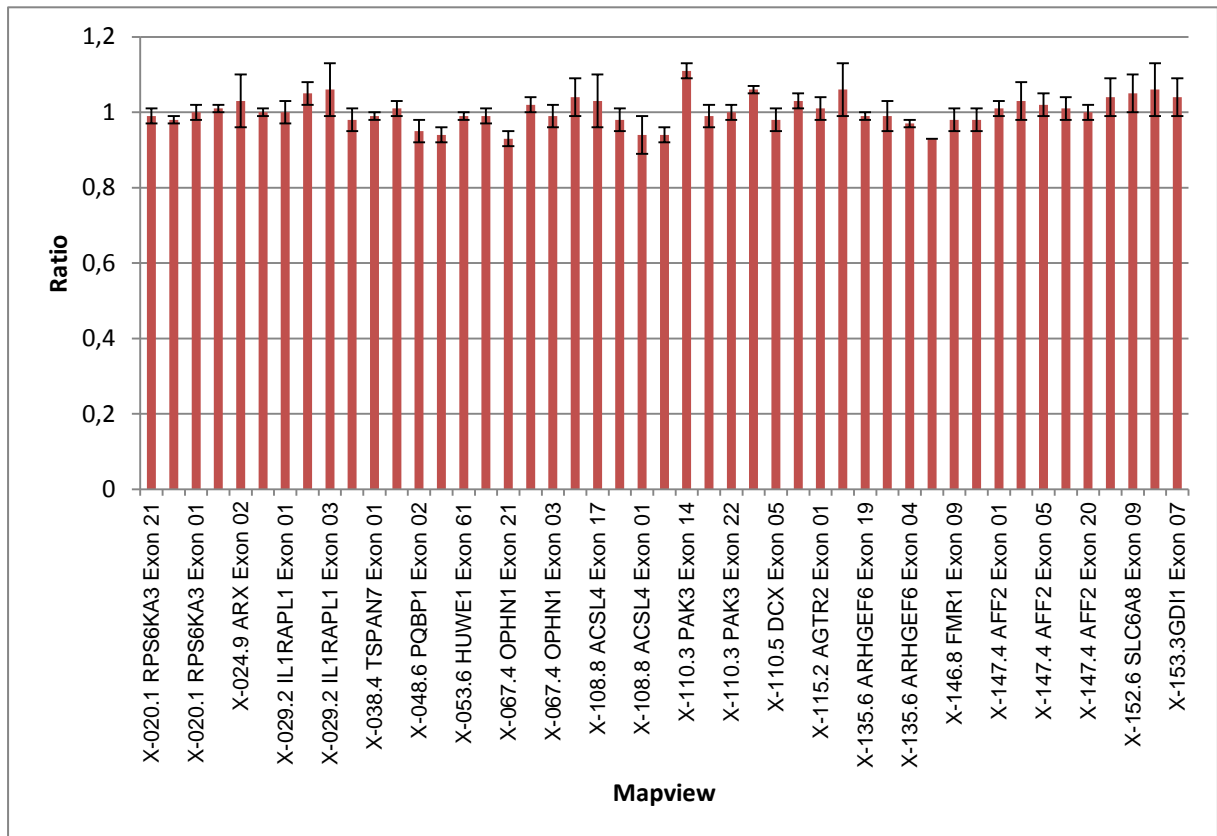
apresentam dois segmentos complementares às seqüências-alvo de DNA: um oligonucleotideo sintético curto e um oligonucleotideo sintético longo. Este contém uma seqüência *stuffer* que varia de tamanho nas diferentes sondas, permitindo a separação dos diferentes fragmentos por eletroforese capilar. Cada kit é composto de até 50 pares de sondas permitindo assim a análise de diversas regiões simultaneamente. Inicialmente as sondas são hibridizadas ao DNA e em seguida os fragmentos são ligados por uma ligase. Após uma nova desnaturação o fragmento formado pela junção das sondas é amplificado por PCR. A reação de PCR é realizada com um único par de *primers*, comum a todas as sondas. Foram seguidos todos os passos e quantidades sugeridas pelo fabricante.

**Tabela 1** - Genes do cromossomo X investigados pelo MLPA com kit *P106-B1 MRX* com suas respectivas posições cromossômicas e localização das sondas.

Gene	Posição	Localização das sondas
<b>RPS6KA3</b>	Xp22.12	Exons 1, 3 e 21
<b>ARX</b>	Xp21.3	Exons 1, 2 e 4
<b>IL1RAPL1</b>	Xp21.3	Exons 1, 2, 3, e 6
<b>TSPAN7 (TM4SF2)</b>	Xp11.4	Exons 1 e 5
<b>PQBP1</b>	Xp11.23	Exons 2 e 5
<b>HUWE1</b>	Xp11.22	Exons 6 e 61
<b>OPHN1</b>	Xq12	Exons 1, 3, 12 e 21
<b>ACSL4 (FACL4)</b>	Xq22.3	Exons 1, 12 e 17
<b>PAK3</b>	Xq22.3	Exons 7, 14, 21, e 22
<b>DCX</b>	Xq23	Exons 2, 4 e 5
<b>AGTR2</b>	Xq24	Exons 1 e 3
<b>ARHGEF6</b>	Xq26.3	Exons 1, 4, 9, e 19
<b>FMR1</b>	Xq27.3	Exons 9 e 16
<b>AFF2 (FMR2)</b>	Xq28	Exons 1, 3, 6, 12, e 21
<b>SLC6A8</b>	Xq28	Exons 4 e 9
<b>GDI1</b>	Xq28	Exons 1 e 7

- *Condições de hibridação e amplificação:* 5µL de DNA (50-100ng) foram colocados em microtubos e levados ao termociclador para desnaturação por 10min a 98°C. À temperatura ambiente foi adicionado o mix de hibridação contendo por reação 1,5µL de MLPA buffer e 1,5µL de SALSA *probe mix*, seguindo-se desnaturação a 95 °C por 1min e hibridação *overnight* a 60°C (entre 16-20h). Após a hibridação foi adicionado o mix de ligação contendo 25µL de H<sub>2</sub>O, 3µL de Ligase *Buffer A*, 3µL de Ligase *Buffer B* e 1µL de enzima Ligase-65. Os tubos foram incubados por 15min a 54°C e 5min a 98°C. Em seguida foi realizada a amplificação por PCR. Para o volume final de 50µL, foram misturados 7,5µL de H<sub>2</sub>O, 2 µL de SALSA PCR *primer mix* e 0,5 µL de SALSA *polymerase*. As condições da amplificação foram: 35 ciclos de 30 seg a 95 °C, hibridação a 60 °C por 30 seg e extensão de 30seg a 72 °C, seguidos de extensão final a 72 °C por 20 min. A reação de MLPA foi realizada em amostras teste (pacientes) e controle (indivíduos do sexo masculino fenotipicamente normais).

Em seguida os fragmentos da PCR foram diluídos e misturados a 0,1 µL de GS500 LIZ® (*Applied Biosystems*, EUA) e 9 µL de Formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*, EUA) e submetidos à eletroforese capilar. A análise do produto do MLPA foi feita em sequenciador automático ABI 3130 (*Applied Biosystems*). O marcador de peso molecular GS500 LIZ (*Applied Biosystems*) foi utilizado para determinação do tamanho dos fragmentos e os resultados foram analisados utilizando-se os programas Genemapper (*Applied Biosystems*) e Coffalyser (*MRC-Holland*). A análise dos resultados foi feita calculando-se o valor da intensidade de amplificação da sonda específica à média das intensidades de amplificação de todas as sondas em relação à média de intensidade nas amostras controle. Como foram testados apenas indivíduos do sexo masculino a região foi considerada deletada quando esse valor foi igual a 0 e duplicada quando esse valor foi superior a 1,8 (**Figura 5**), caso testadas, mulheres apresentariam o valor igual a 2 quando normais, pois possuem dois cromossomos X, valores acima ou abaixo representariam duplicação e deleção do segmento.



**Figura 5:** Resultado de uma análise de MLPA com o kit *P106-B1 MRX* com padrões normais. As barras vermelhas representam os valores normalizados de intensidade de fluorescência para cada uma das sondas

Todos os pacientes, que passaram pelo MLPA receberam relatório com os resultados dos exames.

Em um paciente foi encontrada uma duplicação pelo MLPA e realizados outros testes para confirmação e mapeamento da alteração e para verificarmos se o rearranjo era ou não herdado. A mãe do paciente também foi investigada por MLPA.

### 3.5 ANÁLISE CROMOSSÔMICA POR MICROARRAY.

A análise cromossômica por *microarray* foi realizada para o paciente com resultado alterado pelo MLPA a fim de confirmarmos os resultados e delimitarmos com maior precisão os segmentos envolvidos no rearranjo. A análise cromossômica por *microarray* permite analisar microdeleções ou microduplicações, simultaneamente, em milhares de seqüências alvo do genoma. Esta técnica utiliza como alvo de hibridação um conjunto de sondas (oligonucleotídeos), com localização previamente conhecida nos cromossomos, organizados em alta densidade em um chip de DNA. Utilizamos a plataforma *CytoScan HD Array* (*Affymetrix*, EUA) e as configurações disponíveis no *GeneChip® Scanner 3000 7G System* (*Affymetrix*, EUA). Essa plataforma utiliza microarranjos de DNA contendo 2 milhões de sondas não polimórficas para *Copy number variations* (CNVs) de regiões codificantes e não codificantes do genoma humano e cerca de 750.000 SNPs. O sistema todo inclui os oligonucleotídeos pré-arranjados em *GeneChip®*, conjunto de 38 reagentes diferentes, equipamentos para hibridização, lavagem, coloração, leitura e visualização dos microarranjos, e programa computacional necessário para a identificação dos *Single nucleotide polymorphisms* (SNPs) e das CNVs. A técnica consistiu das seguintes etapas:

- *Preparação do DNA genômico:* Seguindo os padrões recomendados pelo fabricante quanto à estrutura de trabalho, condições e materiais utilizados foi dada seqüência ao protocolo para a análise das amostras, que tem início com a normalização das amostras para a concentração final de 50 ng/μL de DNA diluído em *Low EDTA TE buffer* (*Affymetrix*, EUA). Utilizou-se o protocolo estabelecido para grupo de 8 reações contando com 6 amostras, um controle positivo e um controle negativo.
- *Digestão com Nsp I, ligação de adaptadores e amplificação:* Os DNAs dos pacientes e controles foram submetidos à digestão em sítios específicos com a enzima *Nsp I* (*Affymetrix*, EUA) para a obtenção de fragmentos de DNA de tamanhos variados e posterior ligação de adaptadores com a *T4 DNA Ligase* (*Affymetrix*, EUA), preparando a amostra para a amplificação através da reação da PCR.

Foi utilizada uma mistura de 5  $\mu\text{L}$  de DNA (50ng/ $\mu\text{L}$ ), 11,55  $\mu\text{L}$  de água (*Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water*), 2,00  $\mu\text{L}$  de tampão da *Nsp I* (10X), 0,20  $\mu\text{L}$  de albumina bovina sérica (BSA) (100X) e 1,0 $\mu\text{L}$  da enzima *Nsp I* (10 U/ $\mu\text{L}$ ). A seguir, a mistura foi colocada no termociclador *MyCycler®* (*Bio-Rad*, EUA) por duas horas a 37°C e 20 minutos a 65°C. Os produtos da digestão foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

A seguir, foi realizada a ligação dos fragmentos de DNA a adaptadores específicos, com a mistura de 0,75  $\mu\text{L}$  de adaptador *Nsp I* (50  $\mu\text{M}$ ), 2,50  $\mu\text{L}$  de tampão da T4 DNA Ligase (10X) e 2,00  $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA Ligase (400 U/ $\mu\text{L}$ ). A mistura foi colocada em termociclador (*Bio-Rad*, EUA) por três horas a 16°C e 20 minutos a 70°C. Os produtos da reação de ligação foram diluídos com 75 $\mu\text{L}$  de água e foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

Foram feitas quadruplicatas das reações da PCR de cada amostra para aumentar a quantidade do DNA genômico. Os fragmentos de DNA ligados a adaptadores *Nsp I* foram submetidos à reação de PCR com a utilização de 39,5 $\mu\text{L}$  de água, 10,0  $\mu\text{L}$  de tampão da TITANIUM™ *Taq* DNA Polimerase(10X), 20,0  $\mu\text{L}$  de reagente *GC-Melt*, 14,0  $\mu\text{L}$  de mistura de dNTP's (2,5mM cada), 4,5 $\mu\text{L}$  do iniciador PCR Primer 002 (100 $\mu\text{M}$ ) (*Clontech*, EUA) e 2,0  $\mu\text{L}$  da enzima TITANIUM™ *Taq* DNA polimerase (50X) (*Clontech*, EUA). Foram colocadas em um termociclador Veriti™ onde as reações tinham 1 ciclo de incubação a 94°C (3 minutos), 30 ciclos de 94°C (30 segundos), 60°C (45 segundos) e 68°C (15 segundos) e um último ciclo de 68°C (7 minutos).

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio. O tamanho dos fragmentos deve ser de cerca de 150 a 2000 pb, confirmando o sucesso da digestão, ligação e PCR, permitindo a sequência do protocolo. Os produtos das PCRs foram armazenados a -20°C até o próximo passo.

- *Mistura dos produtos das PCRs, purificação e quantificação:* Os produtos das PCRs das quadruplicatas de cada amostra foram reunidos em um único tubo (volume final 397  $\mu\text{L}$ ) e os fragmentos de DNA foram capturados com o uso de esferas magnéticas (*Affymetrix*, EUA). Após incubação e centrifugação, as esferas magnéticas contendo fragmentos de DNA aderidos a sua superfície foram selecionadas por força magnética na *MagnaRack™* (*Life Technologies*, EUA), lavadas com tampão da purificação (*Affymetrix*, EUA) e, finalmente, os DNAs eluídos



em tampão de eluição (*Affymetrix*, EUA) para um volume final de 47  $\mu\text{L}$ . O material foi quantificado no espectrofotômetro *NanoVue Plus*. Para continuação do protocolo, cada amostra deve apresentar valores de concentração de DNA  $\geq 3.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Os produtos das PCRs purificados foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até o próximo passo.

- *Fragmentação dos produtos das PCRs:* Os produtos das PCRs inicialmente foram misturados com 10  $\mu\text{L}$  do mix de fragmentação que é cuidadosamente preparado com 123.5  $\mu\text{L}$  de água, 158,4  $\mu\text{L}$  de tampão de fragmentação 10x (*Affymetrix*, EUA) e 5,8  $\mu\text{L}$  do reagente de fragmentação (2,5 U/ $\mu\text{L}$ ). A mistura foi colocada no termociclador Veriti<sup>TM</sup> por 35 minutos a  $37^\circ\text{C}$  e 15 minutos a  $95^\circ\text{C}$ . A fragmentação (volume final: 55  $\mu\text{L}$ ) foi observada pela presença de fragmentos entre 25 e 125 pb em eletroforese em gel de agarose 4% corado com brometo de etídio. Os fragmentos obtidos foram armazenados a  $-20^\circ\text{C}$  até o próximo passo.

- *Marcação do DNA fragmentado com biotina:* A marcação das amostras foi realizada com a mistura de 51  $\mu\text{L}$  do DNA fragmentado e 19,5  $\mu\text{L}$  da mistura de marcação formada por 14,0  $\mu\text{L}$  de tampão *Terminal deoxynucleotidyl Transferase* (5X), 2,0  $\mu\text{L}$  de reagente de marcação de DNA 30mM (biotina) e 3,5  $\mu\text{L}$  da enzima *TdT* (30 U/ $\mu\text{L}$ ). A mistura foi colocada em um termociclador Veriti<sup>TM</sup> por quatro horas a  $37^\circ\text{C}$  e 15 minutos a  $95^\circ\text{C}$ . O DNA marcado com biotina foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  até o próximo passo.

- *Hibridização:* Primeiramente foi preparada a mistura de hibridização com os tampões de hibridização parte 1 (165,0  $\mu\text{L}$ ), parte 2 (15,0  $\mu\text{L}$ ), parte 3 (7,0  $\mu\text{L}$ ) e parte 4 (1,0  $\mu\text{L}$ ), mais 2,0  $\mu\text{L}$  de OCR (*Oligo Control Reagent*, *Affymetrix*, EUA). Em seguida foi realizada a mistura de 70,5  $\mu\text{L}$  de DNA biotinilado e 190  $\mu\text{L}$  da mistura de hibridização. Esta mistura foi aquecida no termociclador Veriti<sup>TM</sup> a  $95^\circ\text{C}$  por 10 minutos e resfriada a  $49^\circ\text{C}$  até o próximo passo. Ainda no termociclador, 200  $\mu\text{L}$  da mistura desnaturada foi depositada imediatamente em cada um dos *GeneChip*<sup>®</sup> com os oligonucleotídeos pré-arranjados. Os *GeneChip*<sup>®</sup> com o DNA são incubados em forno de hibridização (modelo *Hybridization Oven 645*, *Affymetrix*, EUA) a  $50^\circ\text{C}$  durante 16 a 18 horas a 60 rpm.

- *Lavagens dos GeneChip<sup>®</sup> e marcação com fluoróforos:* A lavagem e marcação dos *GeneChip*<sup>®</sup> foi realizada, quatro por vez, na estação automatizada *Fluidics Station 450* (*Affymetrix*, EUA) que foi previamente abastecida com os

tampões de lavagem A e lavagem B (*Affymetrix*, EUA) mais água deionizada. Foram preparados também os tubos separados contendo os tampões de marcação 1 (500 µL), 2 (500 µL) e 800 µL de *holding buffer* (*Affymetrix*, EUA) que apresentam em suas formulações os elementos essenciais (estreptavidina, ficoeritrina - SAPE e anticorpo biotinizado antiestreptavidina) para a formação da fluorescência durante a leitura dos *GeneChip*<sup>®</sup> com o laser. Em seguida, os *GeneChip*<sup>®</sup> são retirados do forno de hibridização e, imediatamente, colocados (quatro por vez) na estação fluidica onde as sequências de lavagens e marcações dos microarranjos contidos nos *chips* por fluoróforos são automatizadas sob controle do software *Affymetrix GeneChip*<sup>®</sup> *Command Console*<sup>™</sup> (AGCC) versão 3.2.2 (*Affymetrix*, EUA).

- *Varredura dos GeneChip*<sup>®</sup>, *captação de imagens e análise no software Chromosome Analysis Suite 1.2.2 (Affymetrix®)*: Os chips com microarranjos foram colocados no *GeneChip*<sup>®</sup> *Scanner 3000 7G (Affymetrix, EUA)*, gerenciado pelo programa AGCC. As imagens geradas pela excitação dos fluoróforos (ficoeritrina) captadas pelo digitalizador foram submetidas primeiramente à análise de controle de qualidade geral (QC) por meio do programa *Genotyping Console* versão 3.2.2 (*Affymetrix*, EUA). A imagem dessa leitura pode ser observada com o programa de visualização *Affymetrix GeneChip Viewer (Affymetrix, EUA)*, onde também se podem verificar os controles positivos do sistema de forma a se comprovar que as condições de hibridização do microarranjo foram adequadas.

Após estes procedimentos, utilizando o software *Chromosome Analysis Suite (ChAS)* versão 1.2.2 (*Affymetrix*, EUA) é possível visualizar e analisar as alterações cromossômicas (duplicações, deleções, CNVs, mosaicismo, perda de heterozigose) ao longo do genoma de cada amostra. O programa é oferecido gratuitamente no sítio do fabricante ([www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)) e trabalha com a interface do *Windows 7*. Ele permite analisar arquivos no formato *.CEL* gerados pelo software de leitura (*Affymetrix CytoScan*<sup>®</sup> *Arrays*) dos *GeneChip*<sup>®</sup>, visualizar os dados resultantes da análise da hibridização (arquivos *CYCHP*) sumarizados em forma de tabelas e gráficos, visualizar os dados (arquivos *CNCHP*) da plataforma (*CytoScan*<sup>™</sup> *HD Array*) com a qual são comparados os dados das amostras. O *software* permite ainda criar e customizar parâmetros e regiões para uma análise específica, aplicar filtros para todo o genoma ou regiões de interesse específico para remover informações não relevantes, realizar análises comparativas entre diferentes

amostras, além de acessar os principais bancos de dados externos (*NCBI, UCSC Genome Browser, Ensembl, MIM*<sup>®</sup>).

### 3.6 PESQUISA DE INATIVAÇÃO DO CROMOSSOMO X

Na mãe do indivíduo que apresentou alteração ao MLPA realizamos o estudo do padrão de inativação do cromossomo X. Em portadoras de genes mutados no cromossomo X tem sido mostrado que pode haver desvio no padrão de inativação desse cromossomo favorecendo o funcionamento do alelo normal (9). Assim, o estudo do padrão de inativação do cromossomo X em mães de afetados e em mulheres pertencentes a famílias de indivíduos com XLID pode auxiliar na confirmação do padrão de herança da DI nessa família e apontar possíveis portadoras assintomáticas do alelo mutado. Para o estudo do padrão de inativação foi analisado um marcador genético do tipo microssatélite localizado no gene *AR* (115). Esse gene encontra-se inativado no cromossomo X inativo e na região do microssatélite há um sítio de corte para a enzima *HhaI*. Essa enzima digere apenas fragmentos de DNA não metilados. O teste consiste na amplificação da região por PCR e análise do marcador genético sem e com a digestão da enzima. Dessa forma, a etapa sem digestão permite determinar os alelos presentes na mulher e a etapa após a digestão mostra se há inativação preferencial de algum desses alelos e consequentemente de um dos cromossomos X. A técnica consistiu em:

- Para cada amostra (paciente, mãe e controles normais) foram preparadas duas reações. Para ambas, 1000ng de DNA genômico foram utilizados. Em uma das reações o DNA é digerido com 2 µL da enzima *HhaI* que digere apenas fragmentos de DNA não metilados. A outra reação é preparada somente com a amostra de DNA e os demais reagentes (água, Buffer e BSA), mas sem a enzima *HhaI*. O volume final da reação digerida e não digerida é de 20µL. Ao final todas as amostras são incubadas a uma temperatura aproximada de 37° C por 12 horas.

- 4µL de cada amostra digerida e não digerida foram adicionados ao mix de PCR para amplificação. O volume total da reação foi de 30 µL contendo 15 pmol de *primer forward e reverse*, 4µL de DNTP 200µM, 2.5 µl de 10x PCR Buffer, 1,5 µL

de *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) e 1u de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen). O programa do termociclador consistiu em um primeiro ciclo de 94° C por 1 min, de 69°C por 30 seg e 72° C para a extensão, seguidos de 13 ciclos em que a temperatura de hibridação diminuía 0,5° C por ciclo, até atingir a temperatura de 62°C. A segunda etapa consistiu de 16 ciclos com temperatura de desnaturação de 94° C, hibridação de 62° C e extensão de 72° C, seguidos de extensão final a 72° C por 20 min.

- A eletroforese foi feita em analisador genético ABI-3130 (Applied Biosystems) utilizando 1µL do material amplificado diluído, na presença de 1µL de marcador de peso molecular GS500 LIZ (Applied Biosystems) e 9µL de formamida. A análise dos dados gerados foi feita com o software Genemapper (Applied Biosystems).

- Avaliamos o padrão de inativação do cromossomo X, estabelecendo a razão de inativação. Para isso, calculamos a razão entre o valor do pico de altura (amplificação) do menor alelo e a soma dos valores correspondentes aos dois alelos. O valor do pico de amplificação foi corrigido, usando-se a razão do valor do pico do alelo digerido e do mesmo alelo não digerido:  $(\text{phd1}/\text{phu1})/(\text{phd1}/\text{phu1})+(\text{phd2}/\text{phu2})$ , em que phd1 = alelo menor após digestão, phu1 = alelo menor não digerido, phd2 = alelo maior após digestão e phu2 = maior alelo não digerido (116).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 PACIENTES

Todos os 65 pacientes investigados foram selecionados de acordo com os critérios especificados: são meninos, com cariótipo normal e PCR para X-frágil mostrando o número de repetições CGG dentro da normalidade. Todos eram candidatos a DI ligada ao X.

Os pacientes foram separados em quatro grupos de acordo com sua manifestação clínica e histórico familiar: DI não sindrômica e isolada; DI não sindrômica com outros afetados na família; DI sindrômica isolada e DI sindrômico com outros afetados na família. O grupo considerado sindrômico apresentava, além da DI, dismorfias e/ou outras malformações associadas, mas que não permitiam o diagnóstico de síndrome genética definida.

Nos casos familiares os pacientes possuíam ao menos um parente de até segundo grau do sexo masculino com DI. Em alguns casos a mãe era afetada apresentando quadro de DI mais leve que o do filho. Todos os casos familiares eram sugestivos de herança ligada ao cromossomo X.

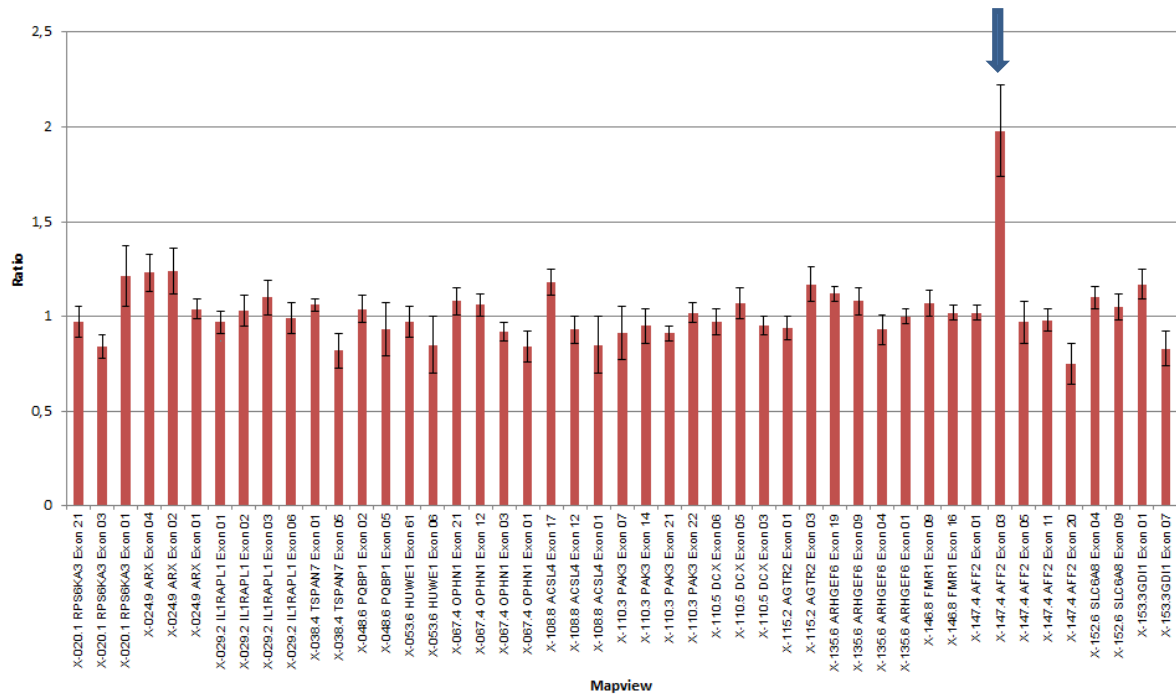
No total foram investigados 23 indivíduos não sindrômicos e de caso isolado; nove pacientes não sindrômicos com afetados na família; 24 pacientes sindrômicos e de caso isolado e nove pacientes sindrômicos com outros afetados na família (**Tabela 2**).

**Tabela 2** - Porcentagem de pacientes estudados de acordo com a manifestação clínica e histórico familiar de DI.

	Isolados		Familiais		Total	
	n	%	n	%	n	%
<b>Não síndrômico</b>	23	35,38	9	13,85	33	50,77
<b>Síndrômico</b>	24	36,92	9	13,85	32	49,23
<b>Total</b>	47	72,3	18	27,7	65	100

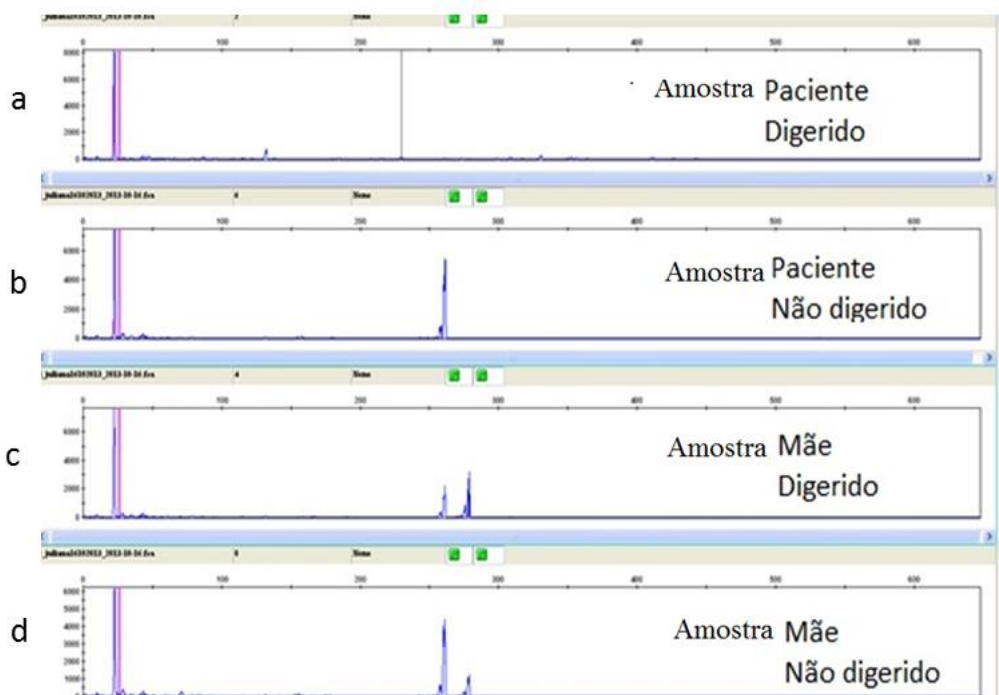
#### 4.2 RESULTADOS DA TRIAGEM DE MICRORREARRANJOS POR MLPA

A triagem por MLPA com o Kit P106-MRX foi realizada para as 65 amostras sendo que 64 delas (98,5%) demonstraram padrões normais para todas as regiões testadas. Logo, a DI nestes pacientes, não é decorrente de grandes deleções ou duplicações dos genes pesquisados. Contudo, como apenas alguns exons são investigados não podemos excluir a presença de rearranjos que não incluam nenhum dos exons testados. Em uma amostra (1,5%) identificamos uma duplicação de uma única sonda correspondente ao exon 3 do gene *AFF2* (*FMR2*), que apresentou intensidade de fluorescência 2x maior após normalização. (**Figura 6**). As demais sondas para o gene *AFF2* correspondentes aos exons 1, 6(5), 12(11) e 21(20) não evidenciaram duplicação.



**Figura 6:** Resultado do MLPA com o kit P-106 MRX evidenciando duplicação da sonda correspondente ao exon 3 do gene *AFF2*. A seta azul aponta para a região duplicada com intensidade próxima a 2,0.

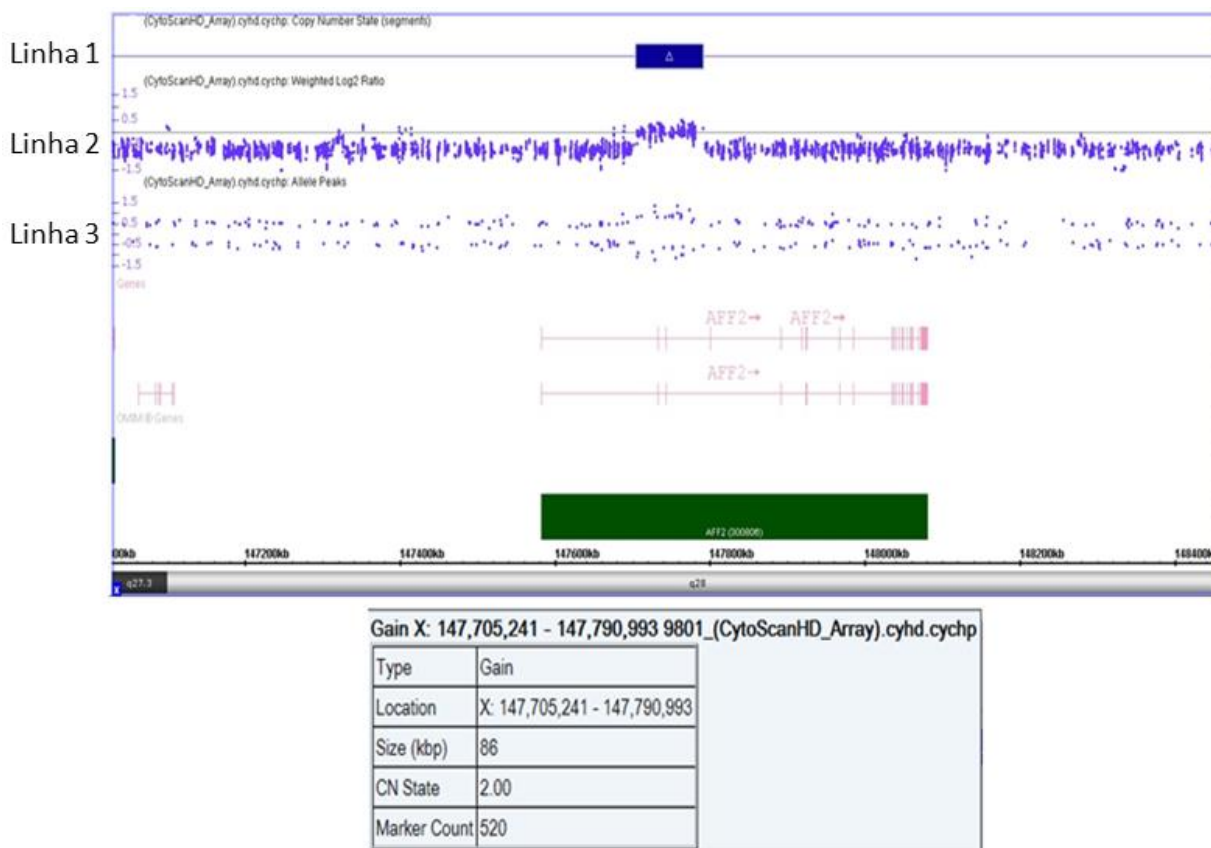
Diante desse resultado, a mãe do paciente foi também investigada por MLPA e confirmamos que ela também era portadora da duplicação. O estudo do padrão de inativação do cromossomo X por meio de marcadores do gene AR revelou que a mãe não possui desvio de inativação (**Figura 7**). A proporção de inativação dos cromossomos X com base na análise de polimorfismos do gene AR foi de 45:55, confirmando ausência de desvio de inativação.



**Figura 7:** Resultado da pesquisa de inativação do cromossomo X em eletroforese capilar. Análise de polimorfismos do gene *AR* após digestão ou não pela enzima *HhaI*. Em (a) podemos observar comparando ao (b), que a enzima digeriu o fragmento correspondente ao cromossomo ativo do paciente. Em (c) comparado com (d), observamos que a mãe ambos os alelos ativos, confirmando ausência de desvio total de inativação na mãe portadora de duplicação no gene *AFF2*.

A fim de confirmarmos o resultado do MLPA e identificarmos a extensão da duplicação realizamos a análise cromossômica por *microarray*. O resultado do *microarray* mostrou que a duplicação incluía além do exon 3, visto pelo MLPA, também o exon 2. O tamanho da duplicação é de cerca de 86 Kb na posição ChrX: 147,705,241 – 147,790,993 – [hg19] (**Figura 8**). Os demais exons do gene não mostraram duplicação. Não foram identificadas outras CNVs possivelmente patogênicas no cromossomo X ou em outros cromossomos.





**Figura 8:** Resultado da análise cromossômica por *microarray* na plataforma Cytoscan HD (Affymetrix®). O retângulo azul (Linha 1) representa o segmento duplicado. A linha 2 mostra as sondas não polimórficas e a linha 3 as sondas polimórficas (SNPs). Em rosa está representado o gene *AFF2*. As barras verticais indicam os exons e a seta a direção de transcrição. Podemos observar que a região duplicada inclui parte do intron 1, até parte do intron 3. No retângulo acima podemos observar a extensão da duplicação: ChrX: 147,705,241 – 147,790,993 – [hg19], tamanho: 86Kb e número total de sondas duplicadas nesse segmento: 520.

Este paciente foi encaminhado ao ambulatório de genética pela psicóloga que o acompanhava com a hipótese diagnóstica de DI ou de TDAH para realização de teste para a Síndrome do cromossomo X frágil que foi negativo.

É filho único de pais não consanguíneos, sem outros casos de DI na família. A mãe não possui contato com outros familiares, por isso, não foi possível resgatar a

genealogia do paciente. A mãe ao nascimento tinha 24 anos e o pai 44 anos. A mãe teve um aborto espontâneo anterior. Durante a gestação relatou movimentos fetais muito cedo e inquietação. Parto cesárea, não chorou ao nascer, pesava 3.650g (75º percentil) e media 51 cm (50º percentil). Sentou aos seis meses, engatinhou aos sete meses e andou aos 12 meses. Aos três anos de idade apresentava relacionamento difícil, mau comportamento e era violento. Foi alfabetizado aos seis anos de idade com auxílio de reforço escolar. Possui comportamento imaturo e não suporta irritação. Foi diagnosticado com déficit de atenção e desde então faz uso de Ritalina. Ao exame clínico por médico geneticista aos nove anos e cinco meses (**Figura 9**) pesava 61.000g (>97º percentil), estatura 150cm (>97º percentil), IMC 27,11 (sobrepeso), perímetro cefálico 56 cm (>98º percentil), comprimento da mão 18,4 cm (97º percentil), comprimento do dedo médio 7,8 cm (>97º percentil), distância intermamilar 23cm (>97º percentil). Não apresenta outras dismorfias ou malformações, além da macrossomia. A mãe relata que o aumento de peso ocorreu após o uso de corticoides.



**Figura 9:** Paciente aos nove anos e cinco meses de idade.

Aos 10 anos de idade foram realizados testes psicológicos por uma equipe de psicólogas, psicopedagogas e fonoaudiólogas. O teste de inteligência WISC-III indicou QI – 112, dentro do intervalo da normalidade. No teste de memória TEPIK-M demonstrou capacidade de memória de curto prazo média para sua faixa etária (19 pontos). O teste HTP (*House, Tree, Person*) foi normal para planejamento e ação. Nas seções com a psicóloga foi evidenciado prejuízo no seu funcionamento global devido a ansiedade e conflitos de ordem emocional e afetiva. A fala é infantilizada e imatura. Testes audiológicos revelaram déficit de processamento auditivo.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 PACIENTES COM RESULTADOS NORMAIS

Dos 65 pacientes investigados quanto à presença de microrrearranjos de genes do cromossomo X, 64 apresentaram resultado normal. Em estudo semelhante foram testados 80 meninos com suspeita de DI ligada ao X (com mais de um indivíduo do sexo masculino afetado em várias gerações ou com mais de três irmãos afetados) (25). Quatro desses pacientes (5%) apresentaram microrrearranjos: uma duplicação do gene *RPS6KA3*, uma duplicação do gene *GDI1*, uma duplicação no gene *ARHGEF6* e uma deleção no gene *OPHN1*. Mais recentemente, em 2011, foi realizado um estudo triando 100 meninos que tinham o diagnóstico de DI não síndrômica ligada ao X e possuíam mais um irmão ou algum afetado do sexo masculino na família materna (44). Apenas um indivíduo apresentou alteração ao MLPA com uma duplicação do exon 5 do gene *TM4SF2* (*TSPAN7*), presente também na mãe e nos irmãos afetados, obtendo assim 1% de positividade. No presente trabalho identificamos 1/65 pacientes (1,5%) com alteração ao MLPA, valor esse comparável ao encontrado nos dois trabalhos realizados anteriormente.

Nosso critério de inclusão foi mais abrangente do que o utilizado por Madrigal et al. e Utine et al. (25,44), uma vez que incluímos também casos isolados de meninos com DI. Quando se utiliza apenas casos familiares com evidência de herança ligada ao X espera-se que a taxa de detecção de mutações no cromossomo X seja maior, como a encontrada por Utine et al. (44). No entanto, no presente trabalho, o único paciente com alteração não possuía outros afetados na família, indicando assim que casos isolados de DI em meninos também devem ser incluídos na triagem para mutações em genes do cromossomo X.

Apesar das baixas taxas de detecção obtidas nos trabalhos que realizaram essa triagem, os genes incluídos no *kit* são aqueles em que já foram de fato identificadas mutações em diversos afetados e por isso são os mais prováveis de se encontrar mutação. No entanto, a grande heterogeneidade genética da DI, mesmo

nos casos de herança ligada ao X está de acordo com esses baixos níveis de detecção.

Um gene importante cuja duplicação causa DI em meninos e que não foi triado pelo kit é o gene *MECP2*. Mutações em *MECP2* podem causar a síndrome de Rett, DI, encefalopatia, e a duplicação do gene tem sido implicada em alguns quadros de autismo e DI (117). No estudo de Utine et al. (44) também foi utilizado o teste de MLPA para o gene *MECP2* nos mesmos 100 pacientes, e esses autores encontraram um paciente (1%) com duplicação desse gene. A inclusão desse gene em nossa pesquisa poderia aumentar a taxa de detecção de alterações e constitui uma perspectiva futura desse estudo.

## 5.2 PACIENTE COM DUPLICAÇÃO DO GENE *AFF2*

O gene *AFF2(FMR2)* é conhecido por, quando mutado no tamanho das expansões CCG, gerar a síndrome de FRAXE. A síndrome é causada pela perda da função do gene. Ocorre um sítio frágil na região Xq28 quando as expansões são maiores que a faixa normal de repetições de trinucleotídeos CCG (6 -20).Essas repetições levam a metilação da ilha CpG, silenciando o gene. Mais raramente afetados podem apresentar fenótipos semelhantes porém, por deleção parcial do gene (100). Essas mutações podem levar à DI leve a moderada, déficit de comunicação, problemas de atenção, hiperatividade e comportamento autista (118).

Em nosso estudo identificamos um paciente com duplicação parcial do gene. Duplicação do gene *AFF2(FMR2)* foi descrita na literatura uma única vez em um menino com duplicação de 210 Kb incluindo os exons 3 a 7 do gene *AFF2* (104). No entanto, esses autores não descrevem detalhes do fenótipo do paciente. O estudo em questão visava identificar microrrearranjos em pacientes com DI, portanto podemos concluir que o paciente possuía algum grau de comprometimento mental.

Nosso paciente possui uma duplicação menor, de apenas 86 Kb, englobando os exons 2 e 3. O gene *AFF2* sofre *splicing* alternativo, codificando seis isoformas distintas. Os exons 2 e 3 participam de todas as isoformas exceto a isoforma 6 que é transcrita a partir de um exon alternativo no intron 3. A duplicação encontrada em

nosso paciente inclui parte do intron 3, contudo não inclui a região do exon alternativo presente na isoforma 6. As diferentes funções e padrão de expressão de cada uma das isoformas ainda não foram elucidadas. Whibley et al. (104), sugeriu que a duplicação parcial de *AFF2* possa ocasionar o aparecimento de um codon de parada prematuro na tradução ou alterar o *splicing*.

Apesar de nosso estudo visar investigar pacientes com DI, o paciente com duplicação do gene *AFF2* foi reavaliado e apresenta QI normal. Contudo, o paciente apresenta transtornos emocionais, imaturidade e fala infantilizada, sugerindo assim comprometimento mental. Apesar do quadro clínico ser leve, pode fazer parte do espectro de variabilidade clínica encontrada em pacientes com mutações em *AFF2*. Deleções parciais do gene *AFF2* foram descritas anteriormente em meninos com atraso de desenvolvimento (94,102,119). Todas as deleções eram parciais e incluíam o exon 2 do gene. Um dos pacientes não apresentava DI, apenas dificuldades de fala reforçando a variabilidade fenotípica associada a mutações no gene *AFF2* (120).

Dessa forma, a duplicação aqui descrita adiciona ao conhecimento atual acerca das mutações no gene *AFF2* e fenótipos associados.

## 6. CONCLUSÃO

1) Dentre os 65 pacientes testados para microrrearranjos de genes do cromossomo X por MLPA apenas um apresentou microduplicação. A taxa de detecção (1,5%) é condizente com a encontrada em outros trabalhos na literatura.

2) O único paciente com alteração apresentou microduplicação parcial dos exons 2 e 3 do gene *AFF2*. Duplicação parcial desse gene foi relatada uma única vez na literatura. A identificação desses pacientes indica que duplicações do gene possam estar relacionadas a quadros de comprometimento mental.

3) A baixa frequência de detecção de alterações pelo MLPA indicam que microrrearranjos desses genes, mesmo em conjunto, ocorrem em baixa frequência em indivíduos com DI.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chiurazzi P, Schwartz CE, Gecz J, Neri G. XLMR genes: update 2007. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008 Apr;16(4):422–34.
2. Ropers H-H, Hamel BCJ. X-linked mental retardation. *Nat. Rev. Genet.* 2005 Jan;6(1):46–57.
3. Vasconcelos MM. Retardo mental. *J. Pediatr. (Rio. J.)*. 2004 Apr;80(2):71–82.
4. Mandel J-L, 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.* 2004 Sep;12(9):689–93.
5. Inlow JK, Restifo LL. Molecular and comparative genetics of mental retardation. *Genetics.* 2004 Feb;166(2):835–81.
6. Frints SGM, Froyen G, Marynen P, Fryns J-P. X-linked mental retardation: vanishing boundaries between non-specific (MRX) and syndromic (MRXS) forms. *Clin. Genet.* 2002 Dec;62(6):423–32.
7. Pembrey ME, Winter RM. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum. Genet.* 1985 Jan;71(2):182–3.
8. Robinson WP, Beever C, Brown CJ, Stephenson MD. Skewed X inactivation and recurrent spontaneous abortion. *Semin. Reprod. Med.* 2001 Jun;19(2):175–81.
9. 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.* 2002 Jul;71(1):168–73.
10. Nguyen DK, Distèche CM. High expression of the mammalian X chromosome in brain. *Brain Res.* 2006 Dec 18;1126(1):46–9.
11. Martin JP, Bell J. A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE. *J. Neurol. Psychiatry.* 1943 Jul;6(3-4):154–7.
12. Lehrke R. A theory of X-linkage of major intellectual traits. Response to Dr. Anastasi and to the Drs. Nance and Engel. *Am. J. Ment. Defic.* 1972 May;76(6):626–31.
13. Lubs HA. A marker X chromosome. *Am. J. Hum. Genet.* 1969 May;21(3):231–44.



14. Richards BW, Sylvester PE, Brooker C. Fragile X-linked mental retardation: the Martin-Bell syndrome. *J. Ment. Defic. Res.* 1981 Dec;25 Pt 4:253–6.
15. Lachiewicz AM. Abnormal behaviors of young girls with fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 43(1-2):72–7.
16. Hagerman RJ, Van Housen K, Smith AC, McGavran L. Consideration of connective tissue dysfunction in the fragile X syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 1984 Jan;17(1):111–21.
17. Lee JA, Lupski JR. Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron.* 2006 Oct 5;52(1):103–21.
18. Raymond FL. X linked mental retardation: a clinical guide. *J. Med. Genet.* 2006 Mar;43(3):193–200.
19. Jacquot S, Merienne K, De Cesare D, Pannetier S, Mandel JL, Sassone-Corsi P, et al. Mutation analysis of the RSK2 gene in Coffin-Lowry patients: extensive allelic heterogeneity and a high rate of de novo mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 1998 Dec;63(6):1631–40.
20. Pereira PM, Schneider A, Pannetier S, Heron D, Hanauer A. Coffin-Lowry syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010 Jun;18(6):627–33.
21. Zeniou M, Pannetier S, Fryns J-P, Hanauer A. Unusual splice-site mutations in the RSK2 gene and suggestion of genetic heterogeneity in Coffin-Lowry syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 2002 Jun;70(6):1421–33.
22. Hunter AGW. Coffin-Lowry syndrome: a 20-year follow-up and review of long-term outcomes. *Am. J. Med. Genet.* 2002 Sep 1;111(4):345–55.
23. Merienne K, Jacquot S, Pannetier S, Zeniou M, Bankier A, Gecz J, et al. A missense mutation in RPS6KA3 (RSK2) responsible for non-specific mental retardation. *Nat. Genet.* 1999 May;22(1):13–4.
24. Tejada M-I, Martínez-Bouzas C, García-Ribes A, Larrucea S, Acquadro F, Cigudosa J-C, et al. A child with mild X-linked intellectual disability and a microduplication at Xp22.12 including RPS6KA3. *Pediatrics.* 2011 Oct;128(4):e1029–33.
25. Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Martinez F, Fernandez I, et al. MLPA as first screening method for the detection of microduplications and microdeletions in patients with X-linked mental retardation. *Genet. Med.* 2007 Feb;9(2):117–22.
26. Matsumoto A, Kuwajima M, Miyake K, Kojima K, Nakashima N, Jimbo EF, et al. An Xp22.12 microduplication including RPS6KA3 identified in a family with

- variably affected intellectual and behavioral disabilities. *J. Hum. Genet.* 2013 Nov;58(11):755–7.
27. Strømme P, Mangelsdorf ME, Shaw MA, Lower KM, Lewis SME, Bruyere H, et al. Mutations in the human ortholog of *Aristaless* cause X-linked mental retardation and epilepsy. *Nat. Genet.* 2002 Apr;30(4):441–5.
  28. Bienvenu T, Poirier K, Friocourt G, Bahi N, Beaumont D, Fauchereau F, et al. *ARX*, a novel Prd-class-homeobox gene highly expressed in the telencephalon, is mutated in X-linked mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* 2002 Apr 15;11(8):981–91.
  29. Kato M, Das S, Petras K, Kitamura K, Morohashi K, Abuelo DN, et al. Mutations of *ARX* are associated with striking pleiotropy and consistent genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* 2004 Feb;23(2):147–59.
  30. Fulp CT, Cho G, Marsh ED, Nasrallah IM, Labosky PA, Golden JA. Identification of *Arx* transcriptional targets in the developing basal forebrain. *Hum. Mol. Genet.* 2008 Dec 1;17(23):3740–60.
  31. Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, et al. Mutation of *ARX* causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat. Genet.* 2002 Nov;32(3):359–69.
  32. Partington MW, Turner G, Boyle J, Géczy J. Three new families with X-linked mental retardation caused by the 428-451dup(24bp) mutation in *ARX*. *Clin. Genet.* 2004 Jul;66(1):39–45.
  33. Szczaluba K, Nawara M, Poirier K, Pilch J, Gajdulewicz M, Spodar K, et al. Genotype-phenotype associations for *ARX* gene duplication in X-linked mental retardation. *Neurology.* 2006 Dec 12;67(11):2073–5.
  34. Thorson L, Bryke C, Rice G, Artzer A, Schilz C, Israel J, et al. Clinical and molecular characterization of overlapping interstitial Xp21-p22 duplications in two unrelated individuals. *Am. J. Med. Genet. A.* 2010 Apr;152A(4):904–15.
  35. Piton A, Michaud JL, Peng H, Aradhya S, Gauthier J, Mottron L, et al. Mutations in the calcium-related gene *IL1RAPL1* are associated with autism. *Hum. Mol. Genet.* 2008 Dec 15;17(24):3965–74.
  36. Carrié A, Jun L, Bienvenu T, Vinet MC, McDonnell N, Couvert P, et al. A new member of the IL-1 receptor family highly expressed in hippocampus and involved in X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 1999 Sep;23(1):25–31.
  37. Gambino F, Pavlowsky A, Béglé A, Dupont J-L, Bahi N, Courjaret R, et al. IL1-receptor accessory protein-like 1 (*IL1RAPL1*), a protein involved in cognitive functions, regulates N-type Ca<sup>2+</sup>-channel and neurite elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007 May 22;104(21):9063–8.

38. Nawara M, Klapecki J, Borg K, Jurek M, Moreno S, Tryfon J, et al. Novel mutation of IL1RAPL1 gene in a nonspecific X-linked mental retardation (MRX) family. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008 Dec 15;146A(24):3167–72.
39. Franek KJ, Butler J, Johnson J, Simensen R, Friez MJ, Bartel F, et al. Deletion of the immunoglobulin domain of IL1RAPL1 results in nonsyndromic X-linked intellectual disability associated with behavioral problems and mild dysmorphism. *Am. J. Med. Genet. A.* 2011 May;155A(5):1109–14.
40. Froyen G, Van Esch H, Bauters M, Hollanders K, Frints SGM, Vermeesch JR, et al. Detection of genomic copy number changes in patients with idiopathic mental retardation by high-resolution X-array-CGH: important role for increased gene dosage of XLMR genes. *Hum. Mutat.* 2007 Oct;28(10):1034–42.
41. Emi N, Kitaori K, Seto M, Ueda R, Saito H, Takahashi T. Isolation of a novel cDNA clone showing marked similarity to ME491/CD63 superfamily. *Immunogenetics.* 1993 Jan;37(3):193–8.
42. Zemni R, Bienvenu T, Vinet MC, Sefiani A, Carrié A, Billuart P, et al. A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat. Genet.* 2000 Feb;24(2):167–70.
43. Maranduba CM da C, Sá Moreira E, Müller Orabona G, Pavanello RC, Vianna-Morgante AM, Passos-Bueno MR. Does the P172H mutation at the TM4SF2 gene cause X-linked mental retardation? *Am. J. Med. Genet. A.* 2004 Feb 1;124A(4):413–5.
44. Utine GE, Kiper PÖ, Alanay Y, Haliloğlu G, Aktaş D, Boduroğlu K, et al. Searching for Copy Number Changes in Nonsyndromic X-Linked Intellectual Disability. *Mol. Syndromol.* 2011;06100:64–71.
45. Iwamoto K, Huang Y, Ueda S. Genomic organization and alternative transcripts of the human PQBP-1 gene. *Gene.* 2000 Dec 23;259(1-2):69–73.
46. Kalscheuer VM, Freude K, Musante L, Jensen LR, Yntema HG, Gécz J, et al. Mutations in the polyglutamine binding protein 1 gene cause X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 2003 Dec;35(4):313–5.
47. Flynn M, Zou YS, Milunsky A. Whole gene duplication of the PQBP1 gene in syndrome resembling Renpenning. *Am. J. Med. Genet. A.* 2011 Jan;155A(1):141–4.
48. Bonnet C, Grégoire MJ, Brochet K, Raffo E, Leheup B, Jonveaux P. Pure de novo 5 Mb duplication at Xp11.22-p11.23 in a male: phenotypic and molecular characterization. *J. Hum. Genet.* 2006 Jan;51(9):815–21.
49. Froyen G, Belet S, Martinez F, Santos-Rebouças CB, Declercq M, Verbeeck J, et al. Copy-number gains of HUWE1 due to replication- and recombination-based rearrangements. *Am. J. Hum. Genet.* 2012 Aug 10;91(2):252–64.

50. Turner G, Gedeon A, Mulley J. X-linked mental retardation with heterozygous expression and macrocephaly: pericentromeric gene localization. *Am. J. Med. Genet.* 1994 Jul 15;51(4):575–80.
51. Nava C, Lamari F, Héron D, Mignot C, Rastetter A, Keren B, et al. Analysis of the chromosome X exome in patients with autism spectrum disorders identified novel candidate genes, including TMLHE. *Transl. Psychiatry.* 2012 Jan;2:e179.
52. Billuart P, Bienvenu T, Ronce N, des Portes V, Vinet MC, Zemni R, et al. Oligophrenin-1 encodes a rhoGAP protein involved in X-linked mental retardation. *Nature.* 1998 Apr 30;392(6679):923–6.
53. Khelifaoui M, Denis C, van Galen E, de Bock F, Schmitt A, Houbbron C, et al. Loss of X-linked mental retardation gene oligophrenin1 in mice impairs spatial memory and leads to ventricular enlargement and dendritic spine immaturity. *J. Neurosci.* 2007 Aug 29;27(35):9439–50.
54. Zanni G, Saillour Y, Nagara M, Billuart P, Castelnau L, Moraine C, et al. Oligophrenin 1 mutations frequently cause X-linked mental retardation with cerebellar hypoplasia. *Neurology.* 2005 Nov 8;65(9):1364–9.
55. Madrigal I, Rodríguez-Revenga L, Badenas C, Sánchez A, Milà M. Deletion of the OPHN1 gene detected by aCGH. *J. Intellect. Disabil. Res.* 2008 Mar;52(Pt 3):190–4.
56. Santos-Rebouças CB, Belet S, Guedes de Almeida L, Ribeiro MG, Medina-Acosta E, Bahia PRV, et al. A novel in-frame deletion affecting the BAR domain of OPHN1 in a family with intellectual disability and hippocampal alterations. *Eur. J. Hum. Genet.* 2013 Oct 9;
57. Kaya N, Colak D, Albakheet A, Al-Owain M, Abu-Dheim N, Al-Younes B, et al. A novel X-linked disorder with developmental delay and autistic features. *Ann. Neurol.* 2012 Apr;71(4):498–508.
58. Bedeschi MF, Novelli A, Bernardini L, Parazzini C, Bianchi V, Torres B, et al. Association of syndromic mental retardation with an Xq12q13.1 duplication encompassing the oligophrenin 1 gene. *Am. J. Med. Genet. A.* 2008 Jul 1;146A(13):1718–24.
59. Watkins PA, Maignel D, Jia Z, Pevsner J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. *J. Lipid Res.* 2007 Dec;48(12):2736–50.
60. Cao Y, Traer E, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Cloning, expression, and chromosomal localization of human long-chain fatty acid-CoA ligase 4 (FACL4). *Genomics.* 1998 Apr 15;49(2):327–30.

61. Meloni I, Muscettola M, Raynaud M, Longo I, Bruttini M, Moizard M-P, et al. *FACL4*, encoding fatty acid-CoA ligase 4, is mutated in nonspecific X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 2002 Apr;30(4):436–40.
62. Raynaud M, Moizard MP, Dessay B, Briault S, Toutain A, Gendrot C, et al. Systematic analysis of X-inactivation in 19XLMR families: extremely skewed profiles in carriers in three families. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000 Apr;8(4):253–8.
63. Piccini M, Vitelli F, Bruttini M, Pober BR, Jonsson JJ, Villanova M, et al. *FACL4*, a new gene encoding long-chain acyl-CoA synthetase 4, is deleted in a family with Alport syndrome, elliptocytosis, and mental retardation. *Genomics.* 1998 Feb 1;47(3):350–8.
64. Gazou A, Riess A, Grasshoff U, Schäferhoff K, Bonin M, Jauch A, et al. Xq22.3-q23 deletion including *ACSL4* in a patient with intellectual disability. *Am. J. Med. Genet. A.* 2013 Apr;161A(4):860–4.
65. Eswaran J, Soundararajan M, Kumar R, Knapp S. UnPAKING the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem. Sci.* 2008 Aug;33(8):394–403.
66. Bienvenu T, des Portes V, McDonnell N, Carrié A, Zemni R, Couvert P, et al. Missense mutation in *PAK3*, R67C, causes X-linked nonspecific mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* 2000 Aug 14;93(4):294–8.
67. Rejeb I, Saillour Y, Castelnau L, Julien C, Bienvenu T, Taga P, et al. A novel splice mutation in *PAK3* gene underlying mental retardation with neuropsychiatric features. *Eur. J. Hum. Genet.* 2008 Nov;16(11):1358–63.
68. Peippo M, Koivisto AM, Särkämö T, Sipponen M, von Koskull H, Ylisaukko-oja T, et al. *PAK3* related mental disability: further characterization of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* 2007 Oct 15;143A(20):2406–16.
69. Hoischen A, Landwehr C, Kabisch S, Ding X-Q, Trost D, Stropahl G, et al. Array-CGH in unclear syndromic nephropathies identifies a microdeletion in Xq22.3-q23. *Pediatr. Nephrol.* 2009 Sep;24(9):1673–81.
70. Des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrié A, et al. A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. *Cell.* 1998 Jan 9;92(1):51–61.
71. Des Portes V, Pinard JM, Smadja D, Motte J, Boespflug-Tanguy O, Moutard ML, et al. Dominant X linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome (*XSCLH/LIS*): evidence for the occurrence of mutation in males and mapping of a potential locus in Xq22. *J. Med. Genet.* 1997 Mar;34(3):177–83.
72. Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, et al. *Doublecortin*, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly

- and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell*. 1998 Jan 9;92(1):63–72.
73. Haverfield E V, Whited AJ, Petras KS, Dobyns WB, Das S. Intragenic deletions and duplications of the LIS1 and DCX genes: a major disease-causing mechanism in lissencephaly and subcortical band heterotopia. *Eur. J. Hum. Genet.* 2009 Jul;17(7):911–8.
  74. Quélin C, Saillour Y, Souville I, Poirier K, N'guyen-Morel MA, Vercueil L, et al. Mosaic DCX deletion causes subcortical band heterotopia in males. *Neurogenetics*. 2012 Nov;13(4):367–73.
  75. Vervoort VS, Beachem MA, Edwards PS, Ladd S, Miller KE, de Mollerat X, et al. AGTR2 mutations in X-linked mental retardation. *Science*. 2002 Jun 28;296(5577):2401–3.
  76. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996 Jan 9;93(1):156–60.
  77. Piton A, Redin C, Mandel J-L. XLID-Causing Mutations and Associated Genes Challenged in Light of Data From Large-Scale Human Exome Sequencing. *Am. J. Hum. Genet.* [Internet]. 2013 Aug [cited 2014 Jan 21];93(2):406. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000292971300339X>
  78. Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, et al. Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat. Genet.* 2000 Oct;26(2):247–50.
  79. Madrigal I, Fernández-Burriel M, Rodríguez-Revenga L, Cabrera JC, Martí M, Mur A, et al. Xq26.2-q26.3 microduplication in two brothers with intellectual disabilities: clinical and molecular characterization. *J. Hum. Genet.* 2010 Dec;55(12):822–6.
  80. Snow K, Doud LK, Hagerman R, Pergolizzi RG, Erster SH, Thibodeau SN. Analysis of a CGG sequence at the FMR-1 locus in fragile X families and in the general population. *Am. J. Hum. Genet.* 1993 Dec;53(6):1217–28.
  81. Ceman S, Brown V, Warren ST. Isolation of an FMRP-associated messenger ribonucleoprotein particle and identification of nucleolin and the fragile X-related proteins as components of the complex. *Mol. Cell. Biol.* 1999 Dec;19(12):7925–32.
  82. Weiler IJ, Greenough WT. Synaptic synthesis of the Fragile X protein: possible involvement in synapse maturation and elimination. *Am. J. Med. Genet.* 1999 Apr 2;83(4):248–52.

83. Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, Pieretti M, Sutcliffe JS, Richards S, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell*. 1991 Dec 20;67(6):1047–58.
84. Sutcliffe JS, Nelson DL, Zhang F, Pieretti M, Caskey CT, Saxe D, et al. DNA methylation represses FMR-1 transcription in fragile X syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1992 Sep;1(6):397–400.
85. Coffee B, Zhang F, Warren ST, Reines D. Acetylated histones are associated with FMR1 in normal but not fragile X-syndrome cells. *Nat. Genet.* 1999 May;22(1):98–101.
86. Verkerk AJ, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu YH, Kuhl DP, Pizzuti A, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell*. 1991 May 31;65(5):905–14.
87. Oberlé I, Rousseau F, Heitz D, Kretz C, Devys D, Hanauer A, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science*. 1991 May 24;252(5009):1097–102.
88. McConkie-Rosell A, Finucane B, Cronister A, Abrams L, Bennett RL, Pettersen BJ. Genetic counseling for fragile x syndrome: updated recommendations of the national society of genetic counselors. *J. Genet. Couns.* 2005 Aug;14(4):249–70.
89. Nolin SL, Brown WT, Glicksman A, Houck GE, Gargano AD, Sullivan A, et al. Expansion of the fragile X CGG repeat in females with premutation or intermediate alleles. *Am. J. Hum. Genet.* 2003 Feb;72(2):454–64.
90. Crawford DC, Schwartz CE, Meadows KL, Newman JL, Taft LF, Gunter C, et al. Survey of the fragile X syndrome CGG repeat and the short-tandem-repeat and single-nucleotide-polymorphism haplotypes in an African American population. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 Feb;66(2):480–93.
91. Fernandez-Carvajal I, Lopez Posadas B, Pan R, Raske C, Hagerman PJ, Tassone F. Expansion of an FMR1 grey-zone allele to a full mutation in two generations. *J. Mol. Diagn.* 2009 Jul;11(4):306–10.
92. Nagamani SCS, Erez A, Probst FJ, Bader P, Evans P, Baker LA, et al. Small genomic rearrangements involving FMR1 support the importance of its gene dosage for normal neurocognitive function. *Neurogenetics*. 2012 Nov;13(4):333–9.
93. Rio M, Malan V, Boissel S, Toutain A, Royer G, Gobin S, et al. Familial interstitial Xq27.3q28 duplication encompassing the FMR1 gene but not the MECP2 gene causes a new syndromic mental retardation condition. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010 Mar;18(3):285–90.

94. Gécz J, Oostra BA, Hockey A, Carbonell P, Turner G, Haan EA, et al. FMR2 expression in families with FRAXE mental retardation. *Hum. Mol. Genet.* 1997 Mar;6(3):435–41.
95. Gecz J, Bielby S, Sutherland GR, Mulley JC. Gene structure and subcellular localization of FMR2, a member of a new family of putative transcription activators. *Genomics.* 1997 Sep 1;44(2):201–13.
96. Korneyev AY. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in memory-related effects of anxiolytics. *Neurobiol. Learn. Mem.* 1997 Jan;67(1):1–13.
97. Chakrabarti L, Knight SJ, Flannery A V, Davies KE. A candidate gene for mild mental handicap at the FRAXE fragile site. *Hum. Mol. Genet.* 1996 Feb;5(2):275–82.
98. Knight SJ, Flannery A V, Hirst MC, Campbell L, Christodoulou Z, Phelps SR, et al. Trinucleotide repeat amplification and hypermethylation of a CpG island in FRAXE mental retardation. *Cell.* 1993 Jul 16;74(1):127–34.
99. Brown WT. The FRAXE Syndrome: is it time for routine screening? *Am. J. Hum. Genet.* 1996 May;58(5):903–5.
100. Bensaid M, Melko M, Bechara EG, Davidovic L, Berretta A, Catania MV, et al. FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure. *Nucleic Acids Res.* 2009 Mar;37(4):1269–79.
101. Honda S, Hayashi S, Kato M, Niida Y, Hayasaka K, Okuyama T, et al. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene. *Am. J. Med. Genet. A.* 2007 Apr 1;143(7):687–93.
102. Stettner GM, Shoukier M, Höger C, Brockmann K, Auber B. Familial intellectual disability and autistic behavior caused by a small FMR2 gene deletion. *Am. J. Med. Genet. A.* 2011 Aug;155A(8):2003–7.
103. Mondal K, Ramachandran D, Patel VC, Hagen KR, Bose P, Cutler DJ, et al. Excess variants in AFF2 detected by massively parallel sequencing of males with autism spectrum disorder. *Hum. Mol. Genet.* 2012 Oct 1;21(19):4356–64.
104. Whibley AC, Plagnol V, Tarpey PS, Abidi F, Fullston T, Choma MK, et al. Fine-scale survey of X chromosome copy number variants and indels underlying intellectual disability. *Am. J. Hum. Genet. The American Society of Human Genetics;* 2010 Aug 13;87(2):173–88.
105. Sandoval N, Bauer D, Brenner V, Coy JF, Drescher B, Kioschis P, et al. The genomic organization of a human creatine transporter (CRTR) gene located in Xq28. *Genomics.* 1996 Jul 15;35(2):383–5.



106. Gregor P, Nash SR, Caron MG, Seldin MF, Warren ST. Assignment of the creatine transporter gene (SLC6A8) to human chromosome Xq28 telomeric to G6PD. *Genomics*. 1995 Jan 1;25(1):332–3.
107. Van de Kamp JM, Mancini GMS, Pouwels PJW, Betsalel OT, van Dooren SJM, de Koning I, et al. Clinical features and X-inactivation in females heterozygous for creatine transporter defect. *Clin. Genet*. 2011 Mar;79(3):264–72.
108. Van de Kamp JM, Betsalel OT, Mercimek-Mahmutoglu S, Abulhoul L, Grünwald S, Anselm I, et al. Phenotype and genotype in 101 males with X-linked creatine transporter deficiency. *J. Med. Genet*. 2013 Jul;50(7):463–72.
109. Yu H, van Karnebeek C, Sinclair G, Hill A, Cui H, Zhang VW, et al. Detection of a novel intragenic rearrangement in the creatine transporter gene by next generation sequencing. *Mol. Genet. Metab*. 2013 Dec;110(4):465–71.
110. Osaka H, Takagi A, Tsuyusaki Y, Wada T, Iai M, Yamashita S, et al. Contiguous deletion of SLC6A8 and BAP31 in a patient with severe dystonia and sensorineural deafness. *Mol. Genet. Metab*. 2012 May;106(1):43–7.
111. Bächner D, Sedlacek Z, Korn B, Hameister H, Poustka A. Expression patterns of two human genes coding for different rab GDP-dissociation inhibitors (GDIs), extremely conserved proteins involved in cellular transport. *Hum. Mol. Genet*. 1995 Apr;4(4):701–8.
112. Sedlacek Z, Konecki DS, Korn B, Klauck SM, Poustka A. Evolutionary conservation and genomic organization of XAP-4, an Xq28 located gene coding for a human rab GDP-dissociation inhibitor (GDI). *Mamm. Genome*. 1994 Oct;5(10):633–9.
113. Strobl-Wildemann G, Kalscheuer VM, Hu H, Wrogemann K, Ropers H-H, Tzschach A. Novel GDI1 mutation in a large family with nonsyndromic X-linked intellectual disability. *Am. J. Med. Genet. A*. 2011 Dec;155A(12):3067–70.
114. Vandewalle J, Van Esch H, Govaerts K, Verbeeck J, Zweier C, Madrigal I, et al. Dosage-dependent severity of the phenotype in patients with mental retardation due to a recurrent copy-number gain at Xq28 mediated by an unusual recombination. *Am. J. Hum. Genet*. 2009 Dec;85(6):809–22.
115. 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*. 1992 Dec;51(6):1229–39.
116. 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*. 2008 May;45(5):309–13.

117. Archer HL, Whatley SD, Evans JC, Ravine D, Huppke P, Kerr A, et al. Gross rearrangements of the MECP2 gene are found in both classical and atypical Rett syndrome patients. *J. Med. Genet.* 2006 May;43(5):451–6.
118. Bensaïd M, Melko M, Bechara EG, Davidovic L, Berretta A, Catania MV, et al. FRAXE-associated mental retardation protein (FMR2) is an RNA-binding protein with high affinity for G-quartet RNA forming structure. *Nucleic Acids Res.* 2009 Mar;37(4):1269–79.
119. Sahoo T, Theisen A, Marble M, Tervo R, Rosenfeld J a, Torchia BS, et al. Microdeletion of Xq28 involving the AFF2 (FMR2) gene in two unrelated males with developmental delay. *Am. J. Med. Genet. A.* 2011 Dec;155A(12):3110–5.
120. Gecz J, Gedeon AK, Sutherland GR, Mulley JC. Identification of the gene FMR2, associated with FRAXE mental retardation. *Nat. Genet.* 1996 May;13(1):105–8.

## RECURSOS DE INTERNET

*Affymetrix* - [www.affymetrix.com](http://www.affymetrix.com)

*Ambrygen* - [www.ambrygen.com/genes](http://www.ambrygen.com/genes)

*Ensembl* - [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

*GeneCards* - <http://www.genecards.org/>

*UCSC Genome* - <http://genome.ucsc.edu/>

*NCBI* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

*NCBI – OMIM* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>

*Puregene* - [www.puregene.com](http://www.puregene.com)

**ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

**Termo de consentimento livre e esclarecido**

A pesquisa intitulada “Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico” pretende investigar a relação entre as alterações cromossômicas e o quadro clínico dos portadores.

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto acima citado. O presente convite contém informações sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de grande importância. Para a realização da pesquisa será necessária a retirada de 4 a 8 mL de sangue de uma das veias do antebraço do paciente e seus genitores para exame feito rotineiramente no laboratório. Este procedimento de coleta de sangue será realizado por pessoa qualificada, é de risco mínimo para a saúde podendo, entretanto, provocar pequeno desconforto. Resultando o teste positivo, será garantido um relatório explicativo sobre esta condição.

A Professora Doutora Íris Ferrari é a pesquisadora responsável pelos procedimentos envolvidos, bem como da utilização dos dados produzidos durante a realização desta pesquisa. A identidade do paciente será mantida em segredo absoluto no caso de qualquer forma de divulgação desta pesquisa.

A recusa em participar da presente pesquisa não resultará em qualquer prejuízo presente ou futuro na prestação de assistência profissional pela equipe do Serviço de Genética Clínica do HUB, ficando também ressaltado que, mesmo após a assinatura do presente termo de consentimento, poderá abandonar a pesquisa a qualquer momento.

Os exames e coleta de sangue para análise só serão realizados se houver concordância em participar deste estudo. Para tal, pedimos gentilmente que o paciente ou seu responsável assine o presente documento que será entregue em duas vias, uma para o paciente e outra que será mantida no Laboratório de Genética Clínica da Faculdade de Medicina - UNB. Participando desta pesquisa, estará ajudando no diagnóstico, aconselhamento genético e melhor entendimento das causas do retardo mental.

Eu, \_\_\_\_\_, profissão  
 \_\_\_\_\_ residente e domiciliado  
 em \_\_\_\_\_, portador da Cédula de Identidade,  
 RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF/MF \_\_\_\_\_ nascido(a) em  
 \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade com a participação de meu  
 (minha) filho(a) \_\_\_\_\_ no estudo “Investigação  
 da etiologia do retardo mental síndrômico”, e afirmo que obtive todas as informações que considero  
 necessárias.

Caso tenham sido tiradas fotografias:

- ( ) Concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário.
- ( ) Concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde.
- ( ) Não concordo que sejam incluídas em qualquer tipo de publicação ou apresentação.

Brasília, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

---

Assinatura do participante

---

Dra. Íris Ferrari

Pesquisadora responsável

Telefone para contato: (61) 3307 2505

## **ANEXO B – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

---

### ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

**Registro de Projeto:** CEP-FM 081/2009.

**Título:** "Investigação da etiologia do retardo mental síndrômico".

**Pesquisador Responsável:** Iris Ferrari.

**Documentos analisados:** Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

**Data de entrega:** 13/10/2009.

Proposição do (a) relato (a)

**Aprovação**

**Não aprovação.**

**Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB:** 28/10/2009.

**Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB:** 25/11/2009.

---

### PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR** "ad referendum", conforme parecer do (a) relator (a) o projeto de pesquisa acima especificado, quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 26 de Novembro de 2009.

  
Prof. Elaine Maria de Oliveira Alves  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Faculdade de Medicina-UnB